



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA



"Importancia de los genes *RAD51* y *RAD52* en el potencial patogénico de *Candida tropicalis*"

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)

CON OPCIÓN EN: BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MICROBIANA

P R E S E N T A

QFB. TERESA DE JESÚS MEZA DÁVALOS

ASESOR DE TESIS:

M.C. Alejandra Paula Espinosa Taxis



Puebla, Pue. a 30 de noviembre 2016.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
PRESENTE.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría de la alumna **Teresa de Jesús Meza Dávalos**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

"Importancia de los genes RAD51 y RAD52 en el potencial patogénico de *Candida tropicalis*"

A nuestro juicio, la alumna Teresa de Jesús Meza Dávalos puede proceder a la impresión de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.
"Pensar Bien Para Vivir Mejor"



D.C. Candelario Vázquez Cruz



D.C. Patricia Sánchez Alonso



D.C. Germán Larriba Calle



D.C. Teresita Spezzia Mazzoco

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Micología Médica perteneciente al Instituto de Ciencias Microbiológicas de la BUAP (CICM-ICUAP), bajo la dirección de M.C: Alejandra Paula Espinosa Taxis y la asesoría de Dra. Patricia Sánchez Alonso y el Dr. German Larriba Calle, además de la ayuda de la MVTZ Zurisadai González González. Durante la realización del trabajo me fue concedida una beca por el Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente a todas las personas que de alguna u otra forma han colaborado con la realización de este trabajo.

En primer lugar, agradezco a mi Director de tesis la M.C. Alejandra Espinosa por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio e impulsarme a ser mejor cada día, a mi asesor la Dra. Patricia Sánchez por enseñarme el valor de la excelencia y por abrirme las puertas de su laboratorio. Agradezco a la M.C Estela Anastasio por enseñarme el valor del compromiso hacia el trabajo y por tener siempre una palabra de aliento, al Dr. Germán Larriba por sus sabios consejos y sugerencias, brindado en base a su experiencia, fundamental para la realización de este trabajo.

Agradezco al coordinador del posgrado Dr. Luis Ernesto Fuentes por la atención y consejos brindados, a la secretaria Ángeles por su trato amable y por siempre estar al servicio de los alumnos. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada.

Agradezco al Dr. Carlos Escamilla Weinmann director del bioterio “Claude Bernard”, por permitirme utilizar las instalaciones y el equipo del bioterio, así como la accesibilidad en la asignación de animales. Agradezco al MVZ Francisco Ramos por responder mis dudas sobre la manipulación de los ratones.

Asimismo, agradezco a mis compañeros del posgrado, principalmente a mi compañera Zurisadai González del laboratorio de Micología Médica y a todos mis compañeros del laboratorio de Microbiología Molecular y Celular, por su cariño, amistad y el apoyo brindado a lo largo de estos dos años, estímulo necesario para que este trabajo fuera posible.

Finalmente agradezco a mi familia por el apoyo incondicional en todas mis decisiones y por el gran amor que me han brindado a lo largo de mi vida.

Gracias.

RESUMEN

“Importancia de los genes *RAD51* y *RAD52* en el potencial patogénico de *Candida tropicalis*”

Candida tropicalis comparte muchas características con *C. albicans*. El éxito de este género para causar candidosis se basa en gran medida en su capacidad para adaptarse a distintos nichos en el hospedero. La adaptación ocurre en parte, a través de cambios genéticos, incluyendo mutaciones puntuales y extensos reordenamientos del genoma que dan lugar a nuevas combinaciones de alelos, pérdida de heterocigosidad (LOH) y aneuploidias. Los procesos que conducen a LOH ocurren por recombinación homóloga (HR) que utiliza secuencias homólogas para reparar el daño al ADN. La reparación por HR está libre de errores, requiere de un subconjunto de genes del grupo epistásico *RAD52*, importante para el mantenimiento de la estabilidad del genoma. Este trabajo tuvo por objetivo determinar la capacidad patogénica en modelo de infección murino de la cepa CAF2-1 de *C. albicans* y la cepa MYA3404 de *C. tropicalis*, así como los mutantes *CtRAD51-ΔΔ* y *CtRAD52-ΔΔ* que son defectivos en mecanismos de HR. Se determinó el porcentaje de supervivencia de ratones BALB/c inoculados vía intravenosa (I.V.) con diferentes suspensiones de células, así como la colonización y el daño provocado al riñón a diferentes tiempos post-infección. Se encontró que la cepa CAF2-1 presentó una virulencia similar a la cepa MYA3404, sin embargo, el desarrollo de la infección y la asociación a riñón por *C. albicans* fue mayor que por *C. tropicalis*. La delección del gen *CtRAD51* no afectó la capacidad de colonización en riñón pero si disminuyó la virulencia de la cepa, mientras que la delección del gen *CtRAD52* afectó de manera considerable ambas capacidades, además que el mutante presentó un considerable mayor tiempo de generación. Nuestros resultados sugieren que en el modelo experimental murino los mecanismos de adaptación de los mutantes *CtRAD51-ΔΔ* y *CtRAD52-ΔΔ*, podrían verse comprometidos por los defectos en los procesos de HR como DSBR, SDSA ó BIR.

ÍNDICE

| | Página |
|---|--------|
| AGRADECIMIENTOS | iv |
| RESUMEN | v |
| ÍNDICE | vi |
| LISTA DE FIGURAS | viii |
| LISTA DE TABLAS..... | x |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| I.1. Micosis oportunistas..... | 1 |
| I.1.1. Candidosis/candidemias | 1 |
| I.1.2. Modelos de infección experimentales | 2 |
| I.2. Descripción del género <i>Candida</i> | 3 |
| I.2.1 <i>Candida tropicalis</i> y <i>Candida albicans</i> | 4 |
| I.3. Mecanismos de adaptación generados por la regulación de la | 5 |
| expresión génica..... | 5 |
| I.3.1 Mecanismos de adaptación generados por cambios genéticos | 8 |
| I.3.2 Pérdida de heterocigosidad..... | 9 |
| I.4. Mecanismos de recombinación mitótica..... | 10 |
| I.4.1 Recombinación homóloga..... | 11 |
| I.4.2 <i>RAD51</i> y <i>RAD52</i> | 12 |
| II. ANTECEDENTES | 14 |
| III. JUSTIFICACIÓN | 15 |
| IV. HIPÓTESIS | 16 |
| V. OBJETIVOS | 17 |
| VI. METODOLOGÍA..... | 18 |
| VI.1 Cepas y condiciones de cultivo | 18 |
| VI.1.1 Medios de cultivo | 18 |
| VI.2 Obtención de la suspensión de células para el inóculo | 19 |
| VI.2.1 Curva de crecimiento | 19 |
| VI.2.2 Preparación del inóculo..... | 19 |
| VI.2.3 Cuantificación de la viabilidad | 20 |
| VI.3 Análisis de infección en modelo murino vía I.V. | 20 |
| VI.3.1 Material biológico | 20 |
| VI.3.2 Determinación de la dosis media efectiva (LD50) | 20 |

| | | |
|----------|--|----|
| VI.3.2.1 | Método Reed Muench..... | 21 |
| VI.3.2.2 | Método Spearman Karber..... | 22 |
| VI.3.2.3 | Método Probit..... | 22 |
| VI.3.3 | Análisis de supervivencia..... | 23 |
| VI.3.4 | Análisis de colonización a riñón..... | 23 |
| VI.3.4.1 | Tinción PAS..... | 24 |
| VI.4 | Identificación de los cultivos recuperados del riñón..... | 25 |
| VI.4.1 | Análisis micro y macroscópico..... | 25 |
| VI.4.2 | CHROMagar Candida..... | 25 |
| VI.4.3 | Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)..... | 25 |
| VI.5 | Análisis estadístico..... | 27 |
| VII | RESULTADOS..... | 28 |
| VII.1 | Obtención del inóculo..... | 28 |
| VII.1.1 | Capacidad de crecimiento en medio YPD líquido..... | 28 |
| VII.2. | Viabilidad del inóculo..... | 29 |
| VII.3. | Virulencia en modelo murino..... | 30 |
| VII.3.1 | Determinación de LD ₅₀ y porcentaje de supervivencia..... | 30 |
| VII.3.2 | Identificación de las cepas recuperadas del riñón..... | 33 |
| VII.4 | Capacidad de colonización a riñón con la dosis 1x10 ⁶ | 33 |
| VII.4.1 | Mortalidad y progresión de la infección..... | 33 |
| VII.4.2 | Determinación de las cargas fúngicas renales..... | 35 |
| VII.4.3 | Histopatología del riñón..... | 36 |
| VII.5 | Identificación de las cepas recuperadas del riñón..... | 38 |
| VIII | DISCUSIÓN..... | 41 |
| IX. | CONCLUSIÓN..... | 45 |
| X | REFERENCIAS..... | 46 |
| | ABREVIATURAS..... | 54 |
| | ANEXO 1..... | 56 |
| | ANEXO 2..... | 59 |

LISTA DE FIGURAS

Página

| | |
|--|----|
| Figura 1 Daño provocado a riñón por <i>C. albicans</i>. (A) Fotografía del riñón de conejo 4 días después de ser inoculado vía I.V. con <i>C. albicans</i> . (B) Fotografía post-mortem del riñón de un paciente con candidiasis diseminada..... | 2 |
| Figura 2 Filogenia de las especies del clado de <i>Candida</i> y <i>Saccharomyces</i>..... | 3 |
| Figura 3 Diferenciación colonial de las especies de <i>Candida</i>. En medio CHROMagar <i>Candida</i> suplementado con agar de Pal a las 48 h a 37 °C | 4 |
| Figura 4 Dimorfismo de hongos patógenos de humanos. Imágenes de <i>C. albicans</i> visualizada por microscopia de contraste por interferencia diferencial (bar 10 µm)..... | 6 |
| Figura 5 Representación de los perfiles de adhesión de <i>Candida spp.</i> Las especies con un alto porcentaje de adhesión a microesferas son <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. tropicalis</i> y <i>C. parapsilosis</i> | 7 |
| Figura 6 Formación de biopelícula en un catéter de PVC. A) y B) Micrografía electrónica de barrido de la formación de biopelícula por <i>C. tropicalis</i> , las flechas indican el material de la matriz (barras 10 µm y 2 µm)..... | 7 |
| Figura 7 Switching fenotípico en <i>C. tropicalis</i>. A) Colonia blanca brillante (W) con un pequeño sector que ha cambiado a opaco (O), B) micrografía electrónica de barrido de una célula blanca (redonda y lisa) y C) una célula opaca (alargada y con gránulos) | 8 |
| Figura 8 Reparación de la rotura de la doble cadena por recombinación homóloga en células en fase G2. La rotura de la cadena puede inducir eventos de LOH..... | 9 |
| Figura 9 Esquema de las vías de reparación de la rotura de la doble cadena de ADN. A) Mecanismo de recombinación homóloga. B) Mecanismo de recombinación ilegítima | 11 |
| Figura 10 Diagrama esquemático de los genes <i>RAD51</i> y <i>RAD52</i> de <i>S. cerevisiae</i>. Comparación de los dominios funcionales de las proteínas pRad51 y pRad52 | 12 |
| Figura 11 Curva de velocidad de crecimiento de las especies de <i>Candida</i>. A) Relación del Log UFC en medio YPD respecto al tiempo de incubación (min). B) Relación de la D.O. a 600 nm respecto al tiempo de incubación (min). | 29 |

| | |
|---|----|
| Figura 12 Regresión lineal para la determinación de la viabilidad del inóculo. Se presenta el coeficiente de determinación y la ecuación de la línea recta para cada cepa..... | 30 |
| Figura 13 Curva de supervivencia de las especies de <i>Candida</i> a diferentes dosis. A) Probabilidad de supervivencia respecto al tiempo post-infección (días) de la cepa CAF2-1 B) El mutante <i>Ctrad51-ΔΔ</i> C) El mutante <i>Ctrad52-ΔΔ</i> | 32 |
| Figura14 Identificación de las cepas recuperadas del riñón mediante la diferenciación colonial en medio CHROMagar <i>Candida</i> y la diferenciación celular A) Cepa de <i>C. albicans</i> CAF2-1 B) mutante <i>Ctrad51-ΔΔ</i> (Barra 10 μm) | 33 |
| Figura15 Curva de supervivencia de los ratones infectados con la dosis 1x10⁶ células. Diferencias en la probabilidad de supervivencia respecto al tiempo de infección (días) para cada cepa | 34 |
| Figura16 Capacidad de colonización a riñón de las especies de <i>Candida</i>. Los datos mostrados corresponden al Log UFC por g de riñón respecto al tiempo post-infección (24, 48 y 72 h) para cada cepa | 35 |
| Figura17 Patología del riñón de los ratones infectados con la dosis 1x10⁶ células. Daño provocado al riñón por las cepas de <i>Candida</i> respecto al tiempo post-infección (24, 48 y 72 h). | 36 |
| Figura18 Histopatología del riñón de ratones infectados con la dosis 1x10⁶ células. Presencia en riñón de las diferentes cepas de <i>Candida</i> respecto al tiempo pos-infección (24, 48 y 72 h). Las secciones se tiñeron con PAS. | 37 |
| Figura19 Morfología colonial y celular de las cepas recuperadas del riñón de ratones infectados con <i>Candida</i>. Morfología colonial en medio YPD a las 24-72 h a 30 °C. Morfología celular en medio líquido YPD con colorante verde claro a las 24 h a 30 °C | 38 |
| Figura20 Identificación de las cepas aisladas del riñón con la dosis 1x10⁶. A) PCR especie específica de las cepas recuperadas del riñón. MW de 100 pb (línea 1 y 6) controles negativos (línea 4 y 5). B) Diferenciación colonial en medio CHROMagar <i>Candida</i> de las especies inoculadas (2, 7, 9, 11) y las especies recuperadas (3, 8, 10, 12) del riñón. | 39 |

LISTA DE TABLAS

| | Página |
|--|--------|
| Tabla 1 Descripción de las cepas de <i>C. tropicalis</i> y <i>C. albicans</i> | 18 |
| Tabla 2 Descripción de los medios de cultivo | 18 |
| Tabla 3 Diferenciación colonial de las especies de <i>Candida</i> en el medio BBL CHROMagar Candida | 25 |
| Tabla 4 Oligonucleótidos utilizados para la identificación de las especies de <i>Candida</i> | 26 |
| Tabla 5 Determinación del Log LD ₅₀ de las especies de <i>Candida</i> | 31 |
| Tabla 6 Porcentaje de mortalidad de las especies de <i>Candida</i> | 31 |

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Micosis oportunistas

Desde principios de la década de los 80s, los hongos se han convertido en una de las principales causas de enfermedades en humanos, especialmente, en pacientes inmunosuprimidos y hospitalizados. La mayoría de estas micosis oportunistas, se asocian con las especies del género *Candida spp*, *Aspergillus spp* y *Criptococcus spp*. Las micosis oportunistas se relacionan con infecciones superficiales afectando piel, uñas y membranas mucosas, o sistémicas, si el agente se disemina a través del flujo sanguíneo y afecta a los órganos internos, lo que se traduce en alta morbilidad y mortalidad. Numerosos factores han contribuido al aumento en la incidencia de estas infecciones causadas por hongos, incluyendo el uso generalizado de diversas prácticas médicas como terapias inmunosupresoras, procedimientos quirúrgicos invasivos y el uso de antibióticos de amplio espectro (Devrim *et al.* 2015; Pfaller & Diekema 2007; Silva *et al.* 2012).

I.1.1. Candidosis/candidemias

La candidosis es una micosis oportunista causada por las especies del género *Candida* que constituyen la cuarta causa de infecciones en sangre (CBSI) en Estados Unidos de América y la sexta en Europa. Es responsable de infecciones en las mucosas (tales como la candidosis oral y vaginitis), así como de infecciones sistémicas potencialmente mortales en humanos (candidosis diseminada), rara vez está presente en individuos sanos, pero se asocia por lo general a pacientes hospitalizados (posquirúrgicos, neutropénicos, neonatos prematuros e inmunodeprimidos en general). La candidemia se define como el aislamiento en hemocultivo de especies de *Candida*; desde el punto de vista clínico se manifiesta como sepsis o shock septicémico de origen nosocomial. La incidencia de candidemia en pacientes hospitalizados es un problema creciente en hospitales de atención terciaria en todo el mundo, con una tasa de mortalidad de alrededor del 50%, debido a un tratamiento fallido y a la difícil identificación de las especies (Bennett 2009; Corzo-Leon *et al.* 2014; Devrim *et al.* 2015; Silva *et al.* 2012; Yamamura *et al.* 1999).

De las aproximadamente 150 especies del género *Candida* el 95% de las infecciones son causadas por 4 especies *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata*. Otras especies clínicas relevantes incluyen a *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis* y *C. famata* que han sido aisladas de casos clínicos con menor frecuencia (Lackey *et al.* 2013; MacCallum 2012; Priest & Lorenz 2015).

I.1.2. Modelos de infección experimentales

Por muchos años, los modelos de infección experimentales en ratones han permitido estudiar el desarrollo de la enfermedad desde el momento en que las células fúngicas se introducen en el huésped. En el modelo de infección por vía I.V., a los pocos minutos de entrar a torrente sanguíneo, estos hongos son detectables en todos los órganos, principalmente en riñón y en cerebro, lo que refleja la situación en el huésped humano. La invasión por el hongo en cerebro se produce en los animales que reciben dosis altas de inóculo. En el bazo, los pulmones y el hígado, los hongos viables desaparecen gradualmente, incluso mientras progresa la infección en los riñones. El extenso daño provocado en riñón se muestra en signos severos, y es considerado la mayor patología de la enfermedad. La proliferación no controlada en este órgano puede ser atribuido a que la principal función (es decir, filtración de la sangre) puede concentrar las células del hongo en el tejido renal en densidades que no se encuentran en otros órganos, además, el hongo encuentra un refugio relativamente seguro para su crecimiento en los túbulos y el sistema colector, produciendo micro-abscesos y necrosis que junto con las masas fúngicas obstruyen el sistema renal (Figura 1) (Fisher *et al.* 2011; Jae-Chen *et al.* 2015; MacCallum 2009; MacCallum *et al.* 2009; Tomaszewski, Jr. & Abramowsky 1981).

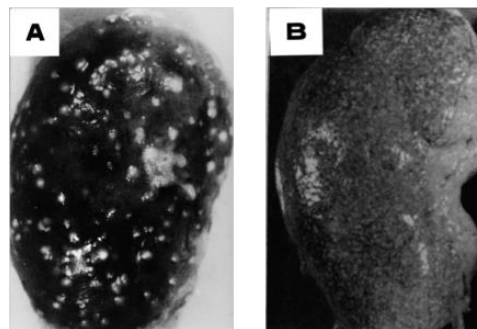


FIGURA 1. Daño provocado a riñón por *C. albicans*. A) Fotografía del riñón de conejo 4 días después de ser inoculado vía I.V. con *C. albicans*. B) Fotografía post-mortem del riñón de un paciente con candidosis diseminada (Fisher *et al.* 2011).

Sin embargo, el impacto de la infección sobre la respuesta inmune del huésped es aún desconocido, la teoría dominante es que la principal causa de mortalidad en los animales, es la sepsis provocada y no el daño al sistema renal (Guinea 2014; Jae-Chen *et al.* 2015; Lackey *et al.* 2013; MacCallum 2009; Spellberg *et al.* 2003).

I.2. Descripción del género *Candida*

El género *Candida* se incluye dentro del *Phylum Ascomicota*, *Subphylum Saccharomycotina* el cual tiene dos grandes ramas. La rama *Candida* que agrupa a todas las especies de *Candida*, incluyendo especies haploides y diploides, excepto a *C. glabrata*, y que se caracteriza por la traducción del codón CUG a serina en lugar de leucina, y la rama de *Saccharomyces*, una de cuyas subdivisiones sufrió una duplicación total del genoma, y que incluye *C. glabrata* (Figura 2) (Bennett 2009; Butler *et al.* 2009; Mancera *et al.* 2015; Silva *et al.* 2012).

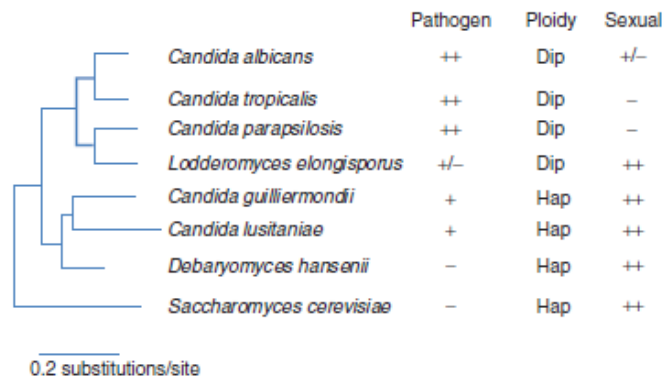


FIGURA 2. Filogenia de las especies del clado de *Candida* y *Saccharomyces* (Bennett 2009).

Aproximadamente el 65% de estas especies son incapaces de crecer a una temperatura de 37 °C. Macroscópicamente las colonias en el medio agar dextrosa sabouraud (SDA), van de un color crema a amarillo, dependiendo de la especie, la textura de la colonia puede ser lisa y brillante o rugosa y seca. Bajo condiciones estándar, las levaduras crecen en forma logarítmica como células gemantes (blastoconidios), las cuales son esféricas u ovaladas y miden aproximadamente de 2 - 5 x 3 - 7 mm. Ciertas especies como *C. albicans*, *C. dubliniensis* y *C. tropicalis* pueden producir hifas verdaderas, un tipo de crecimiento filamentoso, y solo 2 especies *C.*

albicans y *C. dubliniensis* forman tubo germinal (da Silva *et al.* 2016; Lackey *et al.* 2013; Silva *et al.* 2012).

C. albicans es la especie con mayor prevalencia, sin embargo, en las últimas décadas la incidencia de las especies denominadas por sus siglas en inglés Non-*albicans Candida* (NAC) han incrementado significativamente, aunque de forma variable, influenciada por la región geográfica, la exposición previa a los antifúngicos, y el tipo de paciente. Las NACs son de especial interés, ya que algunas son más virulentas y presentan una alta mortalidad, la cual se asocia a un tratamiento fallido, debido a la baja susceptibilidad a azoles, fluconazol (FLC) y anfotericina B (Banerjee *et al.* 2015; Bassetti *et al.* 2006; da Silva *et al.* 2013; Seneviratne *et al.* 2016).

El diagnóstico en el laboratorio, debe basarse en la identificación a nivel de especie. Algunos de los métodos no moleculares utilizados son la prueba de tubo germinal, los medios de cultivo cromogénico (CHROMagar Candida, chromID Candida o CandiSelect), los métodos manuales y automatizados de asimilación de los hidratos de carbono y de nitrógeno (auxanograma), así como técnicas moleculares como el PCR, PFGE, MLST, RFLP y RAPD (Fig. 3) (Oliveira *et al.* 2014; Silva *et al.* 2012; Souza *et al.* 2015).

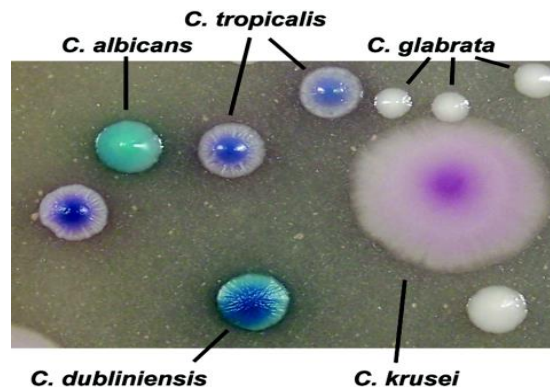


FIGURA 3. Diferenciación colonial de las especies de *Candida*. En medio CHROMagar Candida suplementado con agar de Pal a las 48 h a 37 °C (Sahand *et al.* 2005).

1.2.1. *Candida tropicalis* y *Candida albicans*

C. tropicalis, es una especie relacionada con *C. albicans* (aproximadamente 55 millones de años desde su último ancestro común) comparten muchas características y genéticamente tiene una gran similitud. Ambas especies exhiben un alto grado de

heterocigosidad natural, responsable de la alta capacidad de adaptación y virulencia (Andaluz *et al.* 2011; Butler *et al.* 2009; Mancera *et al.* 2015).

C. albicans posee algunas características biológicas interesantes. Aunque la reproducción es predominantemente clonal, la especie también puede utilizar un ciclo parasexual formar tetraploides y revertir a la diploidía. Su genoma se compone de ocho pares de cromosoma homólogos, que varían en tamaño desde 0,95 a 3,3 Mb y comprenden un total de 16 Mb. La especie es predominantemente diploide. Sin embargo, exhibe un alto grado de plasticidad genómica y frecuentes pérdidas de heterocigosidad (LOH), así como reordenamientos cromosómicos que pueden resultar en aneuploidías (Bennett 2009; McManus & Coleman 2014; Seervai *et al.* 2013).

C. tropicalis es también un organismo diploide obligado, capaz de llevar a cabo un ciclo parasexual, formar tetraploides y reducir luego su ploidía. Su genoma esta organizado en 5 o 6 cromosomas homólogos, de los cuales los de mayor tamaño son difíciles de separar por la técnica de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) y tiene un tamaño de ~15 Mb. El genoma de *C. tropicalis* exhibe una alta frecuencia de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) (uno por 576 pb para la cepa MYA3404), que es cercana a la de *C. albicans* SC5314 (uno por 330 -360) (Butler *et al.* 2009; Forastiero *et al.* 2013; Mancera *et al.* 2015; Oliveira *et al.* 2014; Seervai *et al.* 2013; Silva *et al.* 2012).

I.3. Mecanismos de adaptación generados por la regulación en la expresión génica

Dimorfismo

La transición dimórfica se refiere al cambio reversible de la levadura a una forma filamentosa (pseudohifas e hifas) en respuesta a cambios ambientales. Está controlada por factores de transcripción y señales de transducción (Efg1, Cph1, Nrg1 y Uma6) (Fig. 4). El dimorfismo está estrechamente vinculado a la patogénesis. Durante la infección sistémica, las levaduras son importantes para una rápida diseminación a los órganos, mientras que los filamentos se relacionan con la lisis de macrófagos y neutrófilos, formación de biopelícula, y evasión de la respuesta inmune por la variación antigénica, así como con la invasión de las células epiteliales y tejidos (Calera *et al.*

2000; McManus & Coleman 2014; Thompson *et al.* 2011; Trevijano-Contador *et al.* 2016).

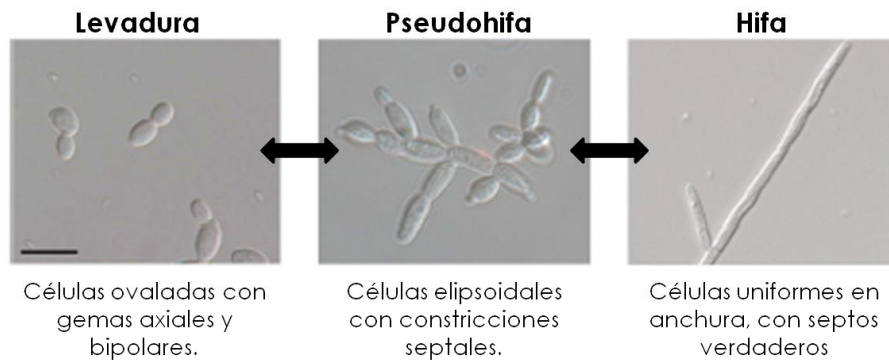


FIGURA 4. Dimorfismo de hongos patógenos de humanos. Imágenes de *C. albicans* visualizadas por microscopia de contraste por interferencia diferencial (barra 10 μm) (Thompson *et al.* 2011).

Enzimas secretadas

La familia génica de secuencias tipo aglutininas se denomina ALS, debido a la semejanza de los dominios de sus proteínas con una aglutinina en *Saccharomyces cerevisiae*, actúan en la adhesión a las superficies, una propiedad relacionada con la patogénesis. *C. albicans* presenta una mayor adhesión de sus hifas, cuando expresa adhesinas *ALS1*, *ALS3*, y *HWP1*. La destrucción de los tejidos del huésped durante la infección diseminada y la evasión de los macrófagos, puede atribuirse a la liberación de enzimas hidrolíticas en el medio como: aspartil proteasas secretadas (SAP), fosfolipasas, lipasas y hemolisinas (Hoyer *et al.* 2001; Silva *et al.* 2012).

Papel de las proteínas del huésped en la adherencia

Un primer paso en la colonización es la capacidad de adherirse a diferentes superficies en el huésped. *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* se caracterizan por una alta adhesión al epitelio humano, mediada por proteínas inmunogénicas (similares a Arp2, Eno1, Tdh3, Tpi1, Pkg1 y Wh11) implicadas en la unión a proteínas del huésped (plasminógeno, quinínógeno, integrinas y proteínas de matriz extracelular), así como a superficies artificiales (catéteres, prótesis, y tubos de PVC) (Figura 5). La capacidad de tener acceso a los tejidos, ya sea en humanos sanos o inmunosuprimidos es probable que resulte de la alta adhesión a los tejidos o dispositivos médicos (Karkowska-Kuleta *et al.* 2015; Kozik *et al.* 2015; Silva-Dias *et al.* 2015).

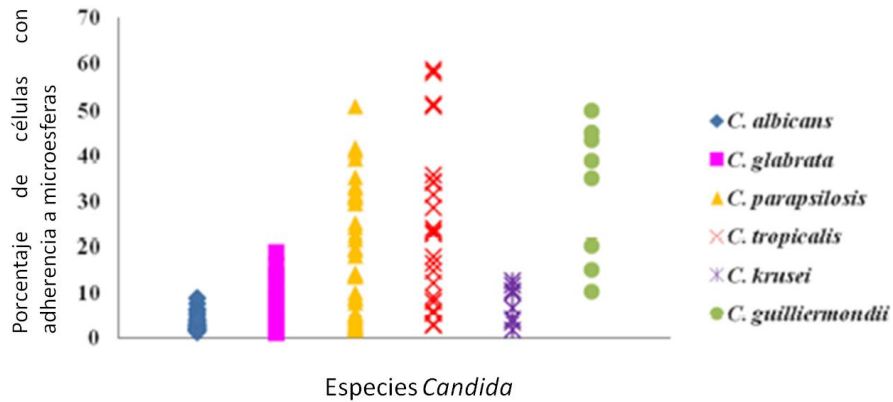


FIGURA 5. Representación de los perfiles de adhesión de *Candida spp.* Las especies con un alto porcentaje de adhesión a micro-esferas son *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* (Silva-Dias *et al.* 2015).

Formación de biopelícula

Las biopelículas son comunidades de células dentro de una matriz extracelular de exopolisacáridos (Fig. 6). La composición de la matriz varía en función de la naturaleza de los organismos presentes (estreptococos, estafilococos y lactobacilos), constituye un medio de protección al ambiente y le confiere resistencia a la célula ante los agentes antifúngicos. Aproximadamente el 65% de los casos clínicos en infecciones están asociados a la formación de biopelícula. En *C. tropicalis* la hexosamina es el principal componente de la matriz extracelular, y es referido como un polisacárido intracelular de adhesión (PIA) que media la interacción célula-célula (Al-Fattani & Douglas 2006; Banerjee *et al.* 2015; Jones, Jr. *et al.* 2014; Silva-Dias *et al.* 2015; van der Mei *et al.* 2014).

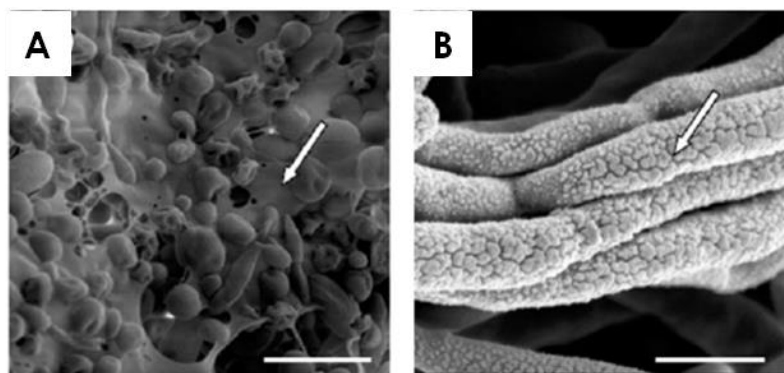


FIGURA 6. Formación de biopelícula en un catéter de PVC. A) y B) Micrografía electrónica de barrido de la formación de biopelícula por *C. tropicalis*, las flechas indican el material de la matriz (barras 10 μm y 2 μm) (Al-Fattani & Douglas 2006).

Switching

El apareamiento o conjugación va precedido de un cambio fenotípico conocido como switching, en el que las células de forma reversible cambian del estado blanco al estado opaco (Fig. 7). El aspecto más notable del switching entre *C. tropicalis* y *C. albicans* es que es regulado por Wor1. En el caso de *C. albicans*, las células opacas son más eficientes en la colonización de la piel y son inestables a 37 °C, mientras que el estado blanco presenta una mayor virulencia en modelos de infección sistémica. En *C. tropicalis* las células opacas son estables a 37 °C, lo que permite el apareamiento eficiente a la temperatura corporal del huésped, ambas células son competentes para el apareamiento y contribuyen a la formación de biopelícula (Jones, Jr. *et al.* 2014; McManus & Coleman 2014; Porman *et al.* 2013; Silva-Dias *et al.* 2015).

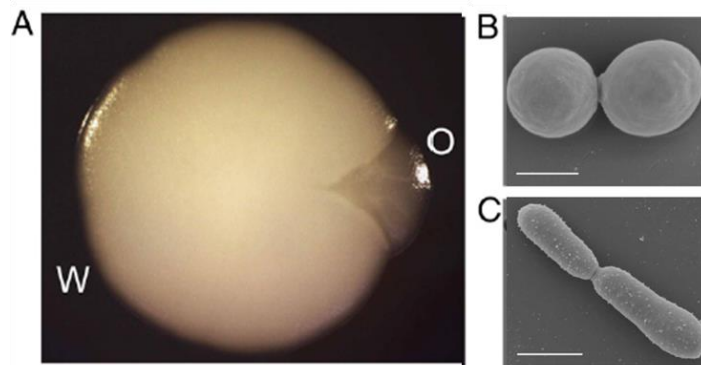


FIGURA 7. Switching fenotípico en *C. tropicalis*. A) Colonia blanca brillante (W) con un pequeño sector que ha cambiado a opaco (O), B) micrografía electrónica de barrido de una célula blanca (redonda y lisa) y C) una célula opaca (alargada y con gránulos) (Porman *et al.* 2011).

I.3.1. Mecanismos de adaptación generados por cambios genéticos

Al reproducirse predominantemente de forma clonal, las especies asexuales del género *Candida* pueden adaptarse a las condiciones ambientales adversas por mecanismos genéticos, como mutaciones, aneuploidías y LOH. Lo que permite la diversificación genética en momentos de estrés, dejando ver nuevas combinaciones de rasgos recesivos (Chauhan *et al.* 2005).

La aneuploidía se refiere a la presencia de un número anormal de cromosomas o segmentos cromosómicos y es una parte integral del ciclo parasexual en *C. albicans*. La aneuploidía de los cromosomas 2, 5 o 6 permiten el crecimiento en fuentes de

carbono específicas, tales como L-sorbosa o D-arabinosa (Rutschencko), y las trisomías de los cromosomas 3 y 4 están generalmente asociadas a la resistencia al fluconazol (FLC) (aproximadamente 50%). Se han descrito eventos de LOH en genomas de levaduras diploides. Por ejemplo, en *C. albicans*, la LOH *in vitro* ocurre principalmente por pérdida y duplicación de cromosomas, mientras que en los aislados clínicos se produce a través de recombinación mitótica, acompañados de cambios en los cariotipos. En *C. tropicalis* la pérdida de heterocigosidad se asocia con una mayor resistencia a los antifúngicos como la formilcitosina (5FC) y el FLC (Chen *et al.* 2011; Ford *et al.* 2015; McManus & Coleman 2014).

I.3.2. Pérdida de heterocigosidad

Llamamos heterocigosidad al estado genético en que dos alelos son diferentes. El proceso que media la conversión de un heterocigoto a un homocigoto se conoce como pérdida de heterocigosidad (LOH). Contribuye en gran medida a la expansión de secuencias y en consecuencia, a la variabilidad/diversidad de las especies (Andaluz *et al.* 2011; Chen *et al.* 2011; McManus & Coleman 2014; Morales & Dujon 2012).

La LOH se puede generar por diferentes mecanismos de recombinación mitótica, conversión génica entre cromosomas homólogos, cruce de ADN ó por pérdida y duplicación de cromosomas. Alrededor del 95% de los eventos de LOH surgen por la replicación inducida por rotura de la doble cadena (Fig. 8) (Haber 2003).

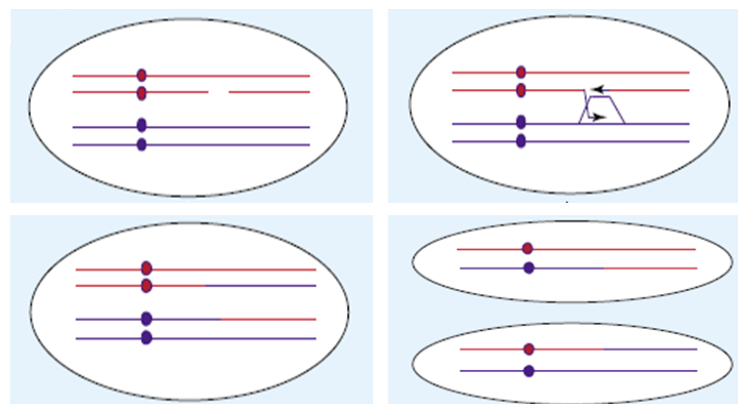


FIGURA 8. Reparación de la rotura de la doble cadena por recombinación homóloga en células en fase G2. La rotura de la cadena puede inducir eventos de LOH (Haber 2003).

I.4. Mecanismos de recombinación mitótica

Los procesos que conducen a la LOH están bajo el control de la red de integridad del ADN que incluye los sistemas de recombinación mitótica. La recombinación mitótica consiste en el intercambio o transferencia de información entre moléculas de ADN y se utiliza en la reparación del daño espontáneo o inducido al ADN (Andaluz *et al.* 2011; Andersen & Sekelsky 2010; Frit *et al.* 2014; Lee *et al.* 2015; Pardo *et al.* 2009).

Las roturas de la doble cadena (*Double-Strand Break, DSB*) se producen continuamente en la célula y son un potente iniciador de recombinación en levaduras y otros organismos. Si no son reparadas, ocasiona el desarrollo de tumores, da lugar a aberraciones cromosómicas (translocaciones y deleciones) y conduce a la inestabilidad genómica. Las células han desarrollado dos mecanismos para hacer frente a la DSB, la recombinación homóloga (*Homologous Recombination, HR*) y la recombinación ilegítima (*Non-Homologous End Joining, NHEJ*) (Fig. 9) (Andersen & Sekelsky 2010; Chauhan *et al.* 2005; Feri *et al.* 2016; Flott *et al.* 2011; Morita *et al.* 1993; Pardo *et al.* 2009).

La NHEJ es un mecanismo versátil, utiliza enzimas específicas que se unen, procesan, y median la re-ligación directa de una amplia gama de DSB, incluyendo aquellas que son complejas, con extremos incompatibles y con daño en las bases; ocurre entre secuencias con poca o ninguna homología. Es dominante en la fase G1 del ciclo celular y es un mecanismo propenso a cometer errores (pequeñas deleciones o inserciones y trasnlocaciones). En esta vía participan proteínas como: el heterodímero Ku (YKU70/YKU80), el complejo Mre11/Rad50/Xrs2 en levaduras y DNA-PK en mamíferos, la ligasa IV (Dnl4) y XRCC4 (Lif1) (Daley & Wilson 2005; Davis *et al.* 2014; Frit *et al.* 2014; Lisby & Rothstein 2009).

Se han descrito, al menos cuatro mecanismos básicos de recombinación homóloga, utilizados para la reparación de la rotura de la doble cadena (*Double-Strand Break Repair, DSBR*), SDSA (*Synthesis-Dependent Strand Annealing*), SSA (*Single-Strand Annealing*) y BIR (*Break-Induced Replication*). Todos estos procesos requieren de las proteínas del grupo espistásico *RAD52*, por lo que se sugiere que este gen es importante en todos los mecanismos de integración homóloga (Andaluz *et al.* 2007; Ciudad *et al.* 2004; Pardo *et al.* 2009).

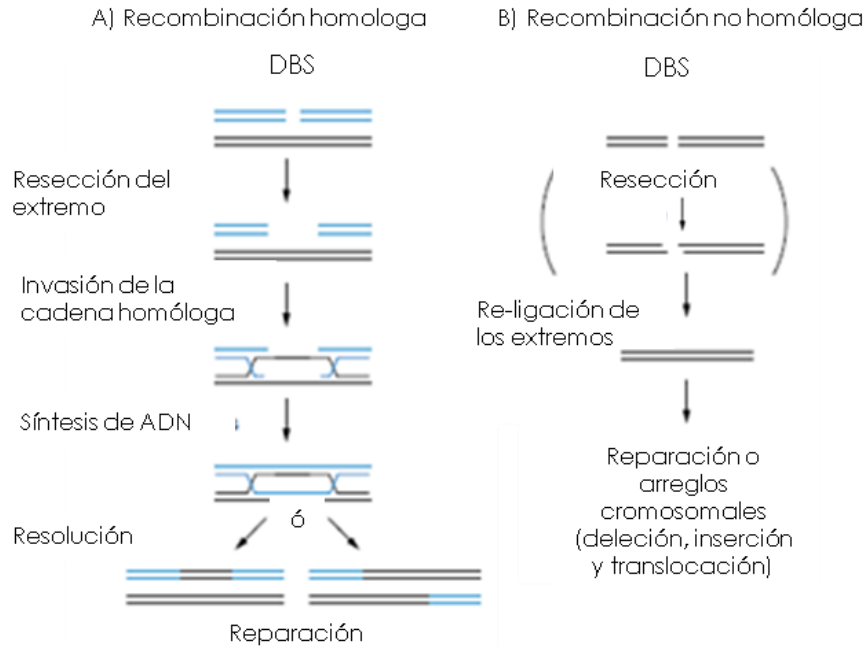


FIGURA 9. Esquema de las vías de reparación de la rotura de la doble cadena de ADN. A) Mecanismo de recombinación homóloga. (B) Mecanismo de recombinación no homóloga (Tsukamoto & Ikeda 1998).

I.4.1. Recombinación homóloga

La HR es un proceso conservado evolutivamente, utiliza secuencias homólogas de ADN (cromátidas hermanas, cromosomas homólogos, regiones ectópicas) para reparar el templado de una manera libre de errores. Es predominante en la fase S y G2 del ciclo celular de levaduras y otras eucariotas con genomas pequeños. En los seres humanos, la HR juega un papel importante en el mantenimiento de la estabilidad del genoma y la supresión de tumores. Requiere un subconjunto de genes del grupo epistasis *RAD52* que incluye *RAD51*, *RAD52*, *RAD54*, *RAD55* y *RAD57*, *RAD59*, *RDH54*, *MRE11* y *XRS2*, así como DNA nucleasas (Exo1, Sae2, Rad1-Rad10), helicasas (Sgs1, Srs2), topoisomerasas (Top3), polimerasas (Pol32) y ligasas (Al-Fattani & Douglas 2006; Gaines *et al.* 2015; li *et al.* 2011; Lee *et al.* 2016; Lisby & Rothstein 2009; Symington 2002; Symington *et al.* 2014; Wang *et al.* 2004).

La HR es caracterizada por tres pasos: 1) La resección del extremo terminal 5' del ADN seguido de 2) la invasión y el intercambio de la cadena dentro del dúplex homólogo, formando lo que se conoce como intermediario de Holliday (dHJ) y finalmente 3) la resolución de los intermediarios de recombinación que origina

productos con entrecruzamientos (crossover) o sin entrecruzamientos (non-crossover). Se ha descrito que las levaduras con mutaciones en los genes *RAD51*, *RAD52* y *RAD54* son defectuosas en procesos de recombinación homologa y sensibles a la radiación ionizante. Además, la delección de los genes *RAD50*, *RAD52* o *MRE11* puede inhibir el desarrollo de la resistencia al FLC a través de eventos de LOH (Garcia-Prieto *et al.* 2010; Hoot *et al.* 2011; Ivanov & Haber 1997; Morita *et al.* 1993; Shen *et al.* 1996).

1.4.2. *RAD51* y *RAD52*

Rad51 y Rad52 son proteínas clave, implicadas en la reparación de la DSB por HR y se conservan entre humanos y en levaduras. Rad51 es una recombinasa eucariota homologa de la proteína bacteriana RecA. Posee los motivos altamente conservados Walker A y Walker B con actividad de ATPasa; en el extremo N-terminal se encuentra el motivo hélice-horquilla-hélice de unión al ADN (HhH-ADN) poco conservado, que media las actividades de intercambio de cadena en búsqueda de homología dando lugar a la formación del filamento presinápticos. La pRad52 actúa como un anillo oligomérico que interactúa con las proteínas RPA, Rad51 y la cadena sencilla de ADN (ssADN). El extremo amino-terminal de la pRad52 comprende los dominios de unión al ADN que son altamente conservados, en comparación con el extremo Carboxilo-terminal poco conservado (Fig. 10). En *S. cerevisiae*, la interacción de la pRad52 con el dominio de pRad51 se encuentra ubicado entre los aminoácidos (aa) 409 y 412, y la región que se extiende del aa 310 en el extremo C-terminal es importante tanto para la interacción con Rad51, como para el reconocimiento de la ssADN (Bellini *et al.* 2014; Jiang *et al.* 1996; Karpenshif & Bernstein 2012; Lee *et al.* 2015; Song & Sung 2000; Symington 2002; Symington *et al.* 2014; Taylor *et al.* 2015).

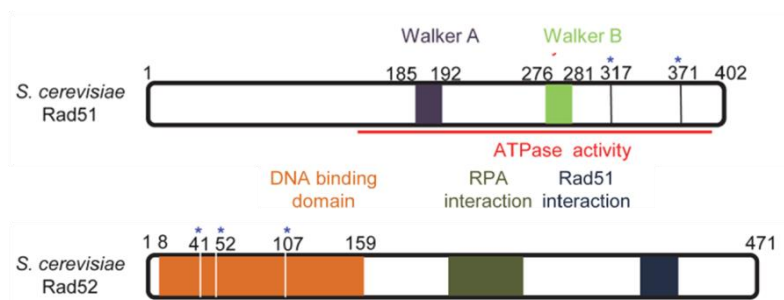


FIGURA 10. Diagrama esquemático de los genes *RAD51* y *RAD52* de *S. cerevisiae*. Comparación de los dominios funcionales de las proteínas Rad51 y Rad52 (Symington *et al.* 2014).

Rad51 cataliza la búsqueda y el intercambio de homología de la cadena de ADN, con la ayuda de la proteína mediadora Rad52 y el complejo Rad57-Rad55 que coopera con la formación del nucleofilamento y el posterior desplazamiento de Rad51, e interactúa con la pRad54 para el remodelamiento de la cromatina. El ensamblaje del filamento presináptico Rad51-ssADN requiere de la unión de ATP pero no de su hidrólisis y es estimulado por la unión del factor RPA (*Replication Protein A*), el cual remueve las estructuras secundarias de la ssDNA. Rad52 acelera la eliminación de RPA de la ssDNA y actúa como mediador para la invasión de la cadena de ADN por el nucleofilamento Rad51. Además, posee una actividad de apareamiento de cadenas sencillas complementarias crucial para diversos mecanismos de recombinación (Li *et al.* 2011; Ivanov & Haber 1997; Symington *et al.* 2014).

II. ANTECEDENTES

Symington en 2002, indica que la delección del gen *RAD52* en *S. cerevisiae* produce defectos en todos los mecanismos de recombinación homóloga como son BIR, DSBR, SDSA y SSA. En 2004, Ciudad y colaboradores describen en *Candida albicans* que en ausencia de la pRad52, las células también muestran defectos en procesos de recombinación homóloga, además que exhiben telómeros más largos y heterogéneos. En 2005, Chauhan y colaboradores reportan que los mutantes *rad52-ΔΔ* de *C. albicans* muestran una virulencia atenuada dependiente de la dosis administrada. García Prieto y colaboradores en 2010, refiere que en *C. albicans* los mutantes *rad52-ΔΔ* son significativamente más sensibles que los mutantes *rad51-ΔΔ* a agentes que causan DSBs y agentes oxidantes.

En 2012 Cuevas y Bellido observan un patrón alto de variabilidad en los cariotipos de aislamientos clínicos de *C. tropicalis* procedentes de diversos estados de la República Mexicana. Posteriormente en 2012, Espinosa Taxis construye el primer mutante heterocigótico *RAD52/rad52::hisG* de la cepa parenteral MYA-3404. Hernández Matamoros en 2013, obtiene los mutantes *RAD51/rad51-Δ* y *rad51-ΔΔ* de *C. tropicalis*, y realiza una caracterización preliminar donde indica que dichos mutantes presentan un crecimiento lento y una morfología filamentosa. Finalmente, Ramírez Falcón en 2014 obtiene los mutantes *rad52-ΔΔ*, *rad51-ΔΔ/rad52-ΔΔ* y el revertiente *RAD51*, realiza una caracterización preliminar donde indica que dichas mutaciones producen cambios en la morfología colonial y celular, comprometiendo de manera significativa el crecimiento del hongo. Observa que la reinserción de la pRad51 en el mutante *rad51-ΔΔ* restaura el fenotipo silvestre.

III. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones nosocomiales emergentes son un problema de salud pública ya que propician que la estancia del paciente en el hospital sea más prolongada, elevando costos. *Candida tropicalis* en México como en América Latina se posiciona entre la tercera y segunda especie más aislada a partir de infecciones en sangre. Se asocia con el desarrollo de candidosis invasiva en pacientes neutropénicos y con cáncer, que a menudo se corresponden con una mayor mortalidad que otras NACs e incluso *C. albicans* (Corzo-Leon *et al.* 2014; Doi *et al.* 2016; Gonzalez *et al.* 2008; Magalhaes *et al.* 2015; Motta *et al.* 2016; Nucci *et al.* 2013; Pfaller & Diekema 2007).

Se han obtenido los mutantes *Ctrad51-ΔΔ* y *Ctrad52-ΔΔ*, sin embargo se desconoce su virulencia. El propósito de este trabajo, es determinar el papel de los genes *RAD51* y *RAD52* en la virulencia de *C. tropicalis*, así como describir el desarrollo de la infección causada en un modelo experimental murino.

IV. HIPÓTESIS

En *Candida tropicalis* el potencial patogénico podrían verse afectado principalmente por la mutación en el gene *RAD52* y *RAD51* como se ha descrito en *C. albicans*, donde dichos mutantes son efectivos en procesos de recombinación homóloga (García-Prieto *et al.* 2011; Andersen *et al.* 2008 Ciudad *et al.*, 2004; Andaluz *et al.*, 2006).

V. OBJETIVOS

V.1. Objetivo general.

Analizar la capacidad patogénica en modelo murino de los mutantes en *Candida tropicalis* en los genes *RAD51* y *RAD52* implicados en recombinación homóloga, así como de la cepa de *C. albicans*.

V.2. Objetivos específicos.

1. Determinar la dosis media efectiva y las curvas de supervivencia de la cepa CAF2-1 y MYA3404, así como de los mutantes.
2. Determinar la colonización en riñón mediante el conteo de las unidades formadoras de colonia (UFC) a diferentes tiempos post-infección (24, 48 y 72 h) con la dosis 1×10^6 células.
3. Realizar el análisis histopatológico del riñón con las dosis 1×10^6 células durante los tiempos 24, 48 y 72 h post-infección.
4. Identificar las cepas recuperadas del riñón de ratones.

VI. METODOLOGÍA

VI.1. Cepas y condiciones de cultivo

Las cepas que se utilizaron en este estudio están indicadas en la tabla 1; provienen de la cepa MYA-3404 de *Candida tropicalis* y la cepa CAF2-1 de *Candida albicans*.

TABLA 1. Descripción de las cepas de *C. tropicalis* y *C. albicans*.

| Cepa | Genotipo | Referencia |
|----------------------------------|---|---------------------------|
| <i>Candida tropicalis</i> | | |
| MYA3404 | Silvestre | |
| Ctrad51- $\Delta\Delta$ | $\Delta rad51::hisG-Ura3-hisG/\Delta rad51::hisG$ | Hernández-Matamoros, 2013 |
| Ctrad52- $\Delta\Delta$ | $\Delta rad52::hisG-Ura3-hisG/\Delta rad52::hisG$ | Ramírez -Falcón, 2014 |
| <i>Candida albicans</i> | | |
| CAF2-1 | $\Delta ura3::\lambda imm434/URA3$ | (Fonzi & Irwin 1993) |

Las cepas se conservaron a corto plazo a 4 °C. Para poder mantenerlas por periodos prolongados se utilizaron ultra-congeladores que las almacenaban a - 80 °C, en este caso se guardaron en glicerol 50% v/v.

VI.1.1. Medios de cultivo

Los medios utilizados en este trabajo se describen en la tabla 2. Las levaduras se incubaron en medio YPD a 30 °C de 24 - 48 h, los cultivos líquidos se mantuvieron en agitación a 200 rpm. Los cultivos en medio CHROMagar y micosel se incubaron a 37 °C por 48 - 72 h, dependiendo de la coloración y el crecimiento, respectivamente.

TABLA 2. Descripción de los medios de cultivo.

| Medio | Composición | Uso |
|---------|--|--|
| YPD | Peptona 20 g/L, extracto de levadura 10 g/L, dextrosa 20 g/L ajustado a pH de 6.5. | Medio completo para el cultivo de levaduras. |
| Micosel | Agar 15.5 g/L Dextrosa 10 g/L Cicloheximida 0.4 g/L Cloranfenicol 0.05 g/L Peptona | Medio selectivo para aislamiento de hongos patógenos de lento crecimiento a partir de muestras con alto contenido de |

| | | |
|-----------|--------------------------------|---|
| | de soya 10 g/L | flora bacteriana. |
| | Cromopeptona 10,0 g/L Glucosa | Medio para el aislamiento e identificación |
| CHROMagar | 20,0 g/L Mezcla cromógena 2,0 | de <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> y <i>C. krusei</i> a |
| Candida | g/L Cloranfenicol 0,5 g/L agar | partir de muestras clínicas. Inhibe el |
| | 15,0 g/L | crecimiento de bacterias. |

VI.2. Obtención de la suspensión de células para el inóculo

VI.2.1 Curva de crecimiento

Los cultivos de las levaduras se incubaron en medio YPD a 30 °C por 24 h. Se tomó una colonia aislada e inoculó en 10 ml de YPD en un tubo falcón e incubó por 12 h a 30 °C con agitación. Se tomó una alícuota ajustando la D.O. a 1, y se depositó en un matraz con 50 ml de YPD e incubó. Posteriormente, se tomó una alícuota cada hora, de 200 µl que se leyó en el espectrofotómetro a 600 nm, realizando una dilución 1:10. Se tomó otra alícuota de 100 µl para realizar 6 diluciones 1:10 con agua destilada estéril. Las diluciones se sembraron por goteo (20 µl) en placas con medio YPD, e incubaron a 30 °C por 24 – 48 h. Finalmente se efectuaron los cálculos correspondientes de las diluciones y se elaboraron gráficas de tiempo vs UFC y tiempo vs D.O. para determinar el tiempo de generación y la fase estacionaria de las cepas. (Todos los experimentos se realizaron por triplicado)

VI.2.2. Preparación del inóculo

Todos los organismos fueron cultivados en placas de YPD, realizando un pase para asegurar la viabilidad. Una vez determinada la fase estacionaria se tomó una colonia aislada de > 1 mm de diámetro de un cultivo de 24 h con un palillo estéril de madera y se suspendió en un tubo Falcón con 10 ml de YPD, se incubó por 12 h. Posteriormente se tomó una alícuota ajustando la D.O. a 1 y suspendió en un tubo Falcón con 50 ml de YPD, incubando hasta fase estacionaria. Se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml una alícuota de 1 ml, se centrifugó a 13000 rpm por 10 min y decantó el sobrenadante. Se realizaron dos lavados con 1 ml solución salina fisiológica SSF (PISA) estéril, centrifugando a 13000 rpm por 8 min, para posteriormente decantar el sobrenadante. Finalmente se suspendió la pastilla en 1 ml de SSF estéril y se realizaron 6 diluciones 1:10 con SSF estéril en tubos eppendorf. Para leer la turbidez de cada dilución de

células se realizó una dilución 1:10 que se leyó en el espectrofotómetro a 600 nm, se utilizó como blanco SSF (PISA) estéril.

Mediante el uso de un hematocitómetro estándar se determinó la cantidad de células de cada dilución. El procedimiento que se empleó para realizar el recuento de células fue el número de células por ml igual al promedio del número de células de los cuadros de las esquinas 1×10^4 . Por convención, todas las células en gemación se contaron como una célula para las cepas silvestres, para los mutantes los filamentos y las células agrupadas fueron contados como uno cuando se utilizó este método.

VI.2.3 Cuantificación de la viabilidad

La viabilidad del inóculo se llevó a cabo de forma cuantitativa en placas con medio YPD para determinar el recuento de células viables. Se realizaron seis diluciones 1:10 con SSF estéril de cada suspensión de inóculo, 20 μ l de cada dilución se sembraron por goteo en placas con YPD. Las placas se incubaron durante 48 h a 30 °C y se contaron las colonias.

Finalmente, se elaboró un análisis de regresión lineal para determinar la relación entre las variables estableciendo el coeficiente de determinación y la ecuación de la línea recta, para cada cepa se realizaron las gráficas correspondientes (todos los experimentos se realizaron por triplicado).

VI.3. Análisis de infección en modelo murino vía I.V.

VI.3.1. Material biológico

Se utilizaron para la determinación de la dosis letal media, ratones de la cepa BALB/c, machos, entre 18-25 g de peso, que fueron colocados en cajas de acrílico con tapaderas de acero inoxidable 40x60x20 (5 ratones por caja). El alimento y agua fueron proporcionados *ad libitum*. Para la determinación de UFC/g de riñón se utilizaron grupos de 9 ratones.

VI.3.2. Determinación de la dosis media efectiva (LD₅₀)

Se formaron grupos aleatoriamente de 10 animales cada uno, los cuales se marcaron y se pesaron. Se incluyó un grupo control al que se administró solamente solución salina

fisiológica estéril. Los ratones fueron anestesiados vía intraperitoneal con 0.12 ml (quetamina/xilasina), fueron inoculados en la vena lateral de la cola con 0.2 ml de suspensión de células, se llevaron al bioterio después de despertar del anestésico. Se observaron 2 veces por día para determinar signos de morbilidad. Los animales moribundos posteriormente de los 21 fueron sacrificados por inhalación con CO₂ en el bioterio. A los ratones que murieron dentro de los 21 días post-infección, se les extrajo el riñón de manera aséptica, se trituró, homogenizó, y colocó en un tubo Falcón con 5 ml de SSF estéril. Se sembró el homogenizado en placas con medio YPD para recuperar la levadura.

La determinación de la dosis letal media efectiva se dividió en dos fases, la primera incluyó la utilización de un intervalo amplio de dosis, partiendo de las suspensiones de células 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 y 1×10^7 , se inocularon grupos de 8 ratones con la cepa CAF2-1 de *C. albicans*. Se observaron los efectos registrando el número de animales muertos y el peso a los 30 días, se construyó una curva dosis-respuesta preliminar.

En las mismas condiciones, se realizó un segundo ensayo. Tomando en consideración los resultados del experimento anterior, se inocularon grupos de 10 ratones y se manejó un margen de suspensión de células más estrecho (1×10^5 , 1×10^6 y 1×10^7) así como de días (21 días). Se inocularon los mutante *Ctrd51-ΔΔ* y *Ctrd52-ΔΔ* y la cepa CAF2-1 de *C. albicans*. Registrando el número de animales muertos a los 21 días post-infección. Para determinar el valor de la dosis letal media se utilizaron 3 modelos estadísticos.

VI.3.2.1. Método de Reed Muench

El método aproximado de Reed Muench, que asume una relación lineal entre los porcentajes de respuesta y las dosis metamétricas (log dosis), frecuentemente da respuestas muy semejantes a métodos rigurosos. En general, la siguiente fórmula se empleo para calcular la "diferencia de los logaritmos" (diferencia de los logaritmos también se conoce como "distancia proporcional" o "valor interpolado"): Los datos fueron ordenados conforme a la tabla 1 y 4 del apéndice 2.

$$\begin{aligned} & \text{Diferencia de logaritmo} \\ &= \frac{[(\text{mortalidad de la dilución por arriba al 50\%}) - 50\%]}{[(\text{mortalidad por arriba al 50\%}) - (\text{mortalidad por debajo al 50\%})]} \end{aligned}$$

VI.3.2.2. Método de Spearman Karber

El método de aproximado de Spearman Karber, parte del supuesto, de que las respuestas serían iguales a cero, (ningún muerto), en la dosis inferior a la menor utilizada en el ensayo X_i , y en la dosis superior a la mayor utilizada, las respuestas se presentarían en la totalidad de los animales (todos muertos).

La siguiente fórmula se empleó para calcular la "diferencia de los logaritmos". Donde: k = número de dosis, X_k = dosis donde la proporción de muertos es 1; $d = X_{i-1} - X_i$; p = proporción de muertos. Los datos se ordenaron conforme a la tabla 2 y 5 del apéndice 2.

$$\log DL_{50} = X_k \frac{1}{2} d - d \sum_{i=1}^k P_i$$

La desviación estándar fue determinada a partir de la siguiente expresión, donde: r_i = número de muertes por dosis, n = número de animales. Se obtuvieron los límites de confianza al 95%.

$$S \log DL_{50} = \sqrt{\frac{d^2 \sum_{i=1}^k n(n - r_i)}{n^2(n - 1)}}$$

VI.3.2.3. Método de Probit

El tercer método utilizado fue el análisis de regresión con "Probit", empleando el método gráfico y el analítico de "máxima verosimilitud", permite determinar el comportamiento de la variable (porcentaje de respuesta Y) de acuerdo con las variaciones del estímulo (dosis), previa estimación de la ecuación de regresión lineal.

Los cálculos utilizados en el análisis de Probit fueron realizados mediante un programa estadístico que se detalla en la tabla 3 y 6 del apéndice 2. El cuál se basa en

la expresión matemática donde: $m = \text{LogLD}_{50}$ al eje de las abscisas correspondiente a $Y = 5$; $X = \text{logaritmo de la dosis}$; $\sigma = \text{desviación estándar del logaritmo de la dosis}$

$$Y = 5 \frac{(x - m)}{\sigma}$$

VI.3.3. Análisis de supervivencia

Para determinar la supervivencia a las diferentes concentraciones del inóculo en cada cepa, se utilizó el análisis de Kaplan Meier y el test log Rank. El análisis de Kaplan Meier se define como la probabilidad de supervivencia en un intervalo de tiempo determinado, se llevó a cabo en un programa estadístico, que se detalla en el apéndice 2. Para probar si la diferencia entre los tiempos de supervivencia de los grupos fue estadísticamente significativo o no, se llevó a cabo el test Long-Rank que se basa en la siguiente fórmula:

$$\text{Long - rank} = \frac{(O_1 - E_1)^2}{E_1} + \frac{(O_2 - E_2)^2}{E_2}$$

VI.3.4. Análisis de colonización a riñón

Se formaron grupos aleatoriamente de 9 animales cada uno, los cuales se marcaron y se pesaron. Se incluyó un grupo control al que se le administró solamente solución salina fisiológica estéril. Los ratones fueron anestesiados con 0.12 ml (quetamina/xilasina), e inoculados en la vena lateral de la cola con 0.2 ml (1×10^6 células/ml). Se observaron por media hora para que despertaran del anestésico y se llevaron al bioterio. Se observaron 2 veces por día para determinar signos de morbilidad. Tres ratones de cada grupo fueron sacrificados en cámaras de CO_2 a las 24, 48 y 74 h post-infección. De cada ratón sacrificado se extrajeron ambos riñones de manera aséptica.

Uno de los dos riñones fue lavado con SSF, pesado y triturado de manera aséptica. Se colocó en un tubo Falcón con 5.0 ml de SSF estéril, y se homogenizó con ayuda del vortex por 1 min, se dejó reposar por espacio de 1 h. Posteriormente, se realizaron 2 diluciones 1/10 del homogenizado, se sembraron por goteo en placas con

medio YPD y micosel. Se incubaron por 48 h a 30 °C y contaron las UFC, finalmente se realizaron los cálculos necesarios.

Al riñón restante, se le realizó un corte con un bisturí estéril, se tomó con una pinzas y se hizo un extendido formando una capa muy fina sobre un portaobjetos. Se fijó con calor y/o con solución de formol-etanol por espacio de 1 min, se enjuagó con agua destilada, para realizar la tinciones de ácido periódico de Schiff (PAS). Posteriormente se colocó el riñón en un frasco con 20 ml de formol al 10% para realizar los cortes histológicos.

VI.3.4.1 Tinción de PAS

La tinción de PAS se realizó con un juego de reactivos comercial (HYCEL). Se fundamenta en la oxidación mediante el ácido periódico de glucógeno, mucoproteínas y otros carbohidratos de alto peso molecular a aldehídos que son reconocidos por el reactivo de Schiff, el cual se combina con ellos para dar un color rojizo brillante. La intensidad de la tinción depende del número de grupos aldehído liberados por el ácido periódico, también influye la madures de la célula. Reactivos:

- Ácido periódico al 0.5 %
- Ácido clorhídrico al 1 %
- Reactivo de Schiff
- Hematoxilina de Harris}
- Verde claro (para hongos)
- Fijador formol-etanol

Procedimiento: se colocaron las laminillas sobre una gradilla de tinción y cubrieron con ácido periódico 0.5% por espacio de 10-15 min. Se enjuagaron con agua destilada. Se tiñeron con el reactivo de Schiff de 15 a 20 min y enjuagaron con agua destilada, preferentemente tibia. Posteriormente se pasó la laminilla por un baño de ácido clorhídrico al 1%, enjuago con agua destilada. El reactivo de contraste utilizado fue hematoxilina de Harris y se colocó por espacio de 2 a 3 min. Finalmente se enjuagó con agua destilada por espacio de 2 min. Se dejaron secar las laminillas, para observar al microscopio con objetivo de inmersión.

VI.4. Identificación de los cultivos recuperados del riñón

VI.4.1. Análisis macroscópico y microscópico

Para la identificación presuntiva, las cepas obtenidas del riñón de los ratones, se cultivaron en medio YPD líquido con agitación constante. Se tomó una alícuota de 10 µl del cultivo y se colocó en un portaobjetos para observar al microscopio con colorante verde claro. Para el análisis macroscópico, se ajustó la D.O. a 1 con SSF y se realizaron diluciones 1:10. Las diluciones se sembraron en medio YPD sólido e incubaron a 30 °C por 24 - 72 horas.

VI.4.2. CHROMagar Candida

Para la identificación presuntiva de las cepas obtenidas a partir de los riñones de los ratones, se tomó una colonia con un palillo estéril de aproximadamente 1 mm de diámetro crecida del medio micosel. Se sembró en una placa de CHROMagar Candida. Se incubó hasta obtener una coloración definida (tabla 3).

TABLA 3. Diferenciación colonial de las especies de *Candida* en el medio BBL CHROMagar Candida.

| Cepas | Medio BBL CHROMagar Candida |
|---------------------------|--|
| <i>Candida albicans</i> | Colonias de color verde claro a mediano |
| <i>Candida krusei</i> | Colonias grandes y planas, de color de rosado claro a rosa, con un borde blancuzco |
| <i>Candida tropicalis</i> | Colonias de azul grisáceo a azul verdoso o azul metálico, con o sin halos violetas en el medio circundante |
| Otras especies | Color malva de claro a oscuro (rosado o violeta) o, un color natural de colonia (de crema a blanco) |

VI.4.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación directa de las células, se tomó una colonia asilada de aproximadamente 1 mm de diámetro con un palillo estéril y colocó en un tubo eppendorf para PCR. Se suspendió con 5 µl de agua PISA estéril y agitó en el vortex por espacio de 15 s para homogenizar, posteriormente, se centrifugó a 12000 rpm por 10 S. Finalmente, se tomaron 0.5 µl de la suspensión para realizar la PCR. Los cultivos

de los cuales fueron tomadas las colonias para PCR, no debieron de tener más de 5 días, para producir colonias viables.

La amplificación de los fragmentos de ADN se llevó a cabo mediante la técnica de electroforesis, se trató de un volumen de reacción de 25 μ l. Se utilizó el kit PCR Master Mix (Promega) que contiene los reactivos: PCR Master Mix 2X: 500 unit/ml taq polimeras suspendida en un buffer (pH 8.5), 400 μ M de dATP, dGTP, dCTP; dTTP y 3 mM de $MgCl_2$, además del agua libre de nucleasas para la reacción, los primers utilizados individualmente para cada especie se detallan en la tabla 4. Para la reacción se utilizó: la suspensión de células (1 μ l), PCR master mix 2x (12.5 μ l); ambos primers con concentración 10 μ M (4 μ l); agua libre de nucleasas (6.5 μ l). Se utilizó un termociclador (Mastercycler personal) con el siguiente programa:

1. . Etapa de inicio (5 min a 96 °C)
2. Etapa de desnaturalización (30 s a 94 °C)
3. Etapa de hibridación de los oligonucleótidos (30s a 58 °C)
4. Etapa de elongación (30 s a 72 °C).
5. 40 ciclos (etapa 2 a la etapa 4)
6. Etapa final (15 min a 72°C) para terminar de amplificar las hebras incompletas

La separación de los fragmentos generados se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % en tampón TBE 0.5 X (ácido bórico, EDTA 0.5 M pH 8.0, Tris-Base). Las muestras fueron mezcladas 1/10 con colorante de carga 6X (10 nM tris-HCl pH 7.6, 0.03% azul de bromofenol, 0.03 % cianol de xileno, glicerol y 60 mM EDTA) (thermo scientific) para darle densidad y visualizar al frente de electroforesis. Se realizó la electroforesis a un voltaje constante que oscilaba de 70 a 100 volt en un tampón 0.5 X TBE por espacio de 1 a 2 h. Los geles se visualizaron en un transiluminador y se documentaron las fotos.

TABLA 4. Oligonucleótidos utilizados para la identificación de las especies de *Candida*

| Espece | Oligonucleótido | Secuencia 5´- 3´ | Fragmento amplificado (pb) |
|----------------------|-----------------|-------------------------------|----------------------------|
| <i>C. tropicalis</i> | CTR1 | CAA TCC TAC CGC CAG AGG TTA T | ~ 357 |
| | CTR2 | TGG CCA CTA GCA AAA TAA GCG T | |

| | | | |
|--------------------|-------|-------------------------------|-------|
| <i>C. albicans</i> | CALB1 | TTT ATC AAC TTG TCA CAC CAG A | ~ 273 |
| | CALB2 | ATC CCG CCT TAC CAC TAC CG | |

VI.5. Análisis estadístico

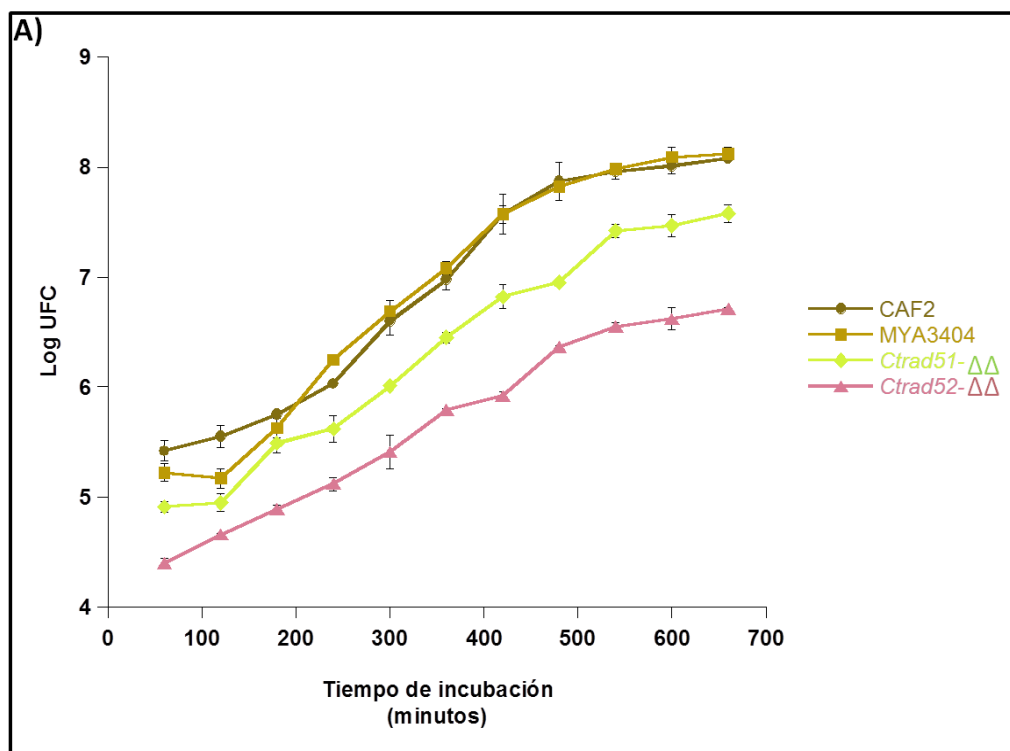
Se elaboró una base de datos en una hoja de cálculo de Excel eligiendo a las variables y clasificándolas. Se realizaron estadísticas descriptivas (frecuencias, promedio, D.E.) y comparativas (χ^2), para la determinación de las UFC/g de riñón. Para la determinación del porcentaje de supervivencia se utilizó el análisis de distribución no paramétrico censurado a la derecha Kaplan Meir y LongRank; para determinar la dosis letal media se utilizó el análisis de Probit. El programa utilizado para los análisis fue Minitab 17 statistical software. Las gráficas fueron elaboradas en el programa KaleidaGraph.

VII. RESULTADOS

VII.1. Obtencion del inóculo

VII.1.1. Capacidad de crecimiento en medio YPD líquido

Se realizó un seguimiento del crecimiento midiendo la D.O. de los cultivos a una absorbancia de 600 nm por 11 horas, en medio rico YPD. El tiempo medio de generación estimado para el mutante *Ctrad51-ΔΔ* fue de 94 min y 106 min para el mutante *Ctrad52-ΔΔ*; la densidad óptica alcanzada en fase estacionaria fue de 9 y 3 unidades respectivamente, para la cepa silvestre MYA3404 y la cepa CAF2-1 el tiempo de generación estimado fue de 90 y 89 min respectivamente, la D.O. alcanzada en fase estacionaria para ambas cepas fue de 13 unidades (Figura 11). Por tanto, podemos concluir que ambas especies de levadura crecen de manera similar y que la delección de los genes *CtRAD51* y *CtRAD52* afecta ligera y moderadamente el crecimiento de *C. tropicalis* en las condiciones ensayadas respectivamente.



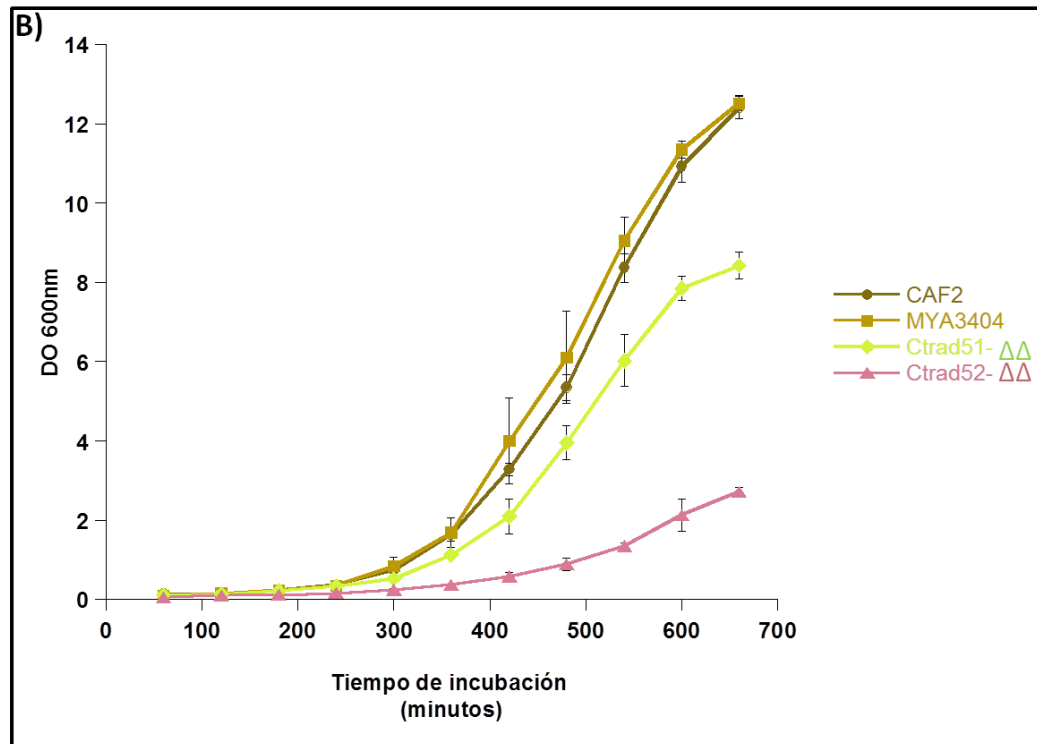


FIGURA 1. Curva de velocidad de crecimiento de las especies de *Candida*. A) Relación del Log UFC en medio YPD respecto al tiempo de incubación (min). B) Relación de la D.O. a 600 nm respecto al tiempo de incubación (min).

VII.2. Viabilidad del inóculo

La determinación de la viabilidad del inóculo se llevó a cabo a las 12 h en medio YPD. Para determinar el número de células viables, se tomó la relación de las células contadas en el hematocitómetro y el número de UFC en placa con medio YPD (Fig. 12). El porcentaje de viabilidad de la cepa CAF2-1 de *C. albicans* y la cepa MYA3404 de *C. tropicalis* fue muy similar (99 % y 100%; media de 97 y 99; DE 0.18 y 0.16 respectivamente), el porcentaje de viabilidad de los mutantes *Ctrad51-ΔΔ* y *Ctrad52-ΔΔ* fue menor al encontrado para MYA3404 (78 y 58 %; media de 68 y 55; DE 0.25 y 0.17, respectivamente). En la figura 12, se presenta las gráficas de regresión lineal correspondiente a cada cepa, donde se muestra el coeficiente de determinación y la ecuación de la línea recta en relación del Log UFC respecto células contadas en el hematocitómetro.

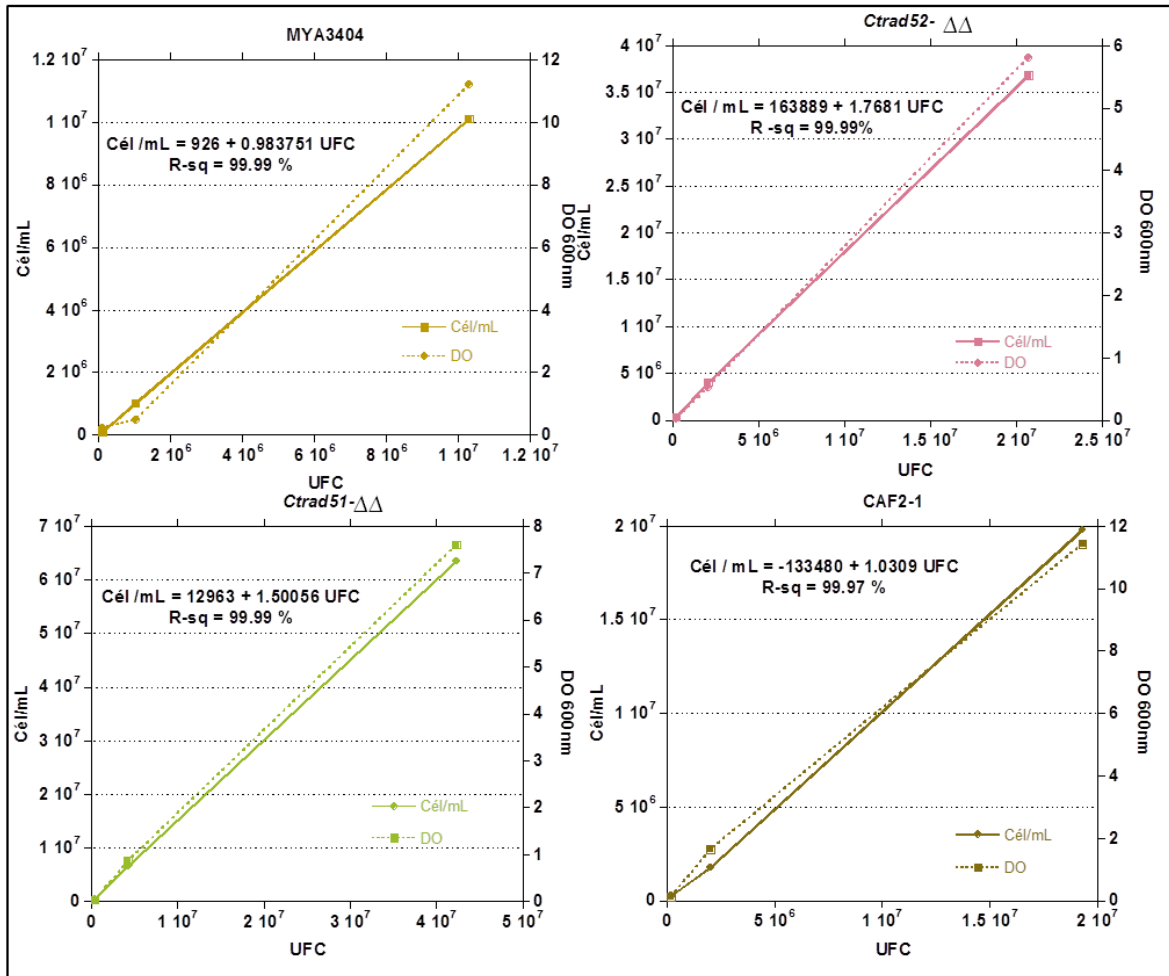


FIGURA 2. Regresión lineal para la determinación de la viabilidad del inóculo. Se presenta el coeficiente de determinación y la ecuación de la línea recta para cada cepa.

VII.3. Virulencia en modelo murino

VII.3.1. Determinación de LD₅₀ y porcentaje de supervivencia

Los resultados de la primera fase experimental para las cepas CAF2-1 y MYA3404 se muestran en el apéndice 1. De acuerdo a los resultados obtenidos, en la segunda fase se decidió utilizar un intervalo más estrecho, entre las dosis 1×10^5 y 1×10^7 células para los mutantes, ya que se tenía el antecedente de ser menos virulentos que la cepa parenteral. La LD₅₀ del mutante *Ctrad51- $\Delta\Delta$* fue menor significativamente a lo encontrado para la cepa CAF2-1 (tabla 6). La mortalidad para ambas cepas fue del 100 % con la dosis 1×10^7 , mientras que para la dosis 1×10^5 el mutante no generó la muerte de ningún ratón, en contraste con CAF2-1 mostró un 50 % de mortalidad (tabla 7). Para el mutante *Ctrad52- $\Delta\Delta$* no se determinó la LD₅₀ ya que a las dosis 1×10^5 y 1×10^6

células la cepa no causó la muerte de ningún ratón; con la dosis 1×10^7 células los ratones inoculados entraron en shock y murieron a los minutos de ser inoculados, por lo que no se administró esta dosis. Una posibilidad es que los ratones fueran afectados por la cantidad de células presentes suspendidas en un volumen pequeño.

En cuanto a los métodos estadísticos empleados para la determinación de la LD_{50} no se mostraron diferencias significativas en los resultados, los métodos de Reed Muench y Sperman Karber fueron rápidos y precisos, aunque el método probit generó una mayor información (tabla 6).

TABLA 5. Determinación del Log LD_{50} de las especies de *Candida*

| Método | Log $LD_{50} \pm DE$ | | |
|----------------|----------------------|--|--|
| | CAF2-1 | <i>Ctrad51-$\Delta\Delta$</i> | <i>Ctrad52-$\Delta\Delta$</i> |
| Reed Muench | 4.91 | 6.29 | -- |
| Sperman Karber | 4.9 ± 0.52 | 6.20 ± 0.30 | -- |
| Probit | 4.82 ± 0.60 | 6.06 ± 0.38 | -- |

TABLA 6. Porcentaje de mortalidad de las especies de *Candida*

| Dosis | Porcentaje de mortalidad | | |
|-----------------|--------------------------|--|--|
| | CAF2-1 | <i>Ctrad51-$\Delta\Delta$</i> | <i>Ctrad52-$\Delta\Delta$</i> |
| 1×10^7 | 100 % | 100 % | -- |
| 1×10^6 | 80 % | 30 % | 0 % |
| 1×10^5 | 50 % | --- | 0 % |
| 1×10^4 | 30 % | -- | -- |

En base a que las cepas CAF2-1 y los mutantes de *Ctrad51- $\Delta\Delta$* y *Ctrad52- $\Delta\Delta$* , mostraron una mortalidad diferente para cada dosis administrada, se elaboraron las curvas de supervivencia para comparar esta respuesta entre las diferentes cepas. Los resultados obteniendo se presentan en la figura 13, donde se observa que la probabilidad de supervivencia de los ratones es dependiente de la dosis para las mutantes, a dosis bajas son avirulentas, así como también se observa la respuesta de los ratones.

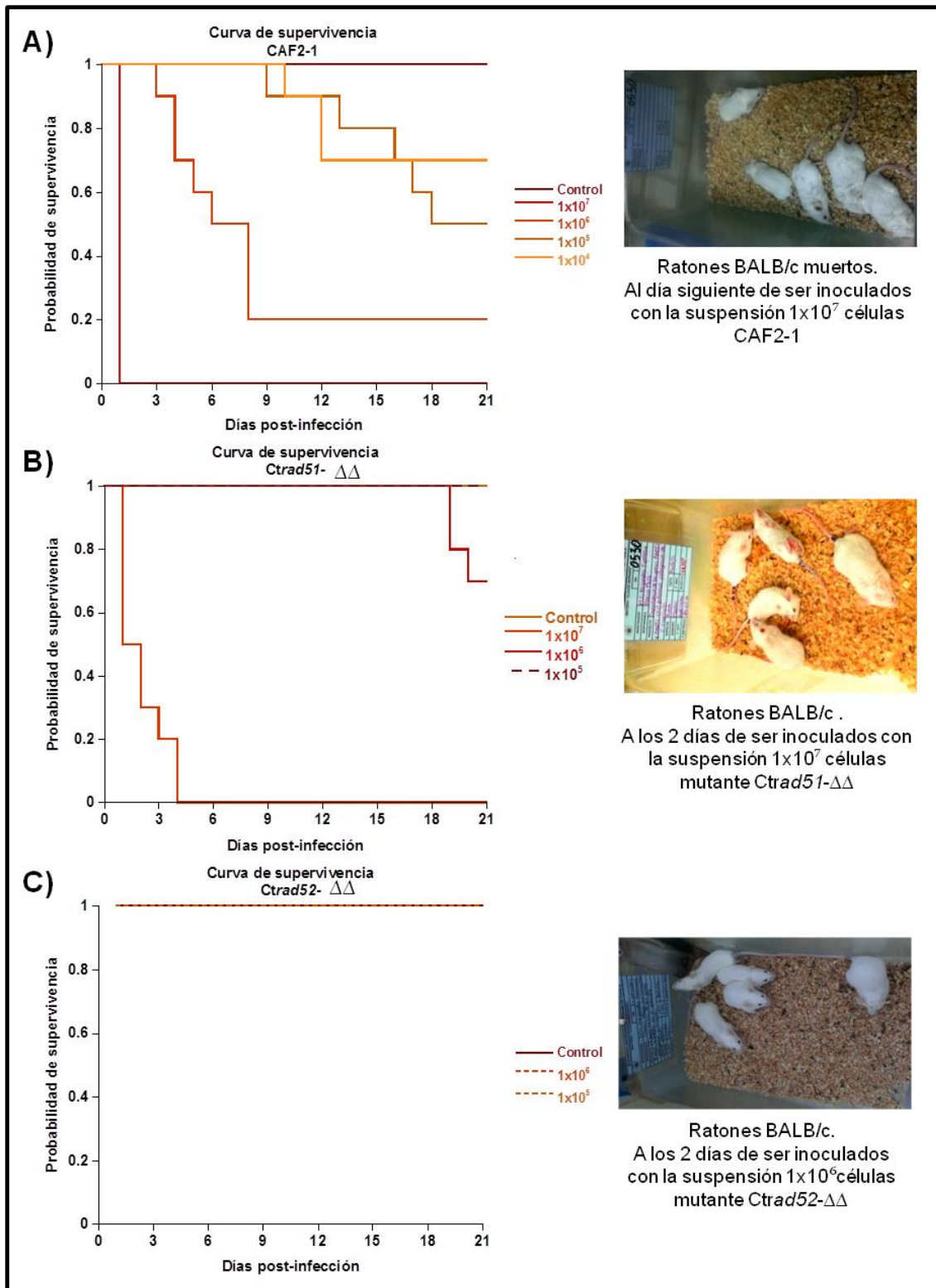


FIGURA 13. Curvas de supervivencia de las especies de *Candida* a diferentes dosis. A) Probabilidad de supervivencia de la cepa CAF2-1 B) El mutante *Ctrad51-ΔΔ* C) El mutante *Ctrad52-ΔΔ*.

VII.3.2. Identificación de las cepas recuperadas del riñón

La identificación presuntiva de los hongos recuperados del riñón del estudio anterior, se realizó a partir de la coloración que presentaron las colonias en el medio CHROMagar Candida. En la Figura 14, se observa que la cepa de *C. albicans* CAF2-1 mostró una coloración verde claro, mientras que el mutante *Ctrad51-ΔΔ* presentó una coloración azul metálico con un halo morado. La morfología celular encontrada en los cultivos obtenidos del riñón fue similar a la morfología de las cepas introducidas en los ratones, filamentosa para el mutante *Ctrad51-ΔΔ* y levaduriforme para CAF2-1.

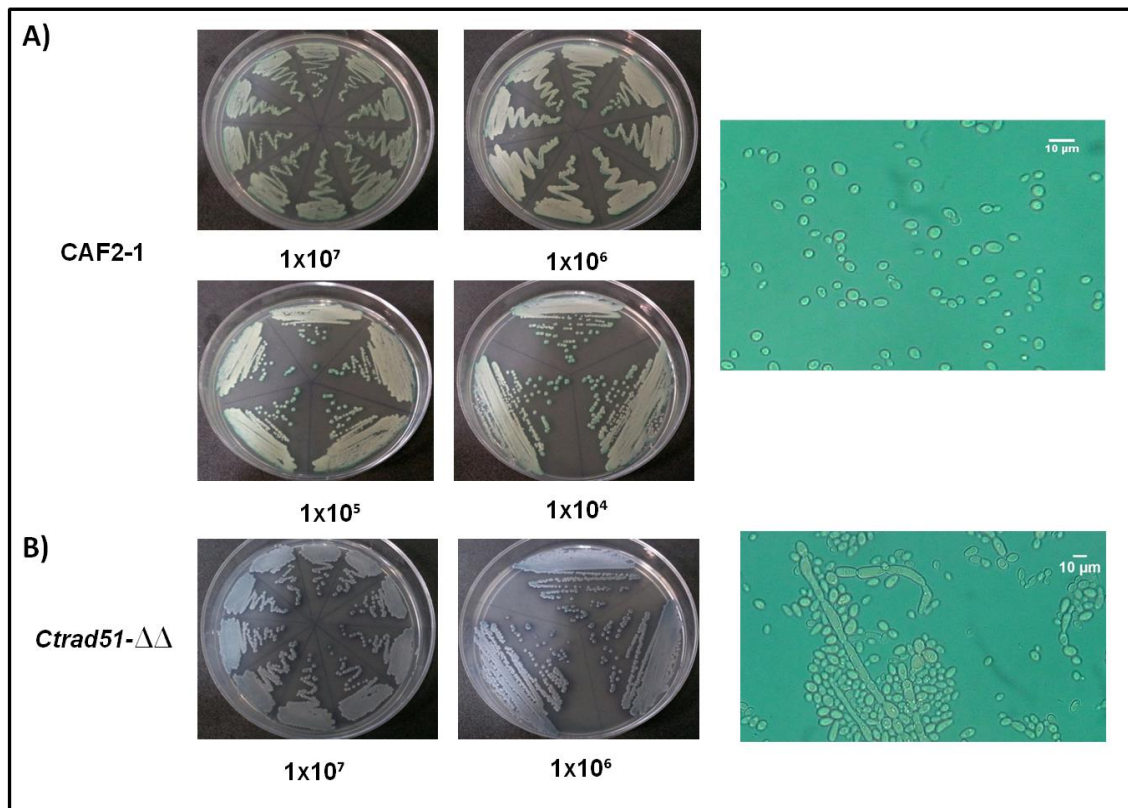


FIGURA 14. Identificación de las cepas recuperadas del riñón mediante la diferenciación colonial en medio CHROMagar Candida y la diferenciación celular. A) Cepa de *C. albicans* CAF2-1 B) mutante *Ctrad51-ΔΔ*. (Barra 10 μm).

VII.4. Capacidad de colonización a riñón con la dosis 1×10^6

VII.4.1 Mortalidad y progresión de la infección

La virulencia que mostraron las cepas CAF2-1 y MYA3404 fue similar, con un 80% de mortalidad en los ratones inoculados a los 21 días posteriores a la infección, como se

muestra en la figura 15. Ambas cepas presentaron una infección aguda, sin embargo, la infección por CAF2-1 se desarrolló durante los primeros 4 días, mientras que la infección por MYA3404 se desarrollo más tarde y ocurrió tras 9 días. La supervivencia de los ratones inoculados con el mutante *Ctrad52-ΔΔ* fue del 100%, igual que los animales control inoculados con SSF, mientras que los ratones inoculados con el mutante *Ctrad51-ΔΔ* exhibieron un porcentaje de muerte del 30%, lo que indica una disminución moderada pero significativa de la virulencia respecto a la cepa silvestre MYA3404. Además, las muertes de los ratones inoculados con el mutante *Ctrad51-ΔΔ* ocurrieron tras 19 días. Cabe mencionar, que los ratones infectados con el mutante *Ctrad52-ΔΔ* desarrollaron la infección de una manera controlada, pues los ratones bajaron inicialmente de peso para mantenerse luego más o menos constante durante los 21 días post-infección, en comparación con los controles, que subieron de peso en el transcurso del experimento. La tasa de supervivencia presentada por los animales control fue del 100%, a los cuales solo se les administro SSF.

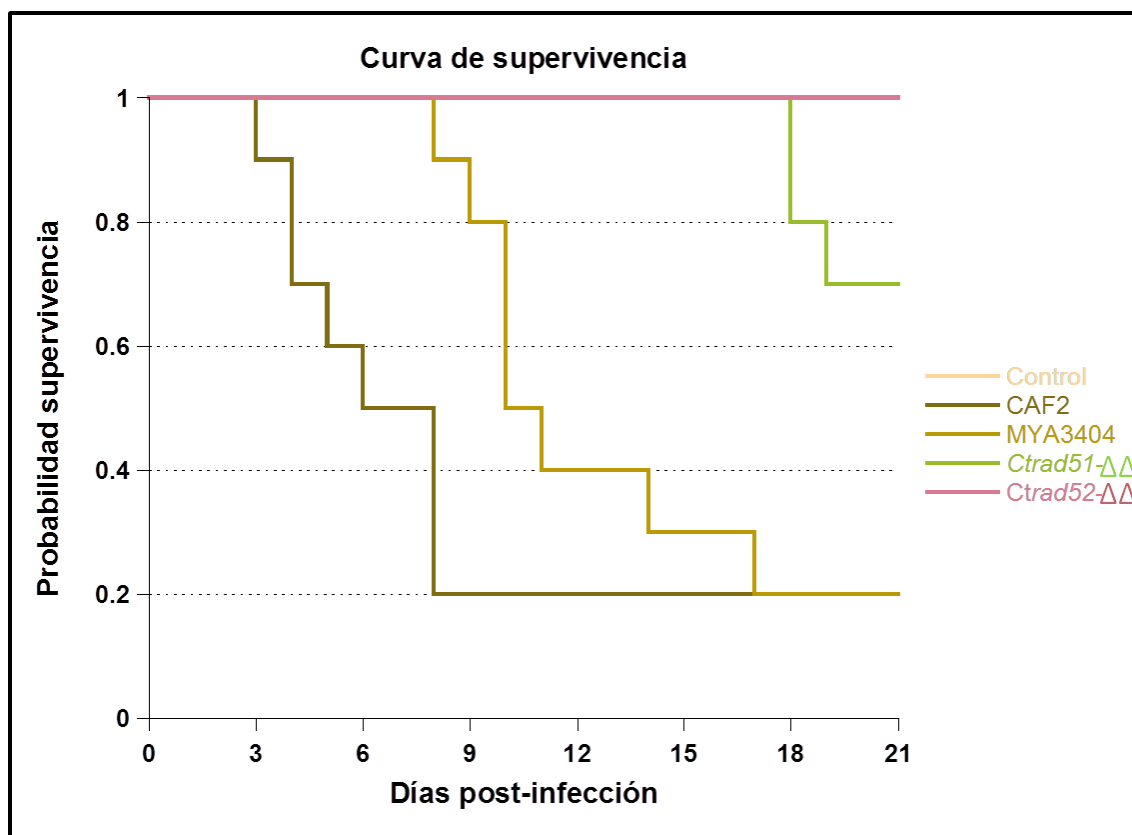


FIGURA 15. Curva de supervivencia de los ratones infectados con la dosis 1×10^6 células. Diferencias en la probabilidad de supervivencia respecto al tiempo de infección (días) para cada cepa.

VII.4.2. Determinación de las cargas fúngicas renales

Se determinó las UFC por gramo de riñón para cada cepa a las 24, 48 y 72 h después de la infección. Como se muestra en la figura 16, en la etapa inicial de la infección a las 24 h, la cepa CAF2-1 presentó un número de UFC considerablemente más alto (5.59 UFC / g de riñón) en comparación con las otras tres cepas. La cepa MYA3404 y el mutante *Ctrad51-ΔΔ* presentaron un número de UFC similar durante los 3 días post-infección, mientras que el mutante *Ctrad52-ΔΔ* presentó un número de UFC menor y más o menos constante durante el experimento. Lo que va de acuerdo con el estudio anterior, en el desarrollo de la infección para cada cepa.

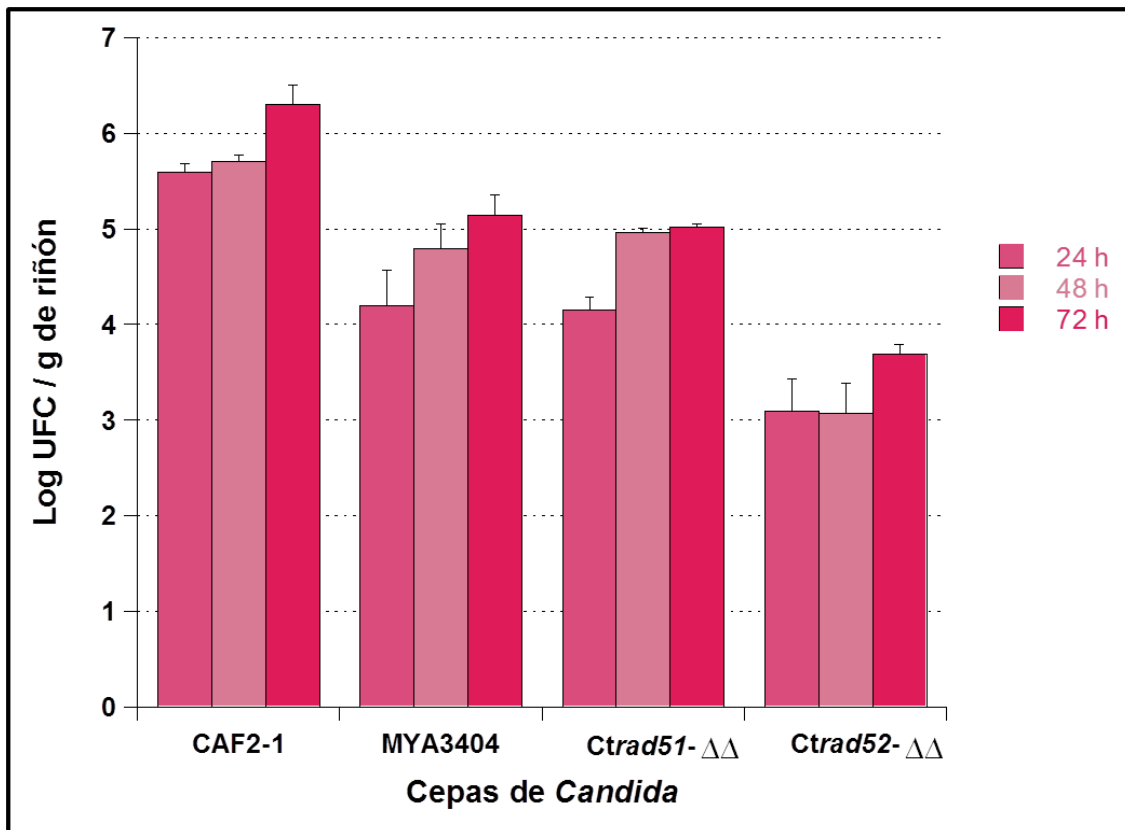


FIGURA 16. Capacidad de la colonización al riñón de las especies de *Candida*. Los datos que se muestran corresponden al Log UFC por g de riñón respecto al tiempo post-infección (24, 48 y 72 h).

Si bien, las diferencias en los niveles de UFC en riñón variaron con respecto al tiempo, las cargas fúngicas promedio para CAF2-1 fueron las más altas. La cepa MYA3404 y su mutante *Ctrad51-ΔΔ* generaron cargas menores y similares entre sí, y la cepa *Ctrad52-ΔΔ* generó la menor carga. Los resultados observados, permiten señalar

que existen diferencias relevantes en la virulencia de las cepas utilizadas. La colonización y desarrollo de la infección ocasionada por las levaduras en los ratones a lo largo de los 21 días post- infección, así como la colonización en riñón fue CAF2-1 > MYA3404 > mutante *Ctrad51-ΔΔ* > mutante *Ctrad52-ΔΔ*.

VII.4.3. Histopatología del riñón

La histopatología que presentaron los riñones de los ratones infectados se muestra en la figura 17. Se observó la presencia de crecimiento filamentoso y un daño severo en el riñón a las 24 h post-infección en la cepa CAF2-1, mientras que para las cepas MYA3404 y el mutante *Ctrad51-ΔΔ* se observó la presencia del hongo a las 48 h posteriores a la infección.

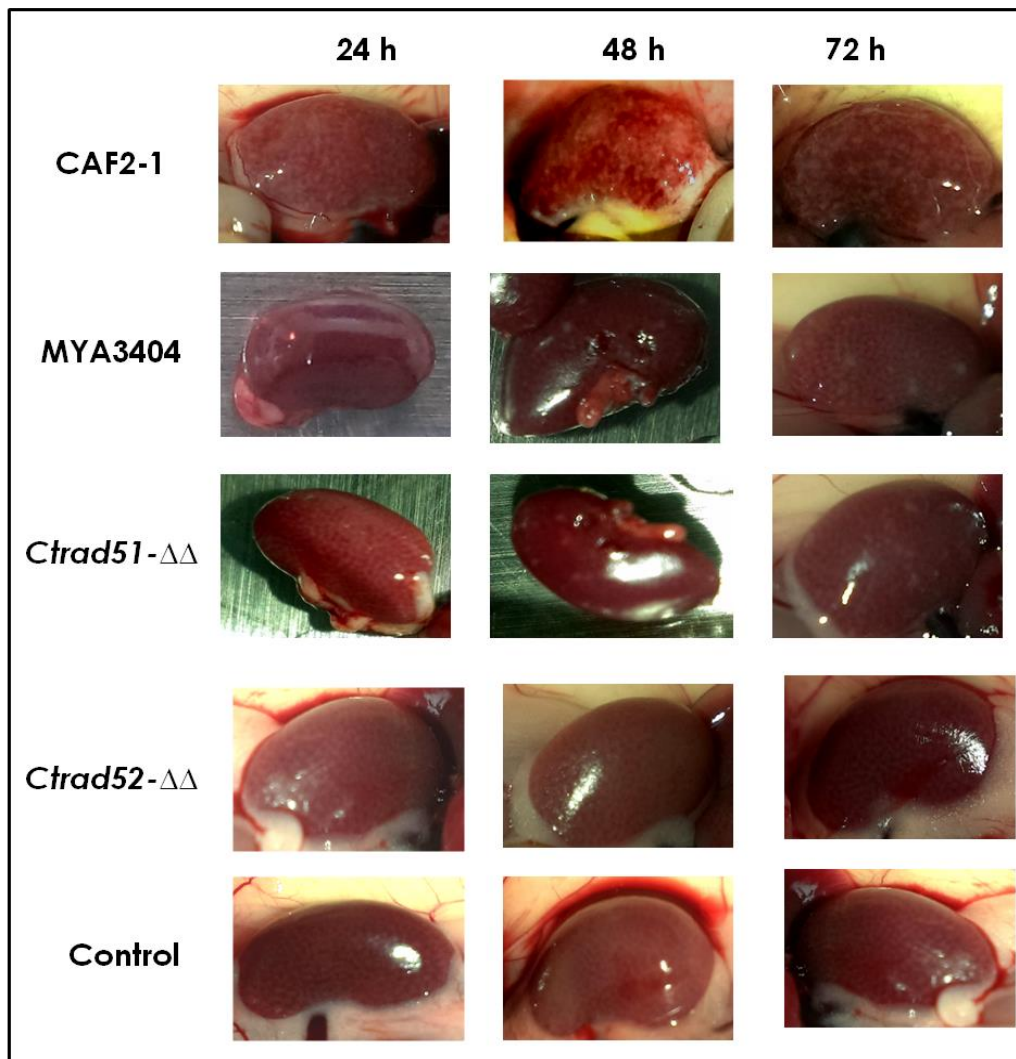


FIGURA 17. Patología del riñón de los ratones infectados con la dosis 1×10^6 células. Daño provocado al riñón por las cepas de *Candida* respecto al tiempo post-infección ((24, 48 y 72 h).

Los animales infectados con el mutante *Ctrad52-ΔΔ*, sobrevivieron al curso del experimento, pero el organismo fue recuperado en niveles constantes en riñón y fue observado en las secciones histológicas del tejido infectado, sin embargo los riñones no mostraron síntomas de infección (Fig. 17). Los controles no presentaron lesiones inflamatorias y visibles en los riñones, y tampoco se observaron las levaduras.

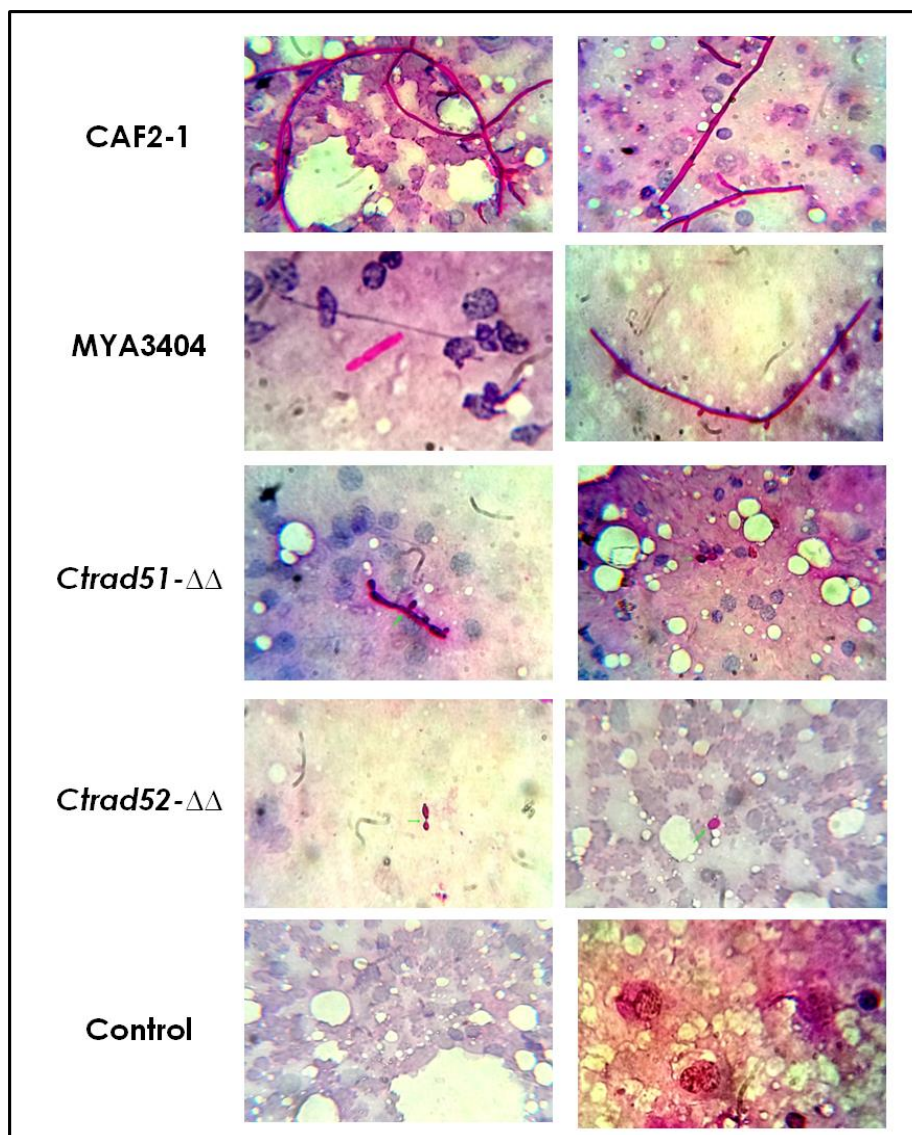


FIGURA 18. Histopatología del riñón de los ratones infectados con la dosis 1×10^6 células. Presencia en riñón de las diferentes cepas de *Candida* respecto al tiempo post-infección (24, 48 y 72 h). Las secciones se tiñeron con PAS.

En las secciones histológicas, la cepa CAF2-1 presentó un crecimiento filamentosos y abundante durante las 24 h 48 h y 72 h. La cepa MYA3404 presentó

principalmente un crecimiento levaduriforme que fue abundante a las 72 h, en comparación con el mutante *Ctrad51-ΔΔ* que presentó crecimiento filamentososo moderado a las 72 h, mientras que el mutante *Ctrad52-ΔΔ* presentó escaso crecimiento levaduriforme en las improntas (Fig. 18).

VII.5. Identificación de las cepas recuperadas del riñón

La identificación presuntiva de los cultivos obtenidos de los riñones, se realizó a partir del análisis de la morfología colonial y celular de las cepas inoculadas (Fig. 19).

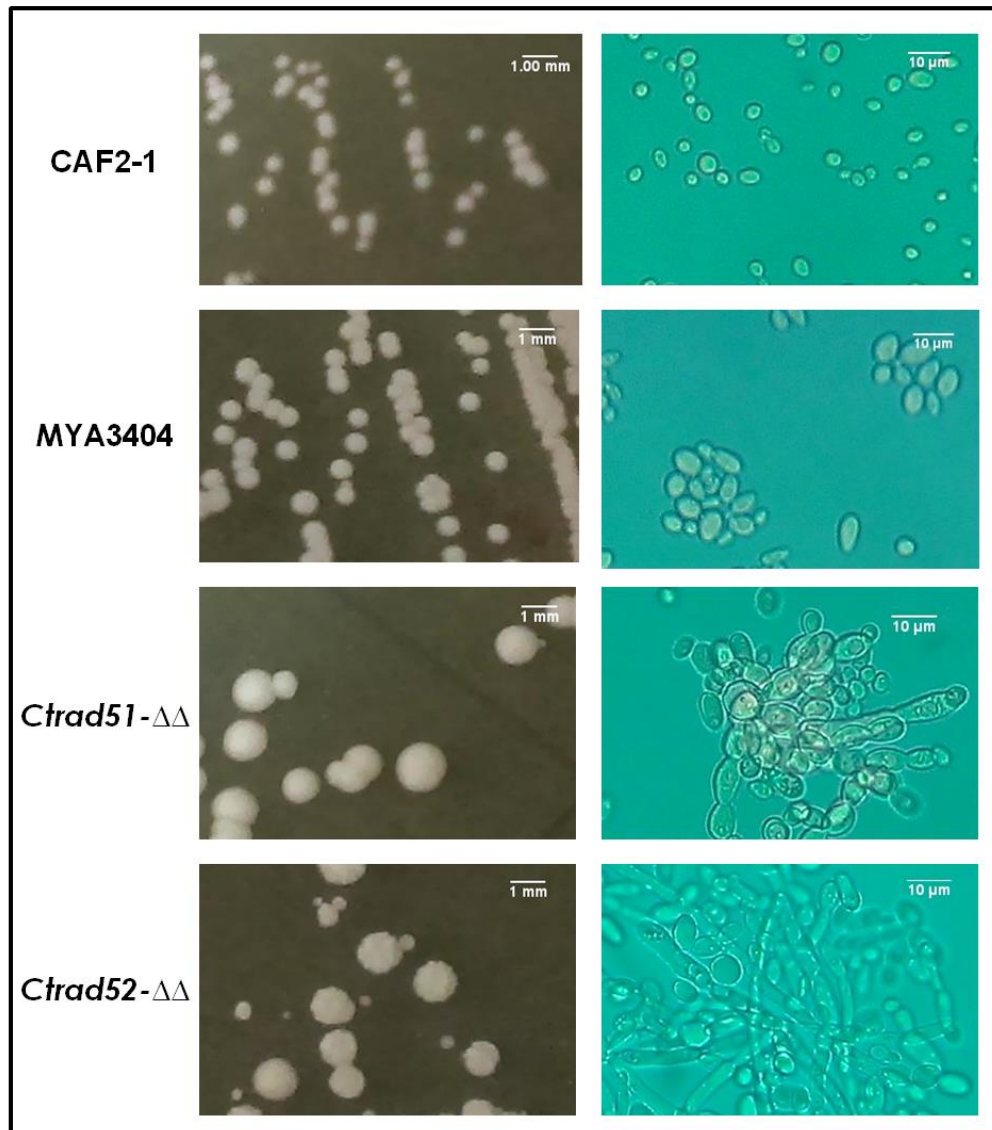


FIGURA 19. Morfología colonial y celular de las cepas recuperadas del riñón de ratones infectados con *Candida*. Morfología colonial en medio YPD a las 72 h a 30 °C, crecimiento celular en medio YPD líquido a las 24 h, colorante verde claro.

La cepa CAF2-1 y la cepa silvestre MYA3404 mostraron un crecimiento celular principalmente levaduriforme en comparación con los mutantes, que presentaron un crecimiento filamentososo aberrante, especialmente el mutante *Ctrad52-ΔΔ*. Por otra parte, la cepa CAF2-1 presentó una morfología colonial brillante y con bordes definidos, mientras que las cepas MYA3404 y el mutante *Ctrad51-ΔΔ* presentaron una morfología opaca y con bordes definidos, y el mutante *Ctrad52-ΔΔ* mostró bordes irregulares.

La identificación confirmatoria se llevó a cabo mediante la técnica de PCR y la diferenciación colonial en el medio CHROMagar, para la cepa de *C. albicans* CAF2-1 se observó un fragmento de ~ 273 pb (línea 2 y 3) y una coloración verde claro en medio CHROMagar Candida, la cepa de *C. tropicalis* MYA3404 y sus mutantes presentaron un amplificado de ~ 357pb (línea 7 a la 12) y una coloración azul metálico en CHROMagar Candida. Lo que indica que las cepas recuperadas (línea 3, 8, 10 y 12) se derivan de las cepas inoculadas (2, 7, 9 y 11) (Fig. 20).

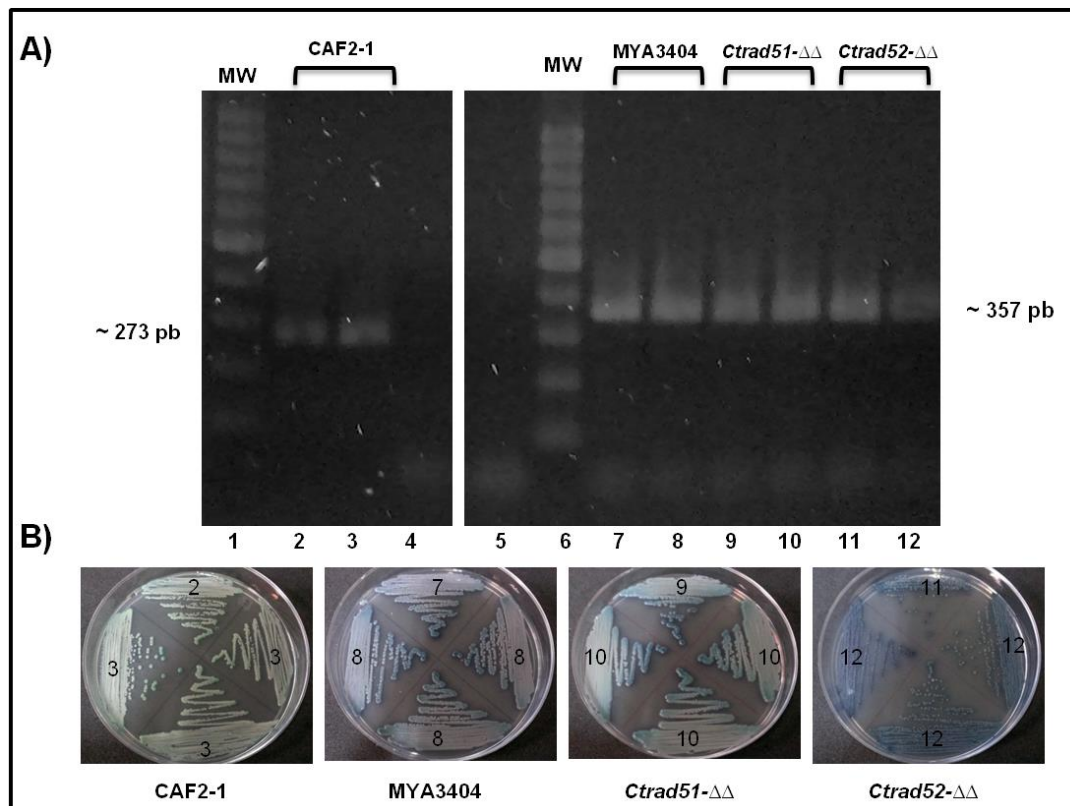


FIGURA 20. Identificación de las cepas aisladas del riñón de ratones inoculados con dosis 1×10^6 . A) PCR especie específica. MW de 100 pb (línea 1 y 6) controles negativos (línea

4 y 5). B) Diferenciación colonial en medio CHROMagar Candida de las especies inoculadas (2, 7, 9, 11) y las especies recuperadas (3, 8, 10, 12) del riñón.

En general, los resultados presentados en la identificación tanto presuntiva como confirmatoria, indican que las cepas aisladas a partir del riñón de los ratones se derivan de las cepas inoculadas y no de especies exógenas del género *Candida*. Tanto por su morfología colonial y celular aberrante para los mutantes, así como por su identificación en medio CRHOMagar Candida y por PCR.

VIII DISCUSIÓN

Candida tropicalis es considerado un patógeno oportunista. Bajo ciertas condiciones muestra una significativa morbilidad y mortalidad en pacientes inmunosuprimidos (40-70%). Se han dedicado considerables esfuerzos para identificar los factores de virulencia e intentar comprender la respuesta del huésped en modelos experimentales (Forastiero *et al.* 2013; Fromtling *et al.* 1987; MacCallum *et al.* 2009).

Desde los años 60 las investigaciones sobre la virulencia de las cepas y sus mutantes se han beneficiado del modelo de infección en ratón vía I.V., considerándolo como un modelo bien caracterizado y reproducible de candidosis diseminada (MacCallum 2009; MacCallum 2012; MacCallum *et al.* 2009).

Hemos encontrado que utilizando el modelo murino, las cepas de *C. albicans* y *C. tropicalis* presentaron una virulencia similar, con un 80% de mortalidad en ratones infectados con la suspensión 1×10^6 células. Aunque presentaron un tiempo de generación similar, el alcance de la infección fue distinto para ambas especies, la colonización y la posterior diseminación por *C. albicans* fue más rápida que por *C. tropicalis*. Calderon en 2002, reportó que *C. albicans* es capaz de crecer y adaptarse a una gran variedad de nichos específicos en el hospedero, así como a diferentes medios y condiciones de cultivo en el laboratorio, mientras que Lackey en 2013, reportó que *C. tropicalis* infecta con más frecuencia nichos específicos dentro del huésped (superficies mucosas y tracto urinario) y se asocia a pacientes neutropénicos ó con cáncer. Estudios comparativos de virulencia en el mismo modelo entre cepas provenientes de aislados clínicos de *C. tropicalis* y *C. albicans* sugieren que estas especies muestran una virulencia comparable y que no difiere significativamente. Hansenclever y Mitchell reportaron que *C. albicans* posee una virulencia equivalente, o mayor que a *C. tropicalis* en el mismo modelo de infección, mientras que Repegtini, encontró que *C. tropicalis* parece ser más virulenta que *C. albicans* en la colonización gastrointestinal en ratones. Por lo que, sería interesante conocer cuales mecanismos de adaptación se llevan a cabo en ambas especies en el modelo experimental murino (de *et al.* 1992; Garcia-Prieto *et al.* 2010; HASENCLEVER & MITCHELL 1961; Lackey *et al.* 2013; Oliveira *et al.* 2014; Wingard *et al.* 1980; Wingard *et al.* 1982).

Es posible que las distintas cepas de *C. tropicalis* exhiban diferente virulencia o difieran en la cinética de muerte en el sistema experimental utilizado, dada la variabilidad genética de estas especies. Comparada con la cepa silvestre, la virulencia de los mutantes *Ctrad51-ΔΔ* y *Ctrad52-ΔΔ* fue significativamente menor. Con la suspensión de células 1×10^6 , el mutante *Ctrad52-ΔΔ* fue avirulento, mientras que el mutante *Ctrad51-ΔΔ* generó una baja mortalidad (30%). Se observó, que el mutante *Ctrad51-ΔΔ* no mostró virulencia con el inóculo de 1×10^5 células, pero la misma cepa con el inóculo 1×10^7 células mostró una mortalidad del 100% en la primera semana. Fisher y colaboradores reportaron que a altas concentraciones de inóculo, la muerte temprana de los ratones no es causada por una insuficiencia renal, sino por una sepsis progresiva, y en la autopsia los riñones se muestran llenos de absesos, lo que refleja la situación clínica en humanos, sin embargo Jean-Chen y colaboradores sugieren que la insuficiencia renal también juega un papel muy importante en la letalidad de *Candida* en ratones. Por el contrario, el mutante *Ctrad52-ΔΔ* no mostró virulencia con el inóculo 1×10^5 y 1×10^6 células. Chauhan y colaboradores describen que los mutantes *rad52-ΔΔ* de *C. albicans* son avirulentos a la dosis 1×10^6 , mientras que a la dosis 3×10^6 la cepa causó la muerte de los ratones, mientras que Andaluz y colaboradores reportaron que los dobles mutantes en el gen *LIG4* (implicado en NHEJ) y *RAD52* son avirulentos incluso a esta concentración. Estos resultados demuestran que la infección inicial por los mutantes fue de progresión lenta y dependiente de la dosis administrada en comparación con la cepa silvestre. Esto podría atribuirse, a que dichos mutantes muestran defectos en procesos de HR, que podrían estar involucrados en mecanismos adaptación. Symington en 2002, indicó que la delección del gen *RAD52* en *S. cerevisiae* produce defectos en todos los procesos de recombinación homóloga, mientras que Ciudad y colaboradores, reportaron que los mutantes *rad52-ΔΔ* de *C. albicans* también mostraron defectos en los procesos de HR, además que exhibieron telómeros largos y heterogéneos incluso en presencia de telomerasa. Sería interesante conocer si esta proteína y la HR también están involucradas en los proceso de mantenimiento de telómeros en *C. tropicalis* (Andaluz *et al.* 2001; Chauhan *et al.* 2005; Ciudad *et al.* 2004; Fisher *et al.* 2011; Garcia-Prieto *et al.* 2010; MacCallum 2009; Symington 2002).

Estos estudios de supervivencia se complementaron con el análisis histopatológico y la cuantificación de la carga fúngica en riñón para estimar el grado de invasión. En la infección inicial por la cepa CAF2-1, las cargas renales del hongo

fueron aumentando conforme la infección a partir de las 24 h, momento en que los riñones mostraron un daño severo. En los riñones de ratones infectados por la cepa MYA3404 ó su mutante *Ctrad51-ΔΔ* este daño fue observable a los 2 días posteriores a la infección. Cabe mencionar, que en el riñón de ambas especies fue posible observar los filamentos del hongo. Por el contrario, en el mutante *Ctrad52-ΔΔ* las cargas renales permanecieron más o menos constantes y el daño al riñón no fue apreciable. MacCallum y colaboradores reportaron que las cargas renales en los ratones infectados con cepas virulentas continúan aumentando hasta que los ratones se vuelven gravemente enfermos. Por el contrario, en la infección que se presenta por las cepas atenuadas, las cargas renales permanecen más o menos constantes a lo largo de infección. Además, refieren que la interacción temprana y la progresión de la enfermedad entre *Candida* y el hospedero se prevén en el nivel del daño provocado al riñón, principal órgano afectado en este modelo. También mencionan que la respuesta inmune producida por la infección en riñón, conduce a la producción de citocinas pro-inflamatorias para controlar el crecimiento del hongo, pero estas contribuyen al desarrollo de la sepsis y finalmente a la muerte en el ratón (Fisher *et al.* 2011; MacCallum 2009; MacCallum *et al.* 2009; Spellberg *et al.* 2003; Tomaszefski, Jr. & Abramowsky 1981).

En cuanto a los resultados obtenidos para la dosis letal media, el análisis de Probit, se puede considerar como un método práctico por su precisión y rapidez, por otro lado, los métodos aproximados (Reed Muench - Sperman Karber), son métodos consistentes, sencillos y se aproximan a métodos rigurosos. Para *C. albicans* va de acuerdo a lo reportado por Wingard y colaboradores en 1980, a partir de aislados de catéter y de sangre y a lo reportado Wingard y colaboradores en 1982 a partir de diferentes aislados de sangre. En el mutante *Ctrad51-ΔΔ* la dosis letal media fue menor significativamente comparada con lo reportado en este estudio para *C. albicans* y en la literatura para *C. tropicalis*, aunque sería necesario realizar más ensayos con un mayor número de dosis. También, sería interesante conocer el porcentaje de supervivencia de los ratones a diferentes dosis así como la LD₅₀ de la cepa de *C. tropicalis* MYA3404 (de *et al.* 1992; Fromtling *et al.* 1987; Miller & Ulrich 2001; Ramakrishnan 2016; Wang *et al.* 2010; Wingard *et al.* 1982).

Nuestros resultados sugieren que el mutante nulo *Ctrad51* resulta significativamente menos virulento a pesar de asociarse al riñón con la misma eficiencia que su cepa parental. Por lo tanto, la inhibición de los procesos de HR que implican la invasión de banda mediada por la pRad51, no parece disminuir la interacción del hongo con la células renales, a pesar del ligeramente mayor tiempo de generación del mutante, pero sí interfiere con su letalidad. Symington describió en *S. cerevisiae* un grado significativo de recombinación en mutantes *rad51-ΔΔ*, sugiriendo que existen mecanismos alternativos de recombinación que ocurre en ausencia del gen *RAD51* donde participa la pRad52, por lo que sería interesante conocer cuál de los mecanismos de letalidad está comprometido en este mutante, ya que dicho mecanismo necesitaría procesos de HR como DSBR, SDSA ó BIR. La menor asociación de *Ctrad52-ΔΔ* con el riñón podría deberse a su considerable mayor tiempo de generación, lo que repercutiría en una menor virulencia. Sin embargo, puesto que la proteína Rad52 participa en todos los mecanismos de HR, en él mutante *Ctrad52-ΔΔ* estarían inhibidos los mismos procesos de HR que en el mutante *Ctrad51-ΔΔ*. Adicionalmente, el mutante *Ctrad52-ΔΔ* sería incapaz de llevar a cabo procesos de HR que ocurren en ausencia de la pRad51 (SSA, BIR-independiente de Rad51). Es pues posible que alguno de estos procesos sea también necesario, o coopere significativamente a la virulencia del hongo en el sistema experimental de ratón.

IX. CONCLUSIONES

La virulencia de los mutantes *Ctrd51-ΔΔ* y *Ctrd52-ΔΔ* fue dependiente de las dosis administradas. La dosis 1×10^5 no generó la muerte en los ratones infectados con las cepas mutantes, mientras que las dosis 1×10^6 el mutante *Ctrd51-ΔΔ* fue virulento con un 30 % de mortalidad al contrario del mutante *Ctrd52-ΔΔ* que no mostró mortalidad en los ratones.

La delección de los genes *RAD51* y *RAD52* disminuyó la virulencia de los mutantes en comparación con la cepa silvestre MYA3404. Esto podría atribuirse a que los mutantes, en especial *Ctrd52-ΔΔ*, poseen defectos en procesos de recombinación homóloga, tal como indica su mayor sensibilidad a diferentes agentes que causan DSBS, su menor viabilidad y adaptabilidad.

Las cepas silvestres de *C. albicans* CAF2-1 y *C. tropicalis* MYA3404 mostraron una virulencia similar. Sin embargo, el alcance de la infección fue distinto para ambas especies, la colonización y la posterior diseminación por *C. albicans* fue más rápida que por *C. tropicalis*.

Este modelo ofrece un sistema rápido y reproducible para evaluar la virulencia entre diferentes cepas de hongos, que lo correlaciona con las observaciones de candidosis descritas en humanos.

X. REFERENCIAS

- Al-Fattani, M. A., and L. J. Douglas, 2006 Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J.Med.Microbiol.* **55**: 999-1008.
- Andaluz, E., A. Bellido, J. Gomez-Raja, A. Selmecki, K. Bouchonville *et al.* 2011 Rad52 function prevents chromosome loss and truncation in *Candida albicans*. *Mol.Microbiol.* **79**: 1462-1482.
- Andaluz, E., R. Calderone, G. Reyes, and G. Larriba, 2001 Phenotypic analysis and virulence of *Candida albicans* LIG4 mutants. *Infect.Immun.* **69**: 137-147.
- Andaluz, E., J. Gomez-Raja, B. Hermosa, T. Ciudad, E. Rustchenko *et al.* 2007 Loss and fragmentation of chromosome 5 are major events linked to the adaptation of rad52-DeltaDelta strains of *Candida albicans* to sorbose. *Fungal.Genet.Biol.* **44**: 789-798.
- Andersen, S. L., and J. Sekelsky, 2010 Meiotic versus mitotic recombination: two different routes for double-strand break repair: the different functions of meiotic versus mitotic DSB repair are reflected in different pathway usage and different outcomes. *Bioessays* **32**: 1058-1066.
- Banerjee, B., R. M. SD, and S. Baliga, 2015 Clinico-microbiological study of candidemia in a tertiary care hospital of southern part of India. *Iran J.Microbiol.* **7**: 55-61.
- Bassetti, M., E. Righi, A. Costa, R. Fasce, M. P. Molinari *et al.* 2006 Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. *BMC.Infect.Dis.* **6**: 21.
- Bellini, A., P. M. Girard, L. Tessier, E. Sage, and S. Francesconi, 2014 Fission yeast Rad52 phosphorylation restrains error prone recombination pathways. *PLoS.One.* **9**: e95788.
- Bennett, R. J., 2009 A *Candida*-based view of fungal sex and pathogenesis. *Genome Biol.* **10**: 230.
- Butler, G., M. D. Rasmussen, M. F. Lin, M. A. Santos, S. Sakthikumar *et al.* 2009 Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* **459**: 657-662.
- Calera, J. A., X. J. Zhao, and R. Calderone, 2000 Defective hyphal development and avirulence caused by a deletion of the SSK1 response regulator gene in *Candida albicans*. *Infect.Immun.* **68**: 518-525.

- Chauhan, N., T. Ciudad, A. Rodriguez-Alejandre, G. Larriba, R. Calderone *et al.* 2005 Virulence and karyotype analyses of rad52 mutants of *Candida albicans*: regeneration of a truncated chromosome of a reintegrant strain (rad52/RAD52) in the host. *Infect.Immun.* **73**: 8069-8078.
- Chen, Y. N., H. J. Lo, C. C. Wu, H. C. Ko, T. P. Chang *et al.* 2011 Loss of heterozygosity of FCY2 leading to the development of flucytosine resistance in *Candida tropicalis*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **55**: 2506-2514.
- Ciudad, T., E. Andaluz, O. Steinberg-Neifach, N. F. Lue, N. A. Gow *et al.* 2004 Homologous recombination in *Candida albicans*: role of CaRad52p in DNA repair, integration of linear DNA fragments and telomere length. *Mol.Microbiol.* **53**: 1177-1194.
- Corzo-Leon, D. E., T. Alvarado-Matute, A. L. Colombo, P. Cornejo-Juarez, J. Cortes *et al.* 2014 Surveillance of *Candida* spp bloodstream infections: epidemiological trends and risk factors of death in two Mexican tertiary care hospitals. *PLoS.One.* **9**: e97325.
- da Silva, C. R., J. B. de Andrade Neto, J. J. Sidrim, M. R. Angelo, H. I. Magalhaes *et al.* 2013 Synergistic effects of amiodarone and fluconazole on *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. *Antimicrob.Agents Chemother.* **57**: 1691-1700.
- da Silva, D. A., K. K. Lee, I. Raziunaite, K. Schaefer, J. Wagener *et al.* 2016 Cell biology of *Candida albicans*-host interactions. *Curr.Opin.Microbiol.* **34**: 111-118.
- Daley, J. M., and T. E. Wilson, 2005 Rejoining of DNA double-strand breaks as a function of overhang length. *Mol.Cell Biol.* **25**: 896-906.
- Davis, A. J., B. P. Chen, and D. J. Chen, 2014 DNA-PK: a dynamic enzyme in a versatile DSB repair pathway. *DNA Repair (Amst)* **17**: 21-29.
- de Repentigny. L., M. Phaneuf, and L. G. Mathieu, 1992 Gastrointestinal colonization and systemic dissemination by *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in intact and immunocompromised mice. *Infect.Immun.* **60**: 4907-4914.
- Devrim, I., B. Demirag, Y. Yaman, N. Bayram, F. Ozdemir *et al.* 2015 A 7-year study of the distribution of nosocomial candidemia in children with cancer. *Turk.J.Pediatr.* **57**: 225-229.
- Doi, A. M., A. C. Pignatari, M. B. Edmond, A. R. Marra, L. F. Camargo *et al.* 2016 Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. *PLoS.One.* **11**: e0146909.

- Feri, A., R. Loll-Krippelber, P. H. Commere, C. Maufrais, N. Sertour *et al.* 2016 Analysis of Repair Mechanisms following an Induced Double-Strand Break Uncovers Recessive Deleterious Alleles in the *Candida albicans* Diploid Genome. *MBio*. **7**.
- Fisher, J. F., K. Kavanagh, J. D. Sobel, C. A. Kauffman, and C. A. Newman, 2011 *Candida* urinary tract infection: pathogenesis. *Clin.Infect.Dis.* **52 Suppl 6**: S437-S451.
- Flott, S., Y. Kwon, Y. Z. Pigli, P. A. Rice, P. Sung *et al.* 2011 Regulation of Rad51 function by phosphorylation. *EMBO Rep.* **12**: 833-839.
- Fonzi, W. A., and M. Y. Irwin, 1993 Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**: 717-728.
- Forastiero, A., A. C. Mesa-Arango, A. Alastruey-Izquierdo, L. Alcazar-Fuoli, L. Bernal-Martinez *et al.* 2013 *Candida tropicalis* antifungal cross-resistance is related to different azole target (Erg11p) modifications. *Antimicrob.Agents Chemother.* **57**: 4769-4781.
- Ford, C. B., J. M. Funt, D. Abbey, L. Issi, C. Guiducci *et al.* 2015 The evolution of drug resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. *Elife*. **4**: e00662.
- Frit, P., N. Barboule, Y. Yuan, D. Gomez, and P. Calsou, 2014 Alternative end-joining pathway(s): bricolage at DNA breaks. *DNA Repair (Amst)* **17**: 81-97.
- Fromtling, R. A., G. K. Abruzzo, and D. M. Giltinan, 1987 *Candida tropicalis* infection in normal, diabetic, and neutropenic mice. *J.Clin.Microbiol.* **25**: 1416-1420.
- Gaines, W. A., S. K. Godin, F. F. Kabbavar, T. Rao, A. P. VanDemark *et al.* 2015 Promotion of presynaptic filament assembly by the ensemble of *S. cerevisiae* Rad51 paralogues with Rad52. *Nat.Comm.* **6**: 7834.
- Garcia-Prieto, F., J. Gomez-Raja, E. Andaluz, R. Calderone, and G. Larriba, 2010 Role of the homologous recombination genes RAD51 and RAD59 in the resistance of *Candida albicans* to UV light, radiomimetic and anti-tumor compounds and oxidizing agents. *Fungal.Genet.Biol.* **47**: 433-445.
- Gonzalez, G. M., M. Elizondo, and J. Ayala, 2008 Trends in species distribution and susceptibility of bloodstream isolates of *Candida* collected in Monterrey, Mexico, to seven antifungal agents: results of a 3-year (2004 to 2007) surveillance study. *J.Clin.Microbiol.* **46**: 2902-2905.

Guinea, J., 2014 Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clin.Microbiol.Infect.* **20 Suppl 6**: 5-10.

Haber, J. E., 2003 Aging: the sins of the parents. *Curr.Biol.* **13**: R843-R845.

HASENCLEVER, H. F., and W. O. MITCHELL, 1961 Pathogenicity of *C. albicans* and *C. tropicalis*. *Sabouraudia.* **1**: 16-21.

Hoot, S. J., X. Zheng, C. J. Potenski, T. C. White, and H. L. Klein, 2011 The role of *Candida albicans* homologous recombination factors Rad54 and Rdh54 in DNA damage sensitivity. *BMC.Microbiol.* **11**: 214.

Hoyer, L. L., R. Fundyga, J. E. Hecht, J. C. Kapteyn, F. M. Klis *et al.* 2001 Characterization of agglutinin-like sequence genes from non-*albicans* *Candida* and phylogenetic analysis of the ALS family. *Genetics* **157**: 1555-1567.

Ii, M., T. Ii, L. I. Mironova, and S. J. Brill, 2011 Epistasis analysis between homologous recombination genes in *Saccharomyces cerevisiae* identifies multiple repair pathways for Sgs1, Mus81-Mms4 and RNase H2. *Mutat.Res.* **714**: 33-43.

Ivanov, E. L., and J. E. Haber, 1997 DNA repair: RAD alert. *Curr.Biol.* **7**: R492-R495.

Jae-Chen, S., J. Young-Joo, P. Seon-Min, S. S. Kang, S. Jung-Hyun *et al.* 2015 Mechanism underlying renal failure caused by pathogenic *Candida albicans* infection. *Biomed.Rep.* **3**: 179-182.

Jiang, H., Y. Xie, P. Houston, K. Stemke-Hale, U. H. Mortensen *et al.* 1996 Direct association between the yeast Rad51 and Rad54 recombination proteins. *J.Biol.Chem.* **271**: 33181-33186.

Jones, S. K., Jr., M. P. Hirakawa, and R. J. Bennett, 2014 Sexual biofilm formation in *Candida tropicalis* opaque cells. *Mol.Microbiol.* **92**: 383-398.

Karkowska-Kuleta, J., D. Zajac, O. Bochenska, and A. Kozik, 2015 Surfaceome of pathogenic yeasts, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*, revealed with the use of cell surface shaving method and shotgun proteomic approach. *Acta Biochim.Pol.* **62**: 807-819.

Karpenshif, Y., and K. A. Bernstein, 2012 From yeast to mammals: recent advances in genetic control of homologous recombination. *DNA Repair (Amst)* **11**: 781-788.

- Kozik, A., J. Karkowska-Kuleta, D. Zajac, O. Bochenska, S. Kedracka-Krok *et al.* 2015 Fibronectin-, vitronectin- and laminin-binding proteins at the cell walls of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* pathogenic yeasts. *BMC.Microbiol.* **15**: 197.
- Lackey, E., G. Vipulanandan, D. S. Childers, and D. Kadosh, 2013 Comparative evolution of morphological regulatory functions in *Candida* species. *Eukaryot.Cell* **12**: 1356-1368.
- Lee, C. S., R. W. Wang, H. H. Chang, D. Capurso, M. R. Segal *et al.* 2016 Chromosome position determines the success of double-strand break repair. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **113**: E146-E154.
- Lee, M. S., M. Yu, K. Y. Kim, G. H. Park, K. Kwack *et al.* 2015 Functional Validation of Rare Human Genetic Variants Involved in Homologous Recombination Using *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS.One.* **10**: e0124152.
- Lisby, M., and R. Rothstein, 2009 Choreography of recombination proteins during the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)* **8**: 1068-1076.
- MacCallum, D. M., 2009 Massive induction of innate immune response to *Candida albicans* in the kidney in a murine intravenous challenge model. *FEMS Yeast Res.* **9**: 1111-1122.
- MacCallum, D. M., 2012 Hosting infection: experimental models to assay *Candida* virulence. *Int.J.Microbiol.* **2012**: 363764.
- MacCallum, D. M., L. Castillo, A. J. Brown, N. A. Gow, and F. C. Odds, 2009 Early-expressed chemokines predict kidney immunopathology in experimental disseminated *Candida albicans* infections. *PLoS.One.* **4**: e6420.
- Magalhaes, Y. C., M. R. Bomfim, L. C. Melonio, P. C. Ribeiro, L. M. Cosme *et al.* 2015 Clinical significance of the isolation of *Candida* species from hospitalized patients. *Braz.J.Microbiol.* **46**: 117-123.
- Mancera, E., A. M. Porman, C. A. Cuomo, R. J. Bennett, and A. D. Johnson, 2015 Finding a Missing Gene: EFG1 Regulates Morphogenesis in *Candida tropicalis*. *G3.(Bethesda.)* **5**: 849-856.
- McManus, B. A., and D. C. Coleman, 2014 Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Candida albicans*. *Infect.Genet.Evol.* **21**: 166-178.
- Miller, J., and R. Ulrich, 2001 On the analysis of psychometric functions: the Spearman-Kärber method. *Percept.Psychophys.* **63**: 1399-1420.

Morales, L., and B. Dujon, 2012 Evolutionary role of interspecies hybridization and genetic exchanges in yeasts. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **76**: 721-739.

Morita, T., Y. Yoshimura, A. Yamamoto, K. Murata, M. Mori *et al.* 1993 A mouse homolog of the *Escherichia coli* *recA* and *Saccharomyces cerevisiae* *RAD51* genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**: 6577-6580.

Motta, F. A., L. M. Dalla-Costa, M. D. Muro, M. N. Cardoso, G. L. Picharski *et al.* 2016 Risk factors for candidemia mortality in hospitalized children. *J.Pediatr.(Rio J.)* .

Nucci, M., F. Queiroz-Telles, T. Alvarado-Matute, I. N. Tiraboschi, J. Cortes *et al.* 2013 Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *PLoS.One.* **8**: e59373.

Oliveira, V. K., L. S. Ruiz, N. A. Oliveira, D. Moreira, R. C. Hahn *et al.* 2014 Fungemia caused by *Candida* species in a children's public hospital in the city of Sao Paulo, Brazil: study in the period 2007-2010. *Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo* **56**: 301-305.

Pardo, B., B. Gomez-Gonzalez, and A. Aguilera, 2009 DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cell Mol.Life Sci.* **66**: 1039-1056.

Pfaller, M. A., and D. J. Diekema, 2007 Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin.Microbiol.Rev.* **20**: 133-163.

Porman, A. M., K. Alby, M. P. Hirakawa, and R. J. Bennett, 2011 Discovery of a phenotypic switch regulating sexual mating in the opportunistic fungal pathogen *Candida tropicalis*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **108**: 21158-21163.

Porman, A. M., M. P. Hirakawa, S. K. Jones, N. Wang, and R. J. Bennett, 2013 MTL-independent phenotypic switching in *Candida tropicalis* and a dual role for *Wor1* in regulating switching and filamentation. *PLoS.Genet.* **9**: e1003369.

Priest, S. J., and M. C. Lorenz, 2015 Characterization of Virulence-Related Phenotypes in *Candida* Species of the CUG Clade. *Eukaryot.Cell* **14**: 931-940.

Ramakrishnan, M. A., 2016 Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J.Virol.* **5**: 85-86.

Sahand, I. H., M. D. Moragues, E. Eraso, M. Villar-Vidal, G. Quindos *et al.* 2005 Supplementation of CHROMagar *Candida* medium with Pal's medium for rapid identification of *Candida dubliniensis*. *J.Clin.Microbiol.* **43**: 5768-5770.

Seervai, R. N., S. K. Jones, Jr., M. P. Hirakawa, A. M. Porman, and R. J. Bennett, 2013 Parasexuality and ploidy change in *Candida tropicalis*. *Eukaryot.Cell* **12**: 1629-1640.

Seneviratne, C. J., S. Rajan, S. S. Wong, D. N. Tsang, C. K. Lai *et al.* 2016 Antifungal Susceptibility in Serum and Virulence Determinants of *Candida* Bloodstream Isolates from Hong Kong. *Front Microbiol.* **7**: 216.

Shen, Z., K. G. Cloud, D. J. Chen, and M. S. Park, 1996 Specific interactions between the human RAD51 and RAD52 proteins. *J.Biol.Chem.* **271**: 148-152.

Silva, S., M. Negri, M. Henriques, R. Oliveira, D. W. Williams *et al.* 2012 *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol.Rev.* **36**: 288-305.

Silva-Dias, A., I. M. Miranda, J. Branco, M. Monteiro-Soares, C. Pina-Vaz *et al.* 2015 Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp. *Front Microbiol.* **6**: 205.

Song, B., and P. Sung, 2000 Functional interactions among yeast Rad51 recombinase, Rad52 mediator, and replication protein A in DNA strand exchange. *J.Biol.Chem.* **275**: 15895-15904.

Souza, M. N., S. O. Ortiz, M. M. Mello, F. M. Oliveira, L. C. Severo *et al.* 2015 COMPARISON BETWEEN FOUR USUAL METHODS OF IDENTIFICATION OF *Candida* SPECIES. *Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo* **57**: 281-287.

Spellberg, B., D. Johnston, Q. T. Phan, J. E. Edwards, Jr., S. W. French *et al.* 2003 Parenchymal organ, and not splenic, immunity correlates with host survival during disseminated candidiasis. *Infect.Immun.* **71**: 5756-5764.

Symington, L. S., 2002 Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **66**: 630-70, table.

Symington, L. S., R. Rothstein, and M. Lisby, 2014 Mechanisms and regulation of mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **198**: 795-835.

Taylor, M. R., M. Spirek, K. R. Chaurasiya, J. D. Ward, R. Carzaniga *et al.* 2015 Rad51 Paralogs Remodel Pre-synaptic Rad51 Filaments to Stimulate Homologous Recombination. *Cell* **162**: 271-286.

Thompson, D. S., P. L. Carlisle, and D. Kadosh, 2011 Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot.Cell* **10**: 1173-1182.

Tomashefski, J. F., Jr., and C. R. Abramowsky, 1981 Candida-associated renal papillary necrosis. *Am.J.Clin.Pathol.* **75**: 190-194.

Trevijano-Contador, N., C. Rueda, and O. Zaragoza, 2016 Fungal morphogenetic changes inside the mammalian host. *Semin.Cell Dev.Biol.* **57**: 100-109.

Tsukamoto, Y., and H. Ikeda, 1998 Double-strand break repair mediated by DNA end-joining. *Genes Cells* **3**: 135-144.

van der Mei, H. C., K. J. Buijssen, B. F. van der Laan, E. Ovchinnikova, G. I. Geertsema-Doornbusch *et al.* 2014 Voice prosthetic biofilm formation and Candida morphogenic conversions in absence and presence of different bacterial strains and species on silicone-rubber. *PLoS.One.* **9**: e104508.

Wang, Q., Y. Zheng, J. Lu, L. Chen, J. Wang *et al.* 2010 Selective breeding of mice strains with different sensitivity to isoflurane. *Chin Med.J.(Engl.)* **123**: 1315-1319.

Wang, R. C., A. Smogorzewska, and L. T. de, 2004 Homologous recombination generates T-loop-sized deletions at human telomeres. *Cell* **119**: 355-368.

Wingard, J. R., J. D. Dick, W. G. Merz, G. R. Sandford, R. Saral *et al.* 1980 Pathogenicity of *Candida tropicalis* and *Candida albicans* after gastrointestinal inoculation in mice. *Infect.Immun.* **29**: 808-813.

Wingard, J. R., J. D. Dick, W. G. Merz, G. R. Sandford, R. Saral *et al.* 1982 Differences in virulence of clinical isolates of *Candida tropicalis* and *Candida albicans* in mice. *Infect.Immun.* **37**: 833-836.

Yamamura, D. L., C. Rotstein, L. E. Nicolle, and S. Ioannou, 1999 Candidemia at selected Canadian sites: results from the Fungal Disease Registry, 1992-1994. *Fungal Disease Registry of the Canadian Infectious Disease Society. CMAJ.* **160**: 493-499.

ABREVIATURAS

| | |
|------------------|--|
| Δ | Disrupción |
| °C | Grado centígrado |
| μ l | Micro litro |
| μ m | Micrómetro |
| 5FC | 5 fluorocitosina |
| aa | Aminoácido |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ALS | Secuencias tipo aglutininas |
| ATP | Adenosin 5´trifosfato |
| BIR | Replicación inducida por rotura |
| CBSI | Infecciones en sangre por <i>Candida</i> |
| Cél | Células |
| D.O. | Densidad óptica |
| DSBR | Reparación de la rotura de la doble cadena |
| DSBs | Rotura de la doble cadena |
| FLC | Fluconazol |
| g | Gramo |
| h | Hora |
| HhH-ADN | Hélice-horquilla-hélice |
| HR | Recombinación homóloga |
| I.V. | Vía intravenosa |
| LD ₅₀ | Dosis letal media |
| LOH | Pérdida de heterocigosidad |
| min | Minuto |
| ml | Mililitros |
| NAC | No <i>Candida albicans</i> |
| NACs | Non- <i>albicans Candida species</i> |
| NHEJ | Non-Homologous End Joining |
| PAS | Ácido Periódico de Schiff |
| pb | Pares de bases |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |

| | |
|-------|---|
| PFGE | Electroforesis en gel de campo pulsado |
| PIA | Polisacárido intracelular de adhesión |
| RAPD | ADN polimórfico amplificado al aleatoriamente |
| RFLP | Polimorfismos de longitud por fragmentos de restricción |
| s | Segundo |
| SAP | Aspartil proteasas secretadas |
| SDA | Agar dextrosa sabouraud |
| SDSA | Anillamiento de la cadena dependiente de síntesis |
| SNP | Polimorfismos de un solo nucleótido |
| Spp | especies |
| SSA | Anillamiento de la cadena sencilla |
| ssADN | ADN de cadena sencilla |
| SSF | Solución salina fisiológica |
| UFC | Unidades formadoras de colonia |
| v | Volumen |
| YPD | Extracto de levadura peptona |

ANEXO 1

Resultados de la primera fase experimental para la cepa CAF2-1. En la figura 1, se muestran las 5 dosis administradas y la respuesta a lo largo de 30 días. Estos resultados se tomaron como base para establecer el intervalo de las dosis administradas así como el tiempo de infección a los mutantes.

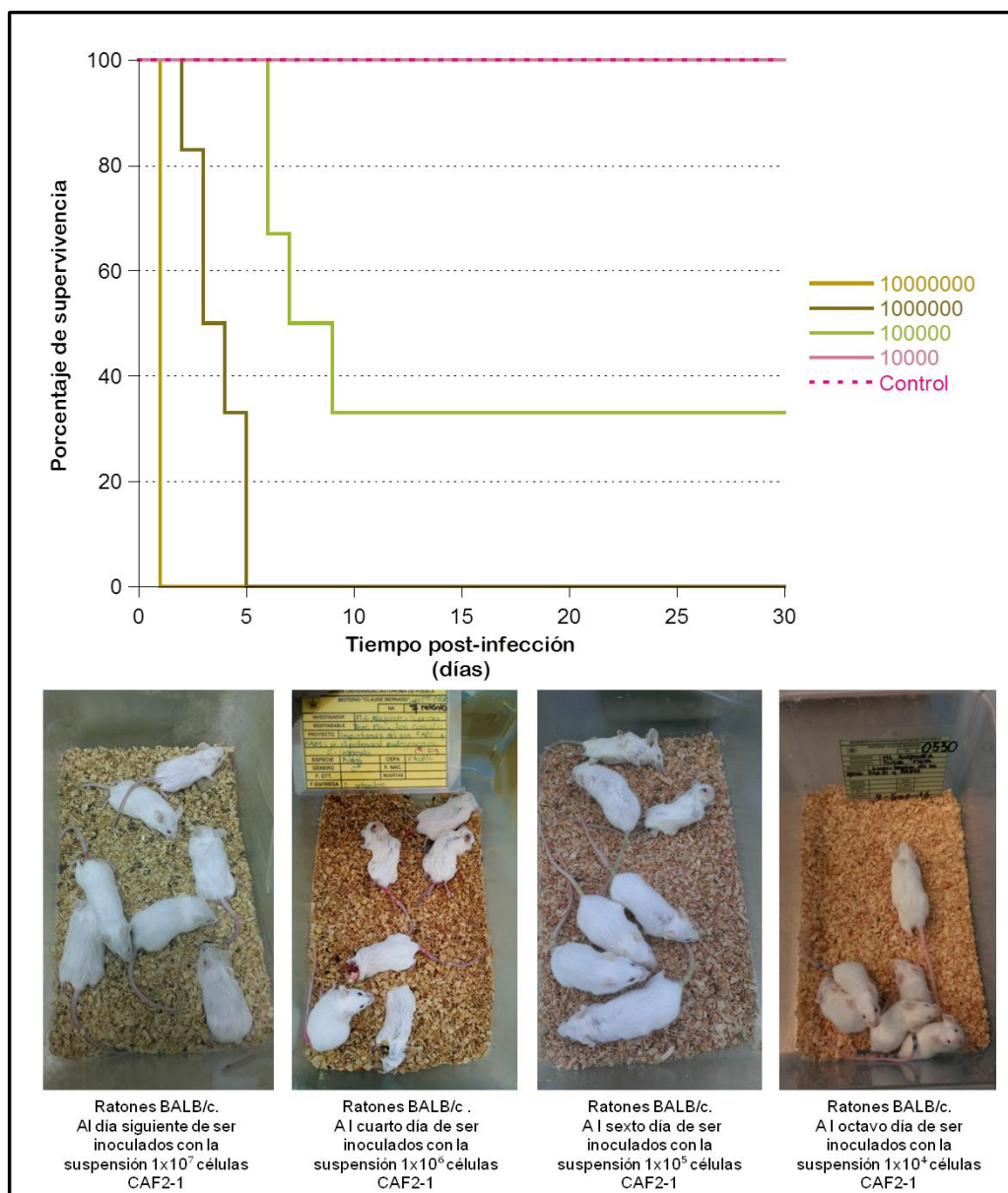


FIGURA 1. Curva de supervivencia. Porcentaje de supervivencia de los ratones inoculados con la cepa CAF2-1 respecto al tiempo (días).

Resultados de las cargas fúngicas de la cepa MYA3404 en diferentes órganos. En la figura 2, se observa que el riñón fue el principal órgano en ser colonizado por este hongo desde las 24 h, seguido por el bazo y el hígado donde se registra una constante carga fúngica dentro del periodo post-infección. Estos datos se tomaron en consideración para establecer al riñón como el órgano principalmente afectado y con una mayor colonización desde las 24 horas post-infección.

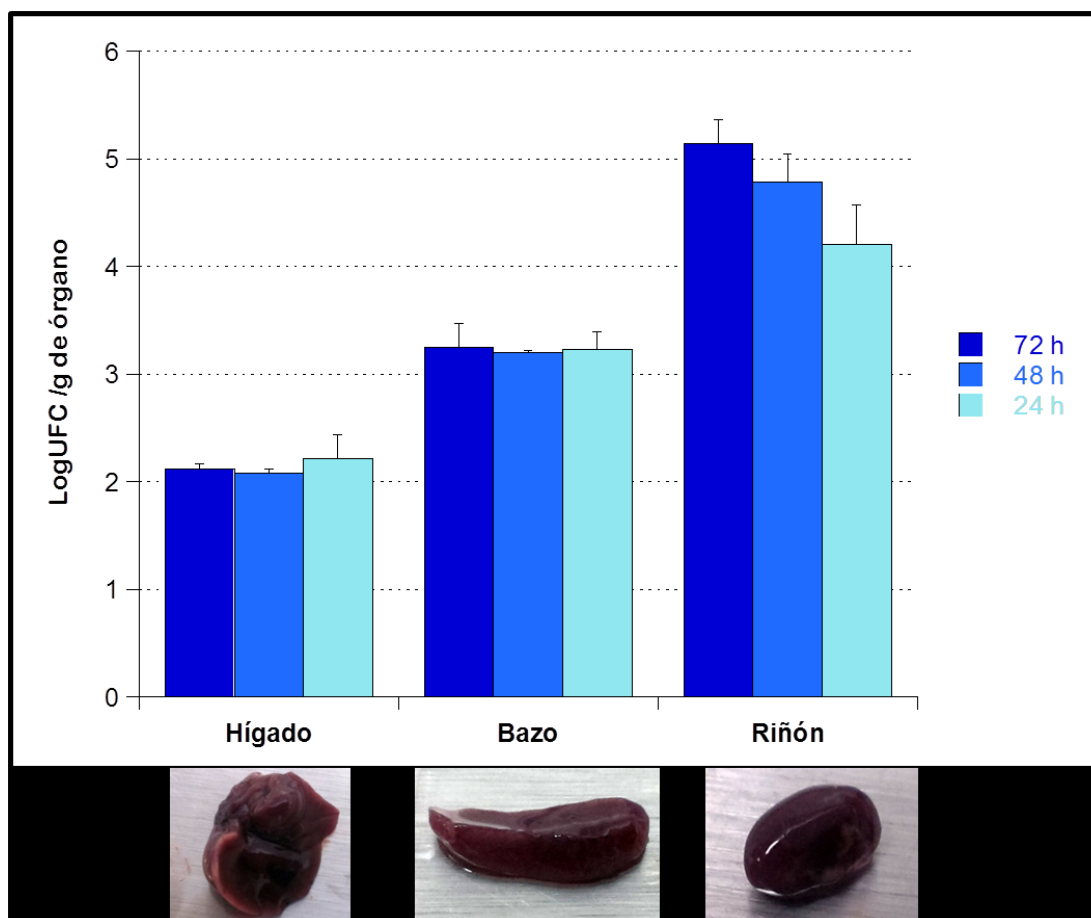


FIGURA 2. Capacidad de colonización de la cepa MYA3404 a diferentes órganos. Los datos corresponden al Log UFC por g de órgano respecto al tiempo post-infección (24, 48 y 72 h) de la cepa MYA3404.

Resultados obtenidos de la determinación de las UFC por gramo de riñón en diferentes medios de cultivo para la cepa MYA3404. Se observó que en el medio rico YPD como en el medio CHROMagar Candida, se encontró un número similar de UFC a pesar de que el medio CHROMagar esta adicionado con antibiótico que inhibe el crecimiento de bacterias y algunos hongos, en cuanto al medio mycosel se obtuvo un bajo conteo de UFC esto podría deberse a los antibióticos adicionados que retardan o inhiben el crecimiento.

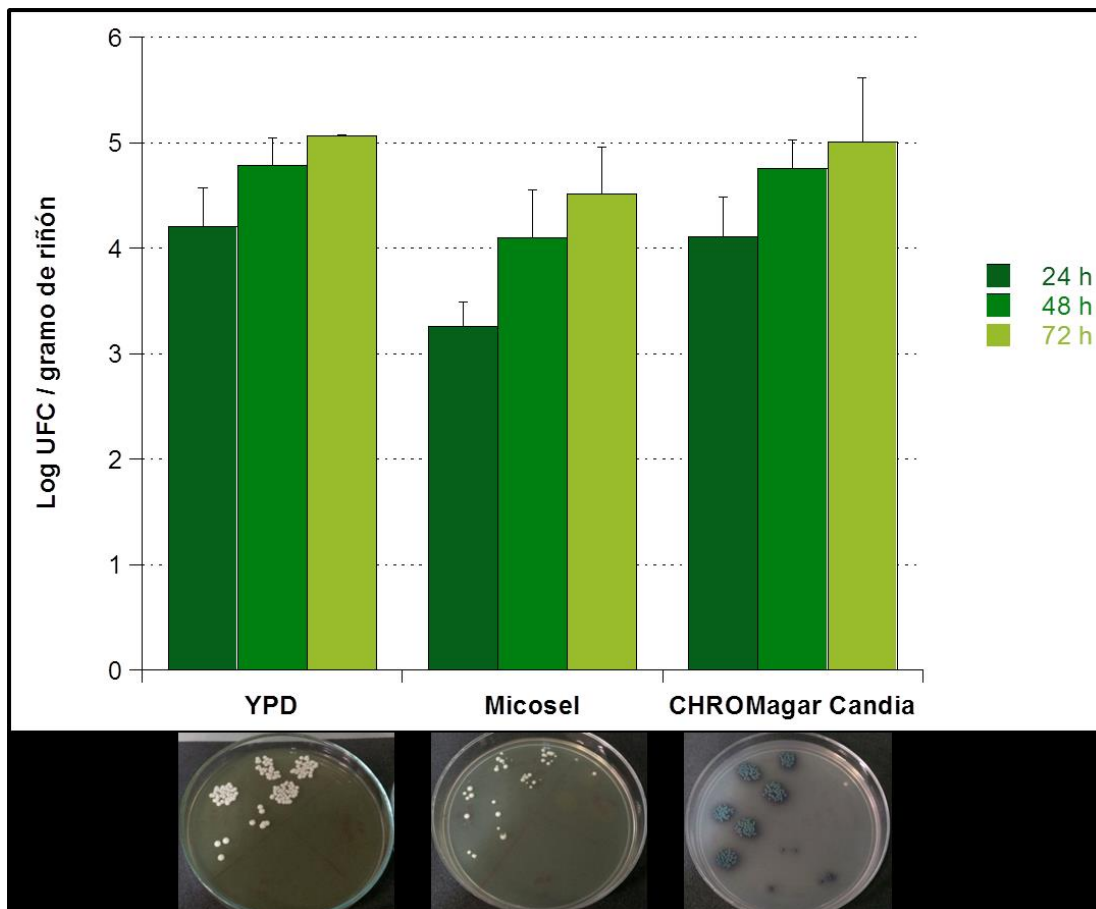


FIGURA 3. Capacidad de colonización de la cepa MYA3404 a riñón. Los datos que se muestran corresponden al Log UFC por gramo de riñón respecto al tiempo post-infección (24, 48 y 72 h) en diferentes medios de cultivo.

ANEXO 2

Cálculos efectuados para la obtención de la dosis media efectiva para la cepa CAF2-1.

TABLA 1. Determinación de la LD₅₀ con el método Reed Muench para CAF2-1.

| Dilución | Ratón | | Total acumulativo | | | Porcentaje de mortalidad |
|----------|---------|-------|-------------------|----------------|-------|--------------------------|
| | Muertos | Vivos | Muertos | Supervivientes | Total | |
| 10000 | 3 | 7 | 3 | 14 | 17 | 17.65 |
| 100000 | 5 | 5 | 8 | 7 | 15 | 53.33 |
| 1000000 | 8 | 2 | 16 | 2 | 18 | 88.89 |
| 10000000 | 10 | 0 | 26 | 0 | 26 | 100 |

TABLA 2. Determinación de la LD₅₀ con el método Sperman Karber para CAF2-1.

| Dilución | Log ₁₀ dilución | Ratones | | | Proporción muertos |
|----------|----------------------------|---------|-------|---------|--------------------|
| | | número | Vivos | muertos | |
| 10000000 | 7 | 10 | 10 | 0 | 1 |
| 1000000 | 6 | 10 | 8 | 2 | 0.8 |
| 100000 | 5 | 10 | 5 | 5 | 0.8 |
| 10000 | 4 | 10 | 3 | 7 | 0.3 |

TABLA 3. Porcentaje dosis-respuesta para CAF2-1 método Probit.

| Porcentaje mortalidad | Log dosis | Error estándar | CI al 95 % | |
|-----------------------|-----------|----------------|------------|----------|
| | | | Inferir | Superior |
| 10 | 3.28 | 0.62 | 0.50 | 4.10 |
| 20 | 3.81 | 0.48 | 1.74 | 4.48 |
| 30 | 4.19 | 0.40 | 2.61 | 4.78 |
| 40 | 4.51 | 0.34 | 3.31 | 5.07 |
| 50 | 4.82 | 0.30 | 3.92 | 5.39 |
| 60 | 5.12 | 0.28 | 4.44 | 5.81 |
| 70 | 5.44 | 0.30 | 4.87 | 6.37 |
| 80 | 5.83 | 0.35 | 5.26 | 7.15 |
| 90 | 6.35 | 0.47 | 5.70 | 8.33 |
| 99 | 7.61 | 0.80 | 6.58 | 11.30 |

Cálculos efectuados para la determinación de la dosis media efectiva para el mutante *Ctrad51-ΔΔ*.

TABLA 4. Determinación de LD₅₀ con el método Reed Muench para *Ctrad51-ΔΔ*.

| Dilución | Ratón | | Total acumulativo | | | Porcentaje de mortalidad |
|----------|---------|-------|-------------------|----------------|-------|--------------------------|
| | Muertos | Vivos | Muertos | Supervivientes | Total | |
| 100000 | 0 | 10 | 0 | 17 | 17 | 0 |
| 1000000 | 3 | 7 | 3 | 7 | 10 | 30 |
| 10000000 | 10 | 0 | 13 | 0 | 13 | 100 |

TABLA 5. Determinación de LD₅₀ método Sperman Karber para el mutante *Ctrad51-ΔΔ*.

| Dilución | Log ₁₀ dilución | Ratones | | | Proporción muertos |
|----------|----------------------------|---------|-------|---------|--------------------|
| | | número | vivos | muertos | |
| 10000000 | 7 | 10 | 10 | 0 | 1 |
| 1000000 | 6 | 10 | 3 | 7 | 0.3 |
| 100000 | 5 | 10 | 0 | 10 | 0.0 |

TABLA 6. Porcentaje dosis-respuesta para el mutante *Ctrad51-ΔΔ* método Probit.

| Porcentaje de mortalidad | Log dosis | Error estándar | CI al 95 % | |
|--------------------------|-----------|----------------|------------|----------|
| | | | Inferior | Superior |
| 10 | 5.27 | 0.27 | 4.22 | 5.68 |
| 20 | 5.54 | 0.22 | 4.78 | 5.91 |
| 30 | 5.74 | 0.20 | 5.14 | 6.11 |
| 40 | 5.90 | 0.19 | 5.42 | 6.31 |
| 50 | 6.06 | 0.19 | 5.65 | 6.54 |
| 60 | 6.21 | 0.20 | 5.84 | 6.80 |
| 70 | 6.38 | 0.22 | 6.01 | 7.11 |
| 80 | 6.57 | 0.25 | 6.19 | 7.50 |
| 90 | 6.84 | 0.31 | 6.41 | 8.07 |
| 99 | 7.48 | 0.47 | 6.86 | 9.48 |