



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
PUEBLA.**

**INSTITUTO DE CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS  
CICM-ICUAP.**

**“OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE  
LOS REINTEGRANTES *RAD 51* Y *RAD52* DE *Candida  
tropicalis*”.**

**TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)  
CON ORIENTACIÓN EN: BIOQUÍMICA Y GENÉTICA  
MICROBIANA.**

**PRESENTA: VERÓNICA LILIANA RAMIREZ FALCÓN.**

**DIRECTORES DE TESIS:**

**M.C. ALEJANDRA ESPINOSA TESIS.  
CICM-ICUAP**

**D. EN C. GERMAN LARRIBA CALLE.  
UNEX**

**NOVIEMBRE 2014.**

## AGRADECIMIENTOS



*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para la realización de esta tesis.*

## **GRACIAS!!!**

Quiero agradecer a la M en C Alejandra Espinosa Taxis por la oportunidad de dejarme desarrollarme como profesional en su laboratorio, en el cual me sentí muy a gusto ya que me permitió trabajar con respeto y dignidad, por ser una persona emprendedora y que como asesora impulsa a sus alumnos a explotar sus capacidades,

Agradezco al D en C German Larriba Calle por haberme abierto las puertas de su laboratorio, darme las facilidades para trabajar en el, ser mi tutor académico y apoyarme en mi formación en el camino de la ciencia.

Les quiero agradecer a los miembros del grupo de trabajo del departamento de microbiología de la universidad de Extremadura (UNEX), de todos ustedes aprendí mucho en el trabajo y de manera personal, a la D en C Antonia Ciudad por todos los conocimientos que compartió conmigo, a el D en C Jonathan Gómez siempre dispuesto a enseñar y resolver dudas, A la D en C María Rosario Cueva por siempre estar preocupada por que tengas lo necesario para trabajar, a la Técnico Belén Hermosa por compartir los tips para que las cosas salgan bien y por su apoyo, y por ultimo pero no el menos importante al próximo D en C Alberto Bellido por el tiempo que dedico para enseñarme a trabajar en el laboratorio, por explicarme cada paso, por su paciencia, por su apoyo y por su comprensión, gracias a todos ustedes les agradezco su amistad y el apoyo que todos y cada uno de ustedes me dieron para realizar este trabajo.

A toda mi familia mi madre, mi hijo, mi esposo, mis hermanos y la madre de mi esposo, gracias por compartir conmigo alegrías y tristezas, por apoyarme en los momentos difíciles, por ser mi soporte y sostén, por darme felicidad y por dejarme realizarme en todos los aspectos de mi vida.

Un ultimo agradecimiento a la Familia Vázquez Báez por su apoyo y por su asesoría en un momento difícil durante la maestría, por su amistad y por ser parte de mi familia, a Pati Vázquez por ser mi amiga, a mi compadre por ser el siempre y a los señores Vázquez por su apoyo.

<b>INDICE</b>	<b>Pag.</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>9-11</b>
<b>C I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>12-24</b>
<b>1. INFECCIONES NOSOCOMIALES (INS).</b>	
<b>2. INFECCIONES NOSOCOMIALES CAUSADAS POR HONGOS (INFS).</b>	
<b>3. GENERO <i>CANDIDA</i>.</b>	
<b>4. CANDIDIASIS.</b>	
<b>5. FACTORES DE VIRULENCIA.</b>	
<b>6. ADHESINAS Y LIGANDOS.</b>	
<b>7. <i>Candida tropicalis</i>.</b>	
<b>8. MORFOGÉNESIS.</b>	
<b>9. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.</b>	
<b>10. FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA.</b>	
<b>11. SWITCHING.</b>	
<b>12. CICLO PARASEXUAL DE <i>Candida tropicalis</i>.</b>	
<b>13. ADAPTABILIDAD.</b>	
<b>14. MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL DAÑO AL DNA.</b>	
<b>15. EVENTOS DE RECOMBINACIÓN.</b>	
<b>16. GENES DEL GRUPO EPISTATICO RAD52.</b>	
<b>17. RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA.</b>	
<b>18. EL PAPEL DE Rad51 EN LOS EVENTOS DE RECOMBINACIÓN.</b>	
<b>19. EL PAPEL DE Rad52 EN LOS EVENTOS DE RECOMBINACIÓN.</b>	
<b>20. TRATAMIENTOS NO QUIRÚRGICOS DEL CÁNCER.</b>	
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>25</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>26</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>26-27</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>28</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>28</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>28</b>
<b>ESQUEMAS DE TRABAJO</b>	<b>29-31</b>

## **C II. METODOLOGÍA**

33-47

### **1. CEPAS UTILIZADAS**

### **2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO**

### **3. PLÁSMIDOS UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO**

Plásmido pMB7.

Plásmido pMBX.

Plásmido pLA8.4.

Plásmido pV18.

### **4. TRANSFORMACIONES.**

Transformación en *Candida tropicalis* MYA-3404.

Transformación en *E. coli*

### **5. EXTRACCIONES DE ÁCIDOS NUCLEICOS.**

Extracción de DNA plasmídico.

Extracción de DNA Genómico.

### **6. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).**

### **7. CLONACIÓN DEL ORF DE *RAD51*.**

### **8. PROTOCOLO DE LIGACIÓN.**

### **9. CONSTRUCCIÓN DEL CASETE DE REINTEGRACIÓN.**

### **10. CONSTRUCCIÓN DE LOS MUTANTES *RAD52ΔΔ* EN EL FONDO GENÉTICO *C. tropicalis* MYA-3404.**

### **11. CONSTRUCCIÓN DEL MUTANTE *RAD51ΔΔ/RAD52ΔΔ* EN *C. tropicalis* MYA-3404 MUTANTE *RAD51ΔΔ*.**

### **12. ANÁLISIS FENOTÍPICO BÁSICO.**

Análisis macroscópico y microscópico.

Análisis de invasividad en agar.

Análisis de la velocidad de crecimiento.

### **13. ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD A AGENTES QUE DAÑAN EL DNA.**

Análisis de sensibilidad a la luz ultravioleta.

Análisis de sensibilidad a MMS, Camptotecina y Bleomicina.

Análisis de sensibilidad a MMS.

### **14. INICIADORES UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO.**

### **C III. RESULTADOS**

48-64

#### **1. OBTENCIÓN DE LOS MUTANTES EN EL FONDO MYA3404 DE *C. tropicalis*.**

##### **1. A. CONSTRUCCIÓN DEL REINTEGRANTE RAD51 EN *C. tropicalis*.**

##### **2.A. VERIFICACIÓN DEL CASETE DE INTERRUPCIÓN DE *Rad52* EN EL FONDO GENÉTICO MYA-3404.**

##### **3.A. GENERACIÓN DE MUTANTES NULOS $Ura^+ rad52::hisG/rad52::hisG-URA3-HisG$ .**

##### **3.B. GENERACIÓN DE MUTANTES NULOS $Ura^+ rad52::hisG/rad52::hisG$ .**

##### **4.A. DISRUPCIÓN DEL PRIMER ALELO DE *RAD52* EN EL FONDO *rad51-ΔΔ*.**

##### **4.B. GENERACIÓN DEL MUTANTE NULO $Ura^+ rad51-ΔΔ rad52::hisG/rad52::hisG-URA3-hisG$ .**

##### **4.C. GENERACIÓN DEL MUTANTE NULO $Ura^+ rad51-ΔΔ rad52::hisG/rad52::hisG$ .**

##### **5.A. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA BÁSICA**

###### **1. ANÁLISIS DE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO.**

###### **2. CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA.**

###### **3. CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA.**

###### **4. ANÁLISIS DE INVASIVIDAD EN AGAR.**

##### **5.B. ANÁLISIS DE LA SENSIBILIDAD A AGENTES QUE DAÑAN EL DNA.**

###### **1. ANÁLISIS DE LA SENSIBILIDAD A LUZ ULTRAVIOLETA.**

###### **2. ANÁLISIS DE LA SENSIBILIDAD A METIL METANO SULFONATO (MMS).**

###### **3. ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD A DROGAS ANTITUMORALES: CAMPTOTECINA (CPT) Y BLEOMICINA (BLM).**

### **DISCUSIÓN**

65-66

### **CONCLUSIÓN**

67

### **BIBLIOGRAFÍA**

68-71

**Fig 1.** Colonias en CHOMagar@candida, 1) *Candida albicans*, 2) *Candida glabrata*, 3) *Candida tropicalis*.

**Fig 2.** Candidiasis Esofágica y Cutánea en paciente femenino con VIH.

**Fig 3.** Fotografías de microscopia cofocal de la invasión de *Candida tropicalis* al epitelio oral humano después de 12 h de incubación.

**Fig 4.** Micrografías electrónicas de barrido de la formación de biopelículas por *C. albicans* (A) y *C. tropicalis* (B, C) en discos de catéteres de PVC DOI 10.1099/jmm.0.46569-0.

**Fig 5.** A) Morfología colonial y morfología microscópica ejemplificando el Switching fenotípico de *Candida tropicalis* doi:10.1371/journal.pgen.1003369.

**Fig 6.** Rotura de la DSB de DNA cuando se expone a agentes como Luz ultravioleta, Camptotecina, Bleomicina y MMS.

**Fig 7.** Verificación del plásmido pMBX.

**Fig 8.** Verificación de la construcción pLA8.4.

**Fig 9.** Verificación de la construcción del casete de reintegración pV18.

**Fig 10.** Diagrama de reintegración del gen *RAD51* en mutantes *rad51ΔΔ*.

**Fig 11.** Diagrama de Interrupción del gen *RAD52* en *C. tropicalis* MYA-3404 y en mutantes *rad51ΔΔ*.

**Fig 12.** Análisis Microscópico.

**Fig 13.** Análisis Macroscópico.

**Fig 14.** Análisis de velocidad de crecimiento.

**Fig 15.** Análisis de Invasividad.

**Fig 16.** Análisis de sensibilidad a Luz Ultravioleta.

**Fig 17.** Análisis de sensibilidad a MMS, CPT y BLM.

**Fig 18.** Análisis de sensibilidad a diferentes Concentraciones de MMS.

**Fig 19.** Construcción del casete de reintegración de *rad51* en *c. tropicalis*.

**Fig 20.** Diagrama de reintegración de *RAD51* en *C. tropicalis*.

**Fig 21.** Verificación del reintegrante *RAD51* (*rad51::hisG/rad51::RAD51-ura3-hisG*) en *C. tropicalis*.

**Fig 22.** Verificación del casete de interrupción de *RAD52* con sus regiones promotora y terminadora clonado en el plásmido pMB7. Abajo, verificación de la construcción.

**Fig 23.** Verificación de los mutantes nulos *rad52::hisG/rad52::hisG-URA3-hisG*.

**Fig. 24** Diagrama de interrupción y verificación del mutante nulo Ura-, (a) Marcador de peso molecular, (b) cepa tipo MYA3404, (c y d) mutante *rad51-ΔΔ /rad52::hisG/rad52::hisG* banda de 1.1 kb.

**Fig 25.** Diagrama de interrupción de un alelo y Verificación del transformante heterocigótico *rad52*, marcador de peso molecular (a), cepa tipo MYA-3404 gen silvestre (b), mutantes heterocigóticos *rad52* (c y d), mutante incorrecto(e).

**Fig 26.** Diagrama de interrupción del segundo alelo y comprobación del doble mutante por PCR, marcador de peso molecular (a) y mutante *rad51-ΔΔ /rad52::hisG-URA3-hisG/ rad52::hisG* (b) banda de 2.2 kb.

**Fig. 27** Diagrama de interrupción y verificación del mutante nulo Ura-, (a) Marcador de peso molecular, (b) cepa tipo MYA3404, (C) mutante *rad51-ΔΔ /rad52::hisG/rad52::hisG* banda de 1.1 kb.

**Fig 28.** Análisis de la velocidad de crecimiento.

**Fig 29.** Análisis microscópico la morfología celular de *C. tropicalis* MYA-3404 (a), *rad51-ΔΔ* (b) , *rad52ΔΔ* (c), *rad51-ΔΔ rad52ΔΔ*(d) y *RAD51*(e) se crecieron en medio rico YPD en agitación durante 18 h, las células fueron fotografiadas con un microscopio óptico y el objetivo 40X.

**Fig 30.** Análisis macroscópico de las cepas de *C. tropicalis* MYA-3404(a), *rad51-ΔΔ*(b), *rad52ΔΔ* (c) y *rad51-ΔΔ rad52-ΔΔ* (d) y *RAD51* (e) estas colonias fueron crecidas en agar YPD y las fotografías fueron tomadas con un microscopio óptico y el objetivo 6X.

**Fig 31.** Análisis macroscópico de *C. tropicalis* MYA-3404(a), *rad51-ΔΔ* (b) , *rad52-ΔΔ* (c), *rad51-ΔΔ rad52-ΔΔ* (d) y *RAD51* (e), estas colonias fueron crecidas en agar YPD y las fotografías fueron tomadas con un microscopio óptico y el objetivo 4X.

**Fig 32.** Análisis de invasividad en agar de las cepas MYA-3404 (a), los mutantes *rad51-ΔΔ* (b) , *rad52ΔΔ* (c y d) y el mutante *rad51-ΔΔ rad52-ΔΔ* (e). Fila superior: colonias de 5 días de cada una de las cepas. Fila inferior: las mismas colonias, una vez lavadas.

**Fig 33.** Análisis de la sensibilidad a luz UV. Las cepas indicadas se sometieron a dosis de 10,15,25 y 30 J/m<sup>2</sup>.

**Fig 34.** Análisis de la sensibilidad a tratamientos crónicos con MMS de las cepas indicadas se sometieron a las siguientes concentraciones de MMS 0.005,0.010 y 0.015%.

**Fig 35.** Análisis de la sensibilidad a MMS, las cepas utilizadas de *Candida albicans* CAF2(A y G), *rad52ΔΔ*(B), *rad51ΔΔ rad52ΔΔ* (C) y *rad51ΔΔ* (H); de *C. tropicalis* son las siguientes (D e I)MYA-3404, (J y K) *rad51ΔΔ*, (E) *rad52ΔΔ*, (F) *rad51ΔΔ rad52ΔΔ* y (L) *Rad51*. Se indican las concentraciones de MMS.

**Fig 36.** Análisis de la sensibilidad a CPT. Se analizaron las cepas de *C. albicans* CAF2 (A y G),*rad52ΔΔ* (B), *rad51ΔΔ rad5-ΔΔ* (C) y *rad51ΔΔ* (H); de *C. tropicalis* MYA-3404 (D e I) *rad51-ΔΔ* (J y K), *rad52ΔΔ* (E) *rad51-ΔΔ rad52-ΔΔ* (F) y el reintegrante *RAD51* (L). Se indican las concentraciones de CPT utilizadas.

**Fig 37.** Análisis de la sensibilidad a BLM. Se analizaron las cepas de *C. albicans* CAF2 (A y G), *rad52-ΔΔ* (B), *rad51-ΔΔ rad52-ΔΔ* (C) y *rad51-ΔΔ* (H); de *C. tropicalis* MYA-3404 (D e I) *rad51-ΔΔ* (J y K), *rad52ΔΔ* (E) *rad51-ΔΔ rad52-ΔΔ* (F) y el reintegrante *RAD51* (L). Se indican las concentraciones de BLM utilizadas

## Tablas

**Tabla 1.** Cepas de *Candida tropicalis* y *Candida albicans* utilizadas en este trabajo.

**Tabla 2.** Cepa de *E.coli* utilizada en este trabajo.

**Tabla 3.** Medios y condiciones de cultivo.

## RESUMEN

Las infecciones nosocomiales son causantes de una alta tasa de morbi-mortalidad de los pacientes que se encuentran ingresados en centros hospitalarios, a la vez que aumentan los costos de hospitalización y el tiempo de permanencia. De estas infecciones las causadas por el género *Candida* ocupan el cuarto lugar en prevalencia, por lo son de gran importancia médica. La infección causada por cualquiera de las especies de este género se denomina candidiasis y sus manifestaciones clínicas son extremadamente variables. Es una infección cosmopolita y su incidencia ha aumentado en los últimos años. Se han identificado más de 200 especies de este género; sin embargo, solo doce son de interés médico, siendo *Candida albicans* la de mayor incidencia. Sin embargo, en México en los últimos 15 años se reportan un mayor número de infecciones causadas por las especies *C. glabrata* y *C. tropicalis*.

Las levaduras del género *Candida* son comensales en individuos sanos; sin embargo, la colonización con *Candida albicans* puede ocasionar una infección sistémica cuando el individuo presenta uno o más factores de riesgo. Se ha reportado que los mecanismos de patogenicidad y virulencia descritos para *Candida albicans* y para *Candida tropicalis* son los mismos e incluyen adherencia, morfogénesis, actividad enzimática intensa (proteasas, lipasas y fosfolipasas), variabilidad antigénica, formación de biopelícula y el denominado cambio fenotípico (phenotypic switching).

*Candida tropicalis* pertenece al grupo de las especies *No Candida albicans* (NCAC) y, dada su creciente prevalencia, se considera una levadura patógena emergente. *C. tropicalis* es la especie de NCAC más frecuentemente aislada de torrente sanguíneo y del tracto urinario, en pacientes de UCI y en pacientes con cáncer. El análisis de electrocariotipos de aislados mexicanos de *Candida tropicalis* indican que posee una plasticidad genómica significativa, lo que sugiere que sufre reordenamientos genómicos en respuesta a estímulos que generen estrés celular. Los eventos de recombinación mitótica son la clave para poder entender la variabilidad genética de *Candida*. Estos eventos están controlados por los sistemas que mantienen la integridad del DNA y por tanto requieren de la participación de genes del grupo epistático *RAD52* que incluye a *RAD50*, *RAD51*, *RAD52*, *RAD54*, *RAD55*, *RAD57*, *RAD59*, *RDH54/TIDI*, *MRE11* y

*XRS2*. Uno de estos procesos, la pérdida de heterocigosidad (LOH), parece crucial para la adaptación a diversos estreses.

La recombinasa Rad51 está muy conservada en todas las eucariotas, y es esencial en los procesos de invasión de banda durante la recombinación homóloga (HR). Puede unirse a DNA, especialmente a DNA de cadena sencilla, o interactuar con otras proteínas a través de su extremo *N*-terminal. La proteína Rad52 muestra una alta homología con sus ortólogos de eucariotas superiores, especialmente en el extremo *N*-Terminal, el cual cataliza la unión de *Rad51* al DNA y puede asociar cadenas sencillas complementarias de DNA (annealing).

Existen agentes que dañan el DNA los cuales son utilizados en tratamientos no-quirúrgicos del cáncer. Estos agentes, que incluyen la radiación ionizante (IR) y drogas como bleomicina (BLM) y camptotecina (CPT), atacan principalmente las células en proliferación y por tanto son parcialmente selectivos. Sin embargo, la inmunosupresión que acompaña a estos tratamientos, dispara la patogénesis de microorganismos oportunistas como *C. tropicalis*. La IR causa un pequeño número de DBSs letales, bases oxidadas, sitios abásicos y SSB terminados en ésteres 3'- fosfoglicolato los cuales se encuentran presentes en clusters y causan DSBs. BLM genera sitios abásicos 3'-oxidados y DSBs con terminaciones 3'- fosfoglicolato. CPT estabiliza los intermediarios transitorios de la unión Top1-DNA durante transcripción o replicación del DNA causando principalmente cortes de cadena sencilla (SSB). La evidencia indica que, si no son reparadas, estas SSBs estas se convierten en DSBs al colisionar con la horquilla de replicación durante la siguiente fase S del ciclo celular.

*C. albicans* un organismo diploide que puede adaptarse a diferentes estreses, incluida la presencia de fluconazol o caspofungina, mediante alteraciones genéticas que requieren procesos de recombinación homóloga (HR). En el grupo de investigación liderado por el Doctor Germán Larriba se ha determinado que en estos eventos son dependientes de Rad51 y Rad52. La ausencia de los genes *RAD51* y *RAD52* conduce a defectos pleiotrópicos que incluyen deficiencias en crecimiento, alteraciones en morfología, roturas y pérdida de cromosomas, que se traducen en una casi total ausencia de virulencia.

*C. tropicalis* una especie emergente del genero *Candida* de las denominadas *Non-albicans* y de mayor prevalencia en México en pacientes de UTI y oncológicos. Posee muchas similitudes con *C. albicans*. En este trabajo hemos utilizado técnicas de biología molecular como extracción de ácidos nucleicos, construcciones genéticas, y transformación para interrumpir el gen *RAD52* en el fondo genético *C. tropicalis* MYA-3404 y reintegrar el gen *RAD51* en su propio locus en un mutante nulo *rad51* a fin de evaluar la restauración del fenotipo silvestre. Además, hemos generado el doble mutante *rad51 rad52*. Estos mutantes fueron sometidos a una caracterización fenotípica básica en relación a su velocidad de crecimiento, morfología celular y colonial, invasividad en agar, y susceptibilidad a agentes genotóxicos como MMS, CPT y BLM y los hemos comparado con los fenotipos que exhiben sus correlativos de *C. albicans*.

Los resultados de los ensayos muestran la importancia de las proteínas Rad51 y Rad52 en la supervivencia a diferentes estreses celulares, ya que la cepa MYA-3404 sobrevivió eficientemente a los mismos, mientras que los mutantes fueron diezmados por estos agentes. Hemos encontrado que, en la mayoría de los ensayos el mutante *rad52* era mucho más sensible que *rad51*, y presentaba una sensibilidad similar a la del doble mutante *rad51 rad52*. Ello indica que como se ha descrito en *Sacharomyces cerevisiae* y *C. albicans* que ambos genes trabajan generalmente en la misma ruta de reparación de DNA y que la mutación *rad52* es epistática a mutación *rad51*.

## **C I. INTRODUCCIÓN**

### **1. INFECCIONES NOSOCOMIALES (INS).**

Las infecciones nosocomiales son aquellas que los pacientes adquieren al ingresar a un recinto de atención a la salud. Estas infecciones no son la causa de ingreso y no se encontraban en periodo de incubación al entrar al nosocomio; sin embargo, aumentan la mortalidad y la morbilidad de los pacientes que las adquieren.

Las INS son un serio problema de salud pública ya que causan un incremento en el tiempo de hospitalización elevando el costo del tratamiento. Tienen especial incidencia en la unidad de cuidados intensivos ya que los pacientes que se encuentran en esta área tienen un sistema inmune comprometido, sufren intervenciones médicas invasivas, y se encuentran bajo una terapia de antibióticos de amplio espectro. En los pacientes que tienen criterio de UTI es considerado como un riesgo latente la posibilidad de que contraigan una infección severa con hongos, ya que éstas se caracterizan por un difícil diagnóstico y una progresión rápida (Gudlaugsson, *et al.*,2003).

### **2. INFECCIONES NOSOCOMIALES CAUSADAS POR HONGOS (INFS).**

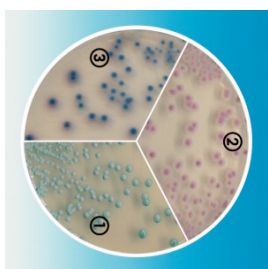
Las infecciones nosocomiales causadas por hongos han aumentado su incidencia en décadas recientes, lo cual está vinculado a los cambios en la práctica médica como el uso de fármacos inmunosupresores, el uso frecuente y prolongado de antibióticos de amplio espectro, la utilización de dispositivos médicos intravasculares e implantes artificiales, aunado al aumento en las enfermedades asociadas a estados de inmunosupresión crónica. Estas situaciones facilitan que organismos saprofitos que se encuentran presentes en tejidos como piel y mucosas puedan proliferar y colonizar eficientemente órganos y tejidos del huésped. El género *Candida* es el más frecuentemente aislado en las infecciones nosocomiales, puesto que hasta un 80% de los casos reportados son causados por este género (Iñiguez *et al.*,2009).

Aunque la especie más comúnmente aislada del genero *Candida* es la especie *albicans*, las infecciones causadas por las especies denominadas No *Candida albicans* (NCAC) han aumentado significativamente en los últimos años y son consideradas como infecciones emergentes. No están claras las razones del fenómeno, pero probablemente se deba a que las llamadas NCAC presentan resistencia a agentes antifúngicos a los

cuales los pacientes se encuentran expuestos durante largos periodos de tiempo (Lass-Flörl *et al.*, 2009; Eggimann *et al.*, 2003; Snyderman *et al.*, 2003; Lundstrom *et al.*, 2001; Krcmery *et al.*, 2002 ).

### 3. GENERO *CANDIDA*.

Dentro del grupo de los denominados Blastomicetos y Endomicetos se encuentran el género de *Candida*. Sus células son globulares u ovoides, con un tamaño medio de 3-5 $\mu$ . La reproducción ocurre por gemación multipolar, pero en algunas especies se puede observar la formación de pseudomicelio y/o tubo germinal (Arenas, 2008). Forman colonias blanquecinas, de aspecto húmedo y bordes bien definidos en agar Saboraud y agar YPD, al ser incubada en un rango de temperatura de 28-37°C. Para su identificación taxonómica de sus especies se utilizan medios cromógenos (ej. CHOMagar®*candida*) en donde las colonias se tiñen diferencialmente según la especie (Arenas, 2008).



**Fig 1.** Colonias en CHOMagar®*candida*, 1) *Candida albicans*, 2) *Candida glabrata*, 3) *Candida tropicalis* (Arenas, 2008).

Las levaduras de este género se encuentran presentes en el suelo, agua dulce, vegetales, frutas, cereales y en cualquier superficie con una fuente rica en hidratos de carbono. Otras especies son comensales de los tractos digestivo y respiratorio y de la piel del ser humano y animales domésticos (Negri *et al.*, 2009). Se han identificado más de 200 especies de este género; sin embargo, solo doce se reportan de interés médico. *Candida albicans* es la especie más común, pero en los últimos 15 años la incidencia de infecciones causadas por este agente etiológico ha disminuido, en favor de las causadas por *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* (Fig1). La infección causada por cualquiera de las especies de este género se denomina candidiasis ( Chai *et al.*, 2010; Negri *et al.*, 2009; Basu *et al.*, 2011).

#### 4. CANDIDIASIS.

La candidiasis es una infección primaria o secundaria causada por levaduras del género *Candida*, con manifestaciones clínicas extremadamente variables de evolución aguda, subaguda, crónica o episódica, en las cuales el hongo puede causar lesiones cutáneas, mucocutáneas, profundas o diseminadas. Es una infección cosmopolita que afecta a individuos de cualquier edad, sexo o grupo étnico y, por tanto, es considerada como la micosis oportunista más frecuente en seres humanos, habiendo aumentado su incidencia en los últimos años. Las vías de infección pueden ser endógenas o exógenas. La infección contraída por vía endógena podría proceder de reservorios mucocutáneos o cutáneos introducidos a través de catéteres u otros dispositivos. La vía exógena puede ser debida a materiales y equipo médico mal esterilizados o desinfectados (Pappas., 2009).



**Fig 2.** Candidiasis Esofágica y Cutánea en paciente femenino con VIH (Pappas., 2009).

#### 5. FACTORES DE VIRULENCIA.

Las levaduras del género *Candida* son comensales en individuos sanos. Sin embargo, la colonización con *Candida albicans* puede ocasionar una infección sistémica cuando el individuo presenta uno o más factores de riesgo. La interacción entre el huésped y el microorganismo es determinante entre en tipo de infección y el destino final de la misma.

Los determinantes de patogenicidad y virulencia descritos para *Candida albicans* y para *Candida tropicalis* son similares, e incluyen: adherencia, morfogénesis, actividad enzimática intensa (proteasas, lipasas y fosfolipasas), variabilidad antigénica, formación de biopelícula y las transiciones morfológicas que incluyen los cambios morfogénicos levadura-pseudohifa-hifa y el switching fenotípico blanco/opaco (phenotypic switching). Estos mecanismos no actúan de manera independiente ni de manera simultánea y su contribución depende del microhábitat en el que se encuentran el organismo (Negri *et al.*, 2012).

## **6. *Candida tropicalis*.**

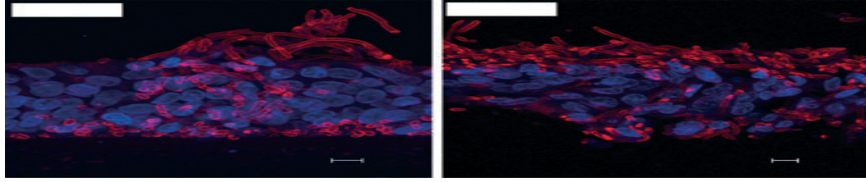
*C. tropicalis* fue conocida primero como *Oidio tropicale*, fue clasificada entre las especies de *Candida* en 1910. Es un ascomiceto levaduriforme diploide y patógeno humano oportunista, el cual es capaz de colonizar varios tractos como el gastrointestinal, respiratorio, genitourinario y piel, es la más frecuentemente aislada de torrente sanguíneo y de tracto urinario. Su prevalencia se ha incrementado significativamente, por lo que se ha considerado una levadura patógena emergente (Rippon., 1988 ; Blandin., 2010).

Las colonias de *C. tropicalis* son de color crema en agar Saboraud, y en CROMagar™ *Candida* aparecen de color azul oscuro. La morfología microscópica de este hongo muestra la presencia de blastoconidios pequeños, pseudohifas largas e hifas verdaderas, se ha observado también un metabolismo fermentativo para carbohidratos como glucosa, sacarosa, galactosa, tetralosa y maltosa, exceptuando otros hidratos de carbono como lactosa (Rajendra., 2010).

*C. tropicalis* es un organismo que se reproduce predominantemente por propagación clonal. La cepa tipo MYA 3404 es la cepa de referencia, habiéndose secuenciado su genoma, el cual se encuentra disponible en el NCBI desde el año 2009. Posee un genoma haploide de 15.3 Mb (30.6 Mb para el diploide), con un porcentaje de GC de un 33.1% , que contiene unos 6,415 genes repartidos en 5-6 cromosomas, que pueden ser separados por electroforesis de campo pulsante o CHEF-PFGE (Contour-clamped homogenous electrophoretic field-Pulse-field gel electrophoresis). Los cromosomas de *C. tropicalis* se denominan 1, 2, 3, 4 y 5 (Bingbing, *et al.*, 2014).

## **7. ADHESINAS Y LIGANDOS.**

La adherencia es el primer paso de la infección y requiere del reconocimiento de ligandos específicos, como proteínas de matriz extracelular (fibronectina, laminina, fibrinógeno y colágeno de tipo I. En *C. tropicalis* se han descrito tres genes que codifican para adhesinas de la familia de ALS llamadas Als3 (Silva., 2011).



**Fig 3.** Fotografías de microscopia cofocal de la invasión de *Candida tropicalis* al epitelio oral humano después de 12 h de incubación (Silva., 2011).

## **8. MORFOGÉNESIS.**

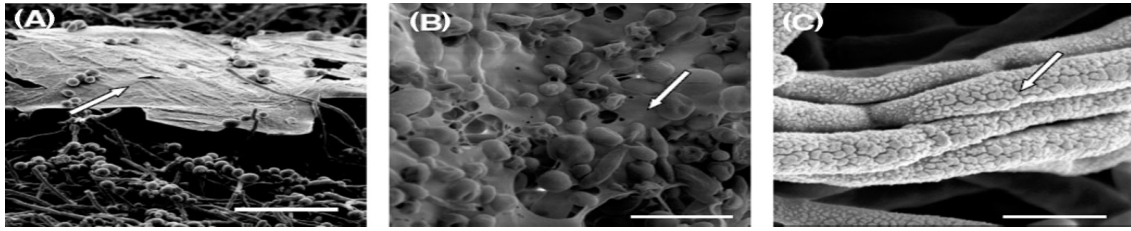
*C. tropicalis* es polimórfica, existe en forma de blastoconidios, pero pueden formar pseudohifas, tubo germinativo o verdaderas hifas que poseen crecimiento apical filamentoso. Los procesos morfogénéticos son reversibles (blastoconidio-hifa, hifa-blastoconidio), y ocurren en respuesta a las condiciones del microhábitat en el cual se encuentra el microorganismo (Chai *et al.*, 2010) .

## **9. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.**

En *Candida tropicalis* se han descrito varias proteinasas de la familia de las aspartil proteasas (Saps), fosfolipasas y lipasas las cuales son enzimas hidrolíticas que contribuyen a la penetración del hongo a través de la mucosa del huésped y la invasión del tejido subyacente (Zaugg *et al.*, 2001). Estas enzimas que son secretadas al exterior de la célula para que lleven a cabo su acción (Silva., 2009).

## **10. FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA.**

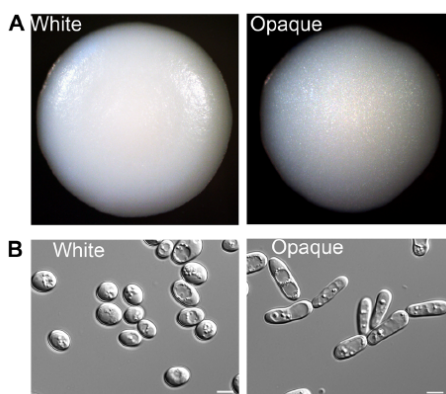
Una biopelícula es una comunidad de microorganismos embebida dentro de una matriz exopolimérica (polisacáridos, proteínas y DNA) adherida a una superficie. La capacidad de formar biopelícula confiere a *Candida tropicalis* un aumento en la resistencia a los antifúngicos y protección contra el sistema inmunológico del hospedero. La composición química de la biopelícula que forma *C. tropicalis* en concentración porcentual es de un 27% de hexosamina, 3.3% de carbohidratos incluyendo un 0.5% de glucosa, 3.3% de proteínas 0.2% de fósforo y 1.6% de ácido úrico (Mohammed., 2006).



**Fig 4.** Micrografías electrónicas de barrido de la formación de biopelículas por *C. albicans* (A) y *C. tropicalis* (B, C) en discos de catéteres de PVC DOI 10.1099/jmm.0.46569-0.

## 11. SWITCHING.

Los cambios fenotípicos permiten realizar transiciones rápidas entre los estados morfológicos celulares a los hongos patógenos facilitando la colonización de diferentes microambientes y la infección de tejidos vivos. En *C. tropicalis* se ha descrito que los genes del locus *MTL* regulan la conmutación celular al cambio blanco/opaco (Fig 5). El perfil transcripcional de *C. tropicalis* de células blancas y células opacas revela una alta coincidencia. Al comparar células homocigotas ( $\alpha$  y  $\alpha$ ), (a y a) y heterocigotas ( $\alpha$  y a), ( $\alpha$  y a), las células heterocigotas transcriben el doble de genes para llevar a cabo la transición de células blancas a opacas. El interruptor fenotípico *WOR1* regula la transición entre blanco/opaco. La sobreexpresión de *WOR1* induce la expresión del fenotipo opaco, así como la expresión de filamentos y la formación de biopelícula independientemente de la expresión del fenotipo blanco/opaco. Por tanto, *CtWOR1* podría jugar un papel importante en las interacciones microorganismo – huésped (Porman *et al.*, 2013).



**Fig 5.** A) Morfología colonial y morfología microscópica ejemplificando el Switching fenotípico de *Candida tropicalis* doi:10.1371/journal.pgen.1003369.

## **12. CICLO PARASEXUAL DE *Candida tropicalis*.**

En *C. tropicalis* se ha demostrado recientemente el apareamiento entre células diploides que la fusionarse forman productos tetraploides (Porman *et al.*, 2011; Xie J *et al.*, 2012). Este hongo posee un ciclo parasexual. El mantenimiento de células tetraploides en medio sorbosa por un periodo de 8-10 días, indujo una reducción de la ploidía celular en los sobrevivientes, dando lugar a células diploides. En otro experimento, las células cambiaron de estado tetraploide a diploide al propagarse en medio rico YPD. En estas condiciones, los cambios en la ploidía celular fueron detectados después de 18 días de incubación y después de 120 generaciones, lo que sugiere que el ciclo parasexual de *C. tropicalis* no necesariamente se lleva a cabo en situaciones de estrés celular, aunque éstas lo aceleran. Una comparación entre células tetraploides y diploides indicó que las células diploides mostraron mayor adaptabilidad que las tetraploides, aunque ambas muestran tiempos de generación similares. En *C. tropicalis* el parasexo permite la generación de genotipos no relacionados los cuales son producidos por reordenamientos genómicos en respuesta a estrés celular (Riyad N., 2013).

## **13. ADAPTABILIDAD.**

En células diploides, la generación de mutantes recesivos que exhiben alteración fenotípica requiere más una alteración genética. En el primer paso, uno de los dos alelos debe mutar lo que genera heterocigosidad genética, pero la presencia de una copia del gen silvestre impide la expresión del fenotipo recesivo. En el segundo, el alelo silvestre es sustituido por el mutado, lo cual puede lograrse por algún proceso de recombinación mitótica, como la conversión génica o un crossover, seguido de la migración de los dos alelos mutados a la misma célula. Este proceso se conoce como pérdida de la heterocigosidad (LOH) y suele conducir a la alteración fenotípica. Por supuesto, si una célula diploide es ya heterocigótica solo se requiere de un paso para completar LOH y mostrar un fenotipo mutante (Forche *et al.*, 2005). La pérdida de la heterocigosidad en *C. tropicalis* y su papel en la resistencia a antimicóticos ha sido analizada por Jacobsen *et al.*, 2008. Estos autores encontraron que la exposición de aislados clínicos a Flucitosina (5-FC) induce la LOH y los aislados homocigotos no mostraran susceptibilidad a 5-FC mientras que los aislados heterocigotos sí son susceptibles a este agente.

En el caso de *C. tropicalis*, la pérdida de la heterocigosidad *in vitro* es el resultado de la pérdida de cromosoma seguida de la duplicación del cromosoma residual, mientras que en los aislados clínicos la LOH fue originada por eventos de recombinación mitótica. LOH es un mecanismo importante que contribuye a la resistencia a 5-FC (Yen-Ning *et al.*, 2011). Este mecanismo podría conferir a *C. tropicalis* adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales y estreses celulares como la exposición a agentes que provocan la rotura del DNA (Waters., 2009).

#### **14. MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL DAÑO AL DNA.**

La propensión del DNA a sufrir roturas o mutaciones por agentes endógenos o exógenos ha conducido a los organismos al desarrollo de rutas de reparación del DNA. Entre ellos se encuentra el sistema MMR, que corrige los errores que comete la polimerasa replicativa. Otros daños son reparados por los sistemas de escisión de nucleótidos (NER; ej., dímeros de timina producidos por radiación UV), o escisión de bases (BER; ej., modificaciones de bases como la alquilación o desaminación producidas por MMS o ácido nitroso respectivamente), mientras que las roturas de doble cadena (Double Strand Break, DSB) son reparadas mediante eventos de recombinación homóloga (HR) y recombinación ilegítima (NHEJ) (Rich *et al.*, 2000; Pardo *et al.*, 2009; Mladenov *et al.*, 2011).

#### **15. EVENTOS DE RECOMBINACIÓN.**

Los eventos de recombinación son el intercambio o transferencia de información entre moléculas de DNA. Estos eventos ocurren en todos los organismos vivos estudiados hasta la actualidad, son los responsables del intercambio de información entre cromátidas no hermanas durante la meiosis, y se utilizan para reparar DSB en el DNA, incluyendo algunos DSBs programados durante el cambio de tipo sexual ( $\alpha$  y  $\alpha$ ) en *S. cerevisiae*. La HR implica el intercambio de DNA entre secuencias de perfecta o casi perfecta homología que comprende uno a varios cientos de pares de bases, mientras que la recombinación por fusión de extremos o *Non- Homologous End-Joining* (NHEJ) ocurre entre secuencias con poca o ninguna homología (Berit *et al.*, 2004).

La rotura de la doble hebra de DNA se presenta muy a menudo como resultado de procesos celulares normales, como la generación de especies reactivas de oxígeno, como consecuencia del metabolismo celular, o tras la exposición a agentes externos,

tanto físicos como químicos (radiación ionizante o luz UV) (Rijkers T *et al.*, 1998). La reparación de la doble hebra se lleva a cabo mediante HR o NHEJ. En levaduras, el papel de NHEJ es menor y lo contrario ocurre en humanos (Rich *et al.*, 2000). Los eventos de recombinación mitótica mediados por HR se llevan a cabo con la participación de los genes del grupo epistático *RAD52* (Symington., 2002).

## **16. GENES DEL GRUPO EPISTATICO RAD52.**

Los eventos de HR requieren la participación del grupo de genes del grupo de epistasis de *RAD52* que comprende a *RAD50*, *RAD51*, *RAD52*, *RAD54*, *RAD57*, *RAD59*, *RDH54/TIDI*, *MRE11* y *XRS2*. También se requiere de las endonucleasas Exo1, Sae1, Rad1-Rad10, helicasas (Sgs1, Srs2), topoisomerasas (Top3), polimerasas (Pol32) y ligasas (Rich *et al.*, 2000; Pardo *et al.*, 2009). Estos genes han sido identificados en muchas eucariotas, procariotas y arqueas, lo que indica que estos están altamente conservados. Se encuentran implicados en la reparación DBSs causados por *SPO11* durante el proceso de recombinación meiótica y participan en los procesos de reparación y recombinación mitótica y en el mantenimiento de los telómeros (Symington., 2002; Berit *et al.*, 2004).

Las proteínas Rad51 y Rad52 son muy importantes y por tanto su ausencia causa defectos graves en la recombinación mitótica y la reparación de DNA dañado. Los mutantes *rad52* presentan defectos mayores, que los mutantes en cualquier otro gen. Rad51 está implicado en la invasión de banda y por tanto es esencial para los procesos que requieren esta etapa, tal como DSBR, SDSA, y la mayoría de eventos BIR. Sin embargo no es requerido, e incluso puede resultar inhibitorio para SSA. Rad52 tiene dos funciones: Cataliza la formación del nucleofilamento de Rad51 al sustituir RPA por Rad51, y tiene actividad de apareamiento de bandas. *RAD54*, *RAD55* y *RAD57* son parálogos de *RAD51* y ayudan a su actividad. *RAD59* es un parálogo de *RAD52* y ayuda en funciones SSA. Los mutantes en genes *RAD* son muy sensibles a Radiación ionizante y se ahí su nombre (Mortensen, *et al.*, 1996; Shinohara., 1998; Song y Sung , 2000).

Se ha observado que alteraciones de estos genes ocasionan defectos en los eventos de recombinación, lo cual evidencia que los procesos de reparación de la doble hebra (DSBR) y la recombinación homóloga se encuentran vinculados (Symington., 2002). Los ortólogos de *RAD51* en *S. pombe* son codificadas por los genes *rhp55* y *rph57*, que

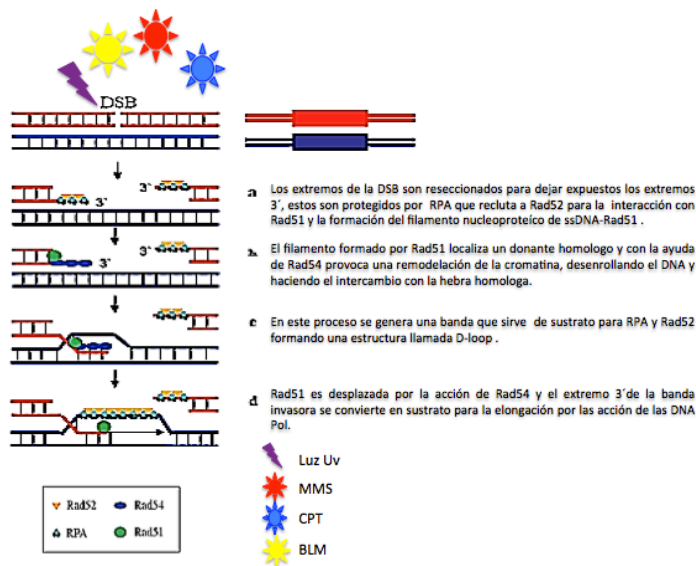
se comportan de la misma manera que sus ortólogos en *S. cerevisiae* (Berit *et al.*, 2004; Kans *et al.*, 2001; Lovett *et al.*, 1994).

## **17. RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA.**

Cuando HR tiene lugar entre cromosomas homólogos o secuencias repetidas dispersas por todo el genoma se generan LOH o reordenamientos cromosómicos respectivamente (Pardo *et al.*, 2009; Lisby *et al.*, 2005). La recombinación homóloga ocurre como resultado de la acción secuencial de proteínas HR, tal como se describe a continuación (Berit *et al.*, 2004):

La hidrólisis de los extremos 5' del DSB por endonucleasas dejan extremos 3' protuberantes. Después RPA se une a DNAss para evitar la formación de estructuras secundarias. Rad52 recluta Rad51 y cataliza la sustitución de *RPA* por *Rad51* para formar el nucleofilamento *Rad51*. El nucleofilamento Rad51 localiza un donador homólogo. Rad51 y Rad 54 remodelan la cromatina, y el nucleofilamento Rad51 invade y desplaza una de las cadenas del receptor y origina un dúplex de DNA con la otra cadena.

Se han descrito al menos cuatro rutas de HR: SDSA ( Syntesis-Dependent Strand-Annealing), DSBR (Double Strand Break Repair), BIR (Break- Induced Replication) y SSA (Single- Strand Annealing). Las dos primeras son conservativas, mientras que las otras dos resultan en pérdida de información (Berit *et al.*, 2004; Symington., 2002; Krejci *et al.*, 2002).



**Fig 6.** Rotura de la DSB de DNA cuando se expone a agentes como Luz ultravioleta, Camptotecina, Bleomicina y MMS.

- DSBR

Los extremos de la DSB son convertidos en extremos 3' de cadena sencilla por la acción de endo- y exo-nucleasas los cuales, tras recubrirse de Rad51, pueden iniciar la invasión del dúplex homólogo. El extremo 3' que ha invadido el dúplex intacto es extendido mediante la síntesis de DNA utilizando de molde la cadena complementaria del dúplex donador. La otra cadena del donador es desplazada y puede llegar a capturar el segundo extremo de la DSB, posibilitando la formación de una segunda estructura de Holliday (dHJ). La banda desplazada sirve de molde para la extensión del segundo extremo 3' que será ser elongado por la polimerasa (Symington, 2002).

- SDSA

La invasión de banda se produce de la misma manera que lo ocurrido en la DSBR, el bucle se forma por la invasión y puede extenderse por la síntesis de DNA de la cadena elongada o puede migrar con el DNA recién sintetizado. Después del desplazamiento del dúplex donador, la cadena naciente (la que invade) es desplazada y se reasocia con el extremo terminal 3' de cadena sencilla del segundo extremo (no invasora) para que se complete la reparación mediante la síntesis de DNA a partir de dicho extremo 3'. La diferencia entre estos dos modelos estriba en que la cadena que no invade puede ser elongada mediante la síntesis de DNA, sin utilizar como molde el bucle formado en la invasión del dúplex intacto (Symington, 2002). SDSA solo puede resultar en conversión

génica sin cross-over, mientras que DSBR puede originar conversión génica sin o con crossover.

- BIR

Este modelo se caracteriza porque después de la invasión de la cadena, con el extremo 3' no hay captura del segundo extremo de la rotura por haberse perdido de alguna manera (Paques y Haber, 1999). En este caso, la síntesis de DNA continúa hasta el final de la molécula (Symington, 2002). Por lo tanto en este proceso, se produce la pérdida de las secuencias distales a la rotura y estas mismas son remplazadas por la secuencia de la cadena donadora (Symington, 2002). Este proceso de intercambio no recíproco de material genético, es conocido por ser importante en el mantenimiento de los telómeros en ausencia de telomerasa (Teng *et al.*, 2000).

### **18. EL PAPEL DE Rad51 EN LOS EVENTOS DE RECOMBINACIÓN.**

El gen *RAD51* codifica para una proteína, que tiene una alta homología con el dominio catalítico de RecA de las bacterias. En *E. coli RecA*, es la proteína más importante para que se lleven a cabo eventos HR y una vez purificada promueve *in vitro* el alineamiento de la doble hebra. Rad51 está conservada en todas las eucariotas. El extremo *N*-terminal de 100 aminoácidos tiene capacidad de unirse a DNA e interactuar con otras proteínas. *RAD51* se une con mayor afinidad a DNA de cadena sencilla, con cualquier secuencia sin importar la composición de bases. La unión de *RAD51* a DNAs para formar el nucleofilamento requiere de la hidrólisis de ATP (Donovan *et al.*, 1994). *RAD51* puede actuar de manera individual o en asociación con *RAD52*, *RAD54*, *RAD55* y otras proteínas pertenecientes al grupo de genes epistático *RAD52*, mediante su extremo *N*-Terminal, se puede unir e interactuar con el extremo *C*-terminal de *Rad52* (Milne *et al.*, 1997; Clever *et al.*, 1997; Symington., 2002).

### **19. EL PAPEL DE Rad52 EN LOS EVENTOS DE RECOMBINACIÓN.**

La proteína Rad52 de *S. cerevisiae* muestra una alta similitud de secuencia con sus ortólogos de otras especies eucariotas, y está especialmente conservada en sus 200 residuos de su extremo *N*-Terminal. Este dominio de Rad52 tiene funciones que le permiten reparar los DSB entre repeticiones directas, de manera independiente de Rad51 (Milne *et al.*, 1997; Symington *et al.*, 2002). El extremo *C*-Terminal, es capaz de interactuar con Rad51 para la formación del nucleofilamento. Rad52 forma un

multímero, en forma de anillos que parecieran formar un molinete el cual tiene un canal intermedio (Rijkers et al., 1998; Ranatunga *et al.*, 2001; Boundy-Mills *et al.*, 1993).

## **20. TRATAMIENTOS NO QUIRÚRGICOS DEL CÁNCER.**

Existen agentes que dañan el DNA los cuales son utilizados en tratamientos no-quirúrgicos del cáncer. Estos agentes, que incluyen la radiación ionizante (IR) y drogas como bleomicina (BLM) y camptotecina (CPT) atacan principalmente las células en proliferación y por tanto son parcialmente selectivos. Sin embargo, la inmunosupresión que acompaña a estos tratamientos, dispara la patogénesis de microorganismos oportunistas como *C. tropicalis*. La IR causa un pequeño número de DBSs letales, bases oxidadas, sitios abásicos y SSB terminados en esteres 3'- fosfoglicolato, los cuales si están presentes en clusters causan DSBs (Datta *et al.*, 2011). La BLM genera sitios abásicos 3'- oxidados y DSBs con terminaciones 3'- fosfoglicolato (Chen et al., 2008; Povirk *et al.*, 2007; Murai *et al.*, 2012). La Camptotecina (CPT) en forma de sus derivados Topotecan e Irinotecan, se utiliza en el tratamiento para el cáncer colorectal, de pulmón y de ovarios. El tratamiento con CPT no interfiere con la progresión del ciclo en la fase S o en la entrada hacia la fase G2. Por tanto, no induce el checkpoint intra S y el daño acumulado durante la replicación se repara en la fase G2 (Rendon *et al.*, 2003). La CPT estabiliza los intermediarios transitorios de la unión Top1-DNA durante transcripción o replicación del DNA, causando principalmente cortes de cadena sencilla (SSB) (Cortés-Ledesma., 2009). Si no son reparadas, las SSBs estas se convierten en DSBs al colisionar con la horquilla de replicación durante la siguiente fase S del ciclo celular.

## ANTECEDENTES

“En *C. albicans*, los mutantes nulos de *RAD51* o *RAD52*, así como sus mutantes condicionales en condiciones de represión, mostraron una morfología filamentosa que se ha atribuido a la acumulación de DSB, la parada en el ciclo celular, y la polarización del crecimiento (Andaluz *et al.*, 2006). Los homocigotos nulos *Carad52* son más sensibles que los homocigotos nulos de *Carad51* a la radiación ultravioleta; sin embargo esta diferencia entre la sensibilidad de ambos mutantes no es significativa, lo que sugiere que la reparación de DSBs utiliza de manera preferencial la vía dependiente de *RAD51*. Por el contrario, los mutantes nulos *Carad52* son mucho más sensibles MMS, bleomicina y camptotecina, en comparación con los mutantes nulos de *rad51*, lo cual sugiere que *RAD52* cumple un papel muy importante durante el proceso de reparación del daño causado por la exposición a estos agentes. Los resultados obtenidos por el grupo de investigación indican que al ser *C. albicans* un organismo diploide, siempre tiene un homólogo para reparar mediante HR, y por tanto estos procesos se han convertido en esenciales en la biología del patógeno. La reparación por NHEJ, es más apropiada para organismos en fase haploide, ya que si están en G1, no existe un donador para efectuar reparación por HR”.

Puesto que *Candida tropicalis* se ha posicionado como un patógeno emergente, en el grupo de investigación nació el interés por estudiar la variabilidad y adaptabilidad genética de este microorganismo. En el primer trabajo se observó variabilidad en los cariotipos de aislados clínicos de *C. tropicalis* procedentes de diversos Estados de la República (Cuevas y Bellido., 2012), y posteriormente se obtuvieron mutantes nulos *rad51* cuya caracterización indicó que presentaban “crecimiento lento y una morfología filamentosa” en comparación con la cepa tipo MYA-3404, en una caracterización preliminar (Hernandez., 2012). En 2012, Espinosa Taxis construyó el mutante heterocigótico *RAD52/rad52::hisG* en el fondo genético MYA-3404.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Las infecciones nosocomiales emergentes son un problema de salud pública, que propicia que la estancia en el hospital del paciente sea más prolongada y también eleva los costos de estancia. Por ello es importante estudiar a los agentes etiológicos que causan dichas infecciones. Entre ellos se encuentra *C. tropicalis*.

## **JUSTIFICACIÓN.**

Entre las infecciones nosocomiales causadas por hongos del género *Candida* en los pacientes oncológicos y de la unidad de cuidados intensivos, las más frecuentes son las causadas por *C. albicans*; sin embargo, en la República Mexicana y más concretamente en el estado de Puebla (Cortés., 2014), se ha incrementado significativamente la frecuencia de las especies denominadas NCAC, de las cuales casi el 90% se han identificado como *C. tropicalis*. Trabajos previos del grupo de investigación han indicado variabilidad en los cariotipos de *C. tropicalis* aisladas de diversos estados de la República. Con base en estos resultados, creemos que al igual que *C. albicans*, *C. tropicalis* puede sufrir cambios genéticos que contribuyen a la adaptación del organismo a diversos estreses, incluyendo la resistencia a antifúngicos, con los cuales algunos de estos pacientes pudieron haber sido tratados. Buena parte de los cambios genéticos caracterizados en *C. albicans* implican recombinación entre cromosomas homólogos para generar LOH o no homólogos para generar translocaciones, dos procesos que son dependientes de *CaRAD51* y *CaRAD52*. La ausencia de estos genes en *C. albicans* causa defectos en crecimiento, morfología aberrante, alta sensibilidad a genotoxinas, pérdida y truncación espontánea de cromosomas, y atenuación o pérdida de virulencia. Por tanto la interferencia con sus funciones podría ser diana de nuevos antifúngicos. Dado el incremento en la incidencia de *C. tropicalis*, hemos decidido ampliar estas investigaciones, caracterizando *CtRAD51* y *CtRAD52*. A tal efecto hemos obtenido los mutantes nulos, los cuales se han caracterizado en cuanto a crecimiento y morfología, así como por su sensibilidad a genotoxinas tales como UV, MMS y a drogas utilizadas en el tratamiento no-quirúrgico del cáncer, como bleomicina y camptotecina.

La plasticidad del genoma de *C. tropicalis* hace que los propios estreses puedan ocasionar mutaciones o LOH. Para estar seguros de que los fenotipos observados corresponden realmente a los mutantes nulos *rad51* y *rad52*, es necesario generar los respectivos reintegrantes a fin de verificar la reversión de la mutación. En el presente trabajo, presentamos la caracterización del reintegrante de *RAD51*, y estamos implicados en la generación del reintegrante de *RAD52*. Adicionalmente, generamos un doble mutante nulo *rad51 rad52* para analizar relaciones epistáticas entre ambas mutaciones.

## **OBJETIVO GENERAL.**

Caracterización de los genes *CtRAD51* y *CtRAD52* a través de la caracterización fenotípica de los mutantes nulos *rad51* y *rad52*, y de los reintegrantes respectivos *rad51-Δ/rad51::RAD51* y *rad52-Δ/rad52::RAD52* en relación a crecimiento, morfología y susceptibilidad a diversos agentes que dañan DNA en *Candida tropicalis*.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS.**

Generación de mutantes nulos *rad52* y *rad51 rad52*.

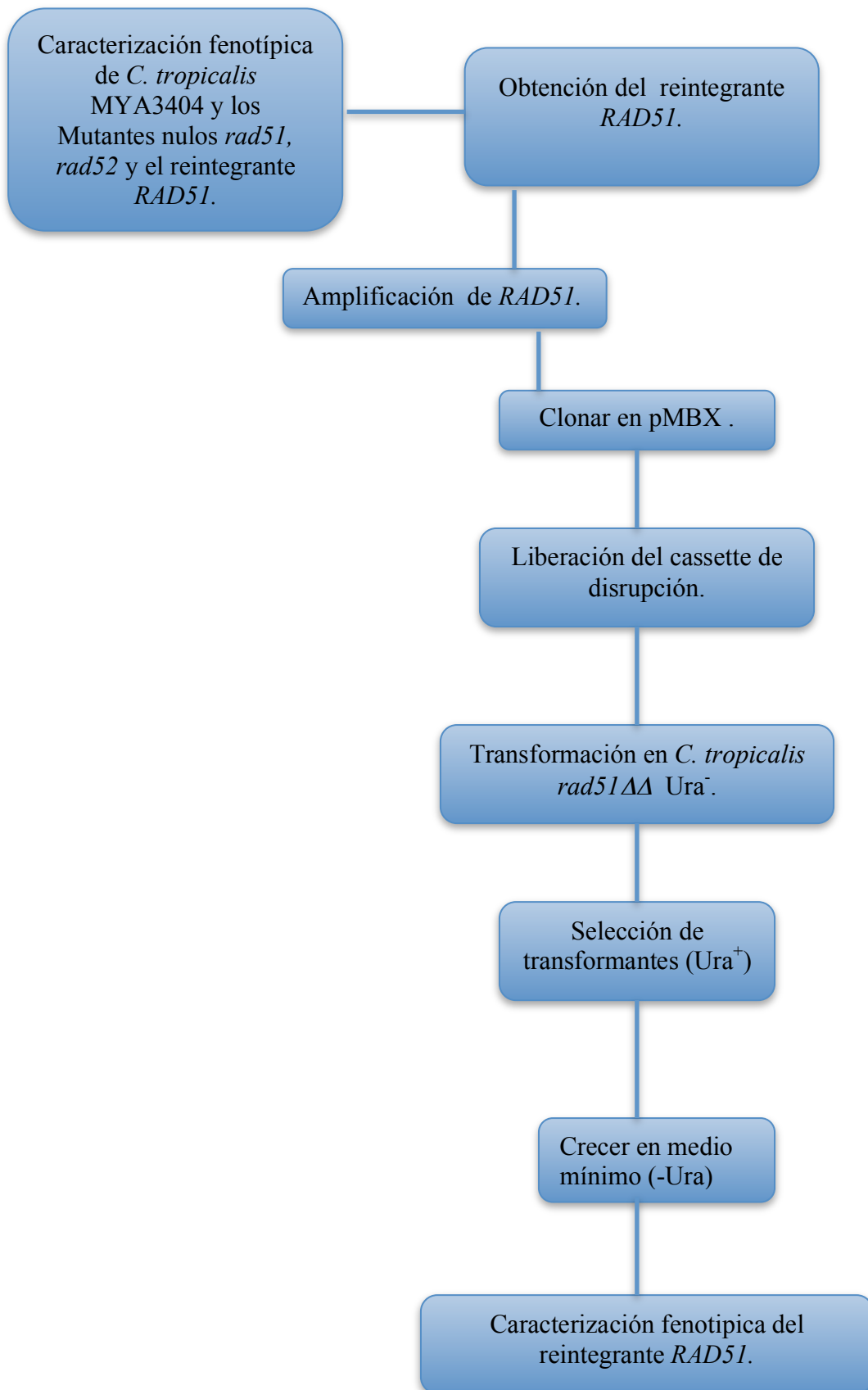
Generación de un reintegrante *RAD51*.

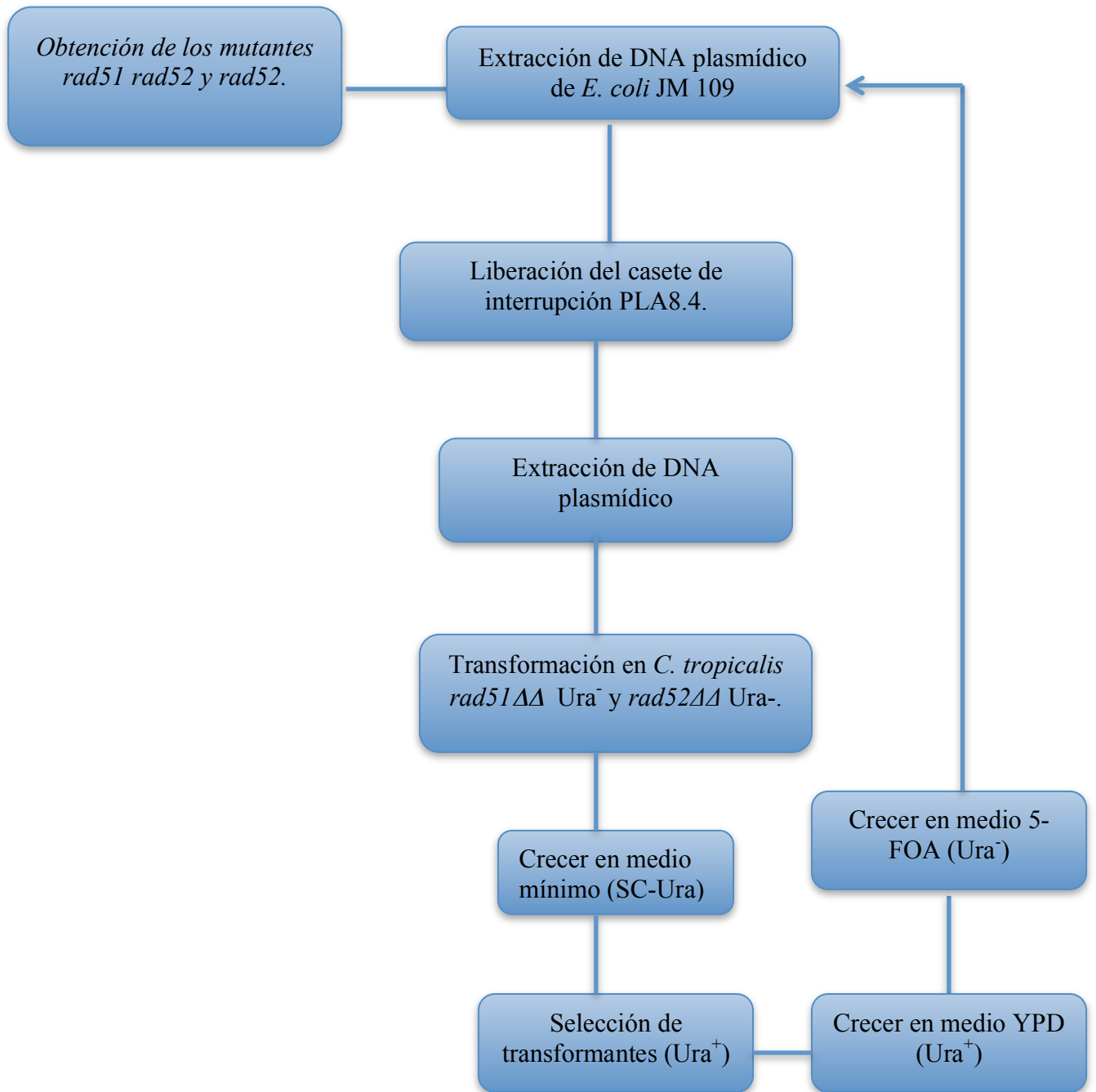
Análisis de la susceptibilidad de estos mutantes a agentes que dañan DNA: UV, MMS, BLM y CPT.

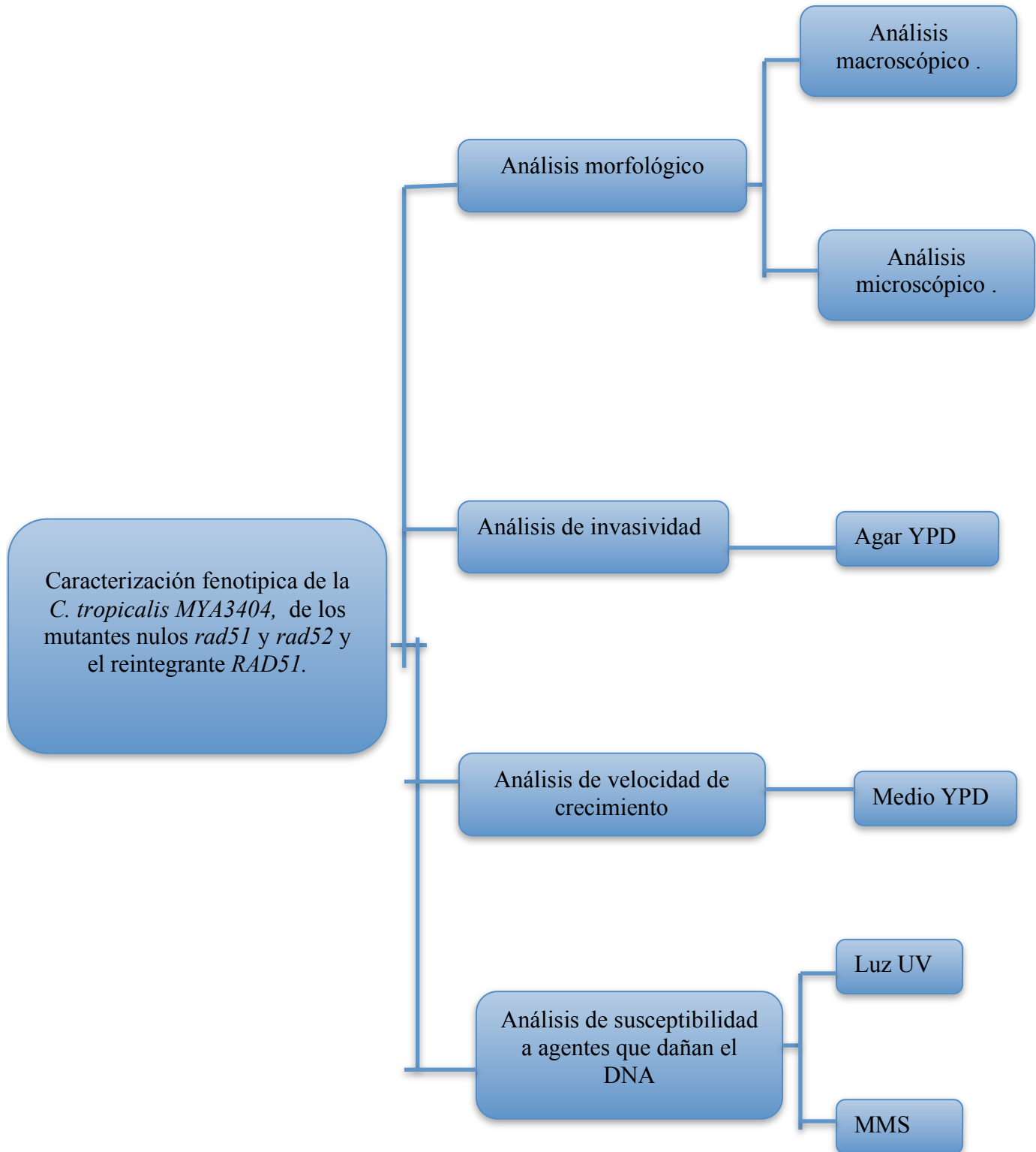
## **HIPOTESIS.**

Los genes *RAD51* y *RAD52* juegan un rol importante en los eventos de recombinación que generan LOH y/o translocaciones y por tanto adaptación a estreses, así como en reparación del daño al DNA en *C. tropicalis*.

## ESQUEMAS DE TRABAJO







## C II. METODOLOGÍA.

### 1. CEPAS UTILIZADAS.

Las cepas utilizadas se muestran en las tablas 1 y 2, la primera tabla muestra las cepas utilizadas en este trabajo, los mutantes *rad52ΔΔ*, *rad51ΔΔ rad52ΔΔ*, *RAD51* fueron contruidos para la realización de este trabajo. La cepa JM 109 fue utilizada para llevar a cabo las transformaciones.

Cepa	Genotipo
<i>C. tropicalis</i> (MAY3404)	Cepa tipo
<i>C. tropicalis rad51ΔΔ(10A2.1)</i>	Ura+ <i>rad51::hisG::rad51::hisG-Ura3-hisG</i>
<i>C. tropicalis Rad52</i> (TA1.1)	Ura+ <i>Rad52::rad52::hisG-Ura3-hisG</i>
<i>C. tropicalis rad52ΔΔ</i>	Ura+ <i>rad52::hisG::rad52::hisG-Ura3-hisG</i>
<i>C. tropicalis rad52ΔΔ</i>	Ura+ <i>rad52::hisG::rad52::hisG-Ura3-hisG</i>
<i>C. tropicalis rad51ΔΔ/rad52ΔΔ</i>	Ura+ <i>rad51-ΔΔ/rad52::hisG::rad54::hisG-Ura3-hisG</i>
<i>C. tropicalis RAD51</i>	Ura+ <i>rad51::hisG::rad51::RAD51-Ura3-hisG</i>
<i>C. albicans</i> (CAF2)	Cepa tipo
<i>C. albicans rad51ΔΔ</i> (JGR5)	Ura+ <i>rad51::hisG::rad51::hisG-Ura3-hisG</i>
<i>C. albicans rad52ΔΔ</i> (TCR2.1)	Ura+ <i>rad52::hisG::rad52::hisG-Ura3-hisG</i>

**Tabla 1.** Cepas de *Candida tropicalis* y *Candida albicans* utilizadas en este trabajo. Algunos de los mutantes fueron contruidos para la realización de este trabajo.

Cepa	Genotipo relevante
JM 109	RecA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 (rk-, mk+supE44A(lac-proAB) relA1)[F'traD36 proAB lacIq ZDM15] λ-

**Tabla 2.** Cepa de *E.coli* utilizada en este trabajo.

### 2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

Los medios que se encuentran en la tabla fueron usados en este trabajo. Los cultivos de levaduras se incubaron en medio YPD a 30° C y los cultivos líquidos en agitación a 200 rpm. En el caso de medios de cultivo solidos se les adiciono un 2% de agar. Las bacterias fueron crecidas a 37°C en medio solido se le adiciono 2% de agar bacteriológico al medio y en medio liquido fueron crecidas en agitación a 200 rpm, al medio se le adiciono ampicilina a una concentración de 1μg/ml.

Medio	Composición	Uso y referencia
<b>LB (Luria-Bertani).</b>	10g/L Bactopectona, 5g/L extracto de levadura, 10g/L NaCl, ajustado a pH de 7.5.	Medio rico para el cultivo de bacterias (Miller, 1972)
<b>YPD (Yeast Peptone Dextrose).</b>	20g/L glucosa, 10g/L extracto de levadura, 20g/L peptona Bactopectona.	Medio completo para el cultivo de levaduras (Lodder <i>et al.</i> ,1970).
<b>SC (Synthetic complete)</b>	20g/L glucosa, 7g/L base nitrogenada para levaduras sin aminoácidos, 2g/L mezcla de aminoácidos.	Medio de selección para levaduras auxótrofas para algún aminoácido.
<b>5'-FOA (5'-fluorootic Acid).</b>	20g/L glucosa, 7g/L base nitrogenada para levaduras con aminoácidos, 1g/L ácido 5'-fluorotico, 25mg/L de uracilo, 20g/L de agar.	Medio de selección para cepas Uri- de <i>C. tropicalis</i> . (Boeke <i>et al.</i> ,1984).

**Tabla 3.** Medios y condiciones de cultivo.

### 3. PLÁSMIDOS UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO.

#### **Plásmido pMB7.**

Tiene un tamaño de 6,7 Kb y procede del plásmido pUC18 (Figura 16). Contiene el casete URA-blaster, constituido por el gen *URA3* de *C. albicans* flanqueado por dos repeticiones directas del gen *hisG* de *Salmonella typhimurium* (Fonzi e Irwin, 1993).

#### **Plásmido pMBX.**

El plásmido pMBX (Fig 7) es una versión modificada del plásmido pMB7, esta modificación consiste en la falta de una *hisG*, la cual se ha logrado al digerir el plásmido pMB7 con la enzima de restricción XbaI, para su posterior religación.

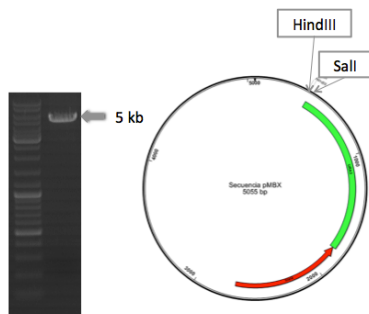
#### **Plásmido pLA8.4.**

El plásmido pLA8.4 (Fig 8) fue obtenido por L.A Cuevas en 2012 usando la secuencia XP\_002548695.1, obtenida de la secuenciación del genoma de MYA-3404 liberada en 2009. Se obtuvo DNA de la cepa parental *C. tropicalis* MYA-3404, con el fin de amplificar los flanqueantes 5' y 3', utilizando los iniciadores PF y PR para amplificar la región promotora, estos iniciadores amplifican 496 pb, para amplificar la región terminadora se utilizaron los iniciadores TF y TR los cuales amplifican 499 pb, se

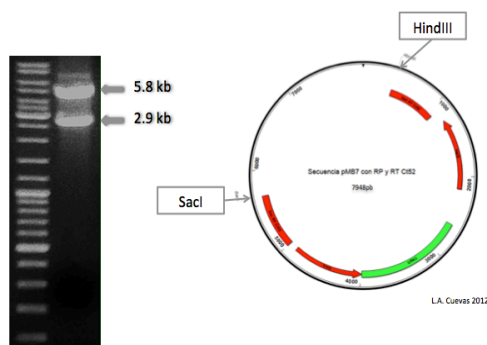
extrajo DNA plasmídico de la cepa JM 109 *E. coli* que contiene al plásmido pMB7, se llevo acabo el procedimiento de ligación entre el plásmido y el amplificado de la región promotora de *RAD52* que tiene un tamaño de 496 pb, para posteriormente transformar en JM 109, extraer DNA plasmídico y realizar la segunda ligación con el amplificado de la región terminadora de *RAD52* de 499 pb, se corrobora la construcción y se transformo en *C. tropicalis MYA-3404 Uri-*.

### Plásmido pV18.

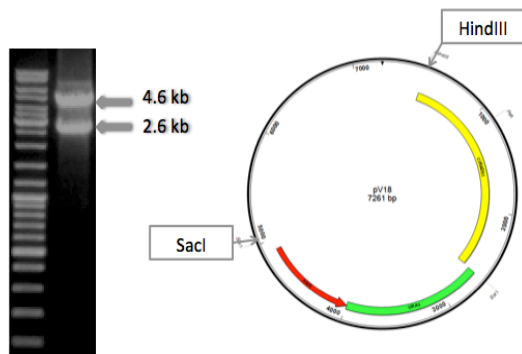
El plásmido pV18 ( Fig 9) fue construido en la realización de este trabajo, amplificando el marco de lectura abierto completo (ORF), la secuencia fue obtenida del genoma que fue liberado en 2009, el identificador es XM\_002546063.1, para lo cual se extrajo DNA de la cepa tipo *C. tropicalis MYA-3404*, se amplificó por PCR con los iniciadores Ct51F y Ct51R, obteniendo un amplificado de 2.2 Kb aproximadamente, el plásmido pMBX tiene un tamaño de 5055 pb, se realizó la ligación entre el amplificado y pMBX con T4 ligasa, con el producto de ligación se transformó en JM 109 *E. coli* , se extrajo DNA plasmídico para posteriormente digerirse con *SacI* y *HindIII*, corroborar la construcción y transformar en los mutantes *rad51ΔΔ* de *C. tropicalis MYA-3404*.



**Fig 7.** Verificación del plásmido pMBX. Se extrajo DNA plasmídico y se comprobó el tamaño del plásmido.



**Fig 8.** Verificación de la construcción pLA8.4. Verificar la construcción pLA8.4 se extrajo DNA plasmídico y se corto con las enzimas de restricción *SacI* y *HindIII*.



**Fig 9.** Verificación de la construcción del casete de reintegración pV18. Se determino la construcción extrayendo DNA plasmídico y digiriendo con las enzimas de restricción HindIII y SacI.

#### 4. TRANSFORMACIONES.

##### **Transformación en *Candida tropicalis* MYA-3404.**

Para llevar a cabo la transformación en *C. tropicalis* se utiliza el método del choque térmico, en el cual las células levaduriformes son tratadas previamente con acetato de litio según el protocolo descrito por Walter y Wendland (2003). El inoculo es incubado toda la noche en 20 ml de medio YPD, el cultivo llegó a fase estacionaria por la mañana y se refresco en 50ml de medio YPD se incubo hasta saturación, se centrifugo a 3000rpm y se lavo con 25 ml de agua estéril, se paso a un tubo eppendorf y se lavo con 1ml de agua estéril, se retiro el sobrenadante y resuspendió en 1ml de acetato de litio, se preparó la mezcla de transformación con 100µl de las células en solución de acetato de litio, 10µl de DNA carrier desnaturalizado a 95°C, DNA de casete de 50-100µl, 600µl de la solución PEG/LiAc, vorteo e incubo toda la noche a 30°C, por la mañana se le dio un choque térmico 45' a 42°C, se centrifugo y lavo con 1ml de agua estéril y se centrifugo, resuspendió y resembro en placas de Sc-URA para después incubar a 30°C por 3 días.

##### **Transformación en *E. coli*.**

La transformación en bacterias como *E. coli* fue descrita por Kushner en 1978, este método esta basado, en llevar acabo el proceso de transformación por choque térmico, las células competentes fueron hechas previamente en el laboratorio y derivan de la cepa JM 109, el DNA plasmídico para transformar se adiciono manteniendo la mezcla en hielo durante 30 min, después de este tiempo se llevo a un choque térmico llevando la mezcla de transformación a 42°C por 45min, se añadió a la mezcla 1 ml de medio LB

y se incubo a 37°C por una hora, al cabo del tiempo la mezcla se centrifugo y se resuspendieron las células en 0.2 ml de medio LB y se sembraron en placas de LB-ampicilina las cuales se incubaron a 37°C de 12-18 h.

## **5. EXTRACCIONES DE ÁCIDOS NUCLEICOS.**

### **Extracción de DNA plasmídico.**

Para la extracción de DNA plasmídico se cultivo 3mL de LB + Ampicilina con *E. coli* durante toda la noche hasta saturación, se centrifugo a 12000 rpm durante 40 min y se desecho el sobrenadante, se resuspendió en 100µl de solución I vorteadando y dejo 5 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 200µl de solución II y se invirtió con la mano el eppendorf hasta que se formo una solución mucosa, se incubo en hielo durante 5 min, se añadió 150µl de solución III se mezclo por inversión y se puso en hielo por 5 min, se centrifugo a 12000 rpm por 5 min, se transvaso el sobrenadante y se añadieron 2.5 volúmenes de etanol al 100% para precipitar el DNA, se resuspendió el pellet en 400µl de TE y añadió 1µl de RNAsa e incubar 30 min a 37°C, añadió 5.3 µl de acetato de amonio y 1ml de etanol al 100%. Se mezclo bien e incubo a -4°C de 40-45 min, se centrifugo durante 5 min a 12000 rpm, se lavo con etanol al 70% y se dejo secar el pellet, se resuspendió finalmente el DNA en 50-100µl de agua destilada.

### **Extracción de DNA Genómico.**

La extracción de DNA genómico se realiza creciendo un cultivo durante toda la noche hasta saturación, el cultivo se centrifuga a 3000 rpm durante 5 minutos usando tubos de 2ml, el medio se retira y las células se resuspenden y transfieren a un microtubo para centrifugarse a 3000 rpm durante 5 min, resuspender el pellet en 250µl de breaking buffer y 200 µl de glassbeads y transferir las células en suspensión a un tubo nuevo, añadir 300 µl de PCI (Phenol/Chloroform/Isoamil), mezclar y vortear por 5', añadir 200 µl de TE y centrifugar a 12000 rpm por 5 min, lavar con 1ml de etanol a 70%, y dejar secar el pellet, resuspender el pellet en 400 µl de TE y añadir 1 µl de RNAsa e incubar durante 30, a 37 °C, después añadir 5.3µl de acetato de amonio y 1 ml de etanol al 100%, mezclar bien e incubar a -4 °C por 40-45, centrifugar durante 5'a 12000 rpm, lavar con etanol al 70% y dejar secar el pellet, resuspender el DNA en 50-100 µl de agua destilada.

## **6. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).**

Los oligonucleótidos fueron suministrados por Biotools, las enzimas utilizadas para este trabajo fueron las Taq polimerasas Phusion de Thermo SCIENTIFIC, Taq polimerasa de Bioline y la NZYTaQ DNA polimerasa de nzytech. Para las reacciones de PCR se utilizaron 2.5µl de Oligos F y R, 5µl de buffer 10X 2µl de Mg Cl<sub>2</sub>, 0.5 µl de la enzima Taq de Bioline, DNA genómico 1 µL y cbp 50 µL de agua. Para las reacciones de PCR se utilizaron 2.5µL de iniciadores F y R, 20µL de buffer 5X 2µl de Mg Cl<sub>2</sub>, 0.5 µL de la enzima Taq Phusion de TS, DNA genómico 1 µl y cbp 50 µl de agua.

Programa de PCR.

1. Etapa de inicio (3 minutos a 95°C).
2. Etapa de desnaturalización ( 30 segundos a 95°C).
3. Etapa de hibridación (30 segundos, 50°C).
4. Etapa de elongación (1 minuto por cada Kb a 72°C).
5. 30 ciclos (desde la etapa 2 a la 4).
6. Etapa de término (5 minutos a 72°C).
7. Ultima etapa 12°C -∞.

## **7. CLONACIÓN DEL ORF DE *RAD51*.**

El gen fue amplificado usando una polimerasa de alta fidelidad Phusion y los iniciadores utilizados fueron Ct51 F y Ct51 R, los cuales poseen una secuencia de cote con las enzimas de restricción SacI y HindIII, el fragmento amplificado es de aproximadamente 2.2 kb.

## **8. PROTOCOLO DE LIGACIÓN.**

La ligación se llevo acabo con la T4 Ligase de Thermo SCIENTIFIC, utilizando 1µl del vector linealizado, 2 µl de DNA amplificado, 2 µl de la 10x T4 DNA Ligase Buffer, 1µl de T4 DNA Ligase y agua cbp 20µl de volumen final.

## **9. CONSTRUCCIÓN DEL CASETE DE REINTEGRACIÓN.**

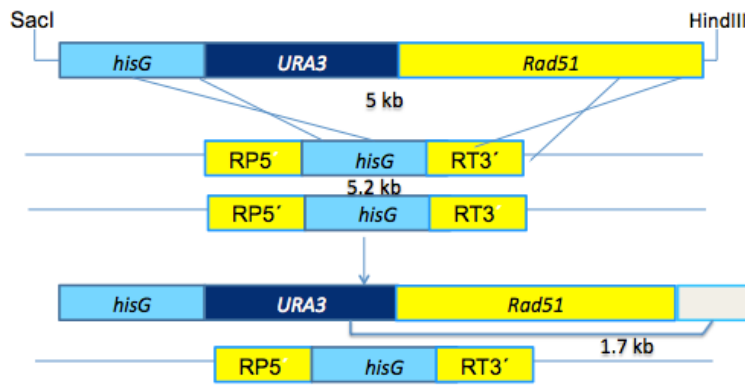
La construcción del casete de reintegración pV18 se realizara la amplificación del marco de lectura abierta ORF de *RAD51*, como lo explica en su apartado, posteriormente se ligo este en el plásmido pMBX, para la posterior transformación en JM 109 y la extracción de DNA plasmídico, mismo que después se digirá con las enzimas de restricción SacI y HindIII y transformar en los mutantes *rad51ΔΔ Uri-* de *C. tropicalis MYA-3404*.

## **10. CONSTRUCCIÓN DE LOS MUTANTES *rad52ΔΔ* EN EL FONDO GENÉTICO *C. tropicalis MYA-3404*.**

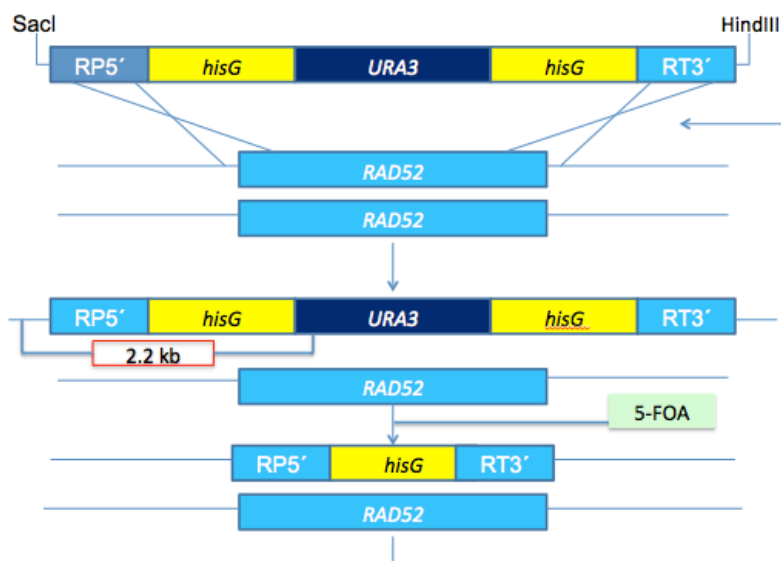
Se interrumpió el gen *RAD52* mediante la técnica del Ura-Blaster, consistentemente en la substitución secuencial de ambos alelos, el primer alelo fue interrumpido por Espinosa Taxis en el año 2012, para dar lugar a la cepa heterocigótica TA1.1, en el 2014 fue interrumpido el segundo alelo en la realización de este trabajo, con un casete reciclable pLA8.4 que contiene al marcador *URA3*, flanqueado por dos repeticiones directas del gen *hisG* de *Salmonella typhimurium*. (Fonzi e Irwin 1993).

## **11. CONSTRUCCIÓN DEL MUTANTE *rad51ΔΔ rad52ΔΔ* EN *C. tropicalis MYA-3404 MUTANTE rad51ΔΔ*.**

Se interrumpió el gen *RAD52* mediante la técnica del Ura-Blaster, consistentemente en la substitución de ambos los alelos, con un casete reciclable que contiene el marcador *URA3*, flanqueado por dos repeticiones directas del gen *hisG* (Fonzi e Irwin 1993).



**Fig 10.** Diagrama de reintegración del gen *RAD51* en mutantes *rad51ΔΔ*.



**Fig 11.** Diagrama de Interrupción del gen *RAD52* en *C. tropicalis MYA-3404* y en mutantes *rad51ΔΔ*.

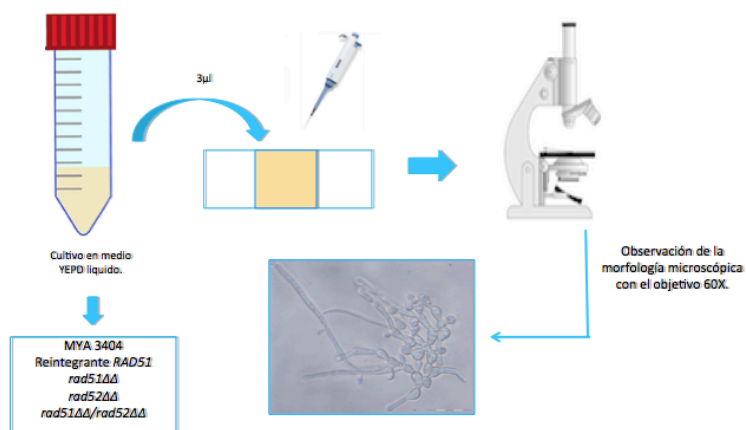
El casete de interrupción se integró por recombinación homologa, los transformantes fueron seleccionadas en medio SC – Uracilo, para seleccionar los mutantes  $Ura^+$ , la perdida del marcador *URA3* tiene lugar por la recombinación intracromosómica y misma que fue inducida por el crecimiento del transformante en medio rico y seleccionada en medio 5-FOA, para interrumpir el segundo alelo se siguió el mismo protocolo, el esquema muestra los sitios de corte para las enzimas *HindIII* y *SacI* (Figura 11).

De la misma manera el casete de reintegración se integró por recombinación homóloga, y el marcador *URA3* vuelve a estar presente en los mutantes *rad51ΔΔ*, estos transformantes se han seleccionado en medio SC –URA, para su posterior crecimiento en medio rico, a estos transformantes no se les induce la pérdida del marcador *URA3* (Fig 10).

## 12. ANÁLISIS FENOTÍPICO BÁSICO.

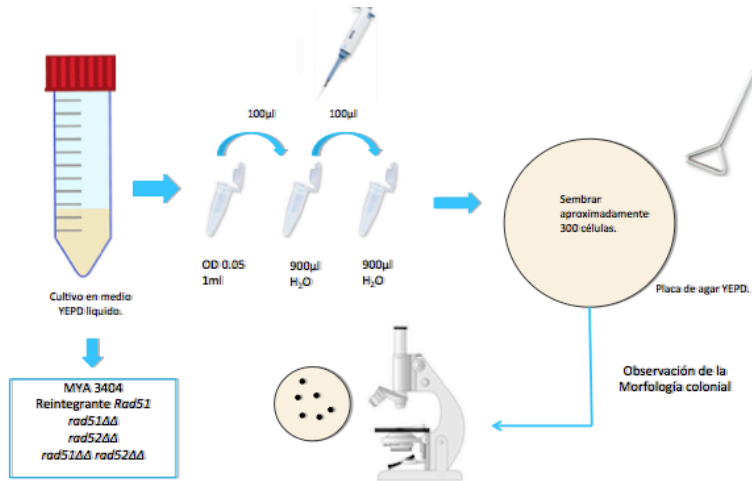
### Análisis macroscópico y microscópico.

Las cepas de *Candida tropicalis* que se muestran en la tabla 1 se cultivaron en medio YPD líquido a 30° por 24 horas en agitación constante y se incubaron a 30°C por 18 horas. Se tomaron 3µl del cultivo se colocaron en un portaobjetos. Se cubrieron con un cubreobjetos y observar al microscopio y documentar mediante fotografías.



**Fig 12.** Análisis Microscópico.

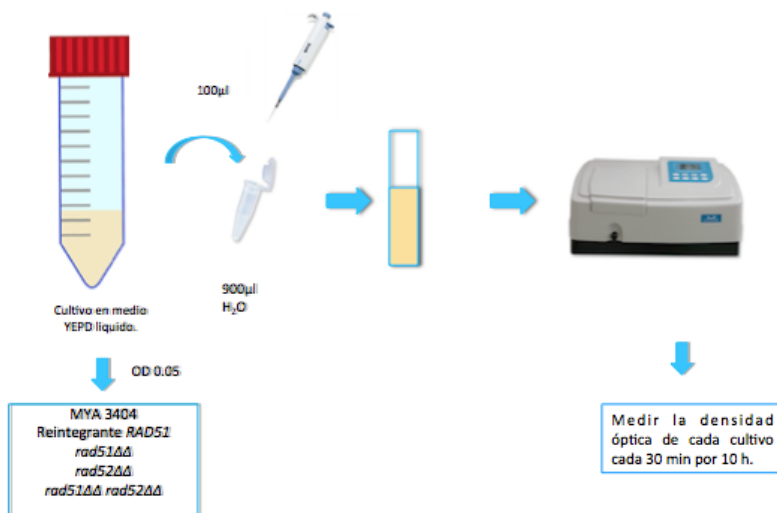
Para el análisis macroscópico se ajustó la OD del cultivo líquido a 0.05 con agua estéril, hacer dos diluciones 1:10 y sembrar aproximadamente 300 células, en medio YPD sólido e incubar a 30°C por 48 horas y observar al microscopio y documentar mediante fotografías.



**Fig 13.** Análisis Macroscópico.

**Análisis de la velocidad de crecimiento.**

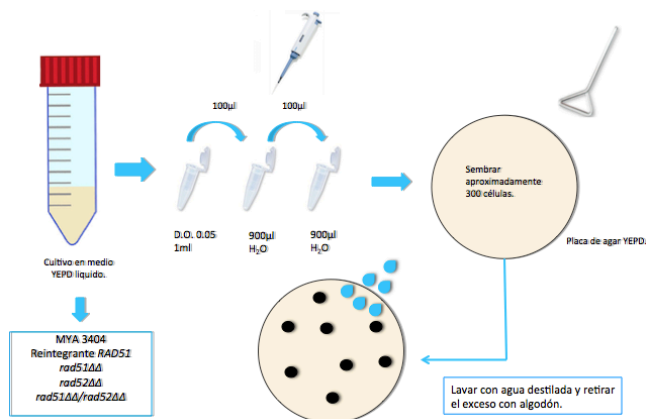
Las cepas de *Candida tropicalis* que se muestran en las tabla 1 se cultivaron en medio líquido YPD a 30° hasta llegar a la fase estacionaria, en medio YPD se colocó un inóculo del cultivo de 24 horas y se ajustaron a un OD de 0.01 un volumen de 50ml y se incubaron en agitación y a 30°. Cada media hora tomar una alícuota de 100µl de medio de cultivo y diluir en 950µl de medio agua estéril, medir la absorbancia a 600nm en el espectrofotómetro y registrar las mediciones hasta alcanzar una OD de 1.



**Fig 14.** Análisis de velocidad de crecimiento.

### **Análisis de invasividad en agar.**

Las cepas de *Candida tropicalis* que se muestran en la tabla 1 se cultivaron en medio YPD líquido a 30° por el periodo de 24 horas en agitación constante y se ajusto el cultivo líquido a una OD de 0.05, se hicieron dos diluciones seriadas 1:10 y se sembraron aproximadamente 300 células en medio YPD sólido y se incubo a 30°C por 48 horas. Se utilizo agua estéril para retirar el exceso de crecimiento de la placa de manera muy cuidadosa tratando de que la superficie del agar quede intacta para poder observar el estado del agar YPD y se documento mediante fotografías la integridad del agar.

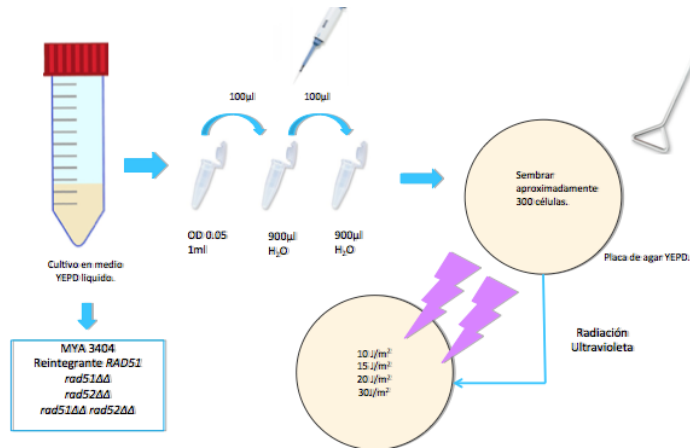


**Fig 15.** Análisis de invasividad en agar.

## **13. ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD A AGENTES QUE DAÑAN EL DNA.**

### **Análisis de sensibilidad a la radiación ultravioleta.**

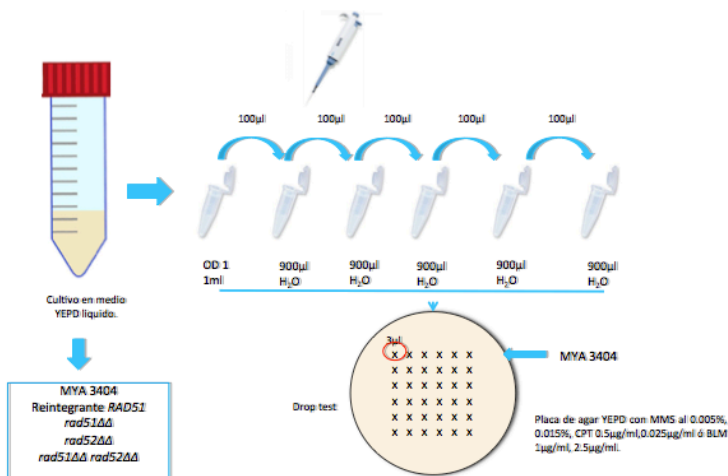
Las cepas de *Candida tropicalis* que se muestran en las tabla 1 se cultivaron en agar YPD a 30° hasta llegar a la fase estacionaria. Se preparo agar YPD, se medio la OD a 600nm del cultivo, y se ajusto la OD del cultivo a 0.05 de absorbancia y se realizaron 5 diluciones seriadas 1:10. Se sembraron con ayuda de una asa de vidrio en césped aproximadamente 300 células y se expusieron a radiación UV las placas con 10,15,20 y 30 J/m<sup>2</sup> de intensidad, se envolvieron en papel aluminio las cajas inoculadas para evitar su exposición a la radiación UV y se incubaron por 48 horas a 30°C las cajas con agar YPD, MMS, CPT y BLM. Se contabilizaron las CFU en cada caja y sacar un promedio del conteo para obtener el % células sobrevivientes.



**Fig 16.** Análisis de sensibilidad a Luz Ultravioleta.

**Análisis de sensibilidad a MMS, Camptotecina y Bleomicina.**

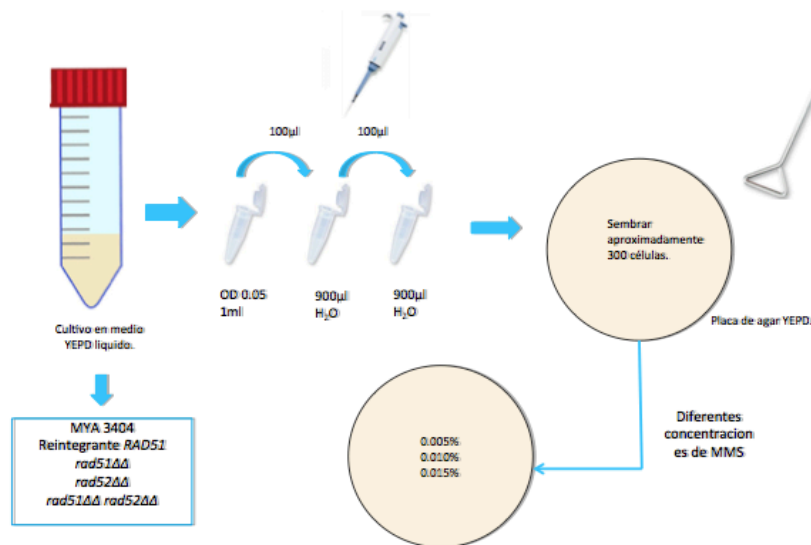
Las cepas de *Candida tropicalis* que se muestran en las tabla 1 se cultivan en agar YPD a 30° hasta llegar a la fase estacionaria, se preparo agar YPD para las diferentes concentraciones de MMS 0.005%, 0.015%, CPT 0.5μg/ml, 0.025μg/ml ó BLM 1μg/ml, 2.5μg/ml cuando este se agrego el agente y plaqueo, se dejaron gelificar las placas (cuidar de la exposición a la luz y el calor a las placas. Se midió la OD a 600nm del cultivo, y se ajusto la OD del cultivo a 0.05 de absorbancia y se realizaron 5 diluciones seriadas 1:10, se sembraron 3μl de cada una de las diluciones en una placa marcada y que contiene el agente y se envolvieron en papel aluminio las cajas inoculadas para evitar su exposición a la luz y la degradación del MMS y se incubo por 48 horas a 30°C las cajas con agar YPD, MMS, CPT y BLM. Se contabilizaron las CFU en cada caja y se calculo el promedio del conteo para obtener el % células sobrevivientes.



**Fig 17.** Análisis de sensibilidad a MMS, CPT y BLM.

### Análisis de sensibilidad a MMS.

Las cepas de *Candida tropicalis* que se muestran en la tabla 1 se cultivaron en agar YPD a 30° hasta llegar a la fase estacionaria, se preparo agar YPD para las diferentes concentraciones de MMS 0.005%, se agrego el agente y plaqueo, se dejaron gelificar las placas (cuidar de la exposición a la luz y el calor a las placas, medir la OD a 600nm del cultivo y ajustar la OD del cultivo a 0.05 de absorbancia y se realizaron 2 diluciones seriadas 1:10, sembrar 50,75 y 100µl de cada una de los en una placa marcada con la concentración de MMS, se envolvieron en papel aluminio las cajas inoculadas para evitar su exposición a la luz y la degradación del MMS y se incubaron por 48 horas a 30°C las cajas con agar YPD y MMS. Se contabilizaron las CFU en cada caja y calculo el promedio del conteo para obtener el % células sobrevivientes.



**Fig 18.** Análisis de sensibilidad a diferentes Concentraciones de MMS.

#### 14. INICIADORES UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO.

Iniciadores para la amplificación del ORF de *RAD51* en *C. tropicalis*.

---

<b>Iniciadores</b>	<b>Amplificación del ORF <i>RAD51</i></b>
<b>Ct51F</b>	<b>5- CCC AAG CTT AGG ATT GAT GGT GGT AAG AC-3</b>
<b>Ct51R</b>	<b>5- ACG CGT CGA CGG TGT ATG TCG TGT AAT TTG G-3</b>

---

Iniciadores para comprobar la interrupción de *RAD52* en *C. tropicalis*.

---

<b>Iniciadores</b>	<b>Comprobación de la interrupción</b>
<b>Ct52F</b>	<b>5- TAG AAT ACA GGG GAA AAT AAG AGG -3</b>
<b>URA 2</b>	<b>5- CGA ATC AAT GGC ACT ACA-3</b>

---

Iniciadores para la comprobación de la pérdida de marcador *URA3* en *C. tropicalis*.

---

<b>Iniciadores</b>	<b>Comprobación de la pérdida del marcador Ura</b>
<b>Ct52F</b>	<b>5- TAG AAT ACA GGG GAA AAT AAG AGG -3</b>
<b>Ct52R</b>	<b>5- GCG CGT GAG AAG AAG AAA AAC -3</b>

---

Iniciadores para la comprobación de la pérdida del gen *RAD52* en *C. tropicalis*.

---

<b>Iniciadores</b>	<b>Comprobación de la pérdida del gen</b>
<b>Ct52F</b>	<b>5- TAG AAT ACA GGG GAA AAT AAG AGG -3</b>
<b>Ct52 I</b>	<b>5- CGC CAA ATT CAA TGC TCG CCA GCC-3</b>

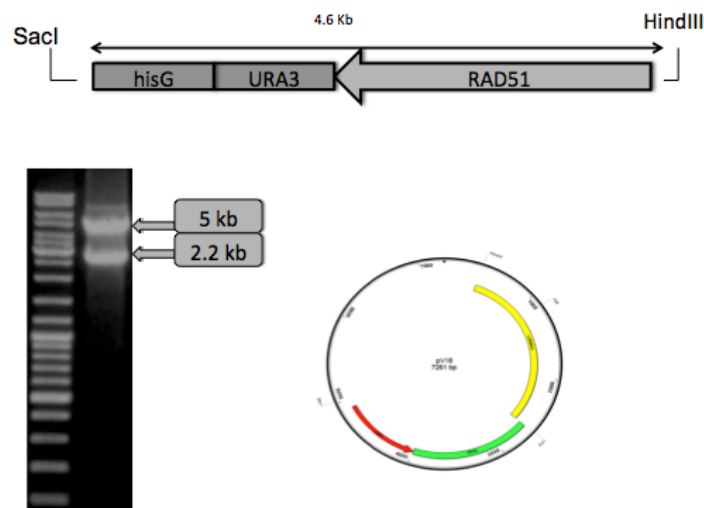
---

### C III. RESULTADOS

#### 1. OBTENCIÓN DE LOS MUTANTES EN EL FONDO MYA3404 DE *C. tropicalis*.

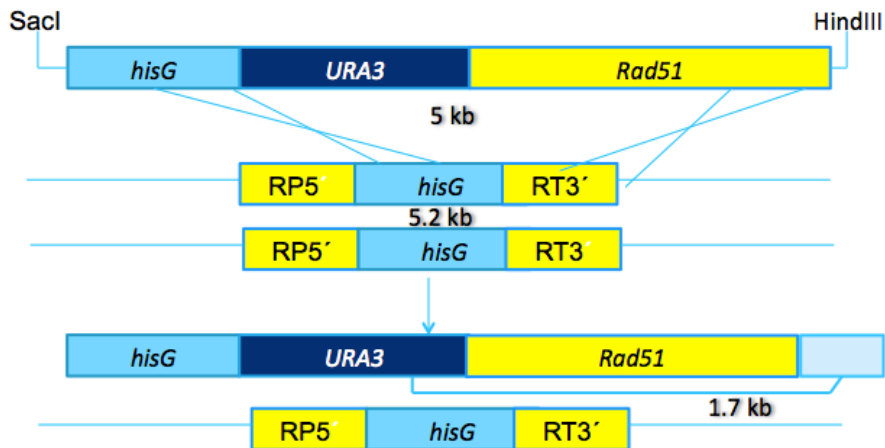
##### 1.A. CONSTRUCCIÓN DEL REINTEGRANTE RAD51 EN *C. tropicalis*

En primer lugar, se incorporó el ORF de *RAD51* de *C. tropicalis* MYA3404 en el plásmido pMBX, derivado de pMB7 (Fonzi e Irwin, 1993), al que se le había sustraído una copia de *hisG*. La región de *RAD51* fue amplificada por PCR utilizando los iniciadores Ct51F y Ct51R y como molde DNA de la cepa tipo MYA3404. Los iniciadores contienen secuencias diana para las enzimas de restricción *SacI* y *HindIII*, lo cual permite la clonación con la orientación deseada en los sitios correspondientes del vector pMBX. El fragmento de *RAD51* amplificado se ligó al vector pMBX utilizando la DNA ligasa de bacteriófago T4 (Fermentas), y la construcción resultante se utilizó para transformar la cepa JM109 de *E. coli*. En la figura 19 se muestra el casete de reintegración de Ct*RAD51*.



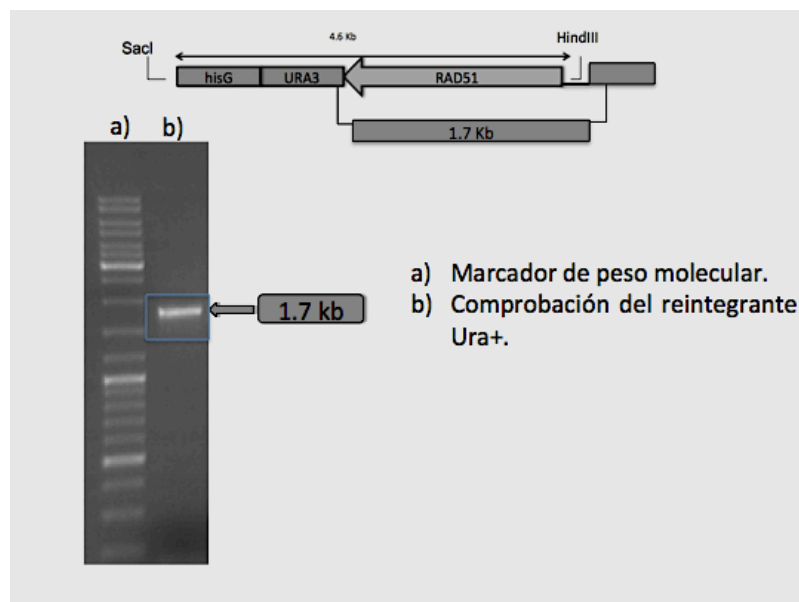
**Fig 19.** Construcción del casete de reintegración de *rad51* en *c. tropicalis*.

El casete de reintegración se liberó del vector (pV18) con las enzimas de restricción *SacI* y *HindIII* dando como resultado 2 bandas, una de 5 kb que corresponde a la construcción (*hisG-URA3-RAD51*) y otra de 2.2 kb correspondiente al resto del plásmido (Fig.19). El fragmento de 5 kb (casete de reintegración), una vez purificado, se utilizó para transformar los mutantes nulos *Ctrad51*.



**Fig 20.** Diagrama de reintegración de *RAD51* en *C. tropicalis*.

El casete de reintegración se integra por recombinación homóloga en el genoma de *C. tropicalis*. Los transformantes fueron seleccionados en medio SC –Uracilo y posteriormente crecidos en medio rico YPD.

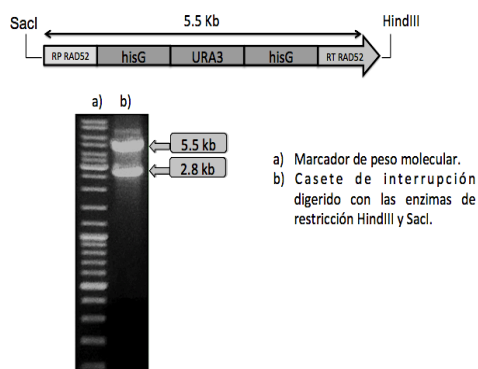


**Fig 21.** Verificación del reintegrante *RAD51* (*rad51::hisG/rad51::RAD51-ura3-hisG*) en *C. tropicalis*.

La reintegración en los transformantes se verificó por PCR utilizando los iniciadores Ct51F y URA2. Como se indica para uno de ellos en la Figura superior 21 se obtuvo la banda esperada de aproximadamente 1.7 kb. Nótese que el marcador *URA3* vuelve a estar presente en el reintegrante *rad51/RAD51*.

## 2.A. COMPROBACIÓN DEL CASETE DE INTERRUPCIÓN DE *Rad52* EN EL FONDO GENÉTICO MYA-3404.

En primer lugar, verificamos la liberación correcta del casete de interrupción del gen *RAD52* clonado en el vector pLA8.4.

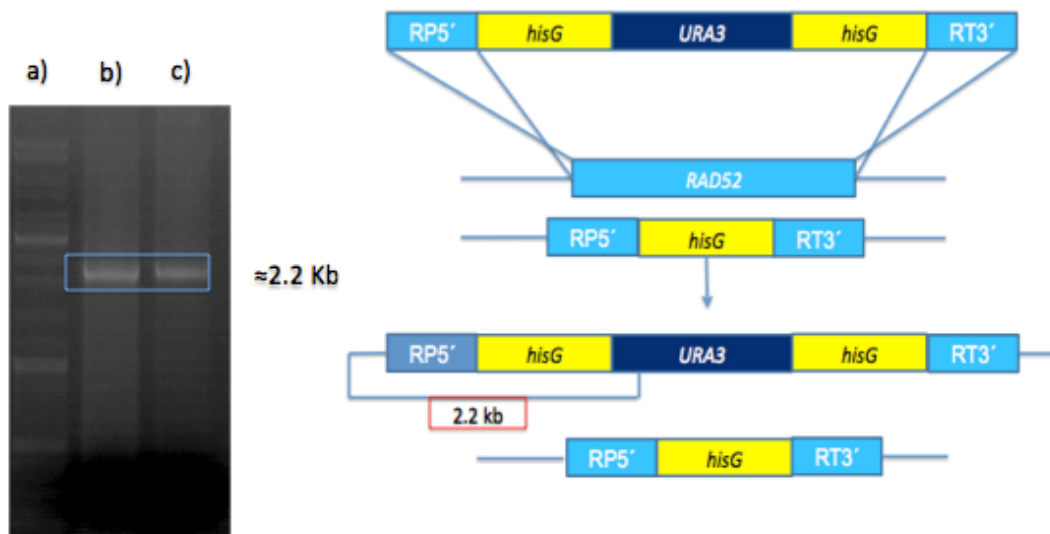


**Fig 22.** Verificación del casete de interrupción de *RAD52* con sus regiones promotora y terminadora clonado en el plásmido pMB7. Abajo, verificación de la construcción.

Para ello, se digirió el DNA plasmídico (pLA8.4) con las enzimas de restricción *SacI* y *HindIII*. Como se indica en la Fig. 22, este tratamiento originó las dos bandas esperadas: una de 5.5 kb (casete) y otra 2.8 kb (resto del plásmido).

## 3.A. GENERACIÓN DE MUTANTES NULOS $Ura^+$ *rad52::hisG/rad52::hisG-URA3-HisG*.

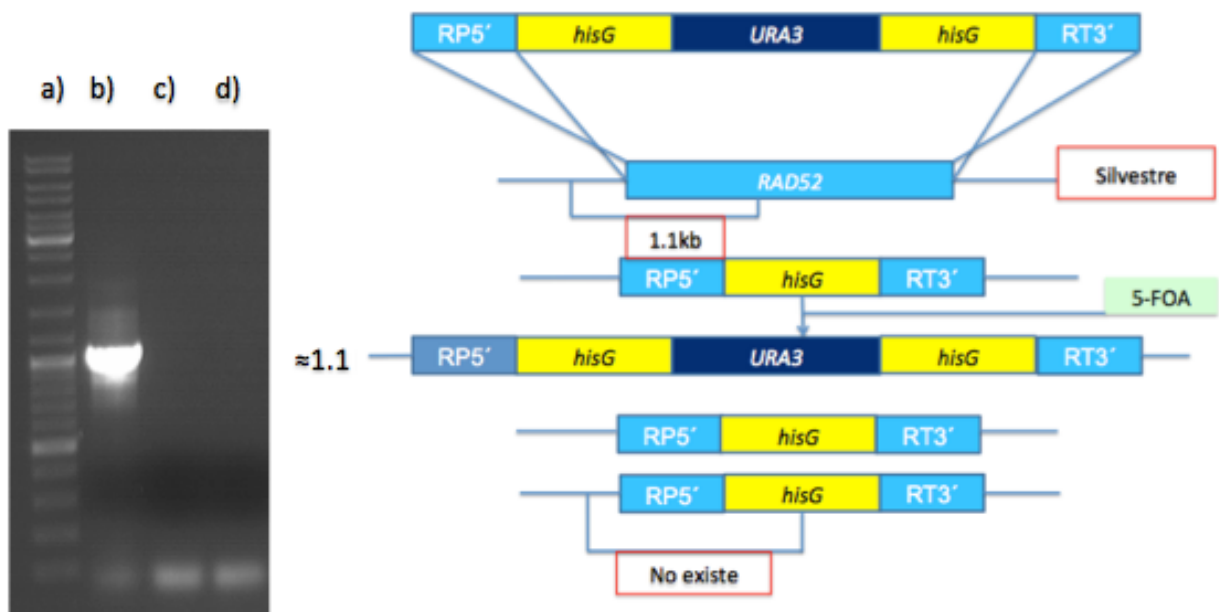
Se llevo a cabo la interrupción secuencial del gen *RAD52* en ambos alelos. Como se ha comentado, en este trabajo se interrumpió el segundo alelo, ya que se partió de una cepa heterocigótica  $Ura^-$  (*RAD52/rad52::hisG*) denominada TA1.1 previamente generada por Espinosa Taxis en 2012. En la Figura 25 se esquematiza la integración del casete de interrupción por HR para obtener el mutante heterocigótico, utilizando el casete construido por Cuevas en 2012. Para obtener el mutante heterocigótico  $Ura^-$ , se pasaron los heterocigóticos *URA3* por placas de ácido 5-fluoro-orótico (5-FOA) + uracilo, tal como se indica en la Figura 25. Los segregantes  $Ura^-$  se utilizaron para la interrupción del segundo alelo *RAD52*. Para ello, se transformaron nuevamente con el casete de disrupción y los transformantes  $Ura^+$  fueron seleccionados en medio SC -Uracilo, procediéndose a continuación a su verificación. Estos pasos se describen en detalle en el apartado 4.



**Fig 23.** Verificación de los mutantes nulos *rad52::hisG/rad52::hisG-URA3-hisG*.

Seleccionamos dos transformantes *URA3* independientes, los cuales fueron verificados mediante PCR utilizando los iniciadores Ct52F y URA2. Dichos iniciadores amplificaron la banda esperada de 2.2 kb (Figura 23).

### 3.B. GENERACIÓN DE MUTANTES NULOS *Ura<sup>+</sup> rad52::hisG/rad52::hisG*.



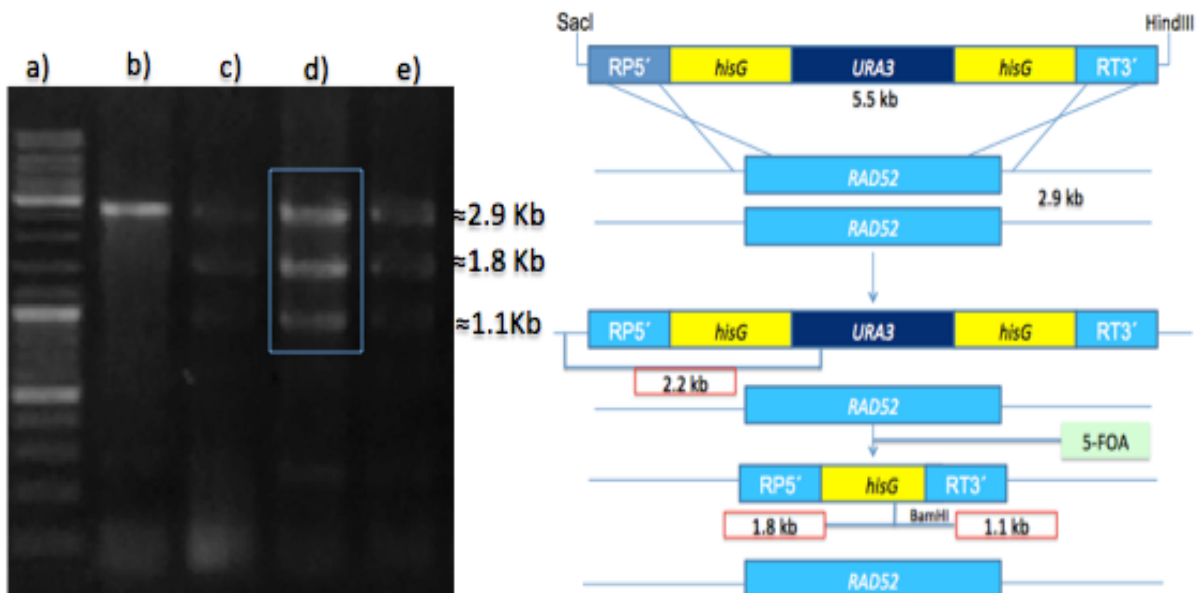
**Fig. 24** Diagrama de interrupción y verificación del mutante nulo *Ura<sup>-</sup>*, (a) Marcador de peso molecular, (b) cepa tipo MYA3404, (c y d) mutante *rad51-ΔΔ /rad52::hisG/rad52::hisG* banda de 1.1 kb.

Para obtener el mutante nulo  $Ura^-$ , se pasaron los mutantes nulos *URA3* por placas de ácido 5-fluoro-orótico (5-FOA) + uracilo, tal como se indica en la Figura 24. Se utilizó los iniciadores Ct52F y Ct52I un iniciador interno del gen *RAD52* para verificar la interrupción de *Rad52* y la pérdida del marcador *URA3*.

#### 4.A. DISRUPCIÓN DEL PRIMER ALELO DE *RAD52* EN EL FONDO *rad51-ΔΔ*.

Se utilizó la misma estrategia descrita en el apartado 3. Dos transformantes *RAD52/rad52::hisG-URA3-hisG* correctos (ver apartado 3), se crecieron en medio rico YPD para la estimulación de la pérdida del marcador *URA3*. Los segregantes  $Ura^-$  fueron seleccionados en medio 5-FOA, para obtener el heterocigótico *RAD52/rad52::hisG* el cual se verificó por PCR utilizando los iniciadores Ct52F y Ct52R. Puesto que la banda del alelo silvestre (*RAD52*) tiene el mismo tamaño que la del interrumpido *rad52::hisG* el producto de PCR fue digerido con la enzima de restricción *Bam*HI, que escinde el alelo *rad52::hisG* (al existir un sitio para esta enzima en *hisG*), pero no *RAD52*, en dos bandas de 1.8 kb y 1.1 kb respectivamente (Figura 25).

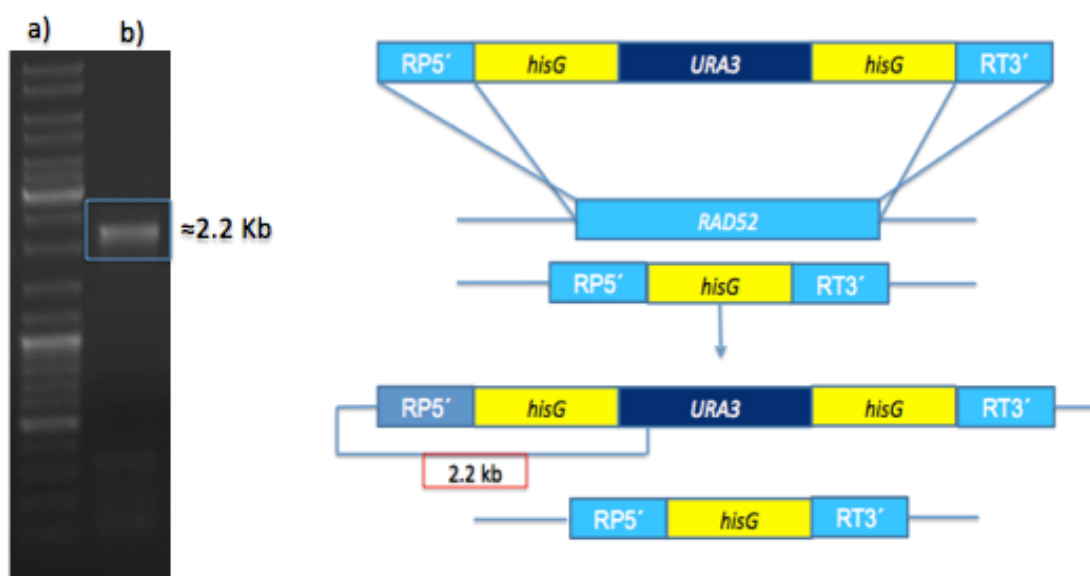
Por tanto, el producto de PCR del genoma del mutante deberá contener, además de ambas bandas, una adicional de 2.9 kb correspondiente al alelo silvestre (*RAD52*).



**Fig 25.** Diagrama de interrupción de un alelo y Verificación del transformante heterocigótico *rad52*, marcador de peso molecular (a), cepa tipo MYA-3404 gen silvestre (b), mutantes heterocigóticos *rad52* (c y d), mutante incorrecto (e).

#### 4.B. GENERACIÓN DEL MUTANTE NULO $Ura^+$ $rad51-\Delta\Delta$ $rad52::hisG/rad52::hisG-URA3-hisG$ .

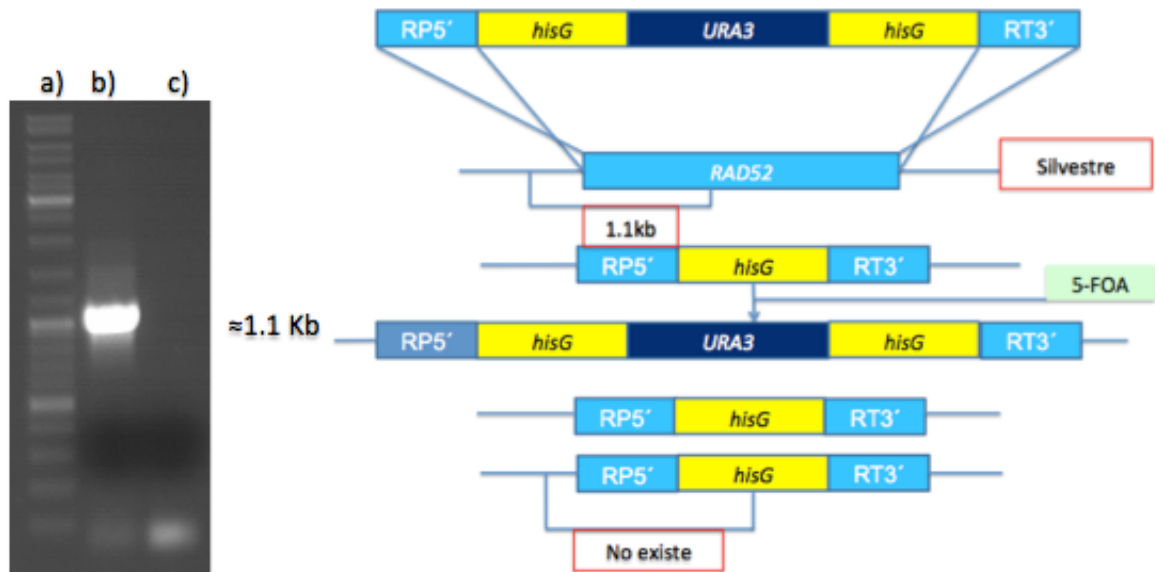
A continuación, en el mutante obtenido descrito en el apartado anterior ( $rad51-\Delta\Delta$   $RAD52/rad52::hisG$ ) interrumpimos el segundo alelo  $RAD52$ , siguiendo la misma estrategia. Se utilizaron dos mutantes independientes, los cuales se transformaron con el casete de interrupción de  $RAD52$ . Los transformantes se seleccionaron en medio SC – uracilo. Un mutante proveniente de cada tipo parental se comprobó mediante PCR utilizando los iniciadores Ct52F y URA2.



**Fig 26.** Diagrama de interrupción del segundo alelo y comprobación del doble mutante por PCR, marcador de peso molecular (a) y mutante  $rad51-\Delta\Delta$   $rad52::hisG-URA3-hisG/rad52::hisG$  (b) banda de 2.2 kb.

En la figura 26 se muestra la comprobación por PCR de la interrupción del segundo alelo de  $RAD52$  en el mutante  $rad51\Delta\Delta$ , para obtener el doble mutante  $rad51-\Delta\Delta$   $rad52::hisG/rad52::hisG-URA3-hisG$ . Como cabía esperar los iniciadores Ct52F y URA2 amplificaron una banda de 2.2 kb que apareció como consecuencia de la interrupción del alelo residual  $RAD52$  con el módulo  $hisG-URA3-hisG$ .

4.C. GENERACIÓN DEL MUTANTE NULO  $Ura^+$   $rad51-\Delta\Delta$   $rad52::hisG/rad52::hisG$ .



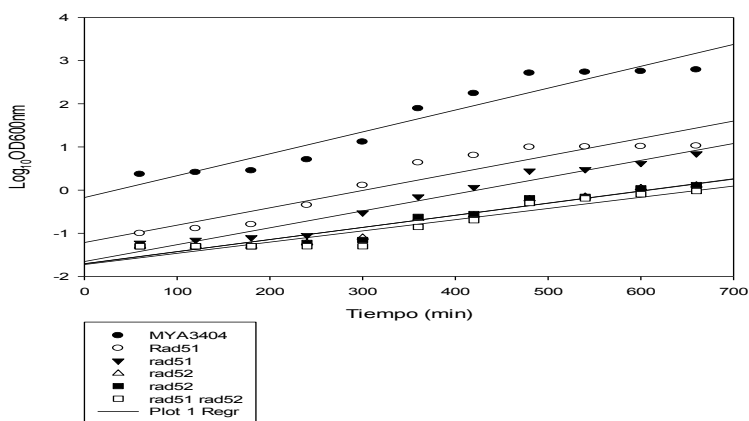
**Fig. 27** Diagrama de interrupción y verificación del mutante nulo  $Ura^-$ , (a) Marcador de peso molecular, (b) cepa tipo MYA3404, (C) mutante  $rad51-\Delta\Delta$   $/rad52::hisG/rad52::hisG$  banda de 1.1 kb.

Para obtener el mutante nulo  $Ura^-$ , se pasaron los mutantes nulos  $URA3$  por placas de ácido 5-fluoro-orótico (5-FOA) + uracilo, tal como se indica en la Figura 27. Se utilizó los iniciadores Ct52F y Ct52I un iniciador interno del gen  $RAD52$  para verificar la interrupción de  $Rad52$  y la pérdida del marcador  $URA3$ .

## 5.A. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA BÁSICA

### 1. ANÁLISIS DE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO.

El análisis de la velocidad de crecimiento se realizó con la finalidad de analizar si las mutaciones *rad51* y *rad52* alteraban la velocidad de crecimiento de la cepa parental. En la figura 25 se muestra la variación de la OD<sub>600</sub> respecto al tiempo de las cepas MYA-3404 (WT), el mutante nulo para *RAD51* (*rad51-ΔΔ*), la cepa reintegrante para el gen *RAD51* (*rad51/rad51::RAD51*) obtenida en este trabajo, dos mutantes nulos independientes de *RAD52* generados en este trabajo (*rad52-ΔΔ*), y un doble mutante nulo para los genes *RAD51* y *RAD52* (*rad51-ΔΔ rad52-ΔΔ*), generado también en este trabajo.

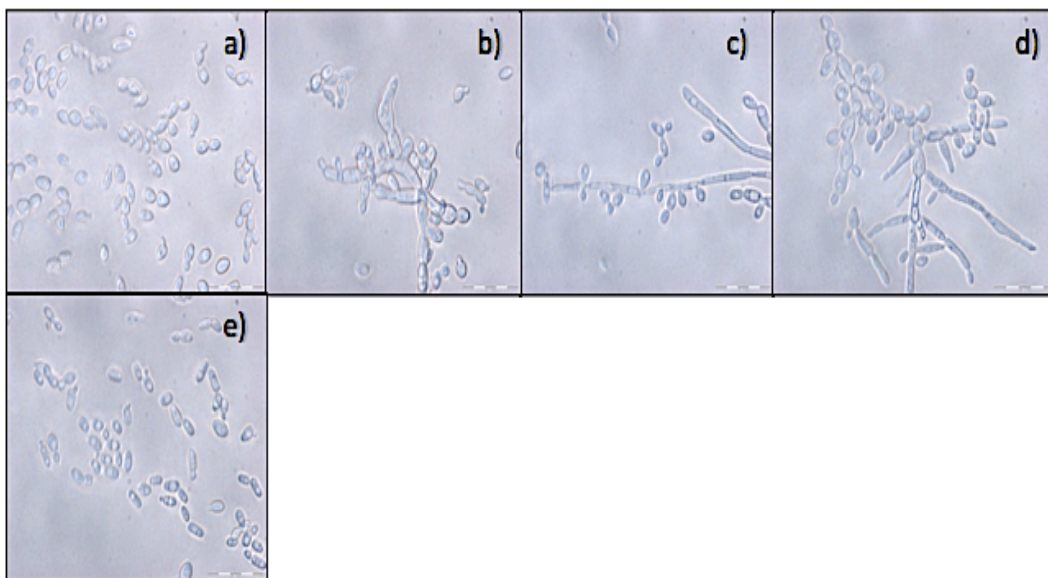


**Fig 28.** Análisis de la velocidad de crecimiento, se comparo la velocidad de crecimiento de los mutantes, los resultados de la medición de la OD<sub>600</sub> se graficaron y se muestran en la figura.

A partir de las curvas de crecimiento representadas en la Fig. 28, se calcularon tiempos de generación de 90 min para la cepa parental, 98 min para el reintegrante *RAD51*, 127 min para los mutantes nulos *rad51-ΔΔ*, 181 min para *rad52-ΔΔ* y 185min para el doble mutante *rad51-ΔΔ rad52ΔΔ*. Nuestros resultados indican que HR es necesaria para mantener una tasa normal de crecimiento. La restauración del tiempo de generación silvestre tras la reintegración del *RAD51* en el mutante *rad51* indica sin ambigüedad que el fenotipo de crecimiento lento es debido a defectos en HR. Ambos mutantes nulos *rad52ΔΔ* se comportan de la misma manera y exhiben una velocidad de crecimiento sensiblemente menor que *rad51ΔΔ*, como corresponde al mayor protagonismo de *RAD52* en HR. El doble mutante *rad51-ΔΔ rad52-ΔΔ* se comportó de manera similar a *rad52ΔΔ*, lo que indica que la mutación *rad52* es epistática a *rad51* para el crecimiento de *C. tropicalis*.

## 2. CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA.

Como se observa en la Fig. 29, en medio líquido YPD, la cepa tipo muestra solo células levaduriformes, mientras que los mutantes *rad51-ΔΔ* y *rad52-ΔΔ* mostraron formas aberrantes, que incluyen formas de levadura, y formas filamentosas que recuerdan pseudohifas o hifas atípicas. Las formas filamentosas fueron más finas y numerosas en los mutantes *rad52ΔΔ* (c) o *rad51-ΔΔ rad52-ΔΔ* (d) que en el mutante *rad51-ΔΔ* (b) que presentó filamentos muy engrosados y en menor cantidad. La reintegración de *RAD51* reversionó al fenotipo morfológico que fue indistinguible del silvestre (e).

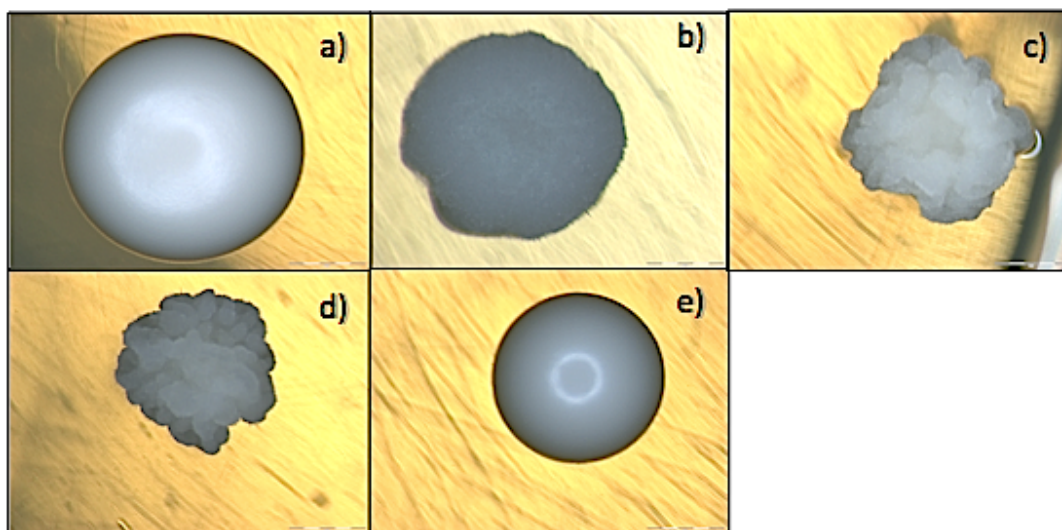


**Fig 29.** Análisis microscópico la morfología celular de *C. tropicalis* MYA-3404 (a), *rad51-ΔΔ* (b) , *rad52ΔΔ* (c), *rad51-ΔΔ rad52ΔΔ*(d) y *RAD51*(e) se crecieron en medio rico YPD en agitación durante 18 h, las células fueron fotografiadas con un microscopio óptico y el objetivo 40X.

Por tanto, *RAD51* y, en mayor medida, *RAD52* son necesarios para mantener la morfología celular de *C. tropicalis*. Adicionalmente, la mutación *rad52-ΔΔ* es epistática a *rad51-ΔΔ*, ya que el doble mutante *rad51-ΔΔ rad52ΔΔ* presentó una morfología similar al mutante simple *rad52ΔΔ*.

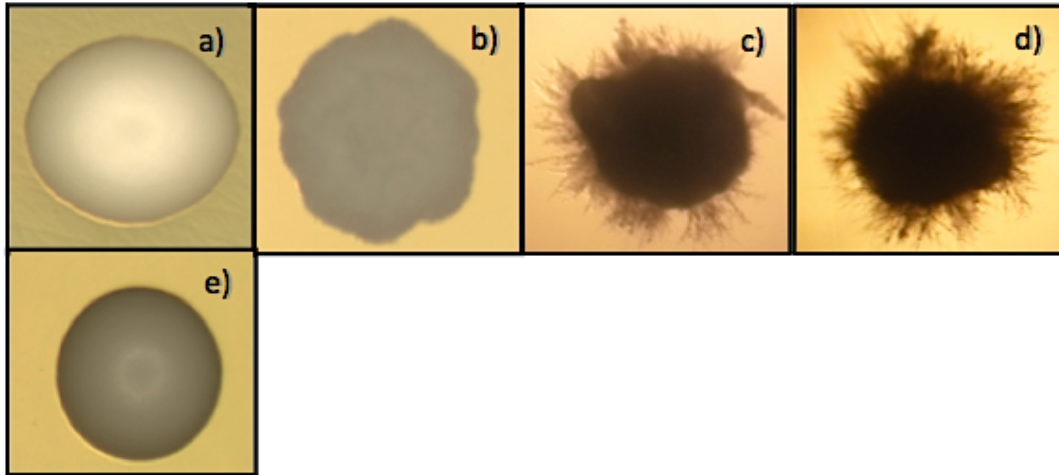
### 3. CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA.

La caracterización microscópica se realizó utilizando un microscopio óptico y se ajustó en el objetivo 6X. Las colonias de la cepa parental MYA-3404 son lisas, con borde bien definido, blanquecinas, y brillantes, mientras que las colonias del mutante *rad51-ΔΔ* no tienen un borde definido, y además son opacas. Las colonias formadas por los mutantes *rad52-ΔΔ* y el mutante *rad51-ΔΔ rad52-ΔΔ* fueron similares, con bordes lobulares y aspecto cordiforme o lobular. El reintegrante *RAD51* muestra una morfología muy similar a la de la cepa parental, lo que indica reversión de la mutación.



**Fig 30.** Análisis macroscópico de las cepas de *C. tropicalis* MYA-3404(a), *rad51-ΔΔ*(b), *rad52ΔΔ* (c) y *rad51-ΔΔ rad52-ΔΔ* (d) y *RAD51* (e) estas colonias fueron crecidas en agar YPD y las fotografías fueron tomadas con un microscopio óptico y el objetivo 6X.

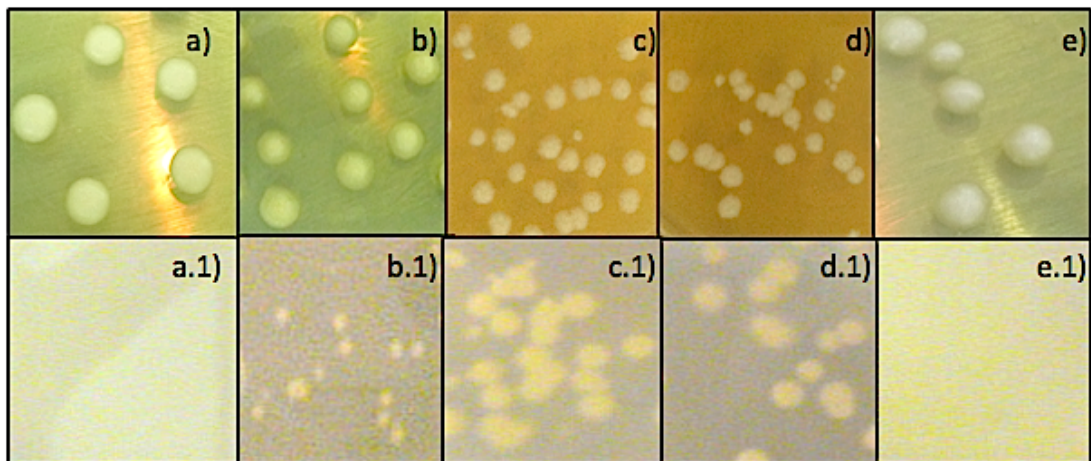
La figura 31 muestra fotografías tomadas con un microscopio óptico y con el objetivo 4x para mostrar la morfología colonial vista desde la parte inferior de las placas de agar YPD. Estas fotografías nos permiten observar la formación de filamentos que penetran o invaden el agar por las colonias de los mutantes *rad51-ΔΔ*, *rad52-ΔΔ*, y *rad51-ΔΔ rad52-ΔΔ*. En concordancia con la morfología celular en medio líquido, los mutantes *rad52-ΔΔ* y el doble mutante *rad51-ΔΔ rad52-ΔΔ* expresan una mayor cantidad de filamentos invasivos que el mutante *rad51-ΔΔ*, y el reintegrante *RAD51* muestra una morfología similar a la de la cepa parental.



**Fig 31.** Análisis macroscópico de *C. tropicalis* MYA-3404(a), *rad51-ΔΔ* (b) , *rad52-ΔΔ* (c), *rad51-ΔΔ rad52-ΔΔ* (d) y *RAD51* (e), estas colonias fueron crecidas en agar YPD y las fotografías fueron tomadas con un microscopio óptico y el objetivo 4X.

### 3. ANÁLISIS DE INVASIVIDAD EN AGAR.

Para evaluar la invasividad en agar, células aisladas en agar YPD se incubaron a 30°C durante 5 días y se tomaron fotografías de las colonias resultantes. Posteriormente, las colonias se lavaron placas con agua estéril, y se volvieron a fotografiar por la parte inferior.



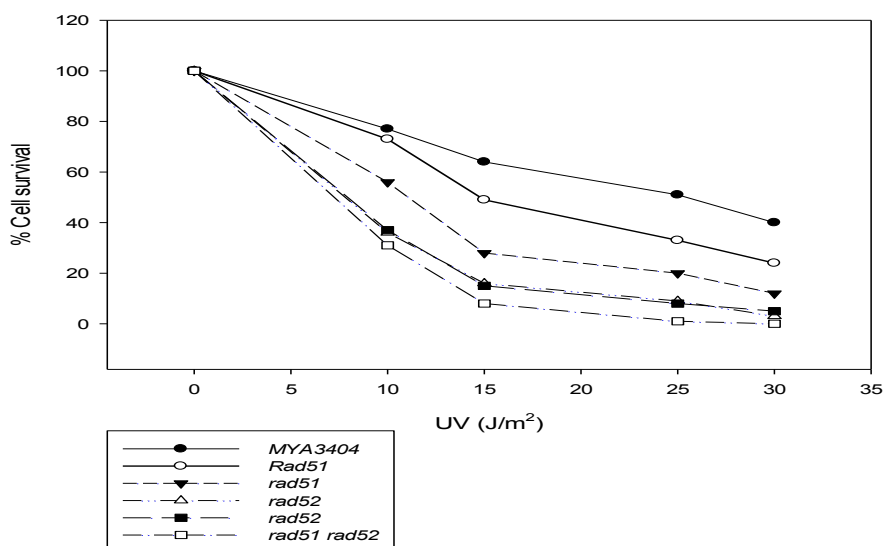
**Fig 32.** Análisis de invasividad en agar de las cepas MYA-3404 (a), los mutantes *rad51-ΔΔ* (b) , *rad52ΔΔ* (c y d) y el mutante *rad51-ΔΔ rad52-ΔΔ* (e). Fila superior: colonias de 5 días de cada una de las cepas. Fila inferior: las mismas colonias, una vez lavadas.

La cepa WT no mostro ninguna invasividad en agar después de 5 días de incubación, mientras que los mutantes *rad51-ΔΔ*, y, en mayor medida los mutantes *rad52ΔΔ* y *rad51-ΔΔ rad52ΔΔ* sí muestran invasividad en agar. De nuevo, la reintegración de *RAD51* revirtió la mutación.

## 5.B. ANÁLISIS DE LA SENSIBILIDAD A AGENTES QUE DAÑAN EL DNA.

### 1. ANÁLISIS DE LA SENSIBILIDAD A RADIACIÓN ULTRAVIOLETA.

La radiación ultravioleta induce la formación de dímeros de ciclopirimidina y (6-4) fotoproductos en el DNA que son normalmente reparados por el sistema NER. Sin embargo, HR también participa en la recuperación de estas lesiones (Birrell et al., 2001; Jang et al, 1995). En *S. cerevisiae*, Rad51 está implicada en la reparación acoplada a la transcripción de daños por radiación UV cuando están presentes moléculas homologas (Aboussekhra y Al-Sharif, 2005), y ambos *Rad51* y *Rad52* intervienen en la reparación postreplicativa de daños inducidos por la radiación UV (Gangavarapu et al., 2007).

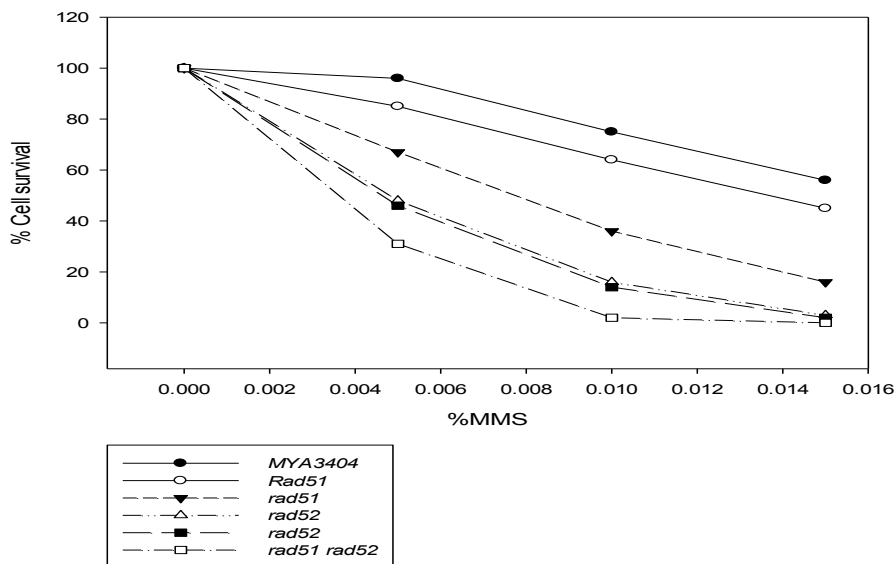


**Fig 33.** Análisis de la sensibilidad a luz UV. Las cepas indicadas se sometieron a dosis de 10,15,25 y 30 J/m<sup>2</sup>.

En primer lugar, se determinó la supervivencia de las cepas MYA-3404 (cepa tipo), los mutantes *rad51-ΔΔ*, *rad52-ΔΔ*, *rad51-ΔΔ rad52-ΔΔ*, y el reintegrante RAD51, mediante un ensayo de CFU, a dosis de luz Ultravioleta de 10-30 J/m<sup>2</sup>. El reintegrante mostró una ligera sensibilidad a respecto la cepa parental, mientras que los mutantes *rad51-ΔΔ*, y en mayor medida, los mutantes *rad52ΔΔ* y el doble mutante *rad51-ΔΔ rad52ΔΔ* exhibieron una marcada sensibilidad a UV.

## 2. ANÁLISIS DE LA SENSIBILIDAD A METIL METANO SULFONATO (MMS).

El MMS es un agente alquilante que N-metila bases del DNA, especialmente N7-metilguanina y N3-metiladenina que bloquean la progresión de la horquilla de replicación. Aunque estas lesiones se reparan preferentemente por el sistema BER, existe evidencia abrumadora de que los mutantes HR son sensibles a MMS, lo que sugiere que algunos daños ocasionados por el MMS son reparados vía HR (Wyatt and Pittman, 2006 ).

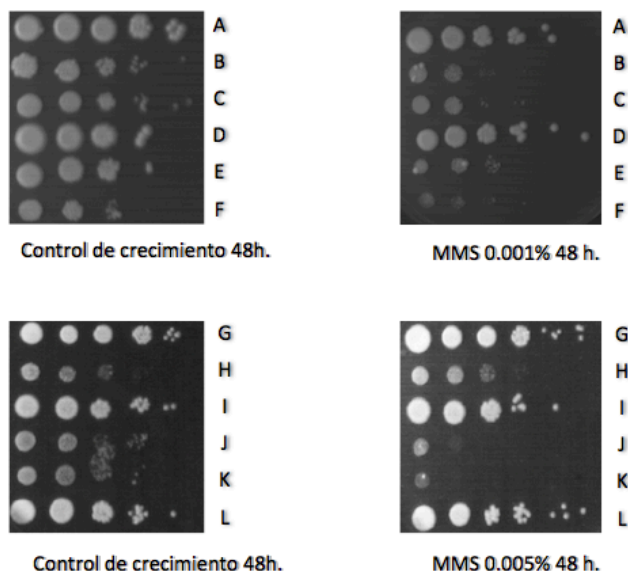


**Fig 34.** Análisis de la sensibilidad a tratamientos crónicos con MMS de las cepas indicadas se sometieron a las siguientes concentraciones de MMS 0.005,0.010 y 0.015%.

Se determinó la supervivencia de las cepas MYA-3404 (cepa tipo), los mutantes *rad51-ΔΔ*, *rad52-ΔΔ*, *rad51-ΔΔ rad52-ΔΔ*, y el reintegrante *RAD51*, mediante un ensayo de CFU a diferentes concentraciones de MMS (0.005- 0.010%). Nuevamente, los mutantes *rad51-ΔΔ*, y en mayor medida *rad52ΔΔ*, mostraron una marcada sensibilidad diferentes concentraciones de MMS. El doble mutante *rad51-ΔΔ rad52-ΔΔ* fue más sensible que *rad52-ΔΔ*, lo que sugiere la existencia de vías de reparación de lesiones MMS que son dependientes de Rad51 e independientes de Rad52. De nuevo, el reintegrante *RAD51* mostro una ligera sensibilidad a MMS respecto a la cepa parental, sugiriendo haploinsuficiencia (efecto de dosis génica).

Como complementación al experimento de CFU (Fig. 34), se realizaron experimentos

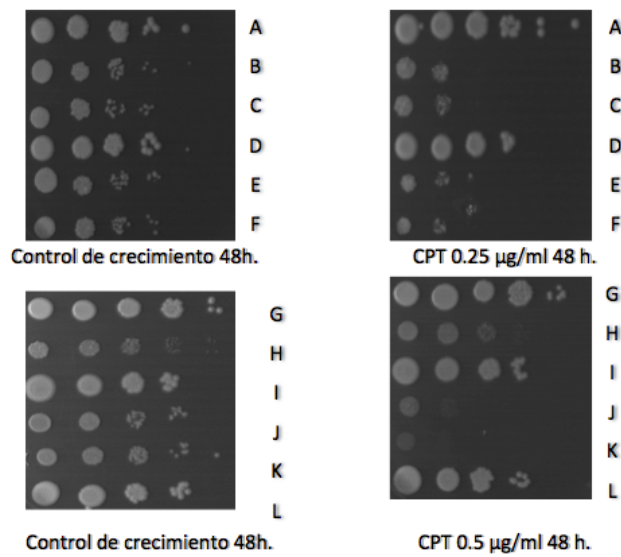
de dilución seriada (drop test) (Fig. 35). Nótese que las concentraciones de MMS utilizadas fueron 5 veces menor para los mutantes *rad52* $\Delta\Delta$  y *rad51*- $\Delta\Delta$  *rad52* $\Delta\Delta$  que para *rad51*- $\Delta\Delta$  y el reintegrante *RAD51*. Aunque este test es menos sensible que el anterior, obtuvimos esencialmente los mismos resultados.



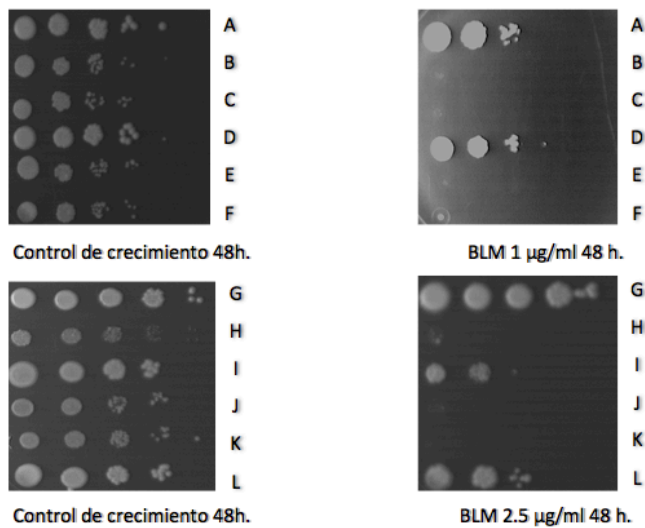
**Fig 35.** Análisis de la sensibilidad a MMS, las cepas utilizadas de *Candida albicans* CAF2(A y G), *rad52* $\Delta\Delta$ (B), *rad51* $\Delta\Delta$  *rad52* $\Delta\Delta$  (C) y *rad51* $\Delta\Delta$  (H); de *C. tropicalis* son las siguientes (D e I)MYA-3404, (J y K) *rad51* $\Delta\Delta$ , (E) *rad52* $\Delta\Delta$ , (F) *rad51* $\Delta\Delta$  *rad52* $\Delta\Delta$  y (L) *Rad51*. Se indican las concentraciones de MMS.

### 3. ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD A DROGAS ANTITUMORALES: CAMPTOTECINA (CPT) Y BLEOMICINA (BLM).

El fármaco antitumoral camptotecina (CPT) inhibe a la topoisomerasa I (Hsiang et al., 1985, 1989), lo que genera roturas (mellans o SSB) bloqueados por 3' fosfotirosilproteína en el DNA; si no se reparan, serán procesadas a DSB en la subsecuente replicación del DNA, cuya reparación exige la participación de HR (Lettier et al., 2006). La droga bleomicina (BLM) forma un complejo en presencia de oxígeno y de hierro, que interacciona con los átomos de hidrogeno de la deoxirribosa y produce sitiosapurínicos y apirimidícos, conocidos como AP oxidativos, y roturas de cadena sencilla SSB terminados en 3'-fosfoglicolato (3'-PG). La bleomicina se reactiva in situ durante la formación de la SSB en el sitio primario siendo capaz de producir un ataque secundario en la otra banda, en las secuencias CGCC, para generar DSB. Este agente es capaz de inhibir a *C. albicans* *in vitro* pero no protegió de la candidiasis experimental de ratones (Graybill et al., 1996).



**Fig 36.** Análisis de la sensibilidad a CPT. Se analizaron las cepas de *C. albicans* CAF2 (A y G), *rad52* $\Delta\Delta$  (B), *rad51* $\Delta\Delta$  *rad5*- $\Delta\Delta$  (C) y *rad51* $\Delta\Delta$  (H); de *C. tropicalis* MYA-3404 (D e I) *rad51*- $\Delta\Delta$  (J y K), *rad52* $\Delta\Delta$  (E) *rad51*- $\Delta\Delta$  *rad52*- $\Delta\Delta$  (F) y el reintegrante *RAD51* (L). Se indican las concentraciones de CPT utilizadas.



**Fig 37.** Análisis de la sensibilidad a BLM. Se analizaron las cepas de *C. albicans* CAF2 (A y G), *rad52*- $\Delta\Delta$  (B), *rad51*- $\Delta\Delta$  *rad52*- $\Delta\Delta$  (C) y *rad51*- $\Delta\Delta$  (H); de *C. tropicalis* MYA-3404 (D e I) *rad51*- $\Delta\Delta$  (J y K), *rad52* $\Delta\Delta$  (E) *rad51*- $\Delta\Delta$  *rad52*- $\Delta\Delta$  (F) y el reintegrante *RAD51* (L). Se indican las concentraciones de BLM utilizadas.

Nuestros resultados indican que los mutantes *rad52* $\Delta\Delta$  y el mutante *rad51*- $\Delta\Delta$  *rad52* $\Delta\Delta$  de *C. tropicalis* son significativamente más sensibles a CPT y BLM que los mutantes *rad51*- $\Delta\Delta$ . Las cepas de *C. albicans* (silvestre, *rad51*- $\Delta\Delta$ , y *rad51*- $\Delta\Delta$  *rad52*- $\Delta\Delta$ ), utilizadas como controles exhibieron un comportamiento similar al de sus correlativas de *C. tropicalis*, y se ajustaron a lo descrito previamente (García-Prieto *et al.*, 2010).

Concluimos que 1) HR es importante para la recuperación de daño causado por UV MMS, BLM, CPT en *C. tropicalis*, 2) Rad52 juega un papel más importante que Rad51, 3) la mutación *rad52* es epistática a *rad51*, y 4) existe un efecto de dosis génica para *RAD51*, ya que el revertiente (una copia) no reganó totalmente la resistencia de la cepa parental (dos copias) a los agentes indicados.

## DISCUSION

Las infecciones nosocomiales fúngicas son causadas por el género *Candida*. Hace unos 20 años, estas infecciones eran causadas principalmente por la especie *albicans* pero recientemente se han aislado cepas de la especie *C. tropicalis* con una frecuencia cercana al 80% de pacientes de UTI y pacientes oncológicos en la República Mexicana. Previamente, nuestro grupo de trabajo analizó 40 cepas de *C. tropicalis* mexicanas (Cuevas, 2010) y encontró una alta variabilidad cariotípica entre ellas. Estas cepas también difieren en su capacidad para realizar “switching” blanco/opaco y su resistencia a antifúngicos. La posibilidad de que la sensibilidad diferencial a antifúngicos estuviera ligada a cambios genómicos nos condujo a investigar los procesos de HR en esta especie. En concreto, estamos analizando en profundidad el papel de los genes *RAD51* y *RAD52* en la biología del patógeno a estreses a través de la caracterización de los mutantes *rad51* y *rad52* con respecto a crecimiento, morfología celular y colonial, y susceptibilidad a agentes que dañan DNA, incluyendo UV, MMS, y los agentes antitumorales BLM y CPT.

Las principales rutas conservativas de reparación por HR en *S. cerevisiae* (SDSA, DSBR) necesitan de la participación de Rad51 y Rad52. Un proceso no conservativo denominado BIR (ya que se pierde información genética), también requiere Rad51 y Rad52, y se ha descrito también un proceso mecanísticamente similar a BIR pero poco eficiente que es independiente de Rad51 y dependiente de Rad52. Otro proceso que requiere homología pero es independiente de Rad51 y altamente dependiente de Rad52 es SSA, que resulta en la pérdida del material genético entre dos repeticiones directas (Paques and Haber, 1999). En *S. cerevisiae*, se ha descrito la existencia de recombinación en ausencia de Rad52 (Coic *et al.*, 2008).

Los mutantes nulos en genes HR importantes en la reparación del DNA como *rad51* y *rad52* en *C. albicans* exhiben un fenotipo filamentoso (Ciudad *et al.*, 2004; Legrand *et al.*, 2007). La filamentación de los mutantes *rad52-ΔΔ* parece estar inducida por el desacoplamiento de varios eventos del ciclo celular derivado de la acumulación de DSBs no reparados (Andaluz *et al.*, 2006). Se ha sugerido que la escasa filamentación de la cepa *rad51-ΔΔ* comparada con la cepa *rad52-ΔΔ* se debe a que la reparación de las DSBs y otras lesiones espontáneas es más dependiente de Rad52 que de Rad51 (Garcia Prieto, 2011). *C. tropicalis* exhibe el mismo comportamiento que *C. albicans* y por lo tanto podemos explicarlas por el mismo razonamiento. Nuestros resultados indican que

lo mismo es válido para las lesiones inducidas por exposición a mutágenos como luz UV, MMS, CPT y BLM.

En *S. cerevisiae*, Rad52 es la proteína más importante del grupo de epistasis Rad52. Los miembros de este grupo están implicados en reparación de lesiones causadas por radiación ionizante, pero los mayores defectos en recombinación y reparación de DNA son conferidos por la falta de Rad52 (es decir mutantes *rad52*). Es más, el doble mutante *rad52* y cualquier otro gen del grupo se comporta como *rad52*, lo que indica que todos los genes están implicados en la misma ruta de reparación y la mutación *rad52* es epistática a cualquier otra, incluyendo *rad51*. Nosotros hemos trasladado estos estudios a *C. tropicalis*, y hemos encontrado que Rad52 es más importante que Rad51 en la resistencia a diferentes mutágenos. Para analizar relaciones de epistasis hemos construido el doble mutante *rad51 rad52*, y hemos encontrado que para la mayoría de los fenotipos Rad52 es epistático a Rad51. El hecho de que sensibilidad a MMS del doble mutante *rad51 rad52* sea mayor que la del mutante simple *rad52* sugiere que en la reparación de estas lesiones intervienen mecanismos independientes de Rad52 que son dependientes de Rad51. Estas rutas se han descrito en *S. cerevisiae* (Coic *et al.*, 2008).

El comportamiento de *C. tropicalis* parental y mutantes siguió una pauta similar a las correspondientes cepas de *C. albicans*, lo que sugiere que utilizan sistemas de reparación similares. Graybill *et al.* (1996) describieron que *C. albicans* era muy sensible a BLM *in vitro*; sin embargo nuestros resultados indican que tanto *C. albicans* como *C. tropicalis* son bastante resistentes tanto si la susceptibilidad se determina por el método de CFU como por el método de la dilución en gotas. Una posibilidad es que esta discrepancia sea debido al uso de diferentes cepas de *C. albicans* entre Graybill *et al.* (1996) y nosotros. Estudios futuros estarán encaminados a la generación de nuevos mutantes y sus respectivos reintegrantes, y a la comparación de los mismos con las cepas correspondientes de *S. cerevisiae* y *C. albicans*. Sería de interés analizar la posible aparición de resistentes de *C. tropicalis* a diferentes antifúngicos tras tratamiento del hongo con agentes antitumorales, incluyendo IR, BLM, y CPT, y correlacionarla con cambios cariotípicos. Ello permitiría seleccionar el agente antifúngico ideal tras cada tratamiento antitumoral específico para evitar o atajar eficientemente infecciones por este patógeno oportunista emergente.

## CONCLUSIÓN

Nuestros resultados demuestran la importancia de las proteínas Rad52 y Rad51 en la biología de *C. tropicalis*, ya que la ausencia de cualquiera de ellas o de ambas causan defectos que disminuyen la viabilidad y/o la adaptabilidad de este microorganismo a los diferentes estreses. La interferencia con ambos productos génicos podría ayudar a controlar las infecciones causadas por *C. tropicalis*. La ausencia de estas proteínas produce cambios fenotípicos en el crecimiento, así como en la morfología colonial y celular, siendo más marcados estos cambios en ausencia de Rad52 y menos drásticos en ausencia de Rad51. Al menos para *rad51*, hemos podido demostrar que estos fenotipos se deben a la ausencia del gen y no a otra mutación secundaria, ya que la reinscripción de *RAD51* restauró el crecimiento y la morfología de la cepa parental. Los mutantes *rad52* fueron también especialmente sensibles a la exposición a agentes que dañan el DNA algunos de los cuales causaron un 100% de pérdida de viabilidad mientras que en la cepa parental apenas se llegó al 35% de pérdida de la viabilidad. Nuevamente, la reinscripción de *RAD51* casi restauró el fenotipo silvestre, lo que sugiere haploinsuficiencia para *RAD51*. El hecho de que los mutantes *Ctrad51* fueran menos sensibles que los *Ctrad52* y que la sensibilidad del doble mutante *Ctrad51 rad52* fuera similar a la de *Ctrad52* sugiere que la mutación en *RAD52* es epistática a *RAD51*. Sin embargo, para la sensibilidad a MMS parece haber un afecto aditivo de ambas mutaciones, lo que sugeriría la existencia de rutas de reparación HR, que por sí solas o en colaboración con otros sistemas (ej. BER) utilizan exclusivamente Rad51.

## BIBLIOGRAFIA

1. Alby, K., Bennett, R.J., 2009. Stress-induced phenotypic switching in *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell.* 20, 3178–3191.
2. Porman, A, Hirakawa, P. MTL–Independent Phenotypic Switching in *Candida tropicalis* and a Dual Role for Wor1 in Regulatin Switching and Filamentation plos genetics March 2013 Volume 9 Issue 3 e1003369.
3. Andaluz, E, Bellido, A, Gómez-Raja, J, Selmecki, A, Bouchonville, K, Calderone, R, Berman, J., and Larriba, G. 2011. Rad52 function prevents chromosome loss and truncation in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology* 7532.
4. Andaluz, E, Ciudad, T, Gómez-Raja, J, Calderone, R, and Larriba, G. 2006. Rad52 depletion in *Candida albicans* triggers both the DNA-damage checkpoint and filamentation accompanied by but independent of expression of hyphaespecific genes. *Mol Microbiol. Mar*;59(5):1452-72.
5. Andaluz, E, Ciudad, T, Gomez-Raja, J, Calderone, R, Larriba, G, 2006. Rad52 depletion in *Candida albicans* triggers both the DNA-damage checkpoint and filamentation accompanied by but independent of expression of hyphaspecific genes. *Mol Microbiol.* 59, 1452-72.
6. Arenas, R. *Micología Médica Ilustrada*. 2008. Mc Graw Hill. pp 307-329.
7. Basu, S., Chakraborty, D., Kumar, S., and Das, S. 2011. Biological Characteristics of Nosocomial *Candida tropicalis* Isolated from Different Materials of Critically III Patients at ICU. *Int. J. Micro.* 2(2): 112-119.
8. Bennett, R. J., Johnson, A. D., 2003. Completion of a parasexual cycle in *Candida albicans* by induced chromosome loss in tetraploid strains. *EMBO J.* 22, 2505- 15.
9. Berit K and Symington L. 2004. Recombination proteins in yeast *Annu. Rev. Genet.* 38:233–71 doi: 10.1146/annurev.genet.38.072902.091500 Copyright\_c 2004 by Annual Reviews.
10. Bingbing Li, Ting Guo, Yong Chen, Jingjing Xie, Huanqing Niu, Dong Liu, Jian Cheng, Xiaochun Chen, Jinglan Wu, Wei Zhuang, Chenjie Zhu, Hanjie Yinga. 2014 Genome Sequence of *Candida tropicalis* no. 121, Used for RNA Production, genome.
11. Birrell, G.W., Giaever, G., Chu, A.M., Davis, R.W., Brown, J.M., 2001. A genome wide screen in *Saccharomyces cerevisiae* for genes affecting UV radiation sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 12608–12613.
12. Blandin G, Ozier-Kalogeroppulos O, Wincker P, Artiguenave F, Dujon B. 2000. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 16. *Candida tropicalis*. *FEBS Lett.* 487:91–94.
13. Boeke, J. D., LaCroute, F., Fink, G. R., 1984. A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol Gen Genet.* 197, 345-6.
14. Calderone, R., 2002. *Candida and Candidiasis*. ASM Press, Washington.
15. Chai. L.Y.A., Denning, D.W., and Warn, P. 2010. *Candida tropicalis* in human.
16. Chico, L., Ciudad, T., Hsu, M., Lue, N. F., Larriba, G., 2011. The *Candida albicans* Ku70 modulates telomere length and structure by regulating both telomerase and recombination. *PLoS One.* 6, e23732.
17. Ciudad, T, Andaluz E, Steinberg-Neifach O, Lue NF, Gow NA, Calderone RA, Larriba G. 2004. Homologous recombination in *Candida albicans*: role of CaRad52p in DNA repair, integration of linear DNA fragments and telomere length. *Mol Microbiol. Aug*;53(4):1177-94.
18. Ciudad, T., Andaluz, E., Steinberg-Neifach, O., Lue, N. F., Gow, N. A., Calderone, R. A., Larriba, G., 2004. Homologous recombination in *Candida albicans*: role of CaRad52p in DNA repair, integration of linear DNA fragments and telomere length. *Mol Microbiol.* 53, 1177-94.
19. Col, E, Feldman, T, Landman, A.S, Haber, J.E, 2008. Mechanisms of Rad52-independent spontaneous and UV-induced mitotic recombination in *Saccharomyces*

- cerevisiae*. *Genetics* 179, 199–211.
20. Cornisteina W, Moraa A, Orellanab N, Capparellic F y Castillo M, 2013. *Candida*: epidemiología y factores de riesgo para especies no albicans *Enferm Infecc Microbiol Clin*;31(6):380–384
  21. Davis, A.P., Symington, L.S., 2004. RAD51-dependent break-induced replication in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 24, 2344–2351. *disease. Crit. Rev. Microbiol.* 36: 282-298.
  22. Kontoyiannis, D, Vaziri, I, Hanna, A, Maha Boktour, Jack Thornby, Ray Hachem, Gerald P. Bodey, and Issam I 2005. Risk Factors for *Candida tropicalis* Fungemia in Patients with Cancer *Clinical Infectious Diseases*; 33:1676–81
  23. Eggimann P, Garbino J, Pittet D, 2003. Epidemiology of *Candida* species infections in critically immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis* 3(11):685–702.
  24. Experimental disseminated candidiasis in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 816–818.
  25. Fonzi, W.A., Irwin, M.Y., 1993. Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* 134, 717–728. For postreplication repair of UV-damaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 27, 7758–7764.
  26. Forche, A., G. May, and P. T. Magee. 2005. Demonstration of loss of heterozygosity by single-nucleotide polymorphism microarray analysis and alterations in strain morphology in *Candida albicans* strains during infection. *Eukaryot. Cell* 4:156–165.
  27. Goudolss, C, 2009. Eukaryotic translesion polymerases and their roles and regulation in DNA damage tolerance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 73, 134-54.
  28. García-Prieto, F., Gómez-Raja, J., Andaluz, E., Calderone, R., and Larriba, G. 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.* May; 47(5):433-45.
  29. Ghannoum, V.M., Rice, L.B. 1999. Antifungal Agents: Mode of action, Mechanism of Resistance, and Correlation of these Mechanisms with Bacterial Resistance. *Clin. Microbiol Rev.* 12:501.
  30. Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande Berg J, Hu J, Messer S, Herwaldt L, Pfaller M, Diekema D. 2003. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis* 37(9):1172–1177.
  31. Hsiang, Y. H., Hertzberg, R., Hecht, S., Liu, L. F., 1985. Camptothecin induces proteinlinked
  32. Hsiang, Y.H., Hertzberg, R., Hecht, S., Liu, L.F., 1985. Camptothecin induces proteinlinked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* 260, 14873–14878.
  33. Hsiang, Y.H., Liu, L.F., Wall, M.E., Wani, M.C., Nicholas, A.W., Manikumar, G., Kirschenbaum, S., Silber, R., Potmesil, M., 1989. DNA topoisomerase I-mediated DNA cleavage and cytotoxicity of camptothecin analogues. *Cancer Res.* 49, 4385–4389.
  34. Huang, M.E., Kolodner, R.D., 2005. A biological network in *Saccharomyces cerevisiae* prevents the deleterious effects of endogenous oxidative DNA damage. *Mol. Cell.* 17, 709–720.
  35. Hull, C.M., Raisner, R.M., Johnson, A.D., 2000. Evidence for mating of the asexual yeast *Candida albicans*. *Science* 289, 307–310.
  36. Íñiguez RC, Morales CI, Rivera ME. 2009. Colonización por *Candida* en enfermos en estado crítico acta médica grupo ángeles. Volumen 7, No. 2, abril-junio 2009
  37. Jacobsen, M. D. 2008. Molecular phylogenetic analysis of *Candida tropicalis* isolates by multilocus sequence typing. *Fungal Genet. Biol.* 45: 1040–1042.
  38. Krcmery V, Barnes AJ. 2002. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect* 50(4):243–260.
  39. Krogh, B. O., Symington, L. S., 2004. Recombination proteins in yeast. *Annu Rev Genet.* 38, 233-71.

40. Lass-Flörl C. 2009. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses* 52(3):197–205.
41. Povirk, L, Tong, Z, Ruizhe, Z, Morton J. Cowan, and Yannoni, S. 2007. Processing of 3-Phosphoglycolate-terminated DNA Double Strand Breaks by Artemis nuclease the journal of biological chemistry vol. 282, no. 6, pp. 3547–3558.
42. Lodder, J, 1970. The Yeasts. A taxonomic study, 2nd ed. Amsterdam & London, North Holland Publishers, pp. 34-113.
43. Lovett, S. 1994. Sequence of the RAD55 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: similarity of RAD55 to prokaryotic RecA and other RecA-like proteins. *Gene* 142:103–106.
44. Lundstrom T, Sobel J. 2001. Nosocomial Candiduria: a review. *Clin Infect Dis* 32(11):1602–1607.
45. Milne, G, and Weaver, T. 1993. Dominant negative alleles of RAD52 reveal a DNA repair/recombination complex including Rad51 and Rad52. *Genes Dev.* 7:1755–1765.
46. Mladelov E, Ilianis G. 2011. Induction and repair of DNA double strand breaks: The increasing spectrum of non-homologous end joining pathways *Molecular Mechanisms of Mutagenesis Volume 711, Issues 1–2, 3 June 2011, Pages 61–72.*
47. Negri, M, Silva, S, Oliveira, R. 2011. Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. *J. Clin Microbiol Infect Dis.* 011-1455-.
48. Pappas P. Clinical practice guidelines for the management of Candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 2009; 48:503-35.
49. Pardo, B., Gomez-Gonzalez B y Aguilera A. 2009. DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cell Mol Life Sci* 66:1039-1056.
50. Porman AM, Alby K, Hirakawa, M, and Bennett R. 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.
51. Ragu, S, Faye, G, Iraqui, I, Masurel-Heneman, A, Kolodner, D, Huang, M, 2007. Oxygen metabolism and reactive oxygen species cause chromosomal rearrangements and cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 9747–9752.
52. Rajendra, J, Kothavade, M, Kura, G. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole Panthaki *Journal of Medical Microbiology* (2010), 59, 873–880.
53. Ranatunga, W., D. Jackson, J. A. Lloyd, A. L. Forget, K. L. Knight, and G. E. Borgstahl. 2001. Human RAD52 exhibits two models of self-association. *J. Biol. Chem.* 276:15876–15880.
54. Rijkers, T, Van Den Ouweland, J, Morolli, B, Rolink, A, Baarends, W, Van Sloun, A, and Pastink, A. 1998. Targeted inactivation of mouse RAD52 reduces homologous recombination but not resistance to ionizing radiation. *Mol. Cell. Biol.* 18:6423–6429.
55. Silva, S, Hooper, J, Henriques, Oliveira, M, Azeredo, J and Williams, W, The role of secreted aspartyl proteinases in *Candida tropicalis* invasion and damage of oral mucosa *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 264–272
56. Saikat, B, Debasrita, C, Subrata, K, and Satada, A. 2011. *Das International Journal of Microbiological Research* 2 (2): 112-119, 2011 ISSN 2079-2093© IDOSI Publications.
57. Snyderman D. 2003. Shifting patterns in the epidemiology of nosocomial *Candida* infections. *Chest* 123(5 Suppl):500S–503S.
58. Symington, L. 2002. Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66, 630.
59. Walther, A, Wendland, J, 2003. An improved transformation protocol for the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Curr. Genet.* 42, 339– 343.
60. Waters, S , Minesinger, B. K., Wilttrout, M. E., D'Souza, S., Woodruff, R. V., Walker, Xie J, Du H, Guan G, Tong Y, Kourkoumpetis TK, Zhang L, Bai FY, Huang G. 2012. N-Acetylglucosamine induces white-to-opaque switching and mating in *Candida tropicalis*, providing new insights into adaptation and fungal sexual evolution. *Eukaryot. Cell* 11:773–782.

61. Yoshida, J., Umezu, K., Maki, H., 2003. Positive and negative roles of Homologous recombination in the maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 164, 31-46.
62. Zaugg C, Zepelin MB, Reichard U et al. 2001. Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. *Infect Immun*; 69: 405–412.