



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**



---

**INSTITUTO DE CIENCIAS  
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS  
POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA**

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DEL  
MUTANTE *rad52-ΔΔ* de *Candida tropicalis***

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)**

**CON OPCIÓN EN: BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MICROBIANA**

**PRESENTA:**

IBT. JENNIFER LUCERO SAMPAYO MORALES

**ASESOR (ES) DE TESIS:**

M en C. ALEJANDRA PAULA ESPINOSA TEXIS

D en C. GERMÁN LARRIBA CALLE

**PUEBLA, PUE.**

**DICIEMBRE, 2017**



Puebla, Pue. a 23 de noviembre 2017.

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

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría de la alumna **Jennifer Lucero Sampayo Morales**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

**"Caracterización fenotípica y molecular del mutante *rad52-Δs* de *Candida Tropicalis*"**

A nuestro juicio, la alumna **Jennifer Lucero Sampayo Morales** puede proceder a la impresión de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente,

"Pensar Bien Para Vivir Mejor"

D.C. Patricia Sánchez Alonso

D.C. Germán Larriba Calle

D.C. Lucía Soto Urzúa

D.C. María Lilia Gedilio Ramírez

Posgrado en Ciencias Microbiológicas  
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC11,  
Ciudad Universitaria  
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72510  
41 (024) 229-55 00 Ext. 2182  
posgrado.micromicrobiologia@buap.mx

## AGRADECIMIENTOS



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

**Se agradece a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado  
por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del  
Programa II.**

## AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

A la M en C Alejandra Espinosa Taxis por haberme recibido en su laboratorio y por ser una persona que siempre me trato con respeto y por darme todas las herramientas necesarias para poder concluir este trabajo de manera satisfactoria. Por su tiempo, su paciencia y dedicación que le demuestra a cada uno de sus alumnos.

Agradezco al D en C German Larriba, co asesor de este proyecto de Tesis que a pesar de la distancia y de no conocernos en ese momento siempre estuvo pendiente del desarrollo de este trabajo, compartiéndome sus conocimientos para mejorar y por estar siempre dispuesto a ayudar.

Agradezco a mi comité revisor por brindarme un poco de su tiempo y paciencia y por estar siempre dispuestos a apoyarme. Por sus sugerencias, sus observaciones y sobre todo por inspirarme a ser mejor persona y prepararme más.

A toda mi familia que sin su apoyo no lo habría podido lograr. Por impulsarme siempre a seguir adelante y a superarme profesionalmente a pesar de los obstáculos durante este arduo camino de la ciencia.

## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES-----	IV
ÍNDICE DE FIGURAS -----	VII
INDICE DE TABLAS-----	X
ABREVIATURAS -----	XI
RESUMEN -----	XII
1. INTRODUCCIÓN-----	1
1.1 ENFERMEDADES CAUSADAS POR HONGOS-----	1
1.2 GÉNERO <i>CANDIDA</i> -----	3
1.3 CANDIDOSIS-----	3
1.4 FACTORES DE VIRULENCIA -----	5
1.4.1 Actividad enzimática -----	6
1.4.1.1 Fosfolipasas-----	7
1.4.1.2 Lipasas (LIPs)-----	7
1.4.2 Adherencia y formación de biopelículas-----	7
1.4.3 Transiciones morfológicas -----	10
1.4.4 Switching-----	11
1.5 Ciclo parasexual-----	12
1.6 CARACTERÍSTICAS DE <i>CANDIDA TROPICALIS</i> -----	13
1.6.1 Estructura del genoma de <i>C. tropicalis</i> -----	14
1.7 DAÑO Y REPARACIÓN DEL ADN -----	14
1.7.1 DSBR -----	16
1.7.2 SDSA-----	16
1.7.3 BIR -----	17
1.8 EVENTOS DE RECOMBINACIÓN-----	18
1.8.1 Recombinación no homóloga -----	19
1.8.2 Recombinación homóloga (mitótica)-----	19
1.9 GENES DEL GRUPO EPISTÁTICO RAD52-----	21
1.9.1 El papel de Rad52 en los eventos de recombinación -----	22
2. ANTECEDENTES -----	23
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA-----	25
4. JUSTIFICACIÓN -----	26
5. OBJETIVO GENERAL-----	27
5.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS -----	27
6. HIPOTESIS-----	28
7. ESQUEMA DE TRABAJO -----	29

8.	METODOLOGÍA	30
8.1	CEPAS UTILIZADAS EN EL TRABAJO	30
8.2	MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	30
8.3	INICIADORES UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO	32
8.4	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR MEDIANTE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	33
8.5	CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA BÁSICA	34
8.5.1	Morfología macroscópica y microscópica	34
8.5.2	Análisis de la velocidad de crecimiento	34
8.6	ANÁLISIS DE INVASIVIDAD EN AGAR	35
8.7	EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA A AGENTES QUE DAÑAN EL ADN	35
8.7.1	Análisis de sensibilidad a radiación ultravioleta (UV)	35
8.7.2	Análisis de sensibilidad al Metil metano sulfonato (MMS)	36
8.7.3	Análisis de sensibilidad a bleomicina	36
9.	RESULTADOS	37
9.1	PCR ESPECIE-ESPECÍFICA	38
9.2	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR MEDIANTE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	39
9.3	CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA BÁSICA	40
9.3.1	Morfología macroscópica y microscópica	40
9.3.2	Análisis de la velocidad de crecimiento	42
9.4	ANÁLISIS DE INVASIVIDAD EN AGAR	43
9.5	EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA A AGENTES QUE DAÑAN EL ADN	49
9.5.1	Análisis de sensibilidad a la radiación ultravioleta (Luz UV)	49
9.5.2	Análisis de sensibilidad al Metil metano sulfonato (MMS)	51
9.5.3	Análisis de sensibilidad a bleomicina	56
10.	DISCUSIÓN	60
11.	CONCLUSIÓN	68
12.	PERSPECTIVAS	70
13.	BIBLIOGRAFÍA	71

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. <i>Candida tropicalis</i> adherida a diferentes superficies.</b> a) Micrografía óptica de <i>C. tropicalis</i> sobre cupones de silicona. b) Micrografía electrónica de barrido de <i>C. tropicalis</i> adherida a una línea celular de vejiga del epitelio humano. c) Microscopia confocal de exploración laser de <i>C. tropicalis</i> que se adhirió a un epitelio humano reconstruido (Negri <i>et al.</i> , 2012).....	8
<b>Figura 2. Modelos de reparación de DSBs dependientes de homología.</b> Existen al menos tres mecanismos usados para la reparación que provienen de la recombinación homóloga, incluyendo la replicación inducida por ruptura (BIR), el alineamiento de banda dependiente de síntesis (SDSA) y la reparación de rupturas de doble cadena (DSBR).....	18
<b>Figura 3. Esquema de trabajo.</b> .....	29
<b>Figura 4. Identificación presuntiva mediante un medio cromogénico (CHROMagar™ <i>Candida</i> Medium) de especies de levaduras del género <i>Candida</i>.</b> A) Cepa tipo de <i>Candida tropicalis</i> MYA3404, B) <i>rad52-ΔΔ-9</i> , C) <i>rad52-ΔΔ-10</i> y D) <i>rad52-ΔΔ-11</i> incubadas a 30°C durante 48 horas. ....	37
<b>Figura 5. PCR-especie-específica de la cepa tipo de <i>Candida tropicalis</i> MYA3404 y mutantes <i>rad52ΔΔ</i> (9,10 y 11).</b> Utilizando los oligonucleótidos CtR1 y CtR2 amplificando la región ITS1 e ITS2 con un tamaño de amplicón de 357pb para <i>C. tropicalis</i> . En el carril 1 y 12 se muestra el marcador de peso molecular de 1 kb, en el segundo carril el control negativo consistente en una mezcla de primers, mix de PCR y agua Pura estéril. En el tercer carril el control positivo y en los carriles 4-10 mutantes <i>rad52ΔΔ</i> . ....	38
<b>Figura 6. Comprobación molecular de la delección del gen RAD52 de <i>C. tropicalis</i> utilizando los oligonucleótidos Ct52F y Ct52I que dan un tamaño de amplicón de aproximadamente 1000 pb.</b> .....	40

<b>Figura 7. Morfología macroscópica y microscópica de la cepa tipo <i>Candida tropicalis</i> MYA3404, y mutantes <i>rad52-ΔΔ</i> (9, 10 y 11) cultivadas en medio sólido (fila 1 y 2) y en medio líquido YPD (fila 3) incubadas a 30°C durante 48 horas. ....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 8. Curva de la velocidad de crecimiento de <i>C. tropicalis</i> y mutantes nulas <i>rad52</i> (<i>rad52-ΔΔ-9</i>, <i>rad52-ΔΔ-10</i> y <i>rad52-ΔΔ-11</i>). A) Relación de la D.O a 600 nm respecto al tiempo de incubación (min) y B) Log UFC respecto al tiempo de incubación (min) en medio YPD líquido a 30°C a 200rpm durante 12 horas. ....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 9. Colonias crecidas en medio YPD, YP, YD y PD causaron una invasión constitutiva aun en presencia de glucosa. Crecimiento evaluado a los 6 días de incubación a 30°C. La columna a, representa el crecimiento habitual antes del lavado de la placa, mientras que la columna b, son colonias que han invadido el agar debido a que no fueron removidas con el método de lavado en placa. ....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 10. Crecimiento de pseudohifas de <i>C. tropicalis</i> y cepas mutantes sobre medios que inducen el crecimiento filamentoso (YPD, SC más glucosa, SC sin glucosa y medio SLAD (medio con condiciones de nitrógeno limitante). ....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 11. Morfología microscópica observada en <i>C. tropicalis</i> y mutantes <i>rad52-ΔΔ</i> crecidas sobre medio YPD y medios que inducen el crecimiento filamentoso (SC más glucosa, SC sin glucosa y medio SLAD). ....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 12. Porcentaje de supervivencia celular en fase de crecimiento exponencial de <i>C. tropicalis</i> MYA3404 y mutantes nulas <i>rad52</i> (<i>rad52-ΔΔ-9</i>, <i>rad52-ΔΔ-10</i> y <i>rad52-ΔΔ-11</i>) expuestas a una dosis de luz UV de 2J/m<sup>2</sup> y 7J/m<sup>2</sup>. ....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 13. Porcentaje de supervivencia celular en fase de crecimiento estacionaria de <i>C. tropicalis</i> MYA3404 y mutantes nulas <i>rad52</i> (<i>rad52-ΔΔ-9</i>, <i>rad52-ΔΔ-10</i> y <i>rad52-ΔΔ-11</i>) expuestas a una dosis de luz UV de 2J/m<sup>2</sup> y 7J/m<sup>2</sup>. ....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 14. Porcentaje de supervivencia celular en fase de crecimiento exponencial de <i>C. tropicalis</i> MYA3404 y mutantes nulas <i>rad52</i> (<i>rad52-ΔΔ-9</i>, <i>rad52-ΔΔ-10</i> y <i>rad52-ΔΔ-11</i>) expuestas a diferentes concentraciones de MMS (0.001%, 0.003%, 0.005% y 0.01%). ....</b>	<b>53</b>

<b>Figura 15. Porcentaje de supervivencia celular en fase de crecimiento exponencial de <i>C. tropicalis</i> MYA3404 y mutantes nulas <i>rad52</i> (<i>rad52-ΔΔ-9</i>, <i>rad52-ΔΔ-10</i>, <i>rad52-ΔΔ-11</i>) expuestas a diferentes concentraciones de MMS (0.001%,0.003%,0.005% y 0.01%).</b> .....	54
<b>Figura 16. Análisis de sensibilidad a MMS mediante la técnica de goteo por dilución en placa.</b> En la imagen se muestran las diferentes concentraciones de MMS (0.001%,0.003%,0.005% y 0.01%) así como el control (medio YPD) y las fotografías tomadas a las 24 y 48 horas de incubación a 30°C en oscuridad. ....	55
<b>Figura 17. Análisis de sensibilidad a MMS mediante la técnica de goteo por dilución en placa.</b> En la imagen se muestran las diferentes concentraciones de MMS (0.001%,0.003%,0.005% y 0.01%) así como el control (medio YPD) y las fotografías tomadas a las 24 y 48 horas de incubación a 30°C en oscuridad. ....	55
<b>Figura 18. Análisis de sensibilidad a bleomicina.</b> La gráfica muestra el porcentaje de supervivencia celular de <i>C. tropicalis</i> MYA3404 y de mutantes nulas <i>rad52</i> que fueron crecidas en medio YPD a 30°C durante 48 horas a tres dosis diferentes de bleomicina (2.5µg/ml, 5µg/ml y 10µg/ml). ....	58
<b>Figura 19. Análisis de sensibilidad a bleomicina.</b> La gráfica muestra el porcentaje de supervivencia celular de <i>C. tropicalis</i> MYA3404 y de mutantes nulas <i>rad52</i> que fueron crecidas en medio YPD a 30°C durante 48 horas a tres dosis diferentes de bleomicina (2.5 µg/ml, 5 µg/ml y 10µg /ml).....	59
<b>Figura 20. Análisis sensibilidad a bleomicina mediante la prueba drop-test en fase de crecimiento exponencial,</b> donde <i>C. tropicalis</i> y mutantes nulas <i>rad52</i> fueron crecidas en medio YPD suplementados con diferentes concentraciones de bleomicina (2.5 µg/ml, 5 µg/ml y 10 µg/ml). ....	59
<b>Figura 21. Análisis sensibilidad a bleomicina mediante la prueba drop-test en fase de crecimiento estacionaria,</b> donde <i>C. tropicalis</i> y mutantes nulas <i>rad52</i> fueron crecidas en medio YPD suplementados con diferentes concentraciones de Bleomicina (2.5µg/ml, 5µg/ml y 10µg/ml). ....	60

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas empleadas en la realización de este trabajo.....	30
Tabla 2. Medios de cultivo utilizados en este trabajo.....	30
Tabla 3. Iniciadores utilizados en este trabajo. ....	32

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>BIR</b>	Replicación inducida por ruptura	<b>%</b>	Porcentaje
<b>BER</b>	Reparación por escisión de bases	<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>CFU</b>	Unidades Formadoras de Colonias	<b>PLA</b>	Fosfolipasas
<b>CI</b>	Candidiasis invasiva	<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>DO</b>	Densidad óptica	<b>SAPs</b>	Aspartil proteinasas secretadas
<b>DSBR</b>	Reparación de roturas de doble cadena	<b>SC</b>	Synthetic Complete
<b>DSBs</b>	Rotura de doble cadena	<b>SCEs</b>	Intercambio de cromatidas hermanas
<b>°C</b>	Grados Celsius	<b>SDSA</b>	Alineamiento de banda dependiente de síntesis
<b>HJs</b>	Estructura de holliday	<b>SLAD</b>	Synthetic low ammonia dextrose
<b>HR</b>	Recombinación Homóloga	<b>ssDNA</b>	ADN de cadena sencilla
<b>LIPs</b>	Lipasas	<b>TAE</b>	Tris-Acetato-EDTA
<b>LOH</b>	Perdida de heterocigocidad	<b>TBE</b>	Tris-Borato-EDTA
<b>μ</b>	Micra	<b>UCI</b>	Unidad de cuidados intensivos
<b>min</b>	Minutos	<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>MMS</b>	Metil-metano-sulfonato	<b>VIH</b>	Virus de inmunodeficiencia humana
<b>NCA</b>	No <i>Candida albicans</i>	<b>YPD</b>	Levadura, Peptona, Dextrosa
<b>NER</b>	Reparación por escisión de nucleótidos	<b>Δ</b>	Disrupción
<b>NHEJ</b>	Non-homologous End-joining		

## RESUMEN

Las enfermedades causadas por patógenos fúngicos se han incrementado considerablemente en las últimas décadas, principalmente aquellas causadas por especies del género *Candida*. A pesar de ser *C. albicans* la especie más frecuentemente aislada, algunas otras levaduras denominadas no *Candida albicans* se han aislado con relativa frecuencia. Dentro de este grupo encontramos a *C. tropicalis* un patógeno emergente considerada como la cuarta causa de infecciones en el torrente sanguíneo en Estados Unidos (Csank *et al.*, 2000). La infección producida por cualquier especie perteneciente al género *Candida* se denomina candidosis y la colonización e invasión de los tejidos del hospedero se da cuando el paciente presenta uno o más factores de riesgo.

La capacidad de provocar daños está relacionada con los mecanismos empleados para la transición de comensal a patógeno, principalmente a través de la expresión de factores de virulencia que le permiten adaptarse a condiciones estresantes y variables. Esta ventaja adaptativa está directamente relacionada a la rápida expresión de genes en respuesta a múltiples estímulos. Los reordenamientos constantes del genoma pueden ser un factor clave y decisivo durante el proceso de patogénesis del hongo (Achkar *et al.*, 2010).

Múltiples mecanismos están involucrados en la generación de diversidad genética, principalmente las rutas de reparación y recombinación del ADN. Donde los eventos de recombinación homóloga (HR) desempeñan un papel fundamental en el proceso de reparación. Un grupo de proteínas codificadas por genes del grupo epistático *RAD52* son necesarios para reparar roturas de doble cadena (DSBs) mediante HR (*RAD50*, *RAD51*, *RAD52*, *RAD54*, *RAD55*, *RAD57*, *RAD59*, *RDH54*, *MRE11* y *XRS2*) (Krogh *et al.*, 2004). También pueden ser requeridas nucleasas (Exo, Sae1, Rad-rad10), helicasas (Sgs1), topoisomerasas (Top3), polimerasas (Pol32) y ligasas (Symington *et al.*, 2014).

En el presente trabajo, se caracterizaron fenotípicamente mutantes nulas *rad52* de *C. tropicalis*. Se encontró que la delección del gen *RAD52* provocó cambios aparentes en la

morfología colonial y celular en comparación con la cepa tipo. Las mutantes *rad52-ΔΔ* crecieron como colonias rugosas y exhibieron un crecimiento filamentosos en medio YPD a 30°C además de un incrementado tiempo de generación. *C. tropicalis* y las mutantes *rad52-ΔΔ* fueron capaces de invadir el agar en medio rico YPD, medio sintético con y sin glucosa y un medio con bajo contenido de nitrógeno como formas levaduriformes y pseudohifas respectivamente, además que la cantidad de micelio producido por las mutantes nulas *rad52* se vio influenciada por las condiciones de crecimiento señalando que bajo ciertas condiciones existe una regulación de las transiciones morfológicas que permiten el establecimiento de una infección dentro del hospedero provocada por *C. tropicalis*.

Las mutantes *rad52-ΔΔ* fueron significativamente más sensibles al tratamiento con bleomicina, MMS y luz ultravioleta (UV) en células creciendo exponencialmente y durante la fase estacionaria respecto a *C. tropicalis*. Nuestros resultados sugieren que *RAD52* en *C. tropicalis* es esencial no solamente para reparar daños en el ADN a través de un mecanismo dependiente de homología sino que también interviene en diversos procesos celulares. La ausencia de *RAD52* causa alteraciones en la morfología colonial además de provocar un crecimiento filamentosos excesivo. Este trabajo refuerza las observaciones realizadas en otras especies pertenecientes al género *Candida* donde *RAD52* es esencial cuando las rutas de reparación menos conservativas se ven comprometidas demostrando su importancia a lo largo del ciclo celular en células en estado quiescente y células en división.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Enfermedades causadas por hongos

Las enfermedades causadas por patógenos fúngicos han sido documentadas desde la antigüedad. Fue en el siglo V a.c. cuando Hipócrates describió por primera vez una infección producida por levaduras (Hazen, 1995). Sin embargo, la visualización microscópica de las células no ocurrió hasta 1839 cuando Langenbeck identificó al agente causal de aftas bucales y determinó que estas lesiones se debían a la presencia de un hongo. Estos hallazgos fueron confirmados más adelante por diversos autores (Hazen, 1995).

Las levaduras pertenecientes al género *Candida* se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y actúan como un constituyente normal de la microflora humana. Sin embargo, pueden tornarse patogénicas u oportunistas cuando el individuo presenta uno o más factores de riesgo principalmente cuando existe una alteración del sistema inmune (Kothavade *et al.*, 2010; Papon *et al.*, 2013; Walsh *et al.*, 2004) poniendo en riesgo la vida de los pacientes (Papon *et al.*, 2013).

De acuerdo a datos existentes en la literatura, la incidencia y prevalencia de las infecciones fúngicas nosocomiales se ha incrementado dramáticamente en años recientes especialmente aquellas causadas por especies del género *Candida*. Esta incidencia es atribuida al descubrimiento e identificación de nuevas especies como *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. guilliermondii* en el año 1963 (Pfaller *et al.*, 2004).

La aparición de nuevas especies puede estar relacionada con los grandes cambios en medicina que surgieron a partir de la década de los 60's, como resultado del desarrollo de nuevas técnicas que permitieron diferenciar una especie de la otra implementando medios cromogénicos y técnicas moleculares más específicas y desde entonces, algunas especies han sido consideradas por algunos autores (Hazen., 1995) como patógenos emergentes. Dado que en décadas pasadas los reportes de infecciones nosocomiales asociadas a hongos eran escasos, no se sabe con exactitud si se trataba de nuevas especies o de sinónimos de especies ya existentes como *C. albicans* que no habían sido reportadas correctamente.

Las especies del género *Candida* son los hongos más frecuentemente aislados causantes de aproximadamente el 80% de las infecciones fúngicas nosocomiales, siendo la cuarta causa responsable de infecciones en el torrente sanguíneo (Csank *et al.*, 2000) y responsable de la mayoría de infecciones en el tracto urinario (Negri *et al.*, 2012; Achkar *et al.*, 2010). Algunos otros hongos como *Aspergillus* también han sido aislados con frecuencia, siendo la causa más común de infecciones neumónicas, mientras que *Cryptococcus neoformans* es la causa más común de mortalidad relacionada con hongos en pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Walsh *et al.*, 2004; Pfaller *et al.*, 2007).

Más de 200 especies del género *Candida* han sido identificadas, sin embargo, solo algunas de ellas son de interés clínico, entre las que destacan: *C. glabrata* (5-40% de todas las especies del género *Candida*) y en menor frecuencia *C. tropicalis* (10-30%), *C. parapsilosis* (20-40% de todas las especies del género *Candida*) y *C. krusei* (10-35%) (Krcmery *et al.*, 2002).

*C. albicans* es el agente etiológico más común causante de infecciones fúngicas oportunistas en humanos. Sin embargo, otras especies denominadas no *C. albicans* (NCA) se han aislado con relativa frecuencia y son causantes de candidosis. Interesantemente, existe variación geográfica de las especies no *C. albicans* y de esta manera podemos observar que *C. tropicalis* se encuentra mayormente distribuida en Asia, India y el Pacífico (Papon *et al.*, 2013; Kothavade *et al.*, 2010; Negri *et al.*, 2012) principalmente.

Un elevado número de factores de riesgo han sido relacionados con el incremento de la incidencia de enfermedades fúngicas, pero generalmente se ha atribuido a las malas prácticas médicas como: procedimientos quirúrgicos invasivos, terapias inmunosupresoras y el uso de antibióticos de amplio espectro son los responsables del aumento en la población de pacientes inmunocomprometidos (Silva *et al.*, 2012; Kothavade *et al.*, 2010; Cantón *et al.*, 2001; Aranda *et al.*, 2015; Pfaller *et al.*, 2007; Giri *et al.*, 2012). Pacientes con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) son más propensos a cursar una infección fúngica (Kothavade *et al.*, 2010). Cuando dos o más factores de riesgo están presentes, la probabilidad de una infección incrementa exponencialmente.

*C. tropicalis*, es considerada un comensal en individuos sanos, ocupa el segundo lugar en frecuencia etiológica y su invasión es más frecuente en pacientes con enfermedades

hematológicas, diabetes o pacientes oncológicos y es comúnmente asociada a pacientes neutropénicos donde invaden y colonizan el tracto gastrointestinal y posteriormente penetran las mucosas (Kothavade *et al.*, 2010).

## 1.2 Género *Candida*

El género *Candida* está integrado por un grupo heterogéneo de especies haploides y diploides, de origen polifilético, caracterizadas en su mayoría por usar un código genético alternativo y traducir el codón “CUG” como serina en lugar de leucina (Priest *et al.*, 2015).

El aislamiento rutinario generalmente se lleva a cabo en agar Dextrosa Sabouraud donde las colonias se tornan de un color crema a amarillas. Dependiendo de la especie, la textura de la colonia puede ser suave, brillante u opaca con bordes irregulares o lisos. Forman colonias blancas, con bordes bien definidos en agar YPD cultivadas a 30°C. Se reproducen principalmente por gemación. Sin embargo en algunas especies se ha demostrado la presencia de un ciclo parasexual como en los casos de *C. albicans* y *C. tropicalis*.

A nivel celular, es un grupo anamorfo de levaduras que incluye formas globosas, ovoides, cilíndricas, alargadas, ojivales o en forma de botella. Ciertas especies como *C. albicans* o *C. tropicalis* pueden presentar un crecimiento tipo filamentoso, donde se producen hifas verdaderas o más frecuentemente pseudohifas bajo ciertas condiciones de crecimiento (Sudbery *et al.*, 2004). La diferencia se basa esencialmente en la separación de las células o no por constricciones. Mientras que las pseudohifas están formadas por cadenas de células alargadas separadas por constricciones, las hifas verdaderas son una prolongación de las células sin constricciones aparentes. En algunas especies no se ha encontrado la formación de pseudohifas, como en el caso de *C. glabrata*, mientras que *C. albicans* puede ser inducida para formar pseudohifas simplemente variando el pH y nutrientes en la orina (Kauffman, 2005). En condiciones de cultivo estándar, las levaduras crecen en forma de blastoconidias.

## 1.3 Candidosis

Es una infección fúngica primaria o secundaria, causada por levaduras del género *Candida*, predominantemente *C. albicans*, habitualmente en pacientes inmunocomprometidos.

Las mucosa oral, genital, esofágica entre otras son un blanco clave para estos microorganismos llegando a producir inicialmente una infección superficial pero también puede manifestarse como candidosis invasiva, que a menudo refleja una alta tasa de morbi-mortalidad en la unidad de cuidados intensivos (UCI). Numerosos reportes indican que también pueden llegar a causar daño en el sistema nervioso central como resultado de procesos neuroquirúrgicos mal desempeñados y puede llegar a establecerse incluso como una infección crónica diseminada principalmente en pacientes oncohematológicos (Cervera., 2012).

La infección parece tener varias vías de entrada y puede contraerse por vía exógena o endógena, siendo la primera causada por el uso de material y equipo mal esterilizado o desinfectado; la vía endógena por su parte, está relacionada a dispositivos médicos contaminados, que sirven como reservorio de dichos microorganismos y que son introducidos a los pacientes como parte de un proceso médico.

Reportes recientes (Richet *et al.*, 2002; Gudlaugsson *et al.*, 2003) indican que las levaduras pertenecientes al género *Candida* continúan siendo la cuarta causa más común de infección nosocomial en el torrente sanguíneo en Norte América en pacientes hospitalarios.

Más de 15 especies distintas del género *Candida* han sido reportadas por ser agentes etiológicos de candidosis invasiva en humanos (Pfaller *et al.*, 2007), sin embargo, más del 90% de candidosis invasiva es causada por cinco especies comúnmente patogénicas *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. krusei* (Pappas *et al.*, 2015).

En un estudio realizado en Francia por Richet *et al.*, (2002) donde evaluaron la incidencia de candidemia en 25 hospitales diferentes de 1000 pacientes en el año 1995, se determinó que la especie más común aislada fue *C. albicans* (53%). Un catéter venoso central (26%) fue el portal de entrada más común y 50 % de los pacientes tenían neoplasma.

La candidosis nosocomial está asociada con un extremadamente alta tasa de morbi-mortalidad atribuible (Gudlaugsson *et al.*, 2003). En una revisión realizada por Olafur y colaboradores (2003) de los casos candidiasis invasiva (CI) en pacientes hospitalizados ocurridas en el periodo comprendido entre los años 1983-1986 las tasas de mortalidad atribuible representaron el 38% mientras que para los años 1997-2001 el porcentaje de mortalidad incrementó hasta un 49%.

En Estados Unidos, la tasa de mortalidad asociada a candidemia constituye un 40%, produciendo 2800-11,200 muertes al año. Mientras que las tasas de mortalidad en instituciones de Suiza corresponden a un 44%-46%, un 44%-45% en 2 hospitales en España y 59% en una sola institución en Taiwán (Wenzel *et al.*, 2005).

#### 1.4 Factores de virulencia

Las especies del género *Candida* son comensales en individuos sanos, sin embargo la presencia de estas levaduras puede tornarse patogénica cuando el individuo presenta uno o más factores de riesgo que facilitan la rápida transición de comensal a patógeno colonizando e invadiendo rápidamente al hospedero provocándole una infección severa (Kothavade *et al.*, 2010).

*C. tropicalis* es altamente patogénica incluso más que otras especies no *C. albicans* y esta capacidad de provocar daño está relacionada con los mecanismos empleados para la transición de comensal a patógeno mediante la expresión de factores de virulencia que se cree pueden conferirle algunas ventajas adaptativas en condiciones estresantes (Negri *et al.*, 2012). La capacidad de adaptación del género *Candida* está directamente relacionada a la rápida expresión de genes en respuesta a múltiples estímulos ambientales.

Los factores de virulencia son definidos por Negri *et al.*, (2012) como aquellos factores que interactúan directamente con las células del hospedero causándole algún tipo de daño.

En estudios anteriores se ha demostrado que *C. tropicalis* es más invasiva que *C. albicans* en el intestino humano, específicamente en pacientes oncológicos (Kothavade *et al.*, 2010). Desafortunadamente poco se sabe acerca de los factores de virulencia asociados a la especies denominadas no *C. albicans* (NCA) y dado su incremento y prevalencia en aislados clínicos, es necesario realizar un estudio a fondo para establecer el rol que desempeñan durante el proceso infeccioso.

Las transiciones morfológicas, la actividad enzimática y la formación de biopelícula son algunos de los factores de virulencia clave que se han descrito en *C. tropicalis*. Recientes hallazgos han demostrado que células de *C. albicans* pueden modular la función de los macrófagos suprimiendo la producción de especies reactivas de nitrógeno vía un factor soluble secretado

desconocido (Priest *et al.*, 2015). Estos datos, podrían explicar cómo ocurre la evasión del sistema inmune y la rápida diseminación de las células en todo el organismo.

#### 1.4.1 Actividad enzimática

Las actividades enzimáticas asociadas a especies de género *Candida* han sido particularmente estudiadas y se han señalado como un factor clave en el inicio y progresión de la infección. Se ha reportado actividad de aspartil proteinasas secretadas (SAPs) en algunas especies del género *Candida*, en donde habitualmente sigue el siguiente orden: *C. albicans* > *C. tropicalis* > *C. kefyr* > *C. krusei*.

En *C. tropicalis* han sido identificados 4 genes codificando SAPs, y son designados como *SAPT1* a *SAPT4*. Estos genes son diferencialmente regulados y expresados bajo una variedad de condiciones de laboratorio. En relación a la función de estas enzimas, se cree que dañan principalmente la membrana de las células del hospedero mediante la degradación de importantes proteínas de superficie, matriz extracelular y proteínas de defensa dejando expuestos receptores que facilitan su adherencia. Algunos de estos genes son expresados de manera específica cuando se trata de una infección superficial o una infección sistémica en levaduras y formas filamentosas (Hube *et al.*, 2001).

Las aspartil proteinasas secretadas por *C. tropicalis* no solamente se encuentran en la superficie de la pared celular antes de invadir los tejidos o durante la diseminación de la infección, sino que incluso actúan también tras la fagocitosis por macrófagos.

Estudios *in vitro* revelaron que *C. tropicalis* secreta altos niveles de Saps en medio conteniendo albumina de suero bovino como única fuente de nitrógeno. Un estudio en *C. tropicalis* demostró la presencia de una nueva proteasa ácida a la cual se le ha atribuido una actividad hemolítica y la capacidad de incrementar la permeabilidad capilar. Por otra parte, en un modelo de infección de células RHOE de humanos, se demostró la expresión de genes *SAPT* durante la invasión del tejido, y los resultados revelan un limitado rol de esas enzimas en la invasión y daño tisular (Silva *et al.*, 2011). Estudios experimentales han sugerido que, después de la ingestión de células de levadura por células fagocíticas, los antígenos SAP son expresados por *C. albicans* o *C. tropicalis*, pero no por *C. parapsilosis* (Kothavade *et al.*, 2010).

#### 1.4.1.1 Fosfolipasas

Las fosfolipasas son un grupo de enzimas que catalizan la conversión de glicerofosfolípidos a ácidos grasos, principalmente aquellos encontrados en las membranas de las células del hospedero. En general, las fosfolipasas (PLs) son clasificadas dentro de 5 subclases: A (PLA), A2 (PLA2), B (PLB), C (PLC) y D (PLD), dependiendo del enlace éster específico al que se dirijan. Evidencias anteriores revelan la participación de las fosfolipasas en la penetración de las células del hospedero, daño y lisis celular. La actividad de esas enzimas comúnmente resulta en la desestabilización de las membranas del hospedero y la liberación de lípidos como segundos mensajeros (Park *et al.*, 2013).

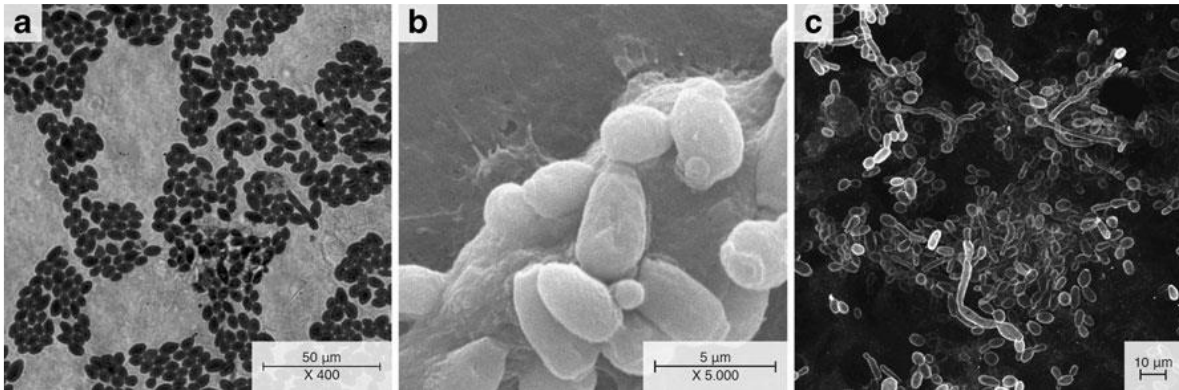
#### 1.4.1.2 Lipasas (LIPs)

Las lipasas catalizan la hidrólisis de las uniones éster de los triacilglicéridos, resultando en la liberación de ácidos grasos. Han sido ampliamente estudiadas en especies del género *Candida* y se cree que su expresión es influenciada por el estadio de infección (Park *et al.*, 2013). Adicionalmente, se ha reportado la presencia de hemolisinas que degradan la hemoglobina y facilitan la recuperación de hierro elemental de las células del hospedero (Negri *et al.*, 2012).

#### 1.4.2 Adherencia y formación de biopelículas

*C. tropicalis* posee la capacidad para adherirse a superficies bióticas y abióticas. La adherencia a células y tejidos humanos es facilitada por la presencia de enzimas conocidas como Als (agglutinin-like sequence) que median el anclaje a diferentes células epiteliales y se encuentran distribuidas a lo largo de su la pared celular. La hidrofobicidad que tiene su superficie podría participar también en el proceso de adherencia, aunque la función exacta no está del todo clara (Rodrigues *et al.*, 1999).

De acuerdo a datos recientes encontrados en la literatura, *C. tropicalis* ha sido descrita como una especie altamente adherente a las células epiteliales, incluso más que otras especies No *C. albicans* (NCA) (Zuza-Alves *et al.*, 2016).



**Figura 1. *Candida tropicalis* adherida a diferentes superficies.** a) Micrografía óptica de *C. tropicalis* sobre cupones de silicona. b) Micrografía electrónica de barrido de *C. tropicalis* adherida a una línea celular de vejiga del epitelio humano. c) Microscopía confocal de exploración laser de *C. tropicalis* que se adhirió a un epitelio humano reconstruido (Negri *et al.*, 2012).

Se sabe que el inicio de una infección exitosa requiere la adhesión de las levaduras a las células del hospedero, seguida de una invasión y colonización dando como resultado la producción de biopelículas maduras. La biopelícula, es una comunidad de microorganismos morfológicamente distintos, compuesta por capas entrelazadas de células levaduriformes y filamentosas altamente estructurada. Algunos otros componentes como proteínas y DNA están presentes, pero sin lugar a duda una característica importante de las biopelículas de *Candida*, es la gran cantidad de matriz exopolimérica que rodea a todos estos componentes confiriéndole mayor resistencia al tratamiento con antifúngicos (Al-Fattani *et al.*, 2006).

Es interesante observar que la matriz exopolimérica forma una estructura tridimensional, altamente hidratada que posee un ambiente cargado localmente en el cual los microorganismos están en gran parte inmovilizados, cuenta con canales de agua que proveen un mecanismo que facilita la circulación de nutrientes y desechos, favoreciendo el establecimiento de micro nichos dentro de la biopelícula (Al-Fattani *et al.*, 2006; López-Ribot., 2005).

En un estudio realizado por Al-Fattani y Douglas (2006) demostraron que el componente mayoritario de la matriz extracelular de *C. tropicalis* es hexosamina (27%), con pequeñas cantidades de carbohidratos (3.3%, incluyendo 0.5% de glucosa), mientras que el componente

mayoritario en *C. albicans* consiste de carbohidratos (39.6%, incluyendo 32% de glucosa). La presencia de hexosamina dentro de la biopelícula podría interferir con la acción de los antifúngicos. Otros componentes como carbohidratos, fosforo, proteínas y ácido urónico también se han descrito como constituyentes minoritarios de la matriz extracelular.

Por otra parte, datos experimentales afirman que existe una mayor producción de matriz extracelular en condiciones de flujo continuo en *C. albicans* en contraste con la cantidad que se produce en un cultivo de *C. tropicalis* crecido estáticamente y las células son más resistentes a anfotericina B (Al-Fattani *et al.*, 2006).

La matriz extracelular actúa como una barrera que regula el flujo de sustancias tóxicas dentro de la biopelícula, además actúa como un mecanismo de defensa que la mantiene integra.

Esos datos podrían explicar el aumento en la incidencia y prevalencia de *C. tropicalis* como un patógeno emergente dado que se ha demostrado que a mayor producción de matriz extracelular se incrementa la resistencia a agentes antimicrobianos empleados usualmente en la práctica clínica. Blankenship *et al.*, (2006) ha propuesto que la resistencia a drogas es adquirida en una fase temprana durante la formación de la biopelícula y se encuentra regulada por mecanismos a lo largo del proceso de maduración.

En relación a la función que desempeñan esas comunidades de microorganismos no está del todo clara, pero se ha demostrado que las células que se desprenden de la biopelícula son más virulentas que las células plantónicas (Blankenship *et al.*, 2006). Además, se sabe que un fenotipo mucóide disminuye la susceptibilidad a antifúngicos.

La expresión de bombas de eflujo de drogas durante la fase temprana de la formación de la biopelícula y las alteraciones en los esteroides de membrana contribuyen a la resistencia a azoles (Mukherjee *et al.*, 2004).

Mezclas de biopelículas conteniendo especies de *Candida* y especies bacterianas han sido empleadas para elucidar las extensas interacciones que ocurren entre células eucariotas y procariontes en poblaciones adherentes (Al-Fattani *et al.*, 2006).

Los fenotipos presentes en las biopelículas de *C. tropicalis* dependen de las condiciones de crecimiento. Así, en un estudio realizado por Bizerra *et al.*, (2008) utilizando medio RPMI para la formación de biopelículas se ha observado una mayor presencia de hifas durante el

crecimiento y maduración de la biopelícula. Pero las transiciones morfológicas reversibles entre células levaduriformes y filamentosas en el proceso de formación de la biopelícula utilizando caldo de cultivo pueden ser inducidas, y el etanol potencialmente puede acelerar este proceso.

### 1.4.3 Transiciones morfológicas

El dimorfismo fúngico, es una característica particular en las especies pertenecientes al género *Candida* que involucra una conversión morfológica y fisiológica de un fenotipo a otro influenciado por las condiciones ambientales. Una variedad de estímulos promueven el crecimiento filamentosos como resultado de la búsqueda de nuevos nutrientes y condiciones que favorezcan el crecimiento, en particular, la limitación de nitrógeno o de fuente de carbono como la glucosa (Cullen *et al.*, 2000; Csank *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 1994).

*C. albicans* por su parte, exhibe una morfología de levadura, hifa y pseudohifa (Achkar, 2010), mientras que las transiciones morfológicas reversibles en *C. tropicalis* ocurren entre células levaduriformes que exhiben un patrón de gemación bipolar y pseudohifas, donde las células son elongadas y tienen un patrón de gemación unipolar (Suzuki *et al.*, 2005).

Las enfermedades producidas por patógenos fúngicos generalmente están acompañadas de transiciones morfológicas que promueven la colonización e invasión en diferentes sitios anatómicos e influyen directamente en la patogénesis del hongo (Cullen *et al.*, 2000). La forma de levadura es asociada con la diseminación, mientras que la forma de hifa con la adhesión, invasión del tejido y actividad proteolítica (Achkar *et al.*, 2010). Sin embargo, la formación de filamentos y la invasión son funciones distintas.

El desarrollo de una hifa a partir de células de levadura se lleva a cabo a una temperatura de 37°C y un pH neutral, mientras que las pseudohifas se desarrollan a temperaturas y pH intermedios (Berman, 2006).

Cabe mencionar, que el crecimiento de pseudohifa en *C. tropicalis* puede ser inducida en medio definido con glucosa y suplementado con etanol (25ml/L) como lo menciona (Suzuki *et al.*, 2005). Sin embargo, otros estudios han demostrado que el inositol a una concentración de (5mg/L) puede actuar como un inhibidor de este efecto (Suzuki T. O., 2005).

#### 1.4.4 Switching

El switching fenotípico fue descrito hace más de 20 años en cepas de la especie *Candida albicans* (WO-1) y desde entonces numerosos esfuerzos se han enfocado en la búsqueda de respuestas que eluciden la relación que establece con la virulencia (Achkar *et al.*, 2010).

Las cepas WO-1 son un modelo que sirve para el estudio del switching fenotípico reversible, donde células blancas redondas se convierten en células opacas de morfología elongada (Whiteway *et al.*, 2007).

Las células de aislados clínicos de *C. albicans* pueden sufrir WOS (white-to-opaque switching) si son homocigotas (a/a o  $\alpha/\alpha$ ). WOS también está asociado a otros factores de virulencia, incluyendo la transición de levadura a hifa, la sensibilidad a neutrófilos y agentes oxidantes, la adhesión y secreción de proteinasas (Achkar *et al.*, 2010).

Modelos de infección *in vitro* demuestran la importancia del switching fenotípico como potencial factor de virulencia sobre la biología y la transición de comensal a patógeno de *C. albicans* y resulta ser que las células blancas, son más virulentas que las opacas, y que esta virulencia resulta aumentada en células humanas donde tienen preferencia por colonizar la piel (Achkar *et al.*, 2010).

El switching fenotípico es regulado por el factor de transcripción Wor1, altos niveles en la expresión de este factor son suficientes para la formación de un estado opaco (Porman *et al.*, 2011). Wor1 es un miembro integrante de una familia de proteínas de unión a DNA que están conservadas a lo largo del linaje fúngico y sirve como un regulador clave de las transiciones en el desarrollo.

Numerosos estudios se han realizado hasta el momento para determinar el rol funcional exacto del switching fenotípico, pero queda poco clara su participación en la biología de *Candida ssp.* Sin embargo, algunos autores han sugerido un modelo en el cual las células opacas de *C. albicans* están en estado de competencia sexual, mientras que las células blancas pueden ser estimuladas por feromonas sexuales resultando en la formación de biopelículas y se cree que la matriz de la biopelícula crea condiciones adecuadas para establecer un gradiente estable de feromonas que inducen el apareamiento en el hospedero (Porman *et al.*, 2011).

La delección de *WOR1* ( $\Delta wor1/\Delta wor1$ ) de *C. tropicalis* demostró que este gen es esencial para la transición morfológica de formas blancas a opacas sugiriendo la participación en la regulación del switching fenotípico (Porman *et al.*, 2011). El cambio blanco-opaco se inhibe en células a/ $\alpha$  como el complejo represor a1/ $\alpha$  del gen *WOR1*.

Adicionalmente, las condiciones estresantes desempeñan un papel muy importante para dar lugar al switching fenotípico, cuando las células son expuestas a la luz UV, al estrés oxidativo o durante el tránsito a través del intestino de ratón, los niveles de cambio de células blancas a opacas se ve incrementado (Berman *et al.*, 2012) sin embargo, la tasa de crecimiento de las células se ve disminuida drásticamente.

La transición de células blancas a opacas está intrínsecamente acoplada al proceso de apareamiento sexual en *C. albicans* (Whiteway *et al.*, 2007).

### 1.5 Ciclo parasexual

*S. cerevisiae* puede propagarse asexual y sexualmente. Generalmente la reproducción asexual ocurre cuando las condiciones son favorables para el crecimiento, mientras que la reproducción sexual es favorecida cuando los nutrientes son limitados (Seervai *et al.*, 2013).

En *C. albicans* no se ha descrito un ciclo sexual, pero si un ciclo parasexual (Turner *et al.*, 2014) mientras que en *C. tropicalis* se han descrito genes asociados a la meiosis, sin embargo no se sabe la razón por la cual no se puede llevar a cabo un ciclo sexual completo (Seervai *et al.*, 2013).

Muchas especies diploides asexuales del género *Candida* incluyendo *C. tropicalis* sufren un ciclo parasexual, un tipo de apareamiento entre células diploides a/ $\alpha$  con un tipo de apareamiento opuesto. En este tipo de apareamiento las células producen tubos de conjugación que crecen hacia la célula adyacente dando lugar a productos tetraploides que resultan pocos estables dentro de la célula, y mediante la reducción de ploidía que ocurre eventualmente por un proceso no meiótico, da como resultado la pérdida de cromosomas. Este proceso se ve favorecido por el crecimiento en medio con sorbosa en un periodo de tiempo prolongado, generando aneuploidías y homocigócis. De esta manera la célula regresa

a su estado diploide normal generando variabilidad genética que permite la selección de aquellas células que mejor se adaptan (Seervai *et al.*, 2013).

El ciclo parasexual requiere de una serie de pasos empezando por el locus mating type locus (*MTL*) debe ser homocigoto en células diploides, posteriormente esas células *MTL<sub>hom</sub>* deben sufrir una transición morfológica de células blancas (levaduriformes) a células opacas (filamentosas), las células competentes de apareamiento deben estar lo suficientemente cerca para enviar y recibir señales de feromonas y lograr aparearse resultando en células tetraploides. En un modelo de infección murino de candidiasis se ha demostrado que las células tetraploides son menos virulentas (Berman *et al.*, 2012).

El apareamiento ocurre eficientemente a 25°C y 37°C, y debido a ello se cree que células en estado opaco sufren una eficiente conjugación célula a célula incluso durante el proceso de infección y colonización del hospedero. Experimentos realizados por Porman *et al.* (2011), revelaron que el apareamiento de *C. tropicalis* está bajo el control del switching fenotípico y que se requiere un estado opaco de las células para que sean competentes, y a su vez, el switching fenotípico es regulado por el extenso programa de reproducción sexual.

Múltiples mecanismos incrementan la generación de diversidad genética principalmente aquellos relacionados a condiciones estresantes como la mutagénesis inducida por estrés, la reproducción sexual y la variación fenotípica mediante un ciclo parasexual.

## 1.6 Características de *Candida tropicalis*

Las colonias de *C. tropicalis* son de aspecto cremoso, blando, liso, brillante, con borde rugoso y micelios cerca del margen. En medios cromogénicos como CHROMagar™ *Candida* Medium las colonias tienen un crecimiento bueno y adquieren una coloración azul grisáceo a azul verdoso o azul metálico, con o sin halos violetas en el medio circundante. En agar dextrosa Sabouraud (SDA), las colonias son de color crema a amarillo con un ligero borde miceliar.

Microscópicamente *C. tropicalis* puede encontrarse en forma levaduriforme o en forma de pseudohifa, con un tamaño aproximado de 4-8 x 5-11 µm. En agar corn meal Tween 80 y a 25°C después de 72h, *C. tropicalis* produce blastosporas ovales, pseudohifas y en algunos casos hifas verdaderas.

Bioquímicamente tiene la habilidad de fermentar y asimilar sacarosa y maltosa.

### 1.6.1 Estructura del genoma de *C. tropicalis*

*C. tropicalis* tiene un genoma diploide sin embargo, el tamaño y el número de cromosomas no se conocen con exactitud. Datos reportados por National Center for Biotechnology Information (NCBI) indican que el tamaño del genoma haploide es de 14.5 Mb, conteniendo aproximadamente 6258 genes, con un porcentaje de GC del 33.1% organizado en 5 o 6 cromosomas, el tamaño promedio de un gen es de 1454 pb, las regiones intergénicas en promedio comprenden 902 pb y es considerada como una especie altamente patogénica. Contiene regiones similares a secuencias mayormente repetidas (MRS) por sus siglas en inglés de *C. albicans*, sugiriendo que la recombinación asociada a MRS podría contribuir a la variación cariotípica observada en cepas de *C. tropicalis*.

## 1.7 Daño y reparación del ADN

El material genético de todos los organismos vivos es propenso a sufrir alteraciones constantes poniendo en riesgo la integridad y estabilidad del genoma. Estos daños pueden ser el resultado de procesos endógenos relacionados al metabolismo oxidativo de la célula como la producción de radicales libres de oxígeno (RLO) o nitrógeno (RLN) que alteran y atacan directamente las bases del ADN (Tafurt Cardona *et al.*, 2014). Por otra parte, los agentes genotóxicos exógenos causantes de daño que afectan directamente o indirectamente al ADN comprende tanto a agentes físicos como la radiación ionizante o la luz ultravioleta (UV) (que forma dímeros de pirimidinas) y una amplia variedad de compuestos químicos como MMS (Metil-metano-sulfonato que alquila las bases del ADN) e incluso algunos agentes antitumorales como la bleomicina o camptotecina utilizados frecuentemente en el tratamiento del cáncer. Cabe mencionar que una célula puede sufrir hasta  $10^5$  lesiones espontáneas en un solo día demostrando que existe una gran dinamismo del material genético (Tafurt Cardona *et al.*, 2014).

Debido al constante riesgo de sufrir alteraciones en el material genético, a lo largo de la evolución, los microorganismos han desarrollado múltiples mecanismos específicos que se

encargan de vigilar la integridad del genoma, censando el daño y activando vías de reparación, específicamente cuando ocurren errores durante la replicación celular garantizando de esta manera, la estabilidad genética y por lo tanto, la propia supervivencia de la célula. Más de 100 genes están involucrados en las distintas rutas de reparación del ADN.

La inducción de la respuesta celular al daño conlleva la activación de varios procesos biológicos (Conconi *et al.*, 2017) que incluyen: reparación del ADN, la activación de los puntos de control de arresto del ciclo celular, cambios en la expresión génica, la reconstrucción de la cromatina y finalmente la apoptosis.

El daño más común a la molécula de ADN comprende la rotura de doble cadena (DSBs) como resultado de errores durante la replicación celular, específicamente, cuando la horquilla de replicación encuentra lesiones que obstaculizan la replicación causando un colapso de la horquilla o a causa del procesamiento de lesiones espontáneas, o rupturas de cadena sencillas no reparadas o mal reparadas que pueden causar inestabilidad genómica observada como rearrreglos cromosomales ya sean deleciones, translocaciones (Hanaoka *et al.*, 2016) y fusiones cromosomales que activan los marcadores de células cancerígenas (Shrivastav *et al.*, 2008) resultando en mutaciones o muerte celular (Lliakis *et al.*, 2004). Pero las DSBs no solamente se forman de manera espontánea sino también, durante los rearrreglos genómicos programados inducidos por nucleasas específicas, incluyendo el switching de tipo de apareamiento en levaduras (Shrivastav *et al.*, 2008).

Las DSBs ocasionadas por factores externos o internos, pueden ser reparadas por recombinación homóloga (HR) o por recombinación no homóloga (NHEJ), mientras que las DSBs producidas por el colapso de la horquilla de replicación son reparadas ante todo por HR (Symington *et al.*, 2004).

Las rutas de NHEJ y HR habitualmente son descritas como propensa a error y libre de errores respectivamente, sugiriendo que la recombinación homóloga juega un papel importante en la reparación de DSBs ocurridas durante el proceso de replicación. En eucariotas superiores el mecanismo fundamental para la reparación de lesiones involucra la recombinación no homóloga (NHEJ), sin embargo, en levaduras la ruta por elección es la recombinación homóloga (HR). La presencia de proteínas de la ruta NHEJ: (DNA-PKcs, BRCA1 y Artemis) en

mamíferos en contraste con la ausencia de estas en levaduras podría explicar la reparación mediante HR (Shrivastav et al., 2008).

Si bien es cierto lo anterior, la elección de la ruta de reparación dependerá no solamente de la presencia de las proteínas de recombinación en la célula, sino también del tipo de lesión y más aún del organismo en cuestión.

Adicionalmente, la reparación mediante la ruta NHEJ se lleva a cabo durante la fase G1, G0 y M del ciclo celular, mientras que la recombinación homóloga ocurre preferencialmente durante la fase S y G2 donde pueden hacer uso de las cromátidas hermanas como secuencias homólogas para la reparación eficiente de las DSBs (Czornak et al., 2008; Shrivastav et al., 2008).

Existen al menos tres mecanismos usados para la reparación que provienen de la recombinación homóloga, incluyendo la replicación inducida por ruptura (BIR), el alineamiento de cadena dependiente de síntesis (SDSA) y la reparación de rupturas de doble cadena (DSBR) (Hanaoka et al., 2016; Symington et al., 2014).

### 1.7.1 DSBR

En este modelo, los extremos 5' de DSB son degradados a colas de ADN de cadena sencilla, una de las cuales invade la doble cadena homóloga para formar un loop de desplazamiento (D-loop) que es usado para la síntesis de ADN, templado por el dúplex donador. El ADN de cadena sencilla 3' del otro lado de la rotura se alinea con la banda desplazada del dúplex donador y se empieza una segunda ronda de síntesis. El ADN recién sintetizado es degradado a cadenas 5' y se forma un intermediario de Holliday junction (dHJ). Para segregarse el dúplex recombinante, el dHJ debe ser removido, y esto puede ocurrir por la actividad de una helicasa y topoisomerasa para dar como resultado un solo no entrecruzamiento (disolución) o por escisión endonucleolítica (resolución) (Symington et al., 2014).

### 1.7.2 SDSA

El modelo SDSA propone que una terminación del dúplex roto invade la cadena donadora e inicia la síntesis de ADN. La banda elongada invasora es desplazada después de la síntesis extensa de ADN y se aparea con el otro lado de la rotura. Ambas colas de ADN de cadena

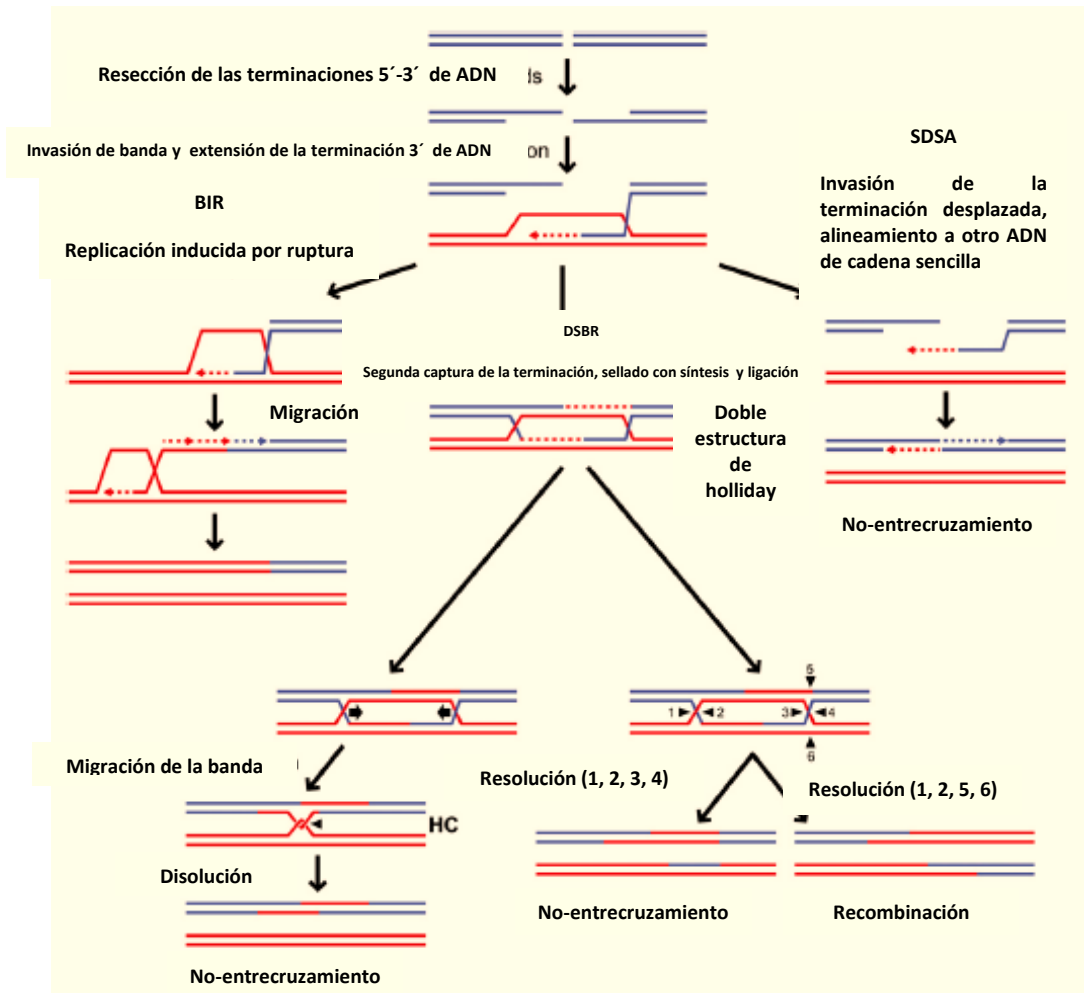
sencilla invaden el dúplex homólogo y después de una limitada síntesis es desplazada por la ADN helicasa; y la cadena naciente complementaria se alinea y después de la síntesis y ligación se generan exclusivamente no entrecruzamientos (Symington *et al.*, 2014).

### 1.7.3 BIR

La replicación inducida por ruptura (BIR) es un proceso dependiente de replicación que resulta en la transferencia no recíproca de ADN del cromosoma donador al aceptor. En este modelo un extremo de la DSB invade un dúplex homólogo de ADN e inicia la replicación del extremo del cromosoma (Symington *et al.*, 2014).

En el modelo BIR puede ocurrir por varias rondas de invasión de banda, síntesis de ADN y disociación resultando en rearrreglos cromosomales cuando la disociación y reinvasión ocurre dentro de secuencias repetidas dispersas (Symington *et al.*, 2014). Así, la alta naturaleza mutagénica de BIR puede contribuir a la evolución y desarrollo de enfermedades en humanos (Symington *et al.*, 2014). De esta manera se da lugar a una extensa pérdida de heterocigocidad (LOH), sugiriendo que BIR es suprimida cuando las DSB tienen dos extremos homólogos a manera de reparar el daño por un mecanismo más conservativo.

En la siguiente imagen se muestran los principales modelos de reparación de DSBs dependientes de homología.



**Figura 2. Modelos de reparación de DSBs dependientes de homología.** Existen al menos tres mecanismos usados para la reparación que provienen de la recombinación homóloga, incluyendo la replicación inducida por ruptura (BIR), el alineamiento de cadena dependiente de síntesis (SDSA) y la reparación de roturas de doble cadena (DSBR) (Symington *et al.*, 2014).

Estos procesos o modelos de reparación requieren de las proteínas del grupo epistático de *RAD52*, este gen tiene un papel importante en la reparación del daño al DNA mediante Recombinación Homóloga (HR).

## 1.8 Eventos de recombinación

La recombinación es el intercambio de información entre moléculas de ADN y se lleva a cabo en todos los organismos vivos (Symington *et al.*, 2004). Existen dos mecanismos principales de

recombinación. La recombinación homóloga (HR) que involucra el intercambio de información entre secuencias con perfecta homología y la recombinación no homóloga (NHEJ) que requiere secuencias con poca o nula homología (Symington *et al.*, 2004).

### 1.8.1 Recombinación no homóloga

En eucariotas superiores la recombinación no homóloga (NHEJ) juega un papel muy importante en el mantenimiento de la integridad del material genético. Generalmente el uso de esta ruta en mamíferos suele ser más eficiente y precisa que en levaduras. Se ha observado que mutaciones en genes centrales de esta ruta (DNA-PKcs, BRCA1 o Artemis) disminuye la supervivencia celular. La ruta de recombinación no homóloga, funciona principalmente durante la fase G1 (Lisby *et al.*, 2009), aunque también se encuentra activa durante la fase S y G2 del ciclo celular. Al igual que la ruta de recombinación homóloga, la función principal es reparar roturas de doble cadena producidas por nucleasas específicas y radiación ionizante.

### 1.8.2 Recombinación homóloga (mitótica)

Las roturas de doble cadena (DSBs) son reparadas por alguna de las dos rutas, ya sea mediante recombinación homóloga (HR) o por unión de extremos no homólogos (NHEJ), de una manera dependiente del ciclo celular, si se encuentran en fase S/G2 o G1, respectivamente.

En un estudio realizado por Terasawa *et al.*, (2014) utilizaron células en fase M expuestas a diferentes agentes químicos y demostraron que las roturas de doble cadena no reparadas durante la fase M, desencadenan masivas aberraciones cromosómicas y que de alguna manera la eficiencia de reparación de DSB durante la fase M es baja, causando un mayor grado de inestabilidad.

La recombinación homóloga es considerado el mecanismo más preciso para la reparación de DSBs debido a que utiliza secuencias homólogas dentro del genoma como cromatidas hermanas, cromosomas homólogos o regiones repetidas en el mismo cromosoma como cebador para la síntesis y reparación de los fragmentos dañados. A pesar de que se considerado un mecanismo 100% efectivo, se ha comprobado que la polimerasa de reparación es más propensa a cometer errores que la polimerasa replicativa en levaduras.

Cuando los templados de reparación no son de perfecta homología y se utiliza la HR, puede conllevar a la pérdida de heterocigocidad (LOH), con transferencia no recíproca de información, un proceso conocido como conversión génica.

La recombinación mitótica generalmente muestra una baja asociación de entrecruzamientos en comparación a la conversión génica observada durante la recombinación meiótica. Durante la mitosis, la recombinación homóloga participa en diferentes procesos: el switching de tipo sexual, la reparación de roturas de doble cadena y la restauración de horquillas de replicación estalladas o colapsadas resultan (Hanaoka *et al.*, 2016).

En el mecanismo de recombinación homóloga, están implicadas las proteínas codificadas por genes del grupo epistático de *RAD52* (*RAD50*, *RAD51*, *RAD52*, *RAD54*, *RAD55*, *RAD57*, *RAD59*, *RDH54*, *MRE11* y *XRS2*) (Symington *et al.*, 2004). También pueden ser requeridas nucleasas (Exo, Sae1, Rad-rad10), helicasas (Sgs1), topoisomerasas (Top3), polimerasas (Pol32) y ligasas. El evento de recombinación involucra tres pasos importantes; el primer paso denominado presinapsis, inicia con la degradación de los extremos 5' de los extremos rotos, que en levaduras es regulada por el complejo (Mre11/Rad50/Xrs2), Exo1 y algunas otras nucleasas. El resultado son regiones de ADN de cadena sencilla 3' que están unidas por la proteína RPA que estimula la unión a ADN de cadena sencilla removiendo estructuras secundarias, posteriormente es reemplazada por Rad51 en una reacción mediada por Rad52 y dos parálogos de Rad51 (Rad55 y Rad57) liberando Rad51 del ADN de cadena sencilla. La sinapsis, donde el nucleofilamento protéico Rad51 busca e invade una secuencia homóloga del dúplex donador, un proceso facilitado por *RAD54* (Hanaoka *et al.*, 2016).

La helicasa Srs2 se cree que disocia Rad51 del ADN de cadena sencilla (ssDNA), permitiendo el apareamiento de bases entre la banda invasora y la cadena donadora y una subsecuente extensión por la ADN polimerasa. Esto provoca un intercambio de cadena e información entre la secuencia dañada y su homóloga intacta; por último se da la resolución de los intermediarios replicativos, en un proceso denominado post-sinapsis.

Este proceso da como resultado la formación de una estructura denominada doble-unión de Holliday que resulta en entrecruzamiento o no entrecruzamiento. Posteriormente, los huecos

de ADN de cadena sencilla y las mellas son reparadas por la ADN polimerasa y ADN ligasa (Hanaoka *et al.*, 2016).

Los entrecruzamientos durante la mitosis potencialmente resultan en un aumento de la inestabilidad del genoma, los entrecruzamientos en la fase G2 entre homólogos resultan en la pérdida de heterocigocidad, mientras que si ocurren en regiones repetidas pueden originar deleciones, inversiones y duplicación génica (Symington , 2002) si pertenecen a cromosomas homólogos o cromatidas hermanas, o incluso translocaciones si las regiones repetidas pertenecen a cromosomas no homólogos.

El desarrollo de sistemas modelo han servido para estudiar el rol de la recombinación homóloga en la reparación de roturas de doble cadena, estimando que este proceso remueve aproximadamente el 50 % de DSBs, sugiriendo un mecanismo alternativo para la reparación de las roturas restantes, según estos datos, la ruta NHEJ podría llevar a cabo esta actividad (Iliakis *et al.*, 2004).

## 1.9 Genes del grupo epistático *RAD52*

Los genes del grupo epistático *RAD52* fueron identificados inicialmente por su requerimiento en la reparación del daño al ADN inducido por radiación ionizante (IR).

De todos los miembros del grupo epistático *RAD52*, la ausencia de *RAD52* produce los más severos defectos en las células, debido a que está involucrado en múltiples rutas de reparación de DSBs. *RAD52* desempeña un papel importante en la ruta de reparación de roturas de doble cadena (DSBR) dependiente de *RAD51*, conocida comúnmente como alineamiento de cadena dependiente de síntesis (SDSA) o en las rutas DSBR independientes de *RAD51*, conocidas como replicación inducida por ruptura (BIR) o alineamiento de cadena sencilla (SSA).

*RAD52* en levaduras es expresado de manera constitutiva en el ciclo celular, sin embargo esta expresión se incrementa dos o tres órdenes durante la exposición a agentes que dañan el ADN. En contraste con lo que sucede en levaduras, la ausencia de *RAD52* en eucariotas superiores no resulta en cambios fenotípicos drásticos, debido a la existencia de proteínas con funciones redundantes que podrían asumir esta función (Sonoda *et al.*, 2001).

Andaluz y colaboradores en 2007 determinaron la importancia del gen *RAD52* en *C. albicans*, demostrando su participación en varios eventos celulares dependientes de recombinación homóloga, incluyendo la integración de ADN lineal y la reparación de daño al ADN causado por luz UV y agentes radiomiméticos como el MMS.

*RAD52* y *RAD59* participan no solamente en los eventos de recombinación homóloga sino también tienen funciones adicionales en rutas menos conservativas como BIR o SSA.

Adicionalmente, estudios realizados utilizando como modelo *S. cerevisiae*, elucidaron la importancia de *RAD52* demostrando que su ausencia conlleva severos defectos en la conversión génica, SSA, recombinación entre repetidos invertidos, y la formación de sobrevivientes en la ausencia de telomerasa (Symington *et al.*, 2004).

La proteína Rad52 por su parte, es esencial en paso primario de la recombinación homóloga, además está involucrada en el alineamiento de cadena sencilla y otras formas de recombinación independientes de *RAD51*, que puede explicar el pronunciado cambio fenotípico en mutantes *rad52* más que en mutantes *rad51*.

Los homólogos de Rad51 y Rad52 están conservados en levaduras y humanos, sugiriendo que el mecanismo usado para el apareamiento de moléculas homólogas de ADN durante la recombinación puede ser universal en eucariotas (Shinohara *et al*, 1998).

### 1.9.1 El papel de Rad52 en los eventos de recombinación

Rad52 interactúa directamente con RPA y Rad51 y se cree que media el ensamblaje del nucleofilamento Rad51. Esta interacción ocurre a través del dominio C-terminal no conservado de la proteína. Mutantes expresando una truncación en el dominio C-terminal de Rad52 remueve la interacción con Rad51 aumentando la sensibilidad a radiación ionizante. Una región ácida de Rad52, que comprende 308-311 residuos aminoacídicos es requerido para la interacción con RPA y resistencia al daño ADN.

Participa en la reparación de roturas de doble cadena en el ADN durante el crecimiento vegetativo y la meiosis y en la recombinación de las cromatidas hermanas inducidas por luz UV.

## 2. ANTECEDENTES

*C. albicans* es la especie más estudiada a nivel genético, se han caracterizado fenotípicamente mutantes *Carad52-Δ/Carad52-Δ* observando que la ruta de recombinación homóloga dependiente de Rad52 es esencial para la reparación de lesiones causadas por la exposición a agentes que dañan el ADN como luz ultravioleta y compuestos radiomiméticos como el metil metano sulfonato (Cuidad *et al.*, 2004). Adicionalmente, la HR se lleva a cabo preferencialmente y de manera más eficiente durante la fase de crecimiento exponencial, probablemente debido a un incrementado número de células que se encuentran en la fase tardía S o G2 del ciclo celular, donde las cromátidas hermanas funcionan como sustrato para llevar a cabo la reparación por HR.

La delección de *RAD52* desencadena varios efectos sobre la biología celular en *C. albicans*. Cultivos de cepas de *rad52-Δ* exhibieron los más severos defectos en cuanto a crecimiento aumentando el tiempo de generación y favoreciendo el crecimiento de colonias con abundantes filamentos radiales como resultado del desacoplamiento de varios eventos del ciclo celular derivando en la acumulación de DSB no reparadas, desencadenando así, el arresto del ciclo celular y la polarización del crecimiento (Andaluz *et al.*, 2006). Esto último, sugiere que algunas proteínas de HR están involucradas en la prevención del crecimiento polarizado en *C. albicans* (García-Prieto *et al.*, 2010) (Bellido *et al.*, 2015).

A. Bellido y colaboradores en 2015 dieron a conocer el primer reporte que revela las interacciones entre genes implicados en HR que promueven la morfología aberrante en *C. albicans* estableciendo un solapamiento parcial de funciones entre Rad51 y Rad52 que afectan el crecimiento celular y la morfología en *C. albicans*.

Dado que *C. tropicalis* se ha posicionado como un patógeno emergente, desde hace algunos años ha crecido el interés por estudiar su variabilidad y adaptabilidad genética. *C. tropicalis* tiene mecanismos importantes en la reparación del daño al ADN a los cuales se encuentran asociados genes del grupo epistático *RAD52* (Symington *et al.*, 2004) y que mantienen la estabilidad genética del microorganismo.

El primer estudio realizado en *C. tropicalis* que permitió visualizar la importancia de las rutas de reparación y mantenimiento de la estabilidad genética fue hecho por Cuevas en 2012 que mediante el estudio de cariotipos de aislados clínicos de *C. tropicalis* procedentes de diversos estados de la República Mexicana pudieron observar la variabilidad en cada muestra (Cuevas, 2012).

En 2012, Espinosa Taxis construyó el mutante heterocigótico *RAD52/rad52::hisG* en el fondo genético de *C. tropicalis* MYA3404.

Ramírez Falcón en 2014 obtuvo el reintegrante *RAD51* que mostró características fenotípicas similares a la cepa tipo MYA3404, así como mutantes nulos *rad52* que presentaron una morfología filamentosa y una incrementada sensibilidad a luz UV, camptotecina, bleomicina y MMS en comparación con la cepa parental (Ramírez Falcón, 2014).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las infecciones nosocomiales se han convertido en un problema de salud pública que requiere una pronta atención. Las infecciones fúngicas representan una alta tasa de morbi-mortalidad en pacientes hospitalarios y la incidencia ha aumentado drásticamente en las últimas décadas. Diversos factores de riesgo presentes en los pacientes pueden desencadenar el desarrollo de una infección fúngica, aunado a esto, los factores que forman parte del microorganismo dan lugar al establecimiento de una infección exitosa. Los principales mecanismos que les permiten colonizar e infectar los tejidos del hospedero están relacionados con los factores de virulencia que posee y es interesante recordar que muchos de esos factores les permiten adaptarse a condiciones adversas y esa adaptación puede estar mediada por los reordenamientos constantes que sufre su genoma.

De tal manera que, es de suma importancia conocer y detallar los mecanismos involucrados en la inestabilidad genómica.

## 4. JUSTIFICACIÓN

La incidencia global de las infecciones fúngicas ha aumentado considerablemente en los últimos años, principalmente aquellas producidas por especies del género *Candida*. De las cuales, *C. tropicalis* ha evolucionado como un patógeno oportunista y su incidencia y prevalencia en los aislados clínicos está incrementándose a tal grado que se ha considerado la segunda especie solo después de *C. albicans* en causar candidosis.

La inestabilidad o variabilidad genética que tiene *Candida tropicalis*, puede funcionar como un mecanismo de adaptación durante la exposición a numerosas condiciones estresantes. Lo anterior sugiere, que los constantes reordenamientos del genoma pueden ser un factor clave y decisivo que influye directamente en la permanencia del microorganismo dentro del hospedero. Dicho lo anterior, la resistencia frente a los agentes antimicrobianos más comunes usados en la práctica clínica se incrementa drásticamente.

Diferentes mecanismos están implicados en la generación de diversidad génica, principalmente aquellos mecanismos de recombinación que participan en la reparación del daño al ADN, de tal manera que, si los daños ocasionados no son reparados o son reparados de manera incorrecta puede resultar en alteraciones en el genoma que pueden ser o no, favorables para la viabilidad de las células.

Dado que la plasticidad genética está bajo el control de la maquinaria de reparación/recombinación del ADN, el análisis de los genes que participan en estos procesos puede ayudar a elucidar la importancia de mantener en correcto funcionamiento las rutas de reparación en *C. tropicalis*. Estas rutas, además de reparar daños producidos por procesos endógenos o factores exógenos pueden generar diversidad génica, cuya elucidación ayudaría a comprender la biología y la patogénesis de este hongo.

Por lo tanto, en este trabajo se pretende realizar un estudio que evalúe la importancia y la participación del gen *RAD52* en los eventos de recombinación mitótica durante la exposición a agentes que dañan el ADN.

Se ha sugerido que la proteína Rad52 participa en el reconocimiento del corte realizado por agentes endógenos o exógenos en el DNA.

## 5. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar fenotípicamente y molecularmente la mutante *rad52-ΔΔ* de *Candida tropicalis*.

### 5.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Caracterizar molecularmente la mutante *rad52-ΔΔ* de *C. tropicalis*.
2. Caracterizar fenotípicamente la mutante *rad52-ΔΔ* de *C. tropicalis* por morfología macroscópica y microscópica.
3. Determinar la velocidad de crecimiento y la invasividad en agar de la mutante *rad52-ΔΔ* de *C. tropicalis*.
4. Determinar el efecto del MMS, BLM y luz UV en la mutante *rad52-ΔΔ* de *C. tropicalis*.

## 6. HIPOTESIS

El gen *RAD52* desempeña un papel fundamental en los mecanismos de recombinación mitótica para la reparación de lesiones en el ADN causadas por agentes exógenos, permitiendo la adaptación y supervivencia de *Candida tropicalis* en condiciones estresantes.

## 7. ESQUEMA DE TRABAJO

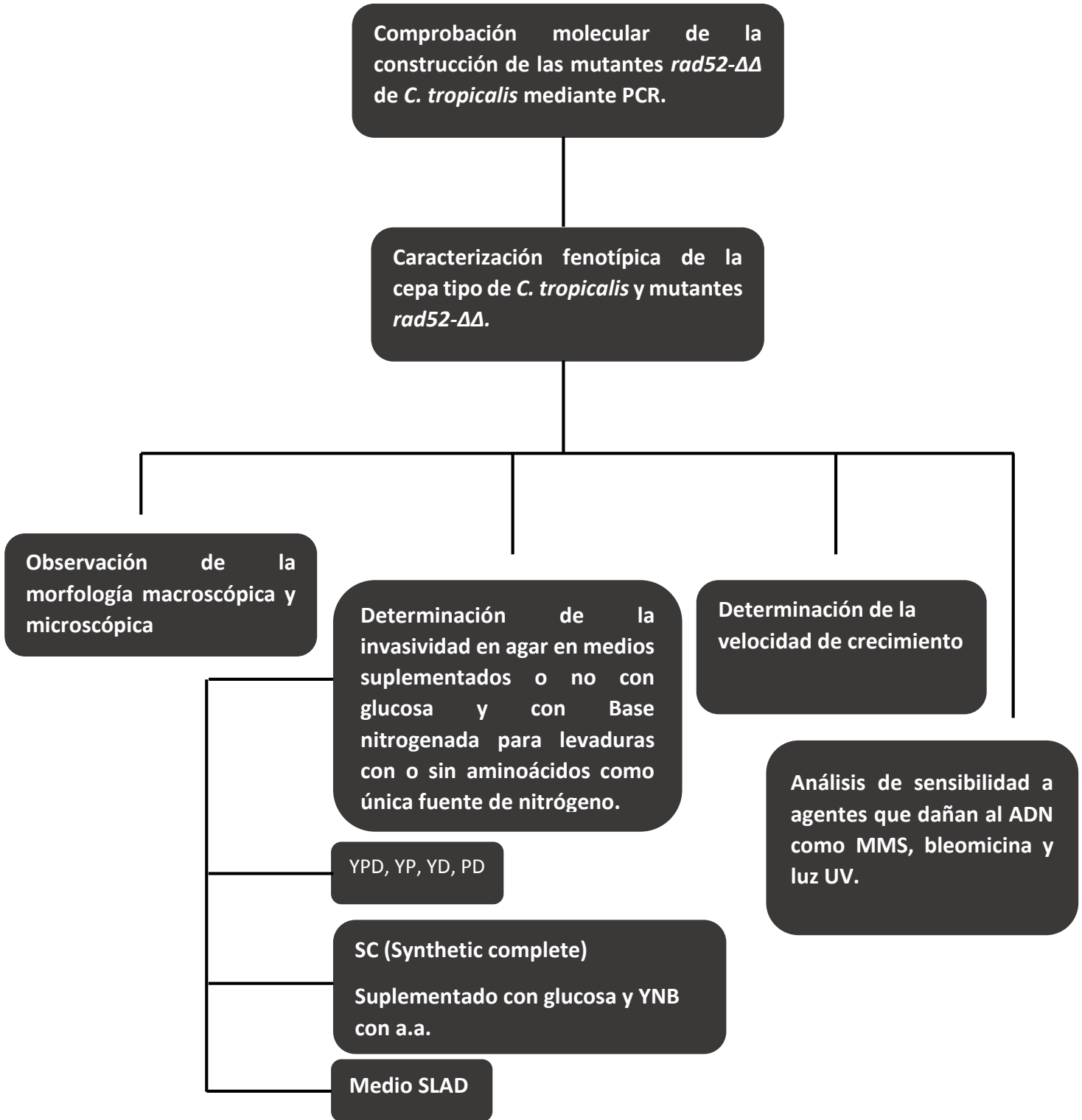


Figura 3. Esquema de trabajo.

## 8. METODOLOGÍA

### 8.1 Cepas utilizadas en el trabajo

Tabla 1. Cepas empleadas en la realización de este trabajo.

Cepa	Genotipo
<i>C. tropicalis</i> (MYA3404)	Cepa tipo
<i>C. tropicalis rad52ΔΔ</i>	<i>Ura+rad52::hisG::rad52::hisG-URA3-hisG</i>

### 8.2 Medios y condiciones de cultivo

*C. tropicalis* MYA3404 se cultivó en medio YPD líquido a 30°C en agitación a 200 rpm. Para el cultivo en medio sólido se adicionaron 15g/L de agar bacteriológico. Las mutantes *rad52-ΔΔ* fueron cultivadas en las mismas condiciones.

Los experimentos de sensibilidad a agentes que dañan el ADN se realizaron en fase de crecimiento exponencial y estacionaria.

Los diferentes medios de cultivo utilizados en este trabajo se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 2. Medios de cultivo utilizados en este trabajo.

Medio	Composición	Uso y referencia
YPD (Yeast Peptone Dextrose)	Extracto de levadura 10 g/L , glucosa 20 g/L, peptona de caseína 20 g/L, agar bacteriológico 15 g/L.	Medio rico nutritivo en sólido o líquido para el crecimiento y propagación de cultivos de levaduras. Medio no selectivo para <i>Candida</i> , <i>Pichia</i> , <i>Saccharomyces</i> y <i>Zygosaccharomyces</i> (MacDonald, 2001).

---

<b>*YP (Yeast-Peptone)</b>	Extracto de levadura 10 g/L, peptona de caseína 20 g/L, agar bacteriológico 15 g/L.	(Cullen et al., 2000).	
<b>*YD (Yeast-Dextrose)</b>	Extracto de levadura 10g/L, glucosa 20g/L, agar bacteriológico 15 g/L.	(Cullen <i>et al.</i> , 2000).	
<b>*PD (Peptone-Dextrose)</b>	Peptona de caseína 20 g/L, glucosa 20 g/L, 15 g/L agar bacteriológico.	(Cullen <i>et al.</i> , 2000).	
<b>SC (Synthetic complete)</b>	Glucosa 20 g/L, Bactoagar 20 g/L, Base nitrogenada para levaduras con aminoácidos (YNB con aminoácidos) 6.7 g/L.	Promueve el crecimiento de levaduras, que no tienen un requerimiento nutricional (MacDonald, 2001).	
<b>SC (Synthetic complete)</b>	Base nitrogenada para levaduras con aminoácidos (YNB con aminoácidos) 6.7 g/L, Bactoagar 20 g/L.	Promueve el crecimiento de levaduras, que no tienen un requerimiento nutricional (MacDonald, 2001).	
<b>SLAD (Synthetic low ammonia dextrose)</b>	Base nitrogenada para levaduras sin aminoácidos 1.7 g/L, glucosa 20 g/L, Bactoagar 20g/L.	Promueve el crecimiento de formas filamentosas en levaduras (Mosch <i>et al.</i> , 1997).	

---

<b>CHROM-agar™ Candida Medium</b>	Cromopeptona 10 g/L, Glucosa 20 g/L, Mezcla cromógena 2 g/L, Cloranfenicol 0.5 g/L, Agar 15 g/L. pH 6.0 ± 0.03.	Aislamiento e identificación de <i>Candida albicans</i> , <i>Candida tropicalis</i> y <i>Candida krusei</i> .
-----------------------------------	---	---

\*Variantes del medio YPD para evaluar el efecto de la remoción de otros componentes de este medio sobre el crecimiento celular, el desarrollo de formas filamentosas y el crecimiento invasivo de levaduras en presencia y ausencia de glucosa.

### 8.3 Iniciadores utilizados en este trabajo

Tabla 3. Iniciadores utilizados en este trabajo.

Iniciadores	Secuencia
	<b>Comprobación especie específica para <i>C. tropicalis</i></b>
<b>CtR1</b>	5´-CAA TCC TAC CGC CAG AGG TTAT-3´
<b>CtR2</b>	5´-TGG CCA CTA GCA AAA TAA GCGT-3´
	<b>Comprobación de mutantes nulas <i>rad52</i> de <i>C. tropicalis</i></b>
<b>Ct52F</b>	5´-TAG AAT ACA GGG GAA AAT AAG AGG-3´
<b>Ct52I (iniciador interno del gen <i>RAD52</i>)</b>	5´-CGC CAA ATT CAA TGC TCG CCA GCC3´

Previo a la caracterización molecular, se llevó a cabo la comprobación de especie de *C. tropicalis* en todas las cepas utilizadas en este trabajo, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR-especie- específica) utilizando los oligonucleótidos CtR1 y CtR2 que amplifican las regiones intergénicas ITS1 e ITS2, utilizando el kit PCR Master Mix suministrado por Promega el cual contiene: 50 unidades/ml de *Taq* DNA polimerasa, 400uM de dATP, dGTP, dCTP, dTTP cada uno y 3mM de MgCl<sub>2</sub>. La muestra fue tomada directamente de colonias frescas crecidas en medio YPD durante 24 horas a 30°C y se preparó de la siguiente manera: con la ayuda de una asa estéril se tomó una colonia aislada y se homogeneizó en 5µl de agua estéril.

Para una reacción de 12.5µl, se depositaron en un tubo eppendorf estéril 6µl del mix de PCR, 1.5µl de oligonucleótido CtR1 (10µM) y 1.5µl de primer CtR2 (10µM), 1µl de la suspensión celular de levaduras y 2.5 µl de agua estéril.

Una muestra de 4µl de cada producto de PCR fueron revelados en un gel de agarosa al 1.5%, utilizando como buffer TBE al 1X a 75 V en una cámara electroforética. El gel fue teñido con bromuro de etidio y las bandas fueron visualizadas sobre un fotodocumentador.

#### **Programa de PCR**

1. Etapa de desnaturalización (5 minutos a 96°C)
2. 40 Ciclos (30 segundos a 94°C)
3. (30 segundos a 58°C)
4. (30 segundos a 72°C)
5. Última etapa (15 minutos a 72°C)

#### **8.4 Caracterización molecular mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La comprobación molecular se llevó a cabo utilizando los oligonucleótidos Ct52F y Ct52I con la finalidad de comprobar la construcción y asegurar la pérdida del gen *RAD52* de *C. tropicalis*. Para la reacción se utilizó el kit de PCR Thermo scientific/Dream Taq Green PCR Master Mix (2X) que contiene: Dream Taq DNA polimerasa, 2X Dream Taq Green buffer, 0.4mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP cada uno y 4mM MgCl<sub>2</sub>. La muestra fue tomada directamente de colonias frescas de cada una de las cepas utilizadas en este trabajo crecidas en medio YPD durante 24 horas a 30°C; con la ayuda de un asa estéril se tomó una colonia aislada y se homogeneizó en 5 µl de agua estéril. Para una reacción de 12.5µl, se depositaron en un tubo eppendorf estéril 6µl del mix de PCR, 1.5µl de oligonucleótido Ct52F (10µM) y 1.5µl de primer Ct52I (10µM), 1µl de muestra y 2.5µl de agua estéril.

Una muestra de 4µl de cada producto de PCR fueron revelados en un gel de agarosa al 1%, utilizando como buffer TAE al 1X a 75 V en una cámara electroforética. El gel fue teñido con bromuro de etidio y las bandas fueron visualizadas sobre un fotodocumentador.

## Programa de PCR: CT52URA2

1. Etapa de inicio (3 minutos/95°C)
2. Etapa de desnaturalización (30 segundos/95°C)
3. Etapa de hibridación (30segundos/50°C)
4. Etapa de elongación (2 min/72°C)
5. 30 ciclos (etapa 2-4)
6. Etapa de término (5 minutos/72°C)
7. Última etapa (12°C- $\alpha$ )

## 8.5 Caracterización fenotípica básica

### 8.5.1 Morfología macroscópica y microscópica

Las cepas de *C. tropicalis* que se muestran en la tabla 1 fueron cultivadas en medio YPD sólido durante 24 horas a 30°C, mientras que los cultivos en YPD líquido se mantuvieron en agitación a 200 rpm. Transcurrido el tiempo de incubación, se visualizó la morfología colonial de cada una de las cepas y se registraron las observaciones tomando en cuenta la forma, color y textura de las colonias.

Para observar la morfología microscópica, se tomaron 10 $\mu$ l a partir del cultivo en medio líquido y se colocaron en un portaobjetos y se visualizó al microscopio con el objetivo 40X.

### 8.5.2 Análisis de la velocidad de crecimiento

Para la preparación del preinóculo, las cepas de *C. tropicalis* que se muestran en la tabla 1 fueron sembradas en 10 ml de YPD líquido y se incubaron en agitación a 200 rpm a 30°C durante 12 horas. Posteriormente se determinó la densidad óptica del preinóculo a 600nm y se inocularon matraces con 50 ml de medio fresco YPD líquido a una  $OD_{600nm}=0.05$ . Se mantuvieron en agitación constante a 200 rpm a 30°C.

Las lecturas en el espectrofotómetro ( $DO_{600nm}$ ) fueron tomadas cada hora durante 12 horas.

Adicionalmente se tomó una muestra de 100µl cada hora durante la curva de crecimiento con la cual se realizaron 6 diluciones seriadas en una proporción 1:10 y se sembraron 5µl de cada dilución en placas de YPD y se incubaron durante 48 horas a 30°C. Posteriormente se determinaron las UFC/ml considerando la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/ ml} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de colonias contadas} \text{ (Factor de dilución)}}{\text{Volumen de siembra}}$$

## 8.6 Análisis de invasividad en agar

Para el análisis de invasividad en agar las cepas de *C. tropicalis* que se muestran en la tabla 1 se cultivaron en medio YPD líquido hasta la fase estacionaria donde se ajustó la  $DO_{600nm}=0.05$  para sembrar por extensión 5µl del cultivo en los medios indicados en la tabla 2 (YPD-YP-YD-PD-SC sin glucosa + YNB con aminoácidos, SC con glucosa + YNB con aminoácidos y medio SLAD) y se incubaron durante 5 días a 30°C, después se incubaron a temperatura ambiente por 3 días más. Se evaluaron las características macroscópicas y microscópicas a lo largo del ensayo.

## 8.7 Evaluación de la respuesta a agentes que dañan el ADN

### 8.7.1 Análisis de sensibilidad a radiación ultravioleta (UV)

El análisis de sensibilidad a la luz ultravioleta (UV) se llevó a cabo a partir de cultivos en medio líquido de las cepas que se muestran en la tabla 1 considerando la fase de crecimiento estacionaria y exponencial. El ensayo se realizó en placas de micro titulación estériles donde se colocaron 200µl del cultivo de cada cepa ajustado a una  $DO= 0.05$  en cada uno de los pozos y se irradiaron a diferentes dosis de luz UV ( $2J/m^2$  y  $7J/m^2$ ). Posteriormente se inocularon directamente de los pozos 5µl de las células en medio YPD para determinar las UFC y el porcentaje de células sobrevivientes. Como control se utilizaron células sin irradiar de cada una de las cepas en medio YPD. Las placas fueron cubiertas con papel aluminio para evitar su exposición a la luz y se incubaron durante 48 horas a 30°C. El análisis de sensibilidad se realizó en tres experimentos independientes cada uno por duplicado.

### 8.7.2 Análisis de sensibilidad al Metil metano sulfonato (MMS)

El análisis de sensibilidad a MMS se llevó a cabo a partir de cultivos en medio líquido de las cepas que se muestran en la tabla 1 considerando la fase de crecimiento estacionaria y exponencial. Para el ensayo se prepararon placas de medio YPD suplementado con diferentes concentraciones de MMS (0.001%, 0.003%, 0.005% y 0.01%) donde se inocularon 5µl del cultivo ajustado a una DO= 0.05 por el método de extensión en placa. Como control se inocularon las células en placas de YPD sin el agente. Las placas fueron cubiertas con papel aluminio para evitar la exposición a la luz y se incubaron durante 48 horas a 30°C. Finalmente, se hizo el conteo de UFC para determinar el porcentaje de supervivencia celular. El análisis de sensibilidad a MMS se realizó en tres experimentos independientes cada uno por duplicado. Adicionalmente se desarrolló la prueba de Dropt-test utilizando 5 diluciones seriadas en una proporción 1:10 de cada cultivo y se sembraron 10µl de cada dilución en placas de YPD como control y YPD con MMS y se incubaron a 30°C durante 48 horas.

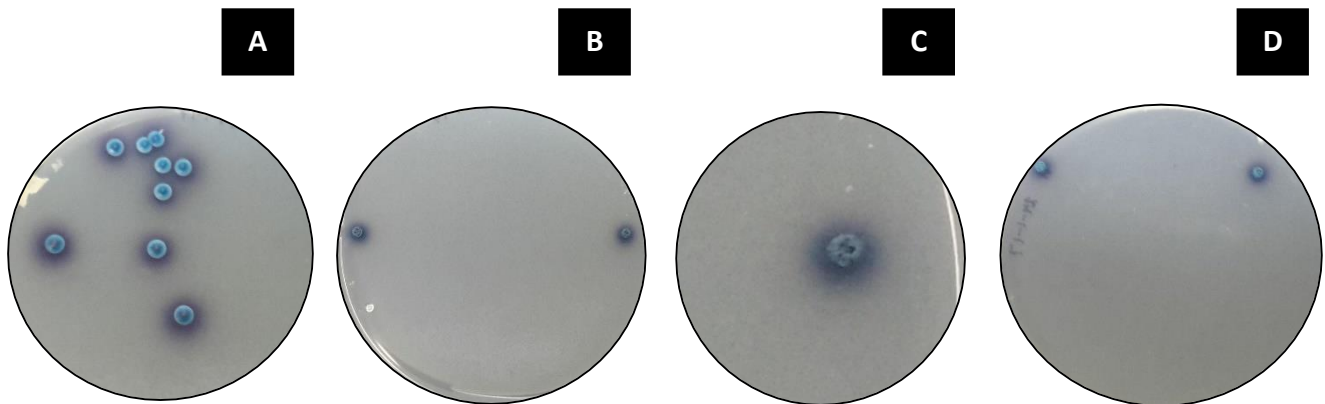
### 8.7.3 Análisis de sensibilidad a bleomicina

El análisis de sensibilidad a bleomicina se llevó a cabo a partir de cultivos en medio líquido de las cepas que se muestran en la tabla 1 considerando la fase de crecimiento estacionaria y exponencial. Para el ensayo se prepararon placas de YPD suplementado con diferentes concentraciones de bleomicina (2.5µg/ml, 5µg/ml y 10µg/ml), donde se inocularon 5µl de la dilución  $1 \times 10^{-2}$  de cada cultivo ajustado previamente a una DO=0.1. Como control se tomaron placas inoculadas con 5µl del cultivo en medio YPD sin bleomicina. Todas las placas se incubaron a 30°C durante 48 horas. El análisis de sensibilidad a bleomicina se realizó en tres experimentos independientes cada uno por duplicado.

Por otra parte, se realizó la prueba de Drop-test utilizando 5 diluciones seriadas 1:10 de cada cultivo y se sembraron 10µl de cada dilución en placas de YPD suplementadas con bleomicina y YPD como control y se incubaron a 30°C durante 48 horas.

## 9. RESULTADOS

El medio CHROMagar™Candida Medium es un medio que permite el aislamiento y la identificación de especies del género *Candida*, entre las cuales se encuentra *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei*. Este medio, comúnmente empleado para la identificación presuntiva de estas especies, contiene sustratos cromógenos que mediante la acción enzimática específica producidas por cada una de las especies, los cromóforos son liberados y pueden detectarse visualmente mediante la observación de un cambio de color de las colonias. De esta manera se obtienen resultados en un periodo relativamente corto en comparación con otros métodos de identificación. El uso de este medio cromogénico ha sido ampliamente documentado por diversos autores. Después de incubar las placas durante 48 horas a 30°C, se tomaron las lecturas correspondientes. Como se puede observar en la figura 4, la cepa tipo de *C. tropicalis* MYA3404 mostró colonias azul metálico con halos violetas, como lo indica el fabricante. De igual forma las mutantes *rad52-ΔΔ*, crecieron como colonias azules con bordes violetas. Cada mutante poseía una morfología colonial característica, tal como se observa en la siguiente imagen:

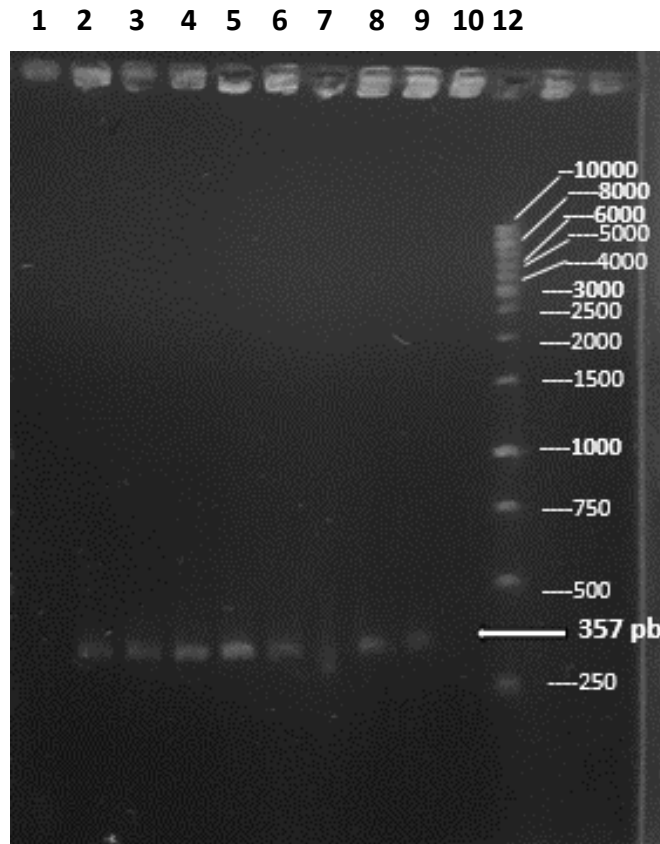


**Figura 4. Identificación presuntiva mediante un medio cromogénico (CHROMagar™Candida Medium) de especies de levaduras del género *Candida*.** A) Cepa tipo de *C. tropicalis* MYA3404, B) *C. tropicalis rad52-ΔΔ-9*, C) *C. tropicalis rad52-ΔΔ-10* y D) *C. tropicalis rad52-ΔΔ-11* incubadas a 30°C durante 48 horas.

## 9.1 PCR especie-específica

De todas las cepas evaluadas en este trabajo solo la cepa tipo de *C. tropicalis* MYA3404 que ha sido previamente secuenciada, al igual que las mutantes 9, 10, 11, 13, 17 y 18 dieron el patrón de bandeo del tamaño esperado correspondiente a 357pb cuando se revelaron en un gel de agarosa al 1.5%, utilizando como buffer TBE al 1X a 75 V en una cámara electroforética (ver figura 5). El gel fue teñido con bromuro de etidio y las bandas fueron visualizadas sobre un transiluminador. Con excepción de la cepa 16 que no dio el amplificado esperado (carril 7).

Por tal motivo se decidió trabajar únicamente con la cepa de referencia de *C. tropicalis* MYA3404 y con las mutantes *rad52-ΔΔ-9*, *rad52-ΔΔ-10* y *rad52-ΔΔ-11*.



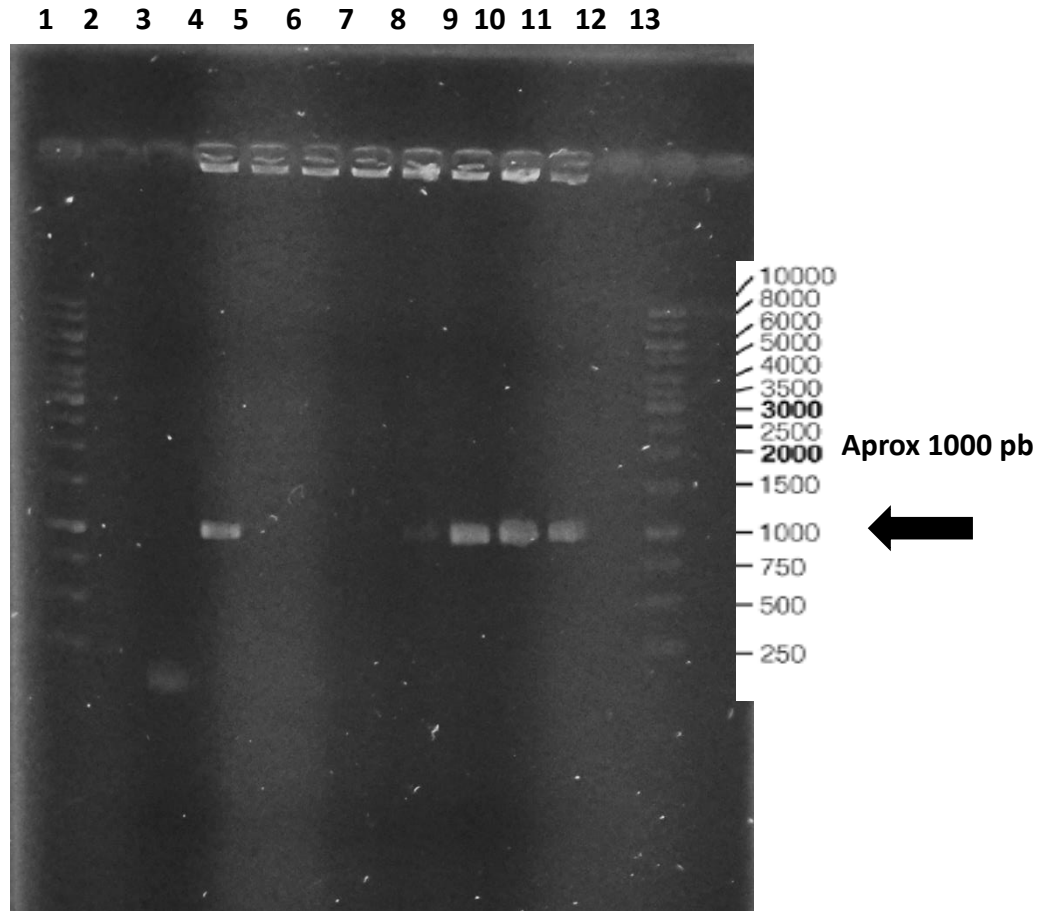
**Figura 5.** PCR-especie-específica de la cepa tipo de *C. tropicalis* MYA3404 y las mutantes *rad52-ΔΔ-9*, *rad52-ΔΔ-10* y *rad52-ΔΔ-11*. Se utilizaron los oligonucleótidos CtR1 y CtR2 que amplifican la región ITS1 e ITS2 con un tamaño de amplicón de 357pb para *C. tropicalis*. En el primer carril se muestra el control negativo consistente en una mezcla de oligonucleótidos, mix de PCR y agua Pisa estéril. En el segundo carril el control positivo (correspondiente a *C.*

*tropicalis* MYA304 y en los carriles 3-9 los mutantes *rad52-ΔΔ*. En el carril 12 se muestra el marcador de peso molecular de 1 kb.

## 9.2 Caracterización molecular mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La caracterización molecular se llevó a cabo utilizando los oligonucleótidos Ct52F y Ct52I con la finalidad de comprobar la construcción y asegurar la pérdida del gen *RAD52* de *C. tropicalis*. La visualización de los productos de PCR en un gel de agarosa al 1% reveló el tamaño de banda esperado de aproximadamente 1000 pb presentes en las mutantes que no cuentan con la construcción correcta (ver figura 6). Dicho de otra manera, aquellas cepas que no contienen esa banda, son las mutantes a las cuales se les ha deletado completamente el gen *RAD52* (ambos alelos) debido a que el iniciador Ct52I reverso fue diseñado para amplificar una región interna del gen junto con el primer Ct52F directo.

En el carril 1 y 13, se muestra el marcador de peso molecular de 1kb, en el carril 3 el control negativo, en el carril 4 *C. tropicalis* MYA3404, en los carriles del 5, 6 y 7 las mutantes con la construcción correcta y designados como *rad52ΔΔ-9*, *rad52-ΔΔ-10* y *rad52-ΔΔ-11*. Mientras que los carriles del 8 al 11 son aquellas cepas a las cuales no se pudo comprobar la presencia de la construcción completa y no fueron tomadas en cuenta en este trabajo.



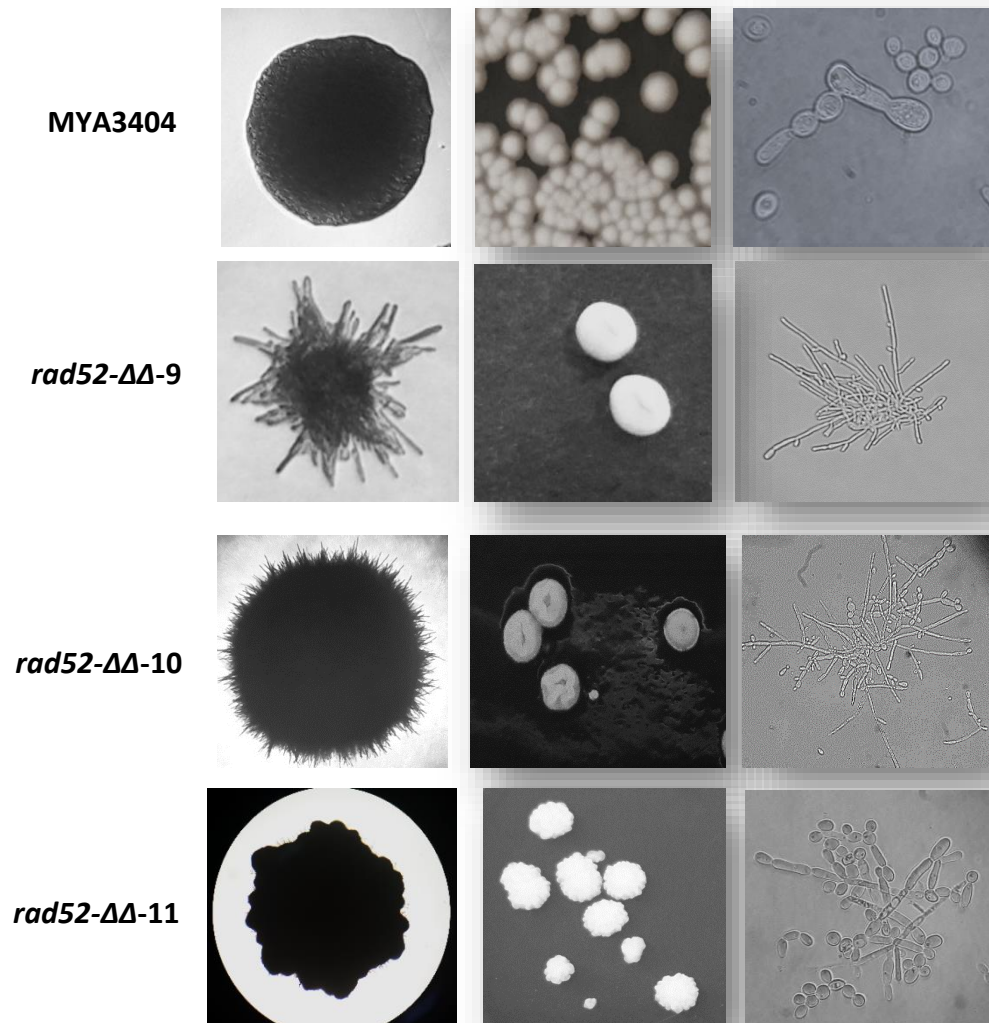
**Figura 6. Comprobación molecular de la delección del gen *RAD52* de *C. tropicalis*.** Utilizando los oligonucleótidos Ct52F y Ct52I que dan un tamaño de amplicón de aproximadamente 1000 pb.

### 9.3 Caracterización fenotípica básica

#### 9.3.1 Morfología macroscópica y microscópica

La cepa tipo de *C. tropicalis* MYA3404 y las mutantes *rad52-ΔΔ* fueron sujetas a un análisis fenotípico básico. Como se muestra en la figura 7 para las cepas crecidas en medio YPD sólido, las colonias de las mutantes nulas presentaron bordes irregulares y produjeron filamentos radiales que se extendían más allá de los bordes de la colonia. Las observaciones macroscópicas indicaron colonias blanquecinas con una apariencia rugosa y terciopelada,

mientras que la cepa tipo de *C. tropicalis* pudo observarse como colonias suaves y redondas con un aspecto cremoso. Cuando las cepas se crecieron en medio YPD líquido, los cultivos de *rad52-ΔΔ-9* y *rad52-ΔΔ-10* contenían células con abundantes filamentos, mientras que la mutante *rad52-ΔΔ-11* adicional a algunas células levaduriformes dispersas, formas filamentosas fueron también observadas en esta mutante. La cepa parental, como podemos observar muestra células levaduriformes y elongadas.



**Figura 7. Morfología macroscópica y microscópica de la cepa tipo *C. tropicalis* MYA3404 y las mutantes *rad52-ΔΔ-9*, *rad52-ΔΔ-10* y *rad52-ΔΔ-11* cultivadas en medio sólido (fila 1 y 2) y en medio líquido YPD (fila 3) incubadas a 30°C durante 48 horas. Todas las imágenes de la morfología microscópica fueron tomadas con un microscopio óptico con el objetivo 40X.**

### 9.3.2 Análisis de la velocidad de crecimiento

La cepa tipo de *C. tropicalis* MYA3404 como las mutantes *rad52-ΔΔ* fueron sometidas a un análisis de velocidad de crecimiento. Como se muestra en la figura 8 para cepas crecidas en medio YPD líquido, las mutantes nulas (*rad52-ΔΔ-9*, *rad52-ΔΔ-10* y *rad52-ΔΔ-11*) exhibieron un tiempo de generación más largo (103 min, 107min y 101min) respectivamente que la cepa parental (93.18 min). Nuestros resultados indican que la disrupción en *RAD52* influye notablemente sobre el tiempo de generación en comparación con la cepa tipo sugiriendo que *RAD52* es importante para asegurar un adecuado crecimiento celular.

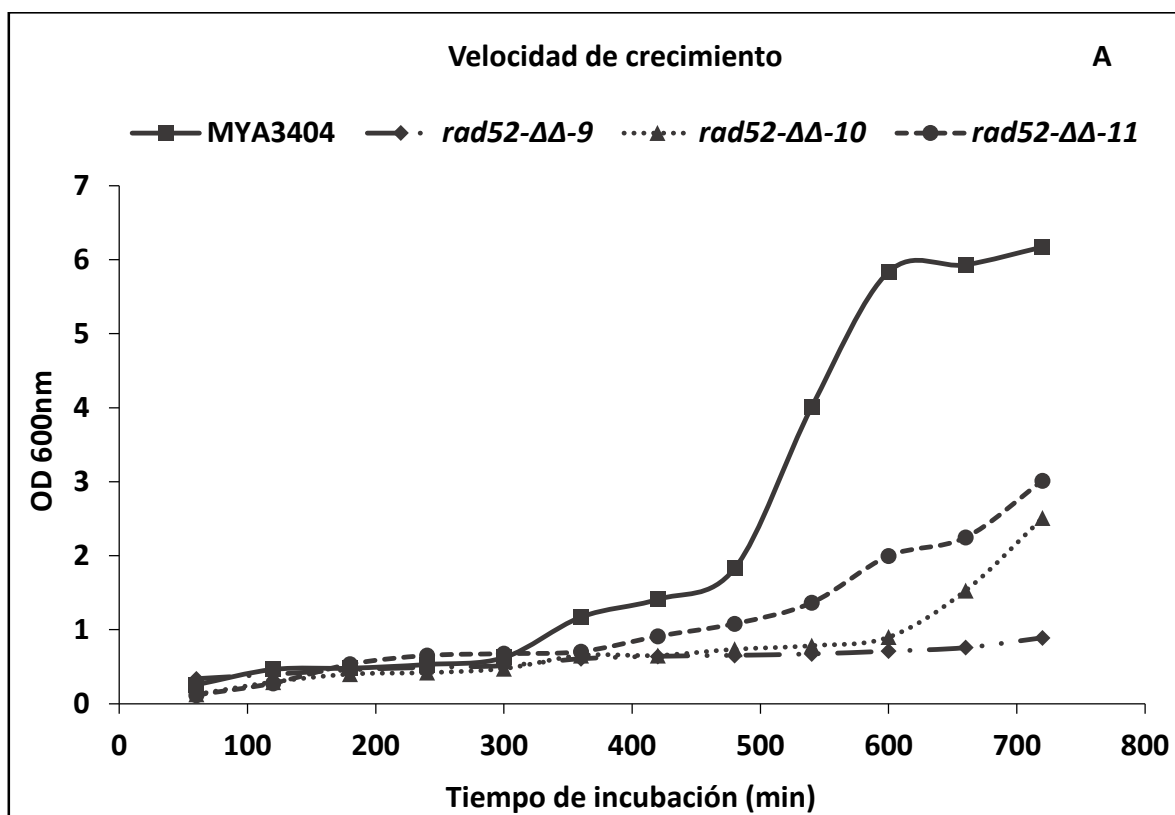
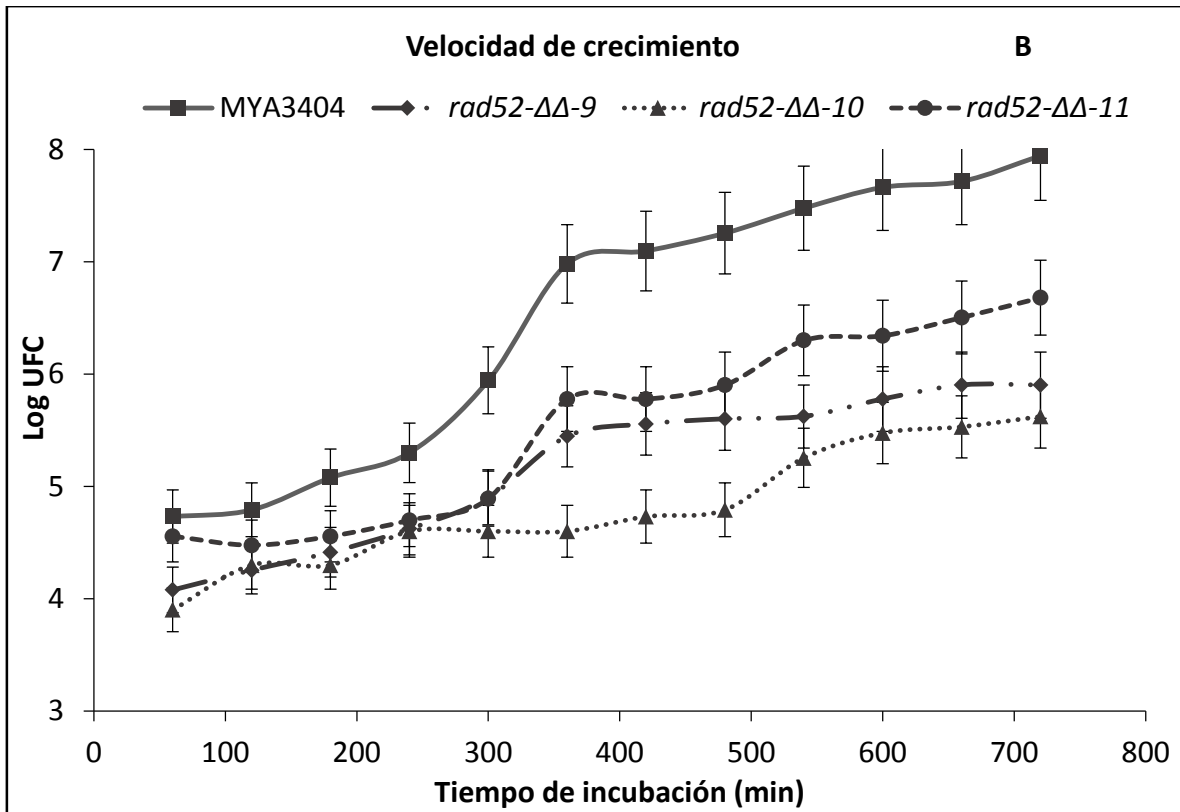


Figura 8. Curva de la velocidad de crecimiento de *C. tropicalis* y las mutantes nulas *rad52* (*rad52-ΔΔ-9*, *rad52-ΔΔ-10* y *rad52-ΔΔ-11*). A) Relación de la D.O a 600 nm respecto al tiempo de incubación (min) y B) Log UFC respecto al tiempo de incubación (min) en medio YPD líquido a 30°C a 200rpm durante 12 horas.

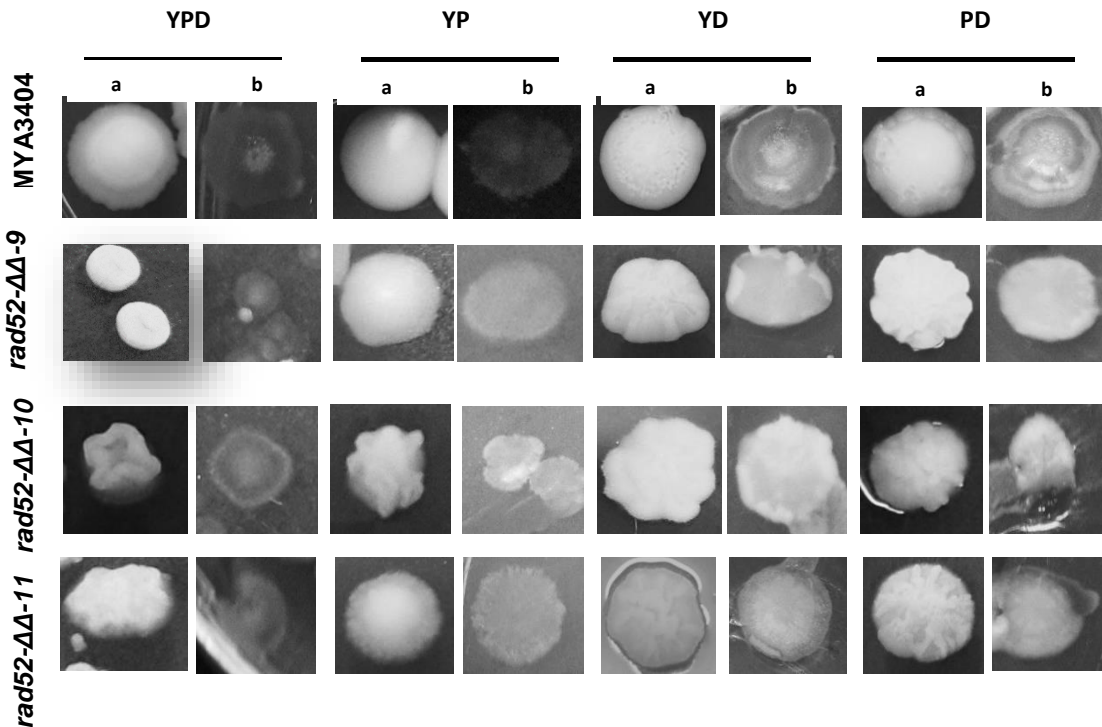


#### 9.4 Análisis de invasividad en agar

Previos reportes sugieren que el crecimiento invasivo en levaduras puede ser el resultado de la limitación de nutrientes esenciales presentes en el medio de cultivo. Esos experimentos demostraron que el ambiente físico es el que regula el crecimiento filamentoso en *C. tropicalis*.

El análisis de invasividad en agar se llevó a cabo en diferentes medios de cultivo que se mencionan en la tabla 2. Las células que han invadido el agar quedaron como colonias visibles sobre la superficie de la placa previamente lavada.

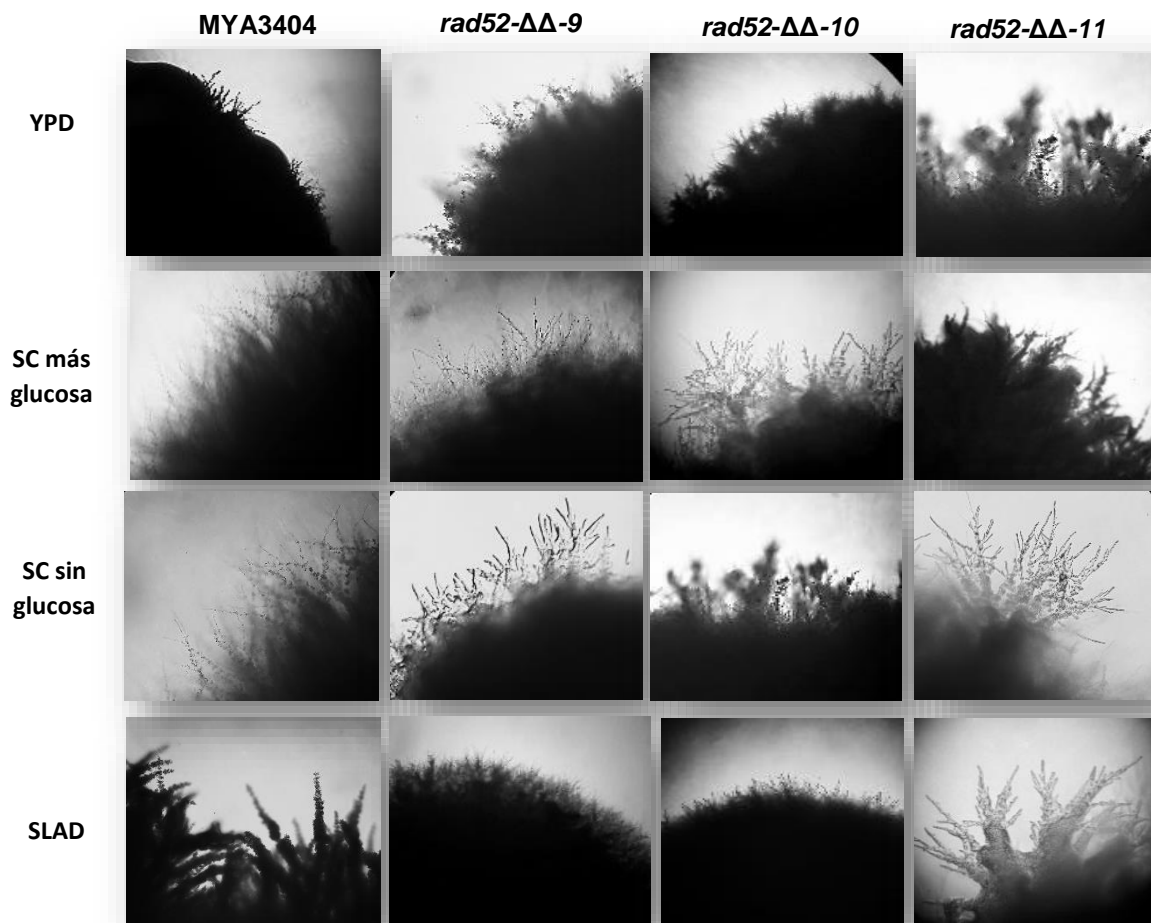
En este experimento se demostró que la remoción de glucosa del medio YPD causó la invasión del agar por el método de lavado de placa en la cepa tipo de *C. tropicalis* como en las mutantes *rad52-ΔΔ*. La remoción de otros componentes del medio YPD como extracto de levadura (PD) o peptona de caseína (YD) también mostraron un incrementado crecimiento invasivo aun en presencia de glucosa como se muestra en la siguiente imagen:



**Figura 9. Colonias crecidas en medio YPD, YP, YD y PD promovieron la invasión del agar aun en presencia de glucosa.** Crecimiento evaluado a los 6 días de incubación a 30°C. La columna (a), representa el crecimiento habitual antes del lavado de la placa, mientras que la columna (b), representa las colonias que han invadido el agar debido a que no fueron removidas con el método de lavado en placa.

La observación microscópica reveló estructuras levaduriformes en medio YPD, YP y PD, mientras que en medio YD se logaron observar formas filamentosas en la cepa tipo de *C. tropicalis* MYA3404. Adicionalmente se examinaron las mutantes *rad52-ΔΔ-9*, *rad52-ΔΔ-10* y *rad52-ΔΔ-11* que, de manera normal, exhiben un crecimiento filamentosos con abundante micelio, sin embargo, se pudo observar un incremento en la cantidad de micelio producido cuando fueron crecidas en medio YPD, YP y PD mientras que en medio YD la cantidad de micelio disminuyó en todas las mutantes.

Un medio Synthetic complete (SC) sin glucosa fue usado para determinar el patrón de crecimiento habitual de *C. tropicalis* y las mutantes *rad52-ΔΔ*. Así como también, se utilizó un medio SC con glucosa y medio SLAD (limitación de nitrógeno) que fue preparado como lo describe (Csank *et al.*, 2000) para poder establecer una relación entre la limitación de nutrientes y el crecimiento invasivo relacionado con las transiciones morfológicas.



**Figura 10. Crecimiento de pseudohifas de *C. tropicalis* y las mutantes *rad52-ΔΔ-9*, *rad52-ΔΔ-10* y *rad52-ΔΔ-11* sobre medios que inducen el crecimiento filamentoso (YPD, SC más glucosa, SC sin glucosa y medio SLAD (medio con condiciones de nitrógeno limitante). Todas las imágenes fueron tomadas con un microscopio óptico con el objetivo 10X.**

La morfología colonial en medio SC sin glucosa fue drásticamente afectada en cuanto al tamaño. Colonias pequeñas fueron observadas en todas las cepas evaluadas en este trabajo a

6 días de crecimiento. Cabe mencionar que las colonias de *C. tropicalis* y las mutantes *rad52-ΔΔ-9*, *rad52-ΔΔ-10* y *rad52-ΔΔ-11* mostraron un patrón de crecimiento similar, con la presencia de abundantes filamentos en los bordes fue una característica interesante y un patrón de crecimiento único en este medio.

Observaciones directas de células en ausencia de glucosa revelaron una morfología levaduriforme para *C. tropicalis*, y a pesar de no mostrar cambios en el crecimiento vegetativo sí hubo una disminución en el número de células. En contraste, las mutantes *rad52-ΔΔ* exhibieron una morfología irregular compuesta por células filamentosas, con abundante micelio en la mutante *rad52-ΔΔ-9*, un patrón similar para la mutante *rad52-ΔΔ-10* en comparación al crecimiento en YPD y un crecimiento filamentoso igual para la mutante *rad52-ΔΔ-11*.

En contraste, las colonias de *C. tropicalis* crecidas en medio sintético en presencia de glucosa (SC más glucosa) contenían células levaduriformes y redondas al igual que células de morfología filamentosas menos acentuada que la presente en YPD y SC sin glucosa. El crecimiento de las colonias fue más grande que en medio rico YPD y abundantes filamentos en la periferia de las colonias se pudieron apreciar. Mientras tanto, el crecimiento de colonias de las mutantes *rad52-ΔΔ-9*, *rad52-ΔΔ-10* y *rad52-ΔΔ-11* fue mayor, sin embargo, se incrementó la cantidad de filamentos en la periferia de las colonias. Adicionalmente se observaron células filamentosas en menor proporción que el crecimiento habitual mostrado en medio YPD en las mutantes *rad52-ΔΔ-9*, *rad52-ΔΔ-10* y *rad52-ΔΔ-11*. *C. tropicalis* al igual que las mutantes *rad52-ΔΔ* tuvieron la capacidad de invadir el agar como células levaduriformes y filamentosas respectivamente (ver figura 11).

Un medio Synthetic low ammonia dextrose (SLAD) preparado bajo condiciones de limitación de nitrógeno, indujo un menor crecimiento filamentosos en relación a un aumento en el tamaño de la colonia. Donde la presencia de pseudohifas fue evidente.

*C. tropicalis* desarrolló colonias con regiones de crecimiento lateral que se extendió más allá de los bordes de la colonia. Esta morfología es distintiva de *C. albicans* y es el resultado del

crecimiento procedente desde una célula vieja combinado con la habilidad de las células filamentosas de penetrar el agar (Csank *et al.*, 2000).

Como se esperaba *C. tropicalis* produjo un crecimiento pseudohifa sobre medio SLAD que fue capaz de invadir el agar ya que la colonia no fue removida después del lavado. Las mutantes *rad52-ΔΔ* mostraron un patrón similar a la cepa parental. Filamentos fueron observados aún después de hacer el lavado de las colonias. Las colonias de *C. tropicalis* mostraron un patrón de crecimiento similar al que tuvo en medio SC con bordes filamentosos al igual que las mutantes *rad52-ΔΔ-9*, *rad52-ΔΔ-10* y *rad52-ΔΔ-11*.

El análisis microscópico indicó que el crecimiento radial de *C. tropicalis* está compuesto de cadenas de células levaduriformes elongadas de gran tamaño. Por otra parte las mutantes *rad52-ΔΔ* crecieron como células filamentosas, un patrón similar al observado en medio SC más glucosa (ver figura 11).

Las características microscópicas de las cepas crecidas en medio YPD, SC con glucosa, SC sin glucosa y medio SLAD se muestran en la siguiente imagen:

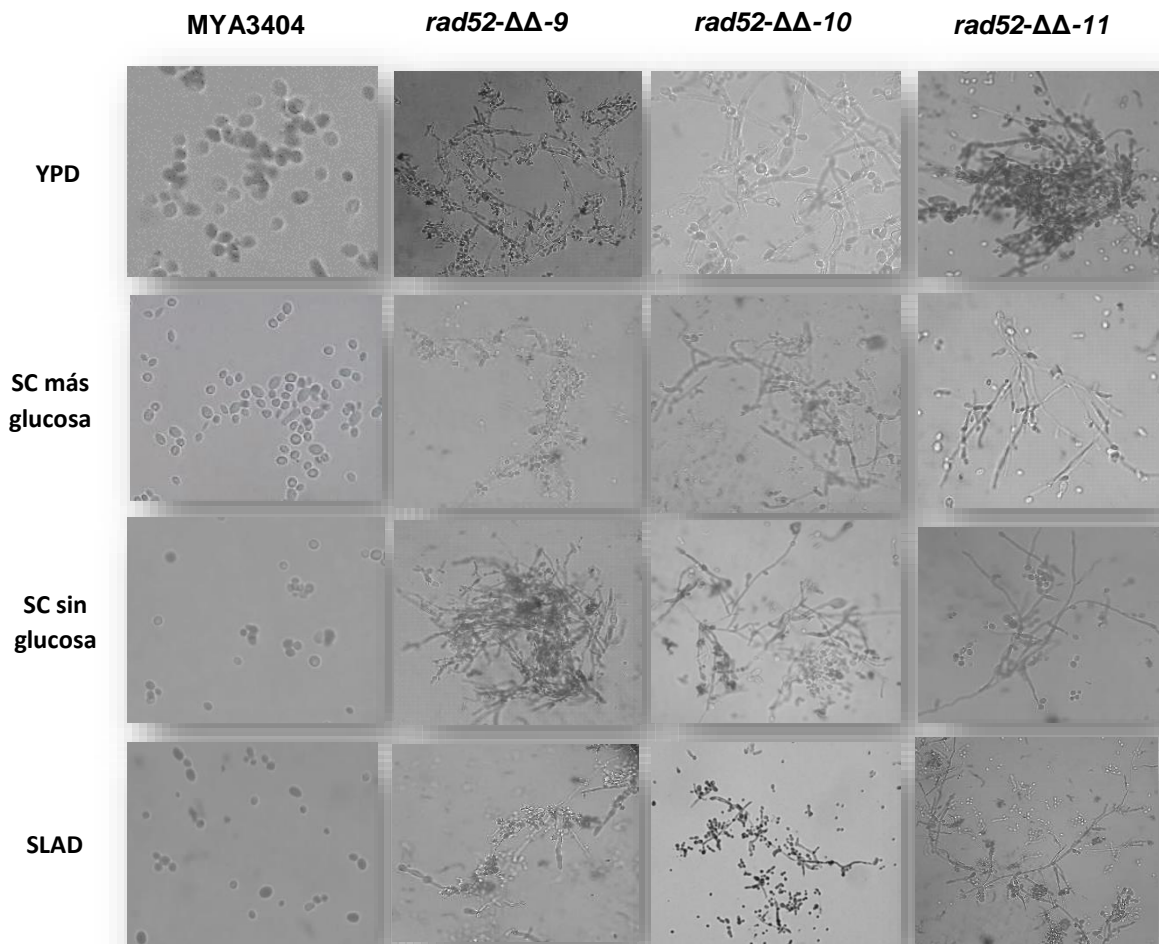


Figura 11. Morfología microscópica observada en *C. tropicalis* y mutantes *rad52-ΔΔ* crecidas sobre medio YPD y medios que inducen el crecimiento filamentoso (SC más glucosa, SC sin glucosa y medio SLAD). Todas las imágenes fueron tomadas con un microscopio óptico con el objetivo 40X.

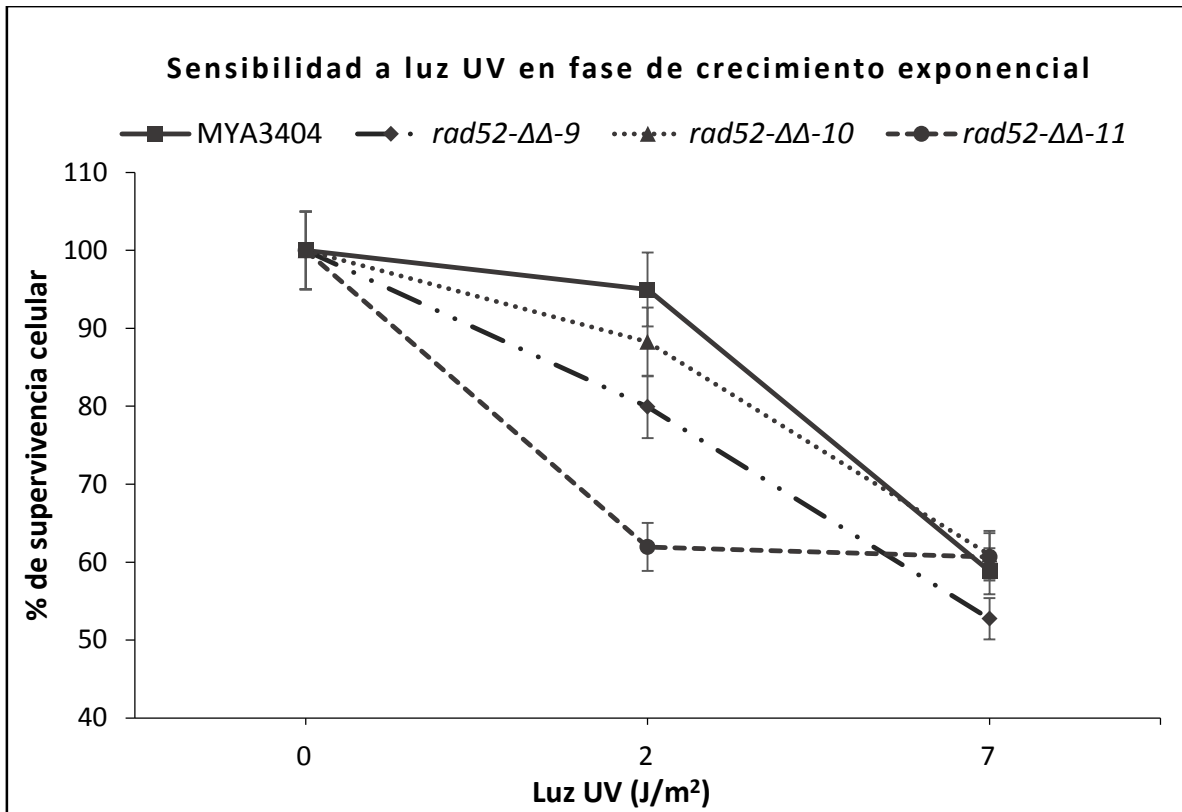
## 9.5 Evaluación de la respuesta a agentes que dañan el ADN

### 9.5.1 Análisis de sensibilidad a la radiación ultravioleta (Luz UV)

La reparación por escisión de nucleótidos (NER) es la principal ruta de reparación encargada de remover dímeros de pirimidina ciclobutano y fotoproductos (6-4) inducidos por la exposición a luz UV. Mutaciones en genes del grupo epistático *RAD52* confieren un modesto incremento en la sensibilidad a luz UV. Rad51, Rad52 y Rad54 son tres proteínas clave en la reparación recombinacional (Gangavarapu *et al.*, 2007). Mientras que la tasa de supervivencia de mutantes nulas *rad52* de *C. albicans* y una mutante llevando una copia adicional de *RAD52* tratadas con luz UV fue de 11 y 43% respectivamente (Takagi *et al.*, 2008).

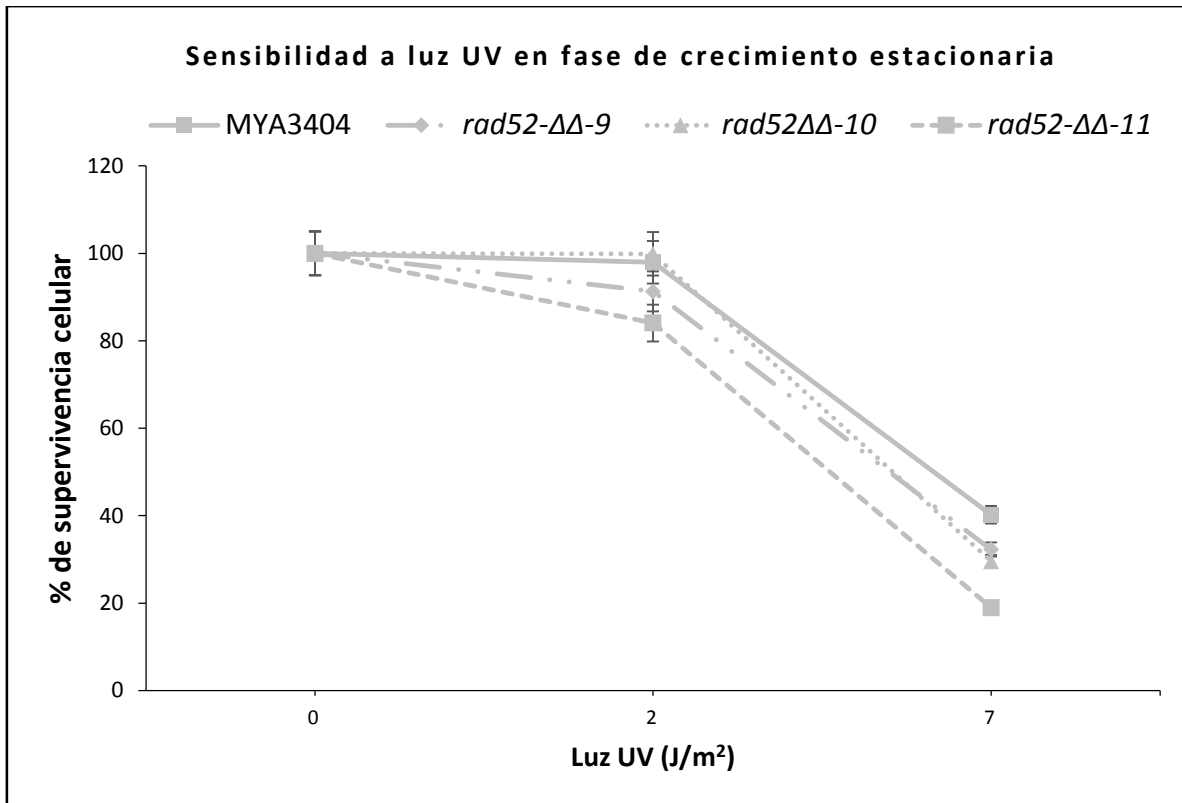
La supervivencia de las células al tratamiento con diferentes dosis de luz UV (2J/m<sup>2</sup> y 7J/m<sup>2</sup>) fue determinada en células creciendo exponencialmente y durante la fase de crecimiento estacionaria. Las mutantes *rad52-ΔΔ-9*, *rad52-ΔΔ-10* y *rad52-ΔΔ-11* fueron más sensibles que *C. tropicalis* en todas las dosis empleadas en fase de crecimiento exponencial. A una dosis de 2J/m<sup>2</sup> el porcentaje de supervivencia celular fue del 94.9%, 79.92%, 88.2% y 61.9% en *C. tropicalis*, *rad52-ΔΔ-9*, *rad52-ΔΔ-10* y *rad52-ΔΔ-11* respectivamente. A una dosis de 7J/m<sup>2</sup> el porcentaje de supervivencia celular fue del 58.8%, 52.7%, 60.9% y 60.6% respectivamente. El cambio más drástico en el porcentaje de supervivencia celular fue observado en *C. tropicalis* con una disminución del 36.1%, mientras que en las mutantes fue del 27.18%, 27.31% y 1.28% (*rad52-ΔΔ-9*, *rad52-ΔΔ-10* y *rad52-ΔΔ-11*) respectivamente.

Sin embargo, la mutante *rad52-ΔΔ-11* resulto más afectada a una dosis de 2J/m<sup>2</sup> respecto a *C. tropicalis* y las mutantes *rad52-ΔΔ-9* y *rad52-ΔΔ-10*. Cuando las células se expusieron a una dosis de 7J/m<sup>2</sup> la mutante *rad52-ΔΔ-9* resulto más afectada que las mutantes *rad52-ΔΔ-10* y *rad52-ΔΔ-11*.



**Figura 12.** Porcentaje de supervivencia celular en fase de crecimiento exponencial de *C. tropicalis* MYA3404 y las mutantes nulas *rad52* (*rad52-ΔΔ-9*, *rad52-ΔΔ-10* y *rad52-ΔΔ-11*) expuestas a una dosis de luz UV de 2J/m<sup>2</sup> y 7J/m<sup>2</sup>.

Por otra parte, *C. tropicalis* fue más resistente al tratamiento a una dosis de luz UV de 2J/m<sup>2</sup> que las mutantes *rad52-ΔΔ-9* y *rad52-ΔΔ-11*, con un porcentaje de supervivencia celular del 97.9%, 91.27% y 84% respectivamente. La mutante *rad52-ΔΔ-10*, por su parte, fue menos sensible a una dosis de 2J/m<sup>2</sup> incluso más que *C. tropicalis* con un porcentaje de supervivencia del 99.8%. La viabilidad fue significativamente más afectada a una dosis de 7J/m<sup>2</sup> donde el porcentaje de supervivencia fue del 40.2%, 32.2%, 29.5% y 18.94% para *C. tropicalis* y las mutantes *rad52-ΔΔ-9*, *rad52-ΔΔ-10* y *rad52-ΔΔ-11* respectivamente.



**Figura 13.** Porcentaje de supervivencia celular en fase de crecimiento estacionaria de *C. tropicalis* MYA3404 y mutantes nulas *rad52* (*rad52-ΔΔ-9*, *rad52-ΔΔ-10* y *rad52-ΔΔ-11*) expuestas a una dosis de luz UV de 2J/m<sup>2</sup> y 7J/m<sup>2</sup>.

### 9.5.2 Análisis de sensibilidad al Metil metano sulfonato (MMS)

El metil-metano-sulfonato (MMS) es un agente alquilante ampliamente utilizado en levaduras para el estudio de sensibilidad frente a agentes que dañan al ADN desde hace ya algunas décadas.

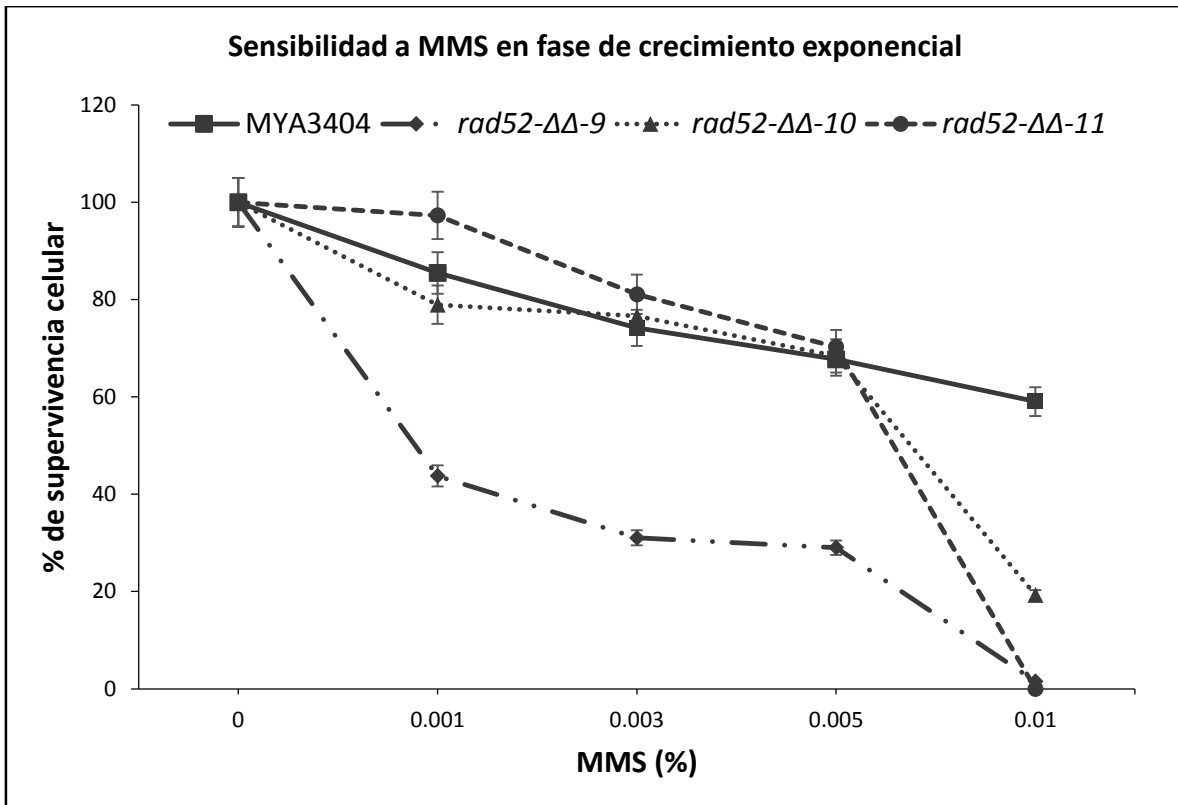
La función principal del MMS dentro de la célula está directamente relacionada con la capacidad de formar aductos N7-metilguanina y N3-metiladenina, siendo esos sitios más susceptibles a metilación en ADN de doble cadena. La metilación de purinas en la posición N3 o N7, desestabiliza el enlace N-glicosídico y es más susceptible a ser hidrolizado dentro de un sitio abásico. A nivel estructural y biológico, se ha descrito que N7-MeG no interfiere con la replicación en contraste con lo que ocurre en N3-MeA. El tratamiento con MMS se ha

relacionado con la formación de roturas de cadena sencilla, mientras que las roturas de doble cadena se producen cuando los daños en la molécula de ADN no son reparados.

El principal mecanismo de reparación de lesiones inducidas por MMS es la reparación por escisión de bases (BER). Sin embargo, se sabe desde hace tiempo que el mecanismo de recombinación homóloga participa también en la reparación de roturas de doble cadena preferencialmente durante la fase S y G2/M del ciclo celular y concuerda con la evidencia que apunta al efecto citotóxico que ejercen los agentes metilantes durante la fase S o G2/M y con la sensibilidad de células deficientes en los mecanismos de reparación a los agentes metilantes (Wyatt *et al.*, 2006).

En el ensayo de susceptibilidad a MMS, se utilizaron diferentes concentraciones de este agente (MMS al 0.001%, 0.003%, 0.005% y 0.01%) en células en crecimiento exponencial y estacionario.

En células creciendo exponencialmente *C. tropicalis* exhibió una ligera sensibilidad a MMS (0.001% a 0.01%) con un porcentaje de supervivencia celular de 85.4%, 74.1%, 67.7% y 59% en cada una de las concentraciones. La mutante *rad52-ΔΔ-9* fue significativamente más sensible que *C. tropicalis* (43.7%, 31%, 29% y 1.52%) y que las mutantes *rad52-ΔΔ-10* y *rad52-ΔΔ-11* a MMS (0.001% a 0.01%). Por otra parte, *rad52-ΔΔ-10* fue más sensible que *rad52-ΔΔ-11* (78.9%, 76.6%, 68.4% y 19.2% de supervivencia celular). Un resultado interesante fue que la mutante *rad52-ΔΔ-11* fue menos sensible que la cepa tipo a MMS (0.001%, 0.003% y 0.005%) con un 97.2%, 81% y 70.2% de supervivencia celular mientras que a una concentración de MMS de 0.01% la viabilidad fue del 0%.

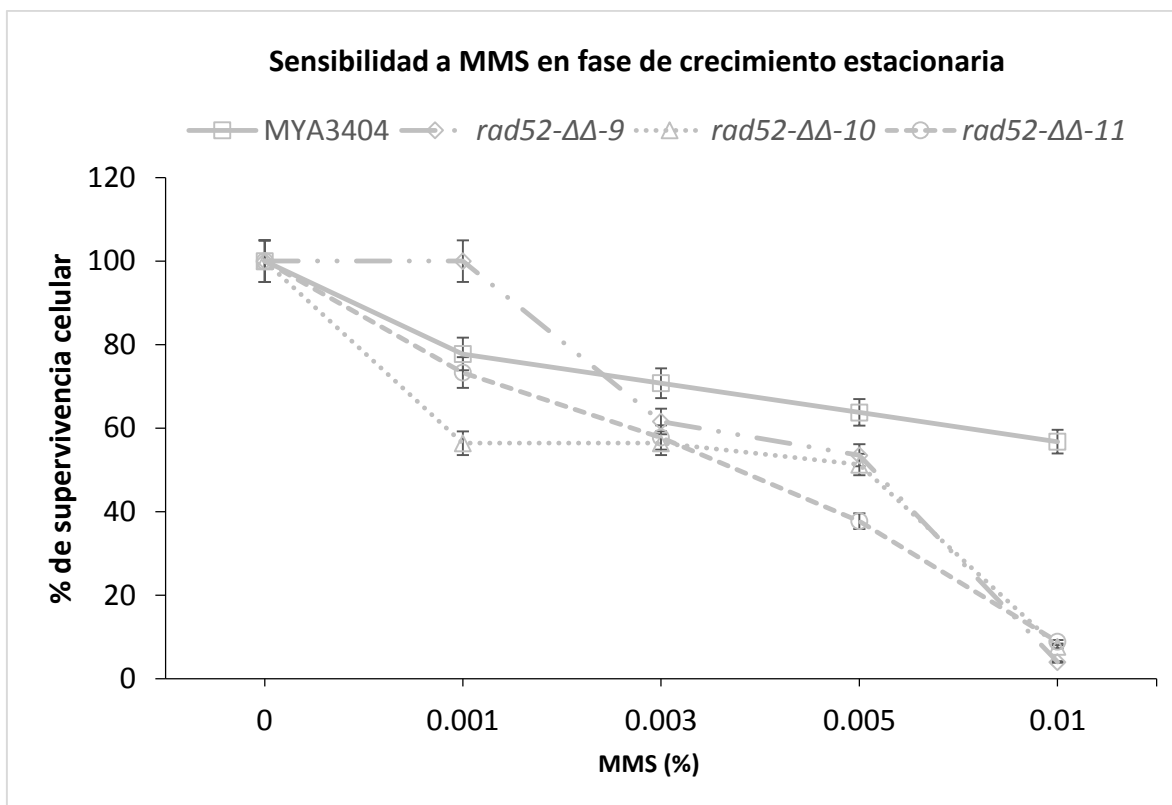


**Figura 14.** Porcentaje de supervivencia celular en fase de crecimiento exponencial de *C. tropicalis* MYA3404 y las mutantes nulas *rad52* (*rad52-ΔΔ-9*, *rad52-ΔΔ-10* y *rad52-ΔΔ-11*) expuestas a diferentes concentraciones de MMS (0.001%, 0.003%, 0.005% y 0.01%).

En el mismo ensayo de sensibilidad durante la fase de crecimiento estacionaria, *C. tropicalis* exhibió un comportamiento similar al mostrado en la gráfica anterior, donde fue ligeramente más sensible a MMS (0.001% a 0.01%) con un porcentaje de supervivencia celular de 77.7%, 70.7%, 63.7% y 56.7% respectivamente. Las mutantes *rad52ΔΔ-10* y *rad52ΔΔ-11*, fueron más sensibles a MMS al 0.001% a 0.01% (56.4%, 56.4%, 51.2% y 7.6%) y (73.3%, 57.7%, 37.7% y 8.8%) respectivamente. En cambio, la mutante *rad52-ΔΔ-9* fue ligeramente más resistente al tratamiento con MMS (0.001% a 0.005%). Mientras que a una concentración de MMS del 0.01% el porcentaje de supervivencia celular disminuyó drásticamente hasta un 4%.

Una alta sensibilidad de las mutantes nulas *rad52* comparadas con *C. tropicalis* fue evidente a una concentración de MMS al 0.01%. El porcentaje de supervivencia de *C. tropicalis* fue mayor al 50%, mientras que para *rad52-ΔΔ-9*, *rad52-ΔΔ-10* y *rad52-ΔΔ-11* fue menor al 10%.

De manera general, *C. tropicalis* y las mutantes nulas *rad52* fueron más resistentes al tratamiento con MMS al 0.001%, 0.003% y 0.005% con excepción de *rad52-ΔΔ-9* en fase de crecimiento exponencial. El cambio más drástico observado fue a una concentración de MMS del 0.01% donde *C. tropicalis* y *rad52-ΔΔ-10* fueron más resistentes en fase de crecimiento exponencial contrario a lo observado en las mutantes *rad52-ΔΔ-9* y *rad52-ΔΔ-11* que exhibieron una incrementada sensibilidad en células creciendo exponencialmente.

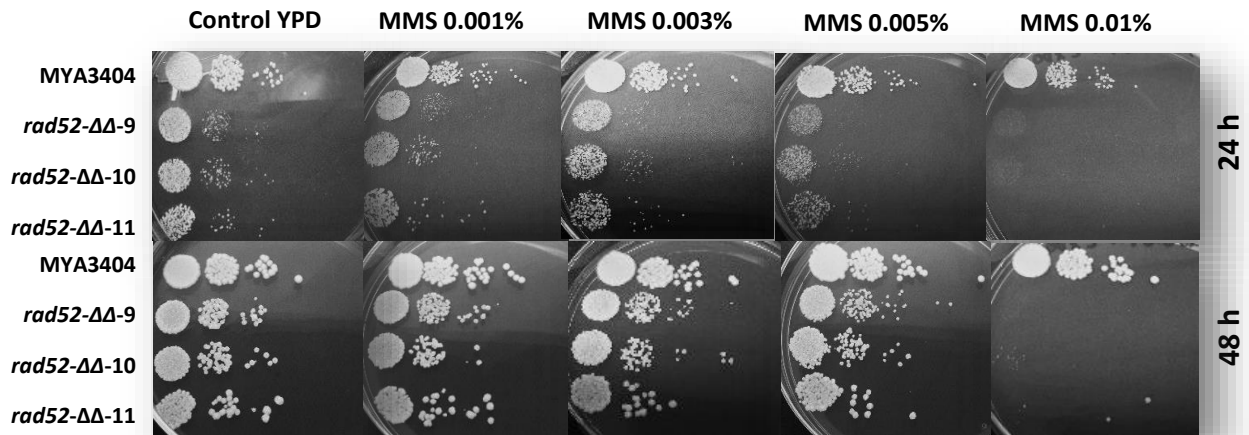


**Figura 15. Porcentaje de supervivencia celular en fase de crecimiento estacionaria de *C. tropicalis* MYA3404 y mutantes nulas *rad52* (*rad52-ΔΔ-9*, *rad52-ΔΔ-10*, *rad52-ΔΔ-11*) expuestas a diferentes concentraciones de MMS (0.001%,0.003%,0.005% y 0.01%).**

El ensayo de Drop-test reveló que *C. tropicalis* es ligeramente más resistente al tratamiento con MMS (0.001%, 0.003%,0.005% y 0.01%) durante la fase de crecimiento exponencial. La mutante *rad52-ΔΔ-9*, por su parte fue más sensible durante la fase estacionaria. Esos datos no corresponden con los datos obtenidos en el ensayo anterior donde la viabilidad celular es mayor en fase estacionaria. Mientras que *rad52-ΔΔ-10* exhibió el mismo comportamiento

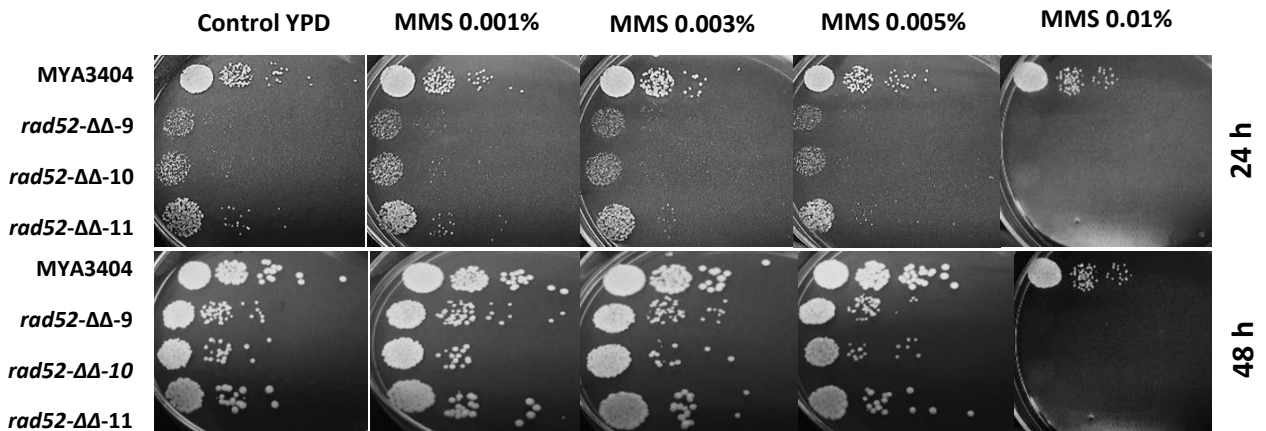
antes mencionado, y por último, *rad52-ΔΔ-11* fue más resistente al tratamiento con MMS durante la fase de crecimiento exponencial.

### Sensibilidad a MMS Drop-test en fase de crecimiento exponencial



**Figura 16. Análisis de sensibilidad a MMS mediante la técnica de goteo por dilución en placa.** En la imagen se muestran las diferentes concentraciones de MMS (0.001%,0.003%,0.005% y 0.01%) así como el control (medio YPD) y las fotografías tomadas a las 24 y 48 horas de incubación a 30°C en oscuridad.

### Sensibilidad a MMS Drop-test en fase de crecimiento estacionaria



**Figura 17. Análisis de sensibilidad a MMS mediante la técnica de goteo por dilución en placa.** En la imagen se muestran las diferentes concentraciones de MMS (0.001%,0.003%,0.005% y 0.01%) así como el control (medio YPD) y las fotografías tomadas a las 24 y 48 horas de incubación a 30°C en oscuridad.

0.01%) así como el control (medio YPD) y las fotografías tomadas a las 24 y 48 horas de incubación a 30°C en oscuridad.

### 9.5.3 Análisis de sensibilidad a bleomicina

La bleomicina (BLM) es un glicopéptido quelante de cobre, producto de la fermentación de *Streptomyces verticillius*. Es un antibiótico antitumoral usado clínicamente como agente quimioterapéutico en el tratamiento de ciertos tipos de células tumorales, como la enfermedad de Hodgkin, carcinoma de testículo, cabeza, cuello, cérvix, piel, pene y recto, exudados pleurales y peritoneales por infiltración maligna. Su actividad citotóxica está relacionada con su habilidad para causar escisión de las cadenas de ADN (roturas de cadena sencilla y doble) y por lo tanto su fragmentación en presencia de un metal de transición como el Cu (I) o Fe(II), oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) y un agente reductor.

El principio fundamental de la actividad se basa en la oxigenación de la desoxirribosa en el ADN, iniciado por un proceso de extracción de hidrogeno en las posiciones C-1', C-4' y C-5'. La extracción de C-1' es normalmente seguida de la adición de O<sub>2</sub>, resultando en la formación de sitios abásicos en el cual la desoxirribosa ha sido convertida a desoxirribonolactona y por último se producen roturas de cadena con terminaciones 3'- y 5'- fosfoglicolato.

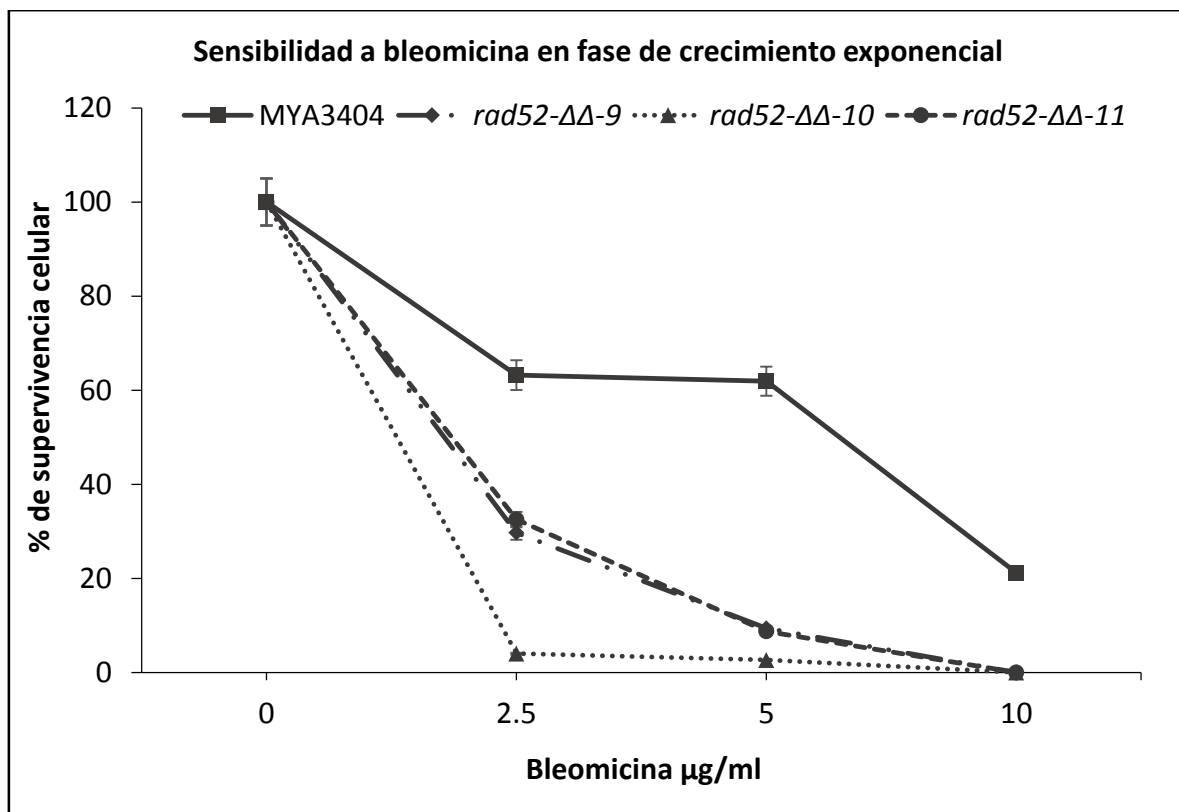
Estudios *in vivo* señalan que el tratamiento con bleomicina en contra de una variedad de aislados de levaduras resulta poco efectivo en un modelo de candidiasis murino (Graybill *et al.*, 1996).

Nuestros resultados indican que la cepa tipo de *C. tropicalis* MYA3404 fue menos susceptible al tratamiento con bleomicina que las mutantes *rad52-ΔΔ* evaluadas en este trabajo en células creciendo exponencialmente y en fase estacionaria.

*C. tropicalis* fue ligeramente más sensible al tratamiento con bleomicina (2.5µg/ml, 5µg/ml y 10µg/ml) en fase de crecimiento exponencial con un porcentaje de supervivencia celular del 63.2%, 61.9% y 21.2% respectivamente en contraste con lo observado en fase estacionaria donde la viabilidad celular fue menos afectada (69.4%, 68.5% y 35.8%).

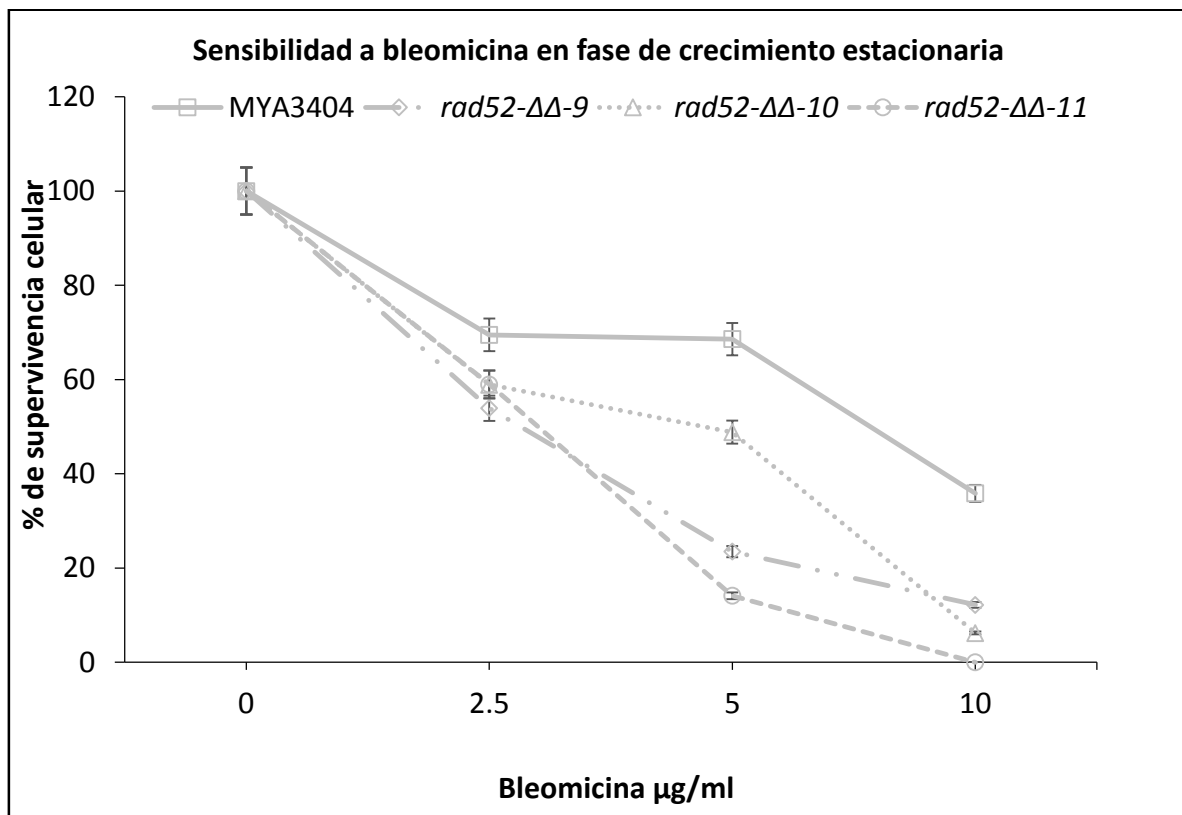
Sin embargo, los datos obtenidos sugieren la existencia de un efecto dependiente de dosis sobre el porcentaje de supervivencia celular, donde a una concentración de 10µg/ml el porcentaje de células recuperadas de *C. tropicalis* fue del 21.21 % durante la fase de crecimiento exponencial, mientras que este efecto en fase estacionaria fue menos drástico (35.84%).

El comportamiento de las mutantes *rad52-ΔΔ*, fue distinto. Por su parte, la mutante *rad52-ΔΔ-9* y *rad52-ΔΔ-10* tuvieron un comportamiento similar entre sí. El cambio más drástico observado fue a una concentración de 2.5µg/ml donde, *rad52-ΔΔ-9* obtuvo un porcentaje de supervivencia celular del 29.6% y *rad52-ΔΔ-11* un porcentaje del 32.5%. Adicionalmente el porcentaje de supervivencia celular en 5µg/ml y 10µg/ml fue del 9.3% y 0% en *rad52-ΔΔ-9* y 8.75% y 0% en *rad52-ΔΔ-11* respectivamente. En el caso de *rad52-ΔΔ-10*, el % de supervivencia celular fue más drástico a una concentración de 2.5µg/ml a partir de esta concentración el porcentaje de recuperación fue del 2.6%, 4% a 5µg/ml y 0% a una concentración de 10µg/ml (ver figura 18).



**Figura 18. Análisis de sensibilidad a bleomicina en fase de crecimiento exponencial.** La gráfica muestra el porcentaje de supervivencia celular de *C. tropicalis* MYA3404 y de las mutantes nulas *rad52* que fueron crecidas en medio YPD a 30°C durante 48 horas a tres concentraciones diferentes de bleomicina (2.5µg/ml, 5µg/ml y 10µg/ml).

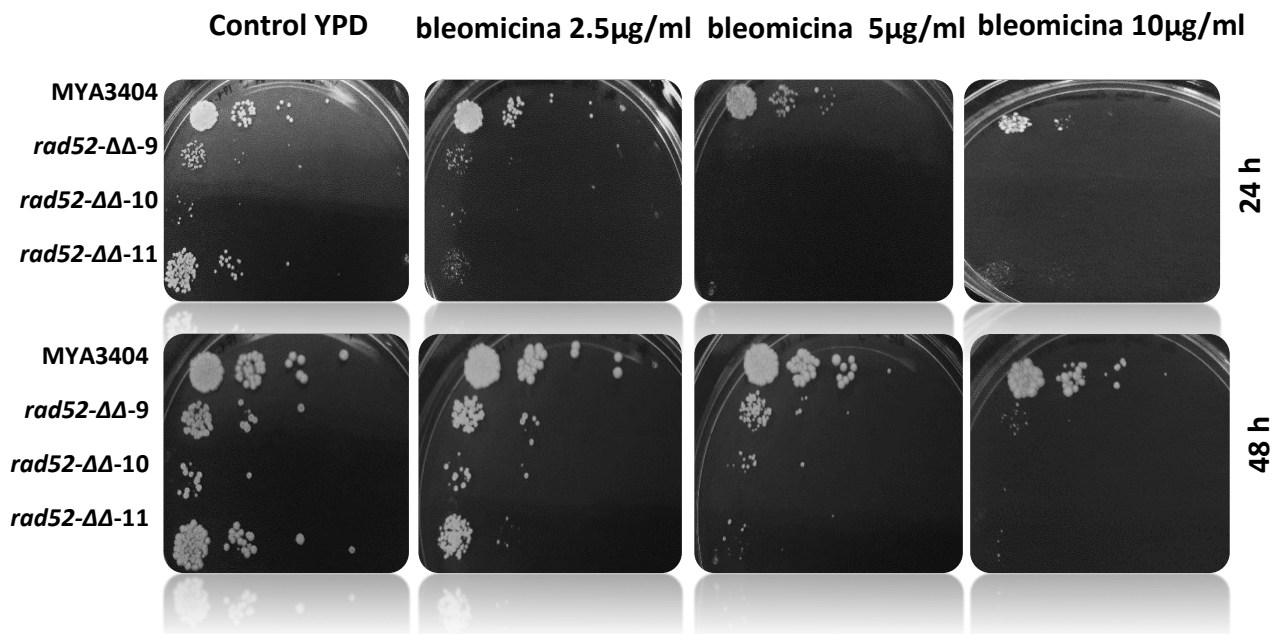
El análisis de sensibilidad a bleomicina en fase de crecimiento estacionaria revelo datos interesantes. Notablemente, *C. tropicalis* tuvo un comportamiento similar al mostrado en la gráfica anterior, sin embargo, la viabilidad celular fue mayor en esta fase de crecimiento en todas las concentraciones utilizadas (69.4%, 68.5% y 35.8%). El porcentaje de supervivencia celular de las mutante *rad52-ΔΔ-9*, *rad52-ΔΔ-10* y *rad52-ΔΔ-11* a 2µg/ml fue de 53.9%, 58.9% y 58.9% y del 23.4%, 48.83% y 14.1% a una concentración de 5µg/ml respectivamente. Por su parte, la viabilidad de las mutantes *rad52-ΔΔ* disminuyó notablemente a 10µg/ml, pero el porcentaje de supervivencia fue mayor que durante la fase de crecimiento exponencial (12.1% para *rad52-ΔΔ-9*, 6.2% para *rad52-ΔΔ-10* y 0% para *rad52-ΔΔ-11*) (ver figura 19).



**Figura 19. Análisis de sensibilidad a bleomicina en fase de crecimiento estacionaria.** La gráfica muestra el porcentaje de supervivencia celular de *C. tropicalis* MYA3404 y de mutantes nulas *rad52* que fueron crecidas en medio YPD a 30°C durante 48 horas a tres concentraciones diferentes de bleomicina (2.5 µg/ml, 5 µg/ml y 10µg /ml).

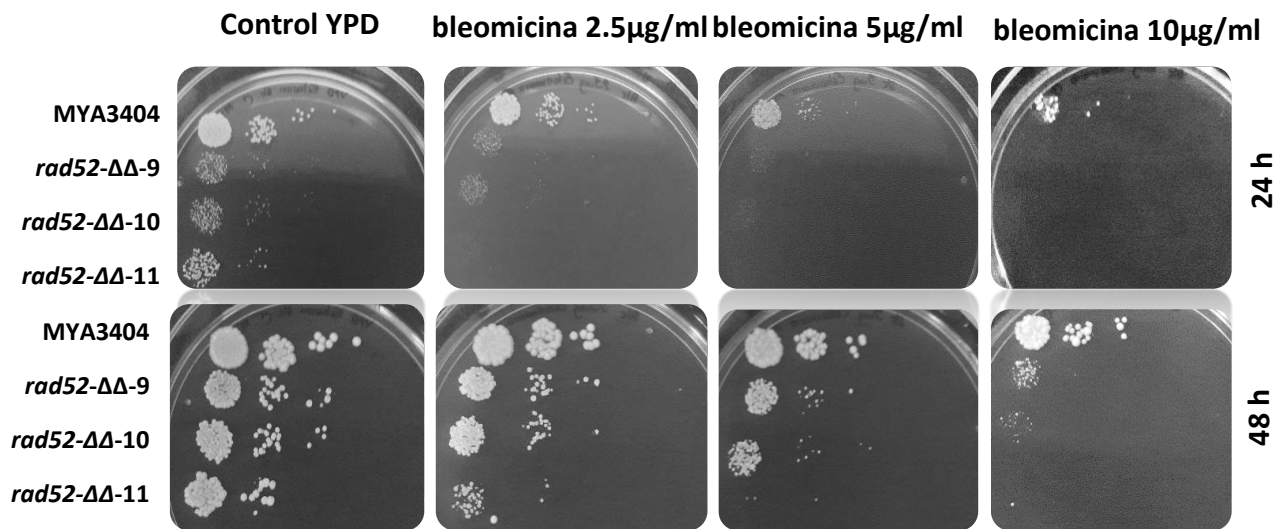
Adicionalmente se realizó una prueba de diluciones seriadas (Drop-test) que permitió visualizar de manera indirecta el efecto de la concentración de bleomicina sobre la viabilidad celular. Como era de esperar, *C. tropicalis* fue ligeramente más sensible al tratamiento con bleomicina (2.5µg/ml a 10µg/ml) durante el crecimiento estacionario al igual que *rad52-ΔΔ-11*. Las mutantes *rad52-ΔΔ-9* y *rad52-ΔΔ-10* exhibieron una ligera sensibilidad en fase de crecimiento estacionaria comparada con la incrementada sensibilidad mostrada durante el crecimiento exponencial (ver figura 20 y 21).

**Sensibilidad a bleomicina Drop-test en fase de crecimiento exponencial**



**Figura 20. Análisis sensibilidad a bleomicina mediante la prueba drop-test en fase de crecimiento exponencial.** Donde *C. tropicalis* y las mutantes nulas *rad52* fueron crecidas en medio YPD suplementado con diferentes concentraciones de bleomicina (2.5µg/ml, 5µg/ml y 10 µg/ml).

## Sensibilidad a bleomicina Drop-test en fase de crecimiento estacionaria



**Figura 21.** Análisis sensibilidad a bleomicina mediante la prueba drop-test en fase de crecimiento estacionaria. Donde *C. tropicalis* y las mutantes nulas *rad52* fueron crecidas en medio YPD suplementado con diferentes concentraciones de bleomicina (2.5µg/ml, 5µg/ml y 10 µg/ml).

## 10. DISCUSIÓN

La incidencia global de las infecciones fúngicas ha aumentado considerablemente en los últimos años, principalmente aquellas producidas por especies del género *Candida*. De las cuales, *C. tropicalis* ha evolucionado como un patógeno oportunista y su incidencia y prevalencia en los aislados clínicos está incrementándose a tal grado que se ha considerado la segunda especie solo después de *C. albicans* en causar candidiasis.

La inestabilidad o variabilidad genética que tiene *C. tropicalis*, puede funcionar como un mecanismo de adaptación durante la exposición a numerosas condiciones estresantes. Uno de los principales mecanismos que generan diversidad génica, está relacionado con las rutas de recombinación y reparación de daño al ADN, donde participan genes del grupo epistático *RAD52*. Concretamente, en este trabajo se realizó una caracterización fenotípica y molecular

para evaluar la participación del gen *RAD52* en los eventos de recombinación mitótica durante la exposición a agentes que dañan el ADN.

La reparación de roturas de doble cadena involucra al menos dos mecanismos, las rutas recombinacionales no homologas (NHEJ) y la recombinación homóloga (HR). La recombinación homóloga opera en células dividiéndose durante la fase S, mientras que NHEJ puede funcionar tanto en células en división como en células en no división y de manera independiente del ciclo celular (Iyama *et al.*, 2013). La ventaja de reparar roturas de doble cadena a través de un proceso de recombinación homóloga permite restaurar la información genética perdida en el sitio de rotura. Rad52 adicionalmente, puede actuar en un estadio temprano en la reparación de ADN por recombinación homóloga a través del reconocimiento y unión al sitio de rotura de doble cadena (Hiom K. , 1999).

El hecho de que en levaduras las roturas de doble cadena sean reparadas principalmente a través de la recombinación homóloga mediada por *RAD52*, hace pensar por qué en eucariotas superiores como mamíferos la reparación se lleva a cabo mediante una ruta menos conservativa la NHEJ, que en levaduras podría suponer la pérdida de información genética. Una posible explicación a este cuestionamiento es que, en levaduras, la cantidad de regiones codificantes es alta y la HR permite reparar de manera eficiente y sin introducir mutaciones que ponen en riesgo la estabilidad dentro del genoma. La ausencia de *RAD52* en líneas celulares de pollos y humanos no influye sobre la viabilidad (Symington L. S., 2002)

En organismos que poseen un homólogo de BRCA2 (*Ustilago maydis*, pollo, humano y ratón), la inactivación de *RAD52* causa mínimos defectos en la reparación de ADN. Esa observación sugiere que *RAD52* tiene una función limitada en organismos conteniendo BRCA2 (Ceccaldi, *et al.*, 2016). En *U. maydis* se encuentra sobrelapada, es decir redundante. En *C. albicans* se ha demostrado que mutantes nulos *rad51* o *rad52* exhiben un fenotipo filamentoso como resultado en el desacoplamiento de varios procesos celulares favorecido por las roturas de doble cadena no reparadas (Andaluz *et al.*, 2006).

*C. tropicalis* es un organismo que tiene la capacidad de adoptar dos formas de crecimiento, una forma levaduriforme y una forma de pseudohifa generalmente en respuesta a disponibilidad de nutrientes como glucosa o nitrógeno.

El crecimiento de pseudohifa es un programa que responde a señales nutricionales en *S. cerevisiae* (Gagiano *et al.*, 2002). Esos datos sugieren una estrecha relación entre el crecimiento filamentoso y el metabolismo de polisacáridos. Mientras que *C. albicans* responde a la estructura y condiciones físicas del ambiente en el que se encuentre produciendo hifas (Riggle *et al.*, 1999).

Las señales que desencadenan las transiciones morfológicas en *C. tropicalis* no están del todo elucidadas. Con el fin de evaluar de manera directa el rol de la glucosa y la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento invasivo en *C. tropicalis*, en este trabajo se utilizó un ensayo de lavado de placa para determinar el comportamiento de *C. tropicalis* y las mutantes nulas *rad52* crecidas en medio rico YPD, medio sintético con y sin glucosa y medio SLAD con sulfato de amonio como única fuente de nitrógeno.

Al respecto, pudimos determinar que la falta de glucosa o de algún otro constituyente en el medio YPD, induce la invasión del agar en *C. tropicalis* y las mutantes nulas *rad52*. En medio YD, *C. tropicalis* tuvo un crecimiento filamentoso en comparación con lo observado en el medio YPD, PD y YP. Esto nos indica que la falta de glucosa en el medio no es un factor que guie de manera directa el crecimiento filamentoso. Por otra parte, la cantidad de micelio producido en las mutantes *rad52-ΔΔ* se vio disminuida en medio YD, incluso más que en medio rico YPD, la ausencia de peptona de caseína en el medio como fuente de nitrógeno pudo haber influido sobre el crecimiento filamentoso.

El crecimiento de *S. cerevisiae* es fuertemente reprimido bajo una limitación de nutrientes (Zupan *et al.*, 2010). *S. cerevisiae*, en respuesta a condiciones estresantes hace una modificación en la organización de la colonia. En medio SC sin glucosa, las colonias de todas las cepas evaluadas disminuyeron drásticamente su tamaño. Las células reducen su crecimiento mediante la reducción en la biogénesis ribosomal y traducción, resultando en una expansión de la fase G1 del ciclo celular (Broach, 2012). Lo anterior podría explicar nuestros

resultados. Adicionalmente, la presencia de glucosa en medio SC, no tuvo algún efecto sobre el crecimiento de la colonia.

Por otro lado, el crecimiento en medio SLAD promovió la formación de pseudohifas en *C. tropicalis* y en mutantes *rad52-ΔΔ* causando la invasión en agar.

Los fenotipos de adherencia e invasión son directamente regulados en la etapa de morfogénesis. La actividad enzimática que presenta una hifa filamentosa desempeña un papel fundamental no solo en la degradación de moléculas importantes en las células del hospedero sino que también son de gran importancia en el proceso de adquisición de nutrientes. Hausauer *et al.*, (2005) sugieren que el crecimiento direccional de las hifas facilita la invasión de las células del hospedero mediante una secreción apical de proteasas y lipasas en comparación con las células levaduriformes.

En *C. albicans* se ha demostrado que mutaciones en genes que gobiernan el crecimiento de pseudohifa reducen su capacidad para filamentar *in vivo* resultando en una virulencia atenuada en un modelo murino de candidosis sistémica (Csank *et al.*, 2000).

El daño producido por la exposición a luz ultravioleta en *S. cerevisiae* parece desacoplar la síntesis de la cadena principal y retrasada, creando gaps largos y cortos de una sola cadena que pueden persistir en la fase G2 (Wyatt *et al.*, 2006). Mutantes nulas *rad52* de *C. albicans* fueron severamente deficientes en pérdida de heterocigocidad inducida por luz UV sugiriendo que *RAD52* es requerido para la pérdida de heterocigocidad inducida por luz UV. Esta pérdida de heterocigocidad ocurre de manera preferencial en células dentro de la fase logarítmica de crecimiento, debido probablemente a la gran acumulación de células en fase S (Takagi *et al.*, 2008).

En fase G1 y G2, los fotoproductos UV pueden ser detectados y procesados por el sistema NER (genes del grupo epistático *RAD3*) (Hanway *et al.*, 2002). Este procesamiento puede generar una señal (ADN de cadena sencilla), que es reconocida por la maquinaria de control del ciclo celular retrasando la entrada a la fase S o previniendo el inicio de la mitosis (Lopes *et al.*, 2006). Si el daño es producido después de la replicación existe una participación de genes del grupo

*RAD6*, que codifican proteínas involucradas en la reparación post-replicativa (Hanway *et al.*, 2002).

Nuestros resultados al igual que otros estudios, han demostrado que la recombinación homóloga dependiente de *RAD52* no es el mecanismo principal para la reparación de daños inducidos por luz UV. El análisis de sensibilidad a luz UV en mutantes nulas *rad52* de *C. tropicalis* en fase exponencial, indican que no hay diferencias significativas entre en la cepa tipo como en las mutantes evaluadas, aunque la sensibilidad incremento ligeramente más en estas últimas cuando las células fueron expuestas a 2 J/m<sup>2</sup>. Se ha evidenciado que células en fase logarítmica son más susceptibles al tratamiento con luz UV. Esto concuerda con nuestros resultados, donde células tratadas a 2J/m<sup>2</sup> en fase exponencial resultaron principalmente afectadas en contraste con lo que se obtuvo en la fase estacionaria. Mientras que a 7 J/m<sup>2</sup>, células en fase exponencial fueron en menor grado afectadas que aquellas en fase estacionaria. Estos resultados concuerdan con lo establecido por (Hanway *et al.*, 2002), donde NER es la principal ruta de reparación de los fotoproductos inducidos por luz UV, sin embargo, la eficiencia de reparación es dependiente de la dosis empleada. Estos resultados sugieren que la recombinación homóloga puede ser un mecanismo secundario de reparación cuando la ruta NER se ve comprometida y resulta ser ineficiente. *C. tropicalis* en fase estacionaria a 7J/m<sup>2</sup> fue más sensible que en fase exponencial, esto puede indicar que las células en esta fase de crecimiento tienen un efecto dependiente de la dosis, donde a determinada dosis la ruta NER disminuye su eficiencia y al no estar presentes proteínas de recombinación que puedan remover las estructuras formadas por la exposición la viabilidad celular se ve comprometida, independientemente del punto del ciclo celular en que se encuentren las células. Estos efectos se ven exacerbados por lo tanto en las mutantes *rad52-ΔΔ*. Rad51 y Rad52 son requeridos para la reparación después de la replicación del ADN dañado por luz UV en *S. cerevisiae* (García-Prieto *et al.*, 2010).

Los agentes que metilan la bases puricas del ADN en las posiciones N3 o N7 desestabilizan el enlace N-glicosídico de la cadena carbonada haciéndolo propenso a ser hidrolizado dentro de un sitio abásico (Wyatt, 2006). La exposición a MMS ha sido estrechamente relacionada con la

formación de roturas de doble cadena (DSBs) promoviendo el intercambio de cromátidas hermanas (SCEs) (Wyatt *et al.*, 2006) y la reparación por recombinación homóloga.

Las bases metiladas son reparadas de manera eficiente mediante la ruta de reparación por escisión de bases (BER) o metiltransferasas (Lundin *et al.*, 2005). Sin embargo, la recombinación homóloga desempeña también un rol fundamental en respuesta al daño generado por la exposición a MMS.

Nuestros resultados indican que la sensibilidad a altas concentraciones de MMS (0.01%) es significativamente alta en las mutantes *rad52-ΔΔ*. La sensibilidad a MMS incrementó en células en fase de crecimiento estacionaria en todas las concentraciones, por lo que podemos atribuir este comportamiento al estado metabólico de las células que puede influir en la elección de la ruta de reparación más eficiente como se ha reportado en *S. cerevisiae* (Andaluz *et al.*, 2004).

Durante la fase de crecimiento exponencial las células se encuentran principalmente en la fase S o G2 del ciclo celular donde la presencia de cromátidas hermanas facilita y promueve la recombinación homóloga; en una ruta independiente de *RAD52*. La ruta de reparación por elección en levaduras es la HR, aunque se sabe que la recombinación no homóloga (NHEJ) también se encuentra activa durante la fase S y G2. Sin embargo, la ausencia en levaduras de proteínas homólogas de reparación involucradas en la recombinación no homóloga (NHEJ) podría explicar la disminución en el porcentaje de supervivencia celular en mutantes *rad52-ΔΔ* de *C. tropicalis* que al no contar un mecanismo de reparación secundario, como la recombinación homóloga, la viabilidad se vio afectada.

Mientras que en fase estacionaria las células se encuentran en fase G0 o G1, donde el sustrato principal para la HR incluye los cromosomas homólogos que puede resultar en pérdida de heterocigocidad y conversión génica.

Es interesante observar que *C. tropicalis* tuvo un comportamiento similar en ambas fases de crecimiento y que la diferencia en la supervivencia celular no fue significativa. Estos hallazgos demuestran que el gen *RAD52* es esencial para los procesos de recombinación homóloga independientemente del punto del ciclo celular en el que se encuentren las células. Por otra parte, se sabe que los genes *RAD51* Y *RAD52* se expresan de manera constitutiva durante todo

el ciclo celular, pero incrementan su expresión durante la fase S y la ausencia de estos genes podría contribuir al incremento en la sensibilidad a MMS (Shrivastav *et al.*, 2008) en las mutantes *rad52-ΔΔ-9*, *rad52-ΔΔ-10* y *rad52-ΔΔ-11*.

Finalmente, únicamente la mutante *rad52-ΔΔ-9* fue más sensible en el ensayo de diluciones seriadas en fase estacionaria, contrario a lo que se obtuvo en el ensayo de UFC/ml. Aunque no se sabe concretamente por qué de esta discrepancia, será necesario hacer un análisis exhaustivo.

A pesar de los esfuerzos realizados para determinar el mecanismo de acción de la bleomicina y cómo esta se introduce a la célula, aun no se sabe con certeza como se lleva a cabo este proceso.

Muchos de esos estudios han permitido elucidar y proponer los mecanismos de daño y reparación del ADN cuando las células fúngicas son expuestas a bleomicina. Los efectos de la exposición a bleomicina incluyen no solamente el daño directo al ADN sino también a nivel estructural de la pared celular facilitando la liberación del fármaco dentro de la célula (Graybill *et al.*, 1996) y una vez dentro, se sabe que puede interactuar con moléculas de ARN mediante la degradación directa por hidrólisis o de manera indirecta mediante la generación de radicales libres. La bleomicina activa puede generar radicales hidroxilo, superóxido y peróxido de hidrógeno que reaccionan con otras moléculas oxidando lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Cabrera Benítez, 2006).

Se sabe que la exposición a compuestos radiomiméticos como la bleomicina, generalmente involucra la fragmentación de la cadena carbonada de desoxirribosa por un proceso radical (Stubbe *et al.*, 1987). La escisión de las cadenas de ADN puede ser la causa de la inhibición en la incorporación de timinas dentro del ADN de células crecientes y la inhibición de la división celular. Datos experimentales en *S. cerevisiae* revelan que el tratamiento con bleomicina incrementa la susceptibilidad a peróxido y radiación ionizante (Graybill *et al.*, 1996) y en el caso específico de *E. coli* puede inhibir la síntesis de ADN (Suzuki *et al.*, 1969).

Diversos autores reportan que la susceptibilidad de las células al tratamiento con bleomicina ocurre de manera preferencial durante la proliferación activa y también depende del estado

transcripcional de las células. Estas observaciones concuerdan con los resultados expuestos anteriormente, donde el porcentaje de supervivencia celular fue mayor durante la fase de crecimiento estacionaria en *C. tropicalis* y las mutantes *rad52-ΔΔ*. Por otra parte, se sabe que células en fase G2, son mayormente afectadas al tratamiento con esta molécula, inhibiendo así la correcta segregación de cromosomas y apropiada división nuclear y citoplasmática. Estos datos soportan nuestros resultados, donde el número de células recuperadas se vio disminuida.

De acuerdo a los resultados obtenidos, sería interesante evaluar nuevamente la sensibilidad de las mutantes nulas *rad52* con concentraciones mayores de MMS, bleomicina y dosis mayores de luz UV y de esta manera comparar los efectos y poder establecer el rol participativo de cada una de las rutas de reparación dependientes e independientes de *RAD52*. Así como también, establecer la relación que existe entre las fases de crecimiento tanto exponencial como estacionaria en la elección de la ruta de reparación.

## 11. CONCLUSIÓN

El gen *RAD52* en *Candida tropicalis* parece jugar un rol primordial no solamente en eventos de recombinación homóloga, sino también en la adaptación y supervivencia en condiciones estresantes. En este trabajo, se determinó que la ausencia de los dos alelos de este gen produjo cambios notables en el fenotipo donde las mutantes nulas *rad52* se desarrollaron como células filamentosas en contraste con la cepa tipo, que creció como células levaduriformes cuando fueron sembradas en medio YPD a 30°C. Por otra parte las cepas fueron capaces de invadir el agar en condiciones limitantes de glucosa y nitrógeno. La morfología de *C. tropicalis* en condiciones de crecimiento limitantes se mantuvo sin cambios mientras que la morfología colonial de las mutantes *rad52-ΔΔ* fue severamente afectada en medio SC sin glucosa, sugiriendo que en ausencia de glucosa los microorganismos cesan o reducen su crecimiento hasta que las condiciones son más favorables.

En medio SC conteniendo glucosa *C. tropicalis* no tuvo cambios significativos en cuanto a la morfología, sin embargo, en las mutantes *rad52-ΔΔ* la cantidad de micelio producido fue menor al observado en medio YPD o medio SC sin glucosa y el tamaño de las colonias fue mucho mayor. Estos datos sugieren que en presencia de glucosa las colonias se desarrollan de manera normal. En medio SLAD, *C. tropicalis* fue capaz de formar pseudohifas e invadir el agar mientras que las mutantes nulas *rad52* formaron filamentos e invadieron el agar.

Las mutantes nulas *rad52* fueron significativamente más sensibles al tratamiento con agentes que dañan el ADN como bleomicina, MMS y luz ultravioleta (UV). En medio conteniendo bleomicina, *C. tropicalis* en fase de crecimiento exponencial fue menos susceptible en comparación con la fase estacionaria donde a una concentración mayor (10μg/ml) el porcentaje de supervivencia celular disminuyó drásticamente, mientras que la viabilidad en la mutante *rad52-ΔΔ-11* fue nula sugiriendo un efecto dependiente de dosis.

El tratamiento con luz ultravioleta parece haber tenido un efecto mayor en células en crecimiento estacionario a una concentración de 7 J/m<sup>2</sup> donde el porcentaje de supervivencia celular fue menor al 50% en todas las cepas evaluadas.

Por otra parte, el tratamiento con MMS parece haber afectado mayormente a células en fase de crecimiento estacionaria en todas las concentraciones evaluadas.

Nuestros resultados sugieren que *RAD52* en *C. tropicalis* es esencial no solamente para reparar daños en el ADN a través de un mecanismo dependiente de homología sino que también interviene en diversos procesos celulares. La ausencia de *RAD52* causa alteraciones en la morfología colonial además de provocar un crecimiento filamentosos excesivo. Este trabajo refuerza las observaciones realizadas en otras especies pertenecientes al género *Candida* donde *RAD52* es esencial cuando las rutas de reparación menos conservativas se ven comprometidas demostrando su importancia a lo largo del ciclo celular en células en estado quiescente y células en división.

## 12. PERSPECTIVAS

- Obtener el reintegrante del gen *RAD52* para comprobar que los fenotipos observados en este trabajo correspondan a la disrupción del gen.
- Caracterizar nuevamente mutantes nulas *rad52-ΔΔ* de *C. tropicalis* así como el reintegrante *RAD52* respecto a la sensibilidad durante la exposición a bleomicina, MMS y luz ultravioleta.
- Hacer un análisis de cariotipos de células de *C. tropicalis* y mutantes *rad52-ΔΔ* expuestas a MMS, bleomicina y luz ultravioleta y evaluar el daño a nivel cromosómico.

## 13. BIBLIOGRAFÍA

1. Achkar, J. M. (2010). Candida infections of the genitourinary tract. *Clinical microbiology reviews*, 23(2), 253-273.
2. Al-Fattani, M. A. (2006). Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *Journal of medical microbiology*, 55(8), 999-1008.
3. Andaluz, E., Ciudad, T., Gómez-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 hypha-specific genes. *Molecular microbiology*, 59(5), 1452-1472.
4. Bellido, A., Andaluz, E., Gómez-Raja, J., Álvarez-Barrientos, A., & Larriba, G. (2015). Genetic interactions among homologous recombination mutants in *Candida albicans*. *Fungal Genetics and Biology*, 74, 10-20.
5. Berman, J., & Hadany, L. (2012). Does stress induce (para)sex? Implications for *Candida albicans* evolution. *Trends in Genetics*, 28(5), 197-203.
6. Berman, J. (2006). Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. *Current opinion in microbiology*, 9(6): 595-601.
7. Bizerra, F. C., Nakamura, C. V., De Poersch, C., Estivalet Svidzinski, T. I., Borsato Quesada, R. M., Goldenberg, S., ... & Yamada-Ogatta, S. F. (2008). Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. *FEMS yeast research*, 8(3), 442-450.
8. Blankenship, J. R. & Mitchell, A. P. (2006). How to build a biofilm: a fungal perspective. *Current opinion in microbiology*, 9(6), 588-594.
9. Broach, J. R. (2012). Nutritional control of growth and development in yeast. *Genetics*, 192(1), 73-105.

10. Cabrera Benítez, S. (2006). Bleomicina: un modelo de fibrosis pulmonar. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 19(1), 53-61.
11. Cantón, E. V. (2001). Infección sistémica nosocomial por levaduras. *Rev Iberoam Micol*, 18, 51-55.
12. Ceccaldi, R., Rondinelli, B., & D'Andrea, A. D. (2016). Repair pathway choices and consequences at the double-strand break. *Trends in cell biology*, 26(1), 52-64.
13. Cervera, C. (2012). Candidemia y candidiasis invasora en el adulto. Formas clínicas y tratamiento. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.*, 30(8), 483-491.
14. Conconi, A., & Bell, B. (2017). Molecular biology: The long and short of a DNA-damage response. *Nature*, 165-166.
15. Csank, C., & Haynes, K. (2000). *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. *FEMS microbiology letters*, 189(1), 115-120.
16. Cuevas Barrera, L. A. (2012). Caracterización fenotípica y molecular de aislados clínicos mexicanos de *Candida tropicalis*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.
17. Cuidad, 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. *Molecular microbiology*, 53(4), 1177-1194.
18. Cullen, P. J., & Sprague, G. F. (2000). Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(25), 13619-13624.
19. Czornak, K., Chughtai, S., & Chrzanowska, K. H. (2008). Mystery of DNA repair: the role of the MRN complex and ATM kinase in DNA damage repair. *Journal of applied genetics*, 49(4), 383-396.

20. Al-Dhaheeri, R. S., & Douglas, L. J. (2008). Absence of amphotericin B-tolerant persister cells in biofilms of some *Candida* species. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(5), 1884-1887.
21. Butler, G., Rasmussen, M. D., Lin, M. F., Santos, M. A., Sakthikumar, S., Munro, C. A., ... & Agrafioti, I. (2009). Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*, 459(7247), 657-662.
22. Gagliano, M., Bauer, F. F., & Pretorius, I. S. (2002). The sensing of nutritional status and the relationship to filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research*, 2(4), 433-470.
23. Gangavarapu, V., Prakash, S., & Prakash, L. (2007). Requirement of RAD52 group genes for postreplication repair of UV-damaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 27(21), 7758-7764.
24. García-Prieto, F., Gómez.-Raja, J., Andaluz, E., Calderone, R., & Larriba, G. (2010). Role of the homologous recombination genes RAD51 and RAD59 in the resistance of *Candida albicans* to UV light, radiomimetics and anti-tumor compounds and oxidizing agents. *Fungal Genetics and Biology*, 47(5), 433-445.
25. Giri, S. & Kindo, A. J. (2012). A review of *Candida* species causing blood stream infection. *Indian journal of medical microbiology*, 30(3), 270.
26. Graybill, J. R., Bocanegra, R., Fothergill, A., & Rinaldi, M. G. (1996). Bleomycin therapy of experimental disseminated candidiasis in mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 40(3), 816-818.
27. Gudlaugsson, O., Gillespie, S., Lee, Ber, J., Hu, J., Messer, S., ...& Diekema, D. (2003). Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clinical Infectious Diseases*, 37(9), 1172-7.
28. Hanaoka, F. & Sugawara, K. (Eds.). (2016). *DNA Replication, Recombination, and Repair: Molecular Mechanisms and Pathology*. Springer.

29. Hanway, D., Chin, J. K., Xia, G., Oshiro, G., Winzeler, E. A., & Romesberg, F. E. (2002). Previously uncharacterized genes in the UV- and MMS-induced DNA damage response in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(16), 10605-10610.
30. Hausauer, D. L., Gerami-Nejad, M., Kistler-Anderson, C., & Gale, C. A. (2005). Hyphal guidance and invasive growth in *Candida albicans* require the Ras-Like GTPase Rsr1p and its GTPase-activating protein Bud2p. *Eukaryotic cell*, 47(7), 1273-1286.
31. Hazen, K. C. (1995). New and emerging yeast pathogens. *Clinical microbiology reviews*, 8(4), 462-478.
32. Hiom, K. (1999). DNA repair: Rad52 — the means to an end. *Current biology*, 9(12), R446-R448.
33. Hube, B., Naglik, J. (2001). *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology*, 147(8), 1997-2005.
34. Iyama, T. & Wilson, D. M. (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair*, 12(8), 620-636.
35. Kauffman, C. A. (2005). Candiduria. *Clinical Infection Diseases*, 41:S371-6.
36. Kothavade, R. J., Kura, M. M., Valand, A. G., & Panthaki, M. H. (2010). *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. *Journal of Medical Microbiology*, 59(8), 873-880.
37. Krcmery, V., & Barnes, A. J. (2002). Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungemia: pathogenicity and antifungal resistance. *Journal of Hospital Infection*, 50(4), 243-260.
38. Krogh, B. O., Symington, L. S. (2004). Recombination Proteins in Yeast. *Annu. Rev. Genet.*, 38, 233-71.
39. Lisby, M., & Rothstein, R. (2009). Choreography of recombination proteins during the DNA damage response. *DNA repair*, 8(9), 1068-1076.

40. Lliakis, G., Wang, H., Perrault, A. R., Boecker, W., Rosidi, B., Windhofer, F., ... & Pantelias, G. (2004). Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenet and genome research*, 104(1-4), 14-20.
41. López-Ribot, J. L. (2005). *Candida albicans* biofilms: more than filamentation. *Current biology*, 15(12), R453-R455.
42. Lundin, C., North, M., Erixon, K., Walters, K., Jenssen, D., Goldman, A. S., & Helleday, T. (2005). Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. *Nucleic acids research*, 33(12), 3799-3811.
43. MacDonald, P. N. (Ed.). (2001). *Two-hybrid systems: methods and protocols* (Vol. 177). Springer Science & Business Media.
44. Terasawa, M., Shinohara, M. (2014). Canonical non-homologous end joining in mitosis induces genome instability and is suppressed by M-phase-specific phosphorylation of XRCC4. *PLoS Genet*, 10(8), e1004563.
45. Lopes, M., Foiani, M., & Sogo, J. M. (2006). Multiple mechanisms control chromosome integrity after replication fork uncoupling and restart at irreparable UV Lesions. *Molecular cell*, 21(1), 15-27.
46. Mösch, H. U., & Fink, G. R. (1997). Dissection of filamentous growth by transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 145(3), 671-684.
47. Mukherjee, P. K., Chandra, J. (2004). *Candida* biofilm resistance. *Drug resistance updates*, 7(4), 301-309.
48. Negri, M., Silva, S., Henriques, M., & Oliveira, R. (2012). Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 31(7), 1399-1412.

49. Papon, N., Courdavault, V., Clastre, M., & Bennett, R. J. (2013). Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. *PLoS pathogens*, 9(9), e1003550.
50. Pappas, P. G., Kauffman, C. A., Andes, D. R., Clancy, C. J., Marr, K. A., Ostrosky-Zeichner, L., ... & Zaoutis, T. E. (2015). Clinical practice guideline for the management of candidiasis: update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 62(4), e1-e50.
51. Park, M., Do, E., & Jung, W. H. (2013). Lipolytic enzymes involved in the virulence of human pathogenic fungi. *Microbiology*, 41(2), 67-72.
52. Cullen, P. J., & Sprague, G. F. (2000). Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(25); 13619-13624.
53. Pfaller, M. A., Diekema, D. J. (2004). Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Journal of clinical microbiology*, 42(10), 4419-4431.
54. Pfaller, M. A. & Diekema, D. J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical microbiology reviews*, 20(1), 133-163.
55. Porman, A. M., Alby, K., Hirakawa, M. P., Bennett, R. J. (2011). Discovery of a phenotypic switch regulating sexual mating in the opportunistic fungal pathogen *Candida tropicalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(52), 21158-21163.
56. Priest, S. J., & Lorenz, M. C. (2015). Characterization of virulence-related phenotypes in *Candida* species of the CUG Clade. *Eukaryot Cell*, 14(9), 931-940.
57. Ramirez Falcón, V. L. (2014). Obtención y caracterización fenotípica de los reintegrantes RAD51 y RAD52 de *Candida tropicalis*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.
58. Zupan, J., & Raspor, P. (2010). Invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae* depends on environmental triggers: a quantitative model. *Yeast*, 27(4), 217-228.

59. Richet, H., Roux, P., Des Champs, C., Esnault, Y., & Andreumont, A. (2002). Candidemia in French hospitals: incidence rates and characteristics. *Clinical microbiology and infection*, 8(7), 405-412.
60. Riggle, P. J., Andrutis, K. A., Chen, X., Tzipori, S. R., & Kumamoto, C. A. (1999). Invasive lesions containing filamentous forms produced by a *Candida albicans* mutant that is defective in filamentous growth in culture. *Infection and immunity*, 67(7), 3649-3652.
61. Roberts, R. L., & Fink, G. R. (1994). Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes & development*, 8(24), 2974-2985.
62. Rodrigues, A. G., Mardh, P. A., Pina-Vaz, C., Martinez-de-Oliveira, J., & Fonseca, A. F. (1999). Germ tube formation changes surface hydrophobicity of *Candida* cells. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*, 7(5), 222-226.
63. Saray Aranda Romo, L. O. (2015). Candidiasis oral. En C. V. Alejandra Paula Espinosa Taxis, *Temas selectos de microbiología médica y molecular* (47-56). Puebla, Pue., Mexico. C.P. 72000: Fomento Editorial.
64. Seervai, R. N., Jones, S. K., Hirakawa, M. P., Porman, A. M., & Bennet, R. J. (2013). Parasexuality and ploidy change in *Candida tropicalis*. *Eukaryotic cell*, 12(12), 1629-1640.
65. Shinohara, A. & Ogawa, T. (1998). Stimulation by Rad52 of yeast Rad51-mediated recombination. *Nature*, 391(6665), 404-407.
66. Shrivastav, M., De Haro, L. P., Nickoloff, J. A. (2008). Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell research*, 18(1), 134-147.
67. Silva, S., Hooper, S. J., Henriques, M., Oliveira, R., Azeredo, J., & Williams, D. W. (2011). The role of secreted aspartyl proteinases in *Candida tropicalis* invasion and damage of oral mucosa. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(2), 264-272.

68. Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W., & Azeredo, J. (2012). *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS microbiology reviews*, 36(2), 288-305.
69. Sonoda, E., Takata, M., Yamashita, Y. M., Morrison, C., & Takeda, S. (2001). Homologous DNA recombination in vertebrate cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(15), 8388-8394.
70. Stubbe, J. & Kozarich, J. W. (1987). Mechanisms of bleomycin-induced DNA Degradation. *Chemical reviews*, 87(5), 1107-1136.
71. Sudbery, P., Gow, N., & Berman, J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in microbiology*, 12(7), 317-324.
72. Suzuki, H., Nagai, K., Yamaki, H., Tanaka, N., & UMEZAWA, H. (1969). On the mechanisms of action of bleomycin: Scission of DNA strands in vitro and in vivo. *The journal of antibiotics*, 22(9), 446-448.
73. Suzuki, T., Omi, K., Ito, T., Takata, T., Kikutsugi, H., Fujimura, T., ... & Kamihara, T. (2005). Ethanol-induced pseudohyphal transition in the cells of *Candida tropicalis*: participation of phosphoinositide signal transduction. *FEMS yeast research*, 6(2), 177-185.
74. Krogh, B. O., & Symington, L. S. (2004). Recombination proteins in yeast. *Annu. Rev. Genet.*, (38), 233-71.
75. Symington, L. S. (2002). Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiology and molecular biology reviews*, 66(4), 630-670.
76. Symington, L. S., Rothstein, R., & Lisby, M. (2014). Mechanisms and regulation of mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 198(3), 795-835.
77. Tafurt Cardona, Y., Morales, M., & Aparecida, M. (2014). Principales mecanismos de reparacion de daños en la molécula de ADN. *Biosalud*, 13(2), 95-110.

78. Takagi, Y., Akada, R, Kumagai, H., Yamamoto, K., & Tamaki, H. (2008). Loss of heterozygosity is induced in *Candida albicans* by ultraviolet irradiation. *Applied microbiology and biotechnology*, 77(5), 1073-1082.
79. Turner, S. A., & Butler, G. (2014). The *Candida* pathogenic species complex. *Cold Spring Harb perspectives in Medicine*, 4(9), a019778.
80. Walsh, T. J., Groll, A., Hiemenz, J., Fleming, R., Roilides, E., & Anaissie, E. (2004). Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(s1), 48-66.
81. Wenzel, R. P., & Gennings, C. (2005). Bloodstream infections due to *Candida* species in the intensive care unit: identifying especially high-risk patients to determine prevention strategies. *Clinical infections diseases*, 41( Supplement\_6), S389-S393.
82. Whiteway, M., & Bachewich. (2007). Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu. Rev. Microbiol.*, 61, 529-553.
83. Wyatt, M. D., & Pittman, D. L. (2006). Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks. *Chemical research toxicology*, 19(12), 1580-1594.
84. Zupan, J., & Raspor, P. (2010). Invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae* depends on environmental triggers: a quantitative model. *Yeast*, 27(4), 217-228.
85. Zuzá-Alves, D. L., de Mendeiros, S. S., de Souza, L. B., Silva-Rocha, W. P., Francisco, E. C., de Araújo, M. C., ... & Chaves, G. M. (2016). Evaluation of virulence factors in vitro, resistance to osmotic stress and antifungal susceptibility of *Candida tropicalis* isolated from the coastal environment of Northeast Brazil. *Frontiers in microbiology*, 7.

