



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



**INSTITUTO DE CIENCIAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA**

**DETERMINACIÓN DEL *LOCUS* MTL EN *CANDIDA*
ALBICANS, *CANDIDA TROPICALIS* Y *CANDIDA*
*GLABRATA***

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

***MAESTRÍA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA) CON OPCIÓN EN
MICROBIOLOGÍA MÉDICA***

PRESENTA:

Q.F.B MARY JOSE ALTAMIRANO LÓPEZ

ASESOR (ES) DE TESIS:

M.C ALEJANDRA PAULA ESPINOSA TESIS

D.C MARIA PATRICIA GEORGINA SÁNCHEZ ALONSO

PUEBLA, PUEBLA

OCTUBRE 2025



BUAP

Puebla, Pue. a 25 de junio 2025.

**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 **Mary Jose Altamirano López**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

"Determinación del Locus MTL en *Candida albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*"

A nuestro juicio, la alumna **Mary Jose Altamirano López** puede proceder a la digitalización 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. Lucía Soto Urzúa

D.C. Luis Javier Martínez Morales

D.C. María Patricia G. Sánchez Alonso

D.C. Rebeca Débora Martínez Contreras



“Esta tesis fue realizada con el apoyo de una Beca Nacional otorgada por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnología (CONAHCYT) de agosto 2022 a julio 2024, número de apoyo 821814”



CONAHCYT

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, a Dios, por la vida que me ha dado y acompañarme en el camino que me ha permitido concluir esta etapa de mi vida.

Al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, ICUAP, así como a los docentes de este centro que han sido parte primordial de mi formación profesional y contribuido a la realización de este proyecto.

A la M.C Alejandra P. Espinosa Taxis, por aceptarme en el laboratorio de Micología y permitirme trabajar con ella para el desarrollo de este trabajo. Así como por sus enseñanzas, apoyo y comprensión durante mi estancia en el posgrado.

A la D.C Patricia G. Sánchez Alonso, por todas sus enseñanzas y apoyo en el trabajo de laboratorio, al igual que por su paciencia, dedicación y aportaciones para la elaboración de este trabajo.

A la D.C María del Rayo Santellan Olea, por sus enseñanzas, recomendaciones y apoyo para poder llevar a cabo esta tesis.

A la D.C Lucia Soto Urzúa, por sus aportaciones y tiempo dedicado para el enriquecimiento de este trabajo.

Al D.C Luis Javier Martínez Morales, por sus recomendaciones y guía a lo largo del desarrollo de esta tesis.

A la D.C. Rebeca D. Martínez Contreras, por el tiempo dedicado y sus aportaciones para la mejora de este proyecto.

A mis docentes del posgrado, por todas sus enseñanzas, tiempo y dedicación para formarme e impulsarme a mejorar como profesionista.

Al D.C Samuel Treviño Mora, por motivarme y darme la confianza para perseguir un camino dentro del posgrado. Gracias por creer en mí.

A mi familia, por ser mi pilar en la vida y darme todo el amor y apoyo necesario para perseguir mis metas.

DEDICATORIAS

A mis padres, María Dolores y Jose Félix por criarme, educarme, amarme y esforzarse cada día para brindarme todas las oportunidades necesarias para permitirme llegar hasta el día de hoy. Sobre todo, por estar a mi lado y darme por todo su apoyo y cuidados a lo largo de mi vida.

A mi hermano, Abraham, por cuidarme, motivarme y ser mi compañero en las alegrías y tragos amargos de la vida, por siempre darme su cariño y apoyo.

A mis abuelos Rufina y Virgilio† por estar siempre estar para mi a lo largo de toda mi formación profesional e impulsarme a crecer.

A todos mis tíos y primos, por su apoyo moral e impulsarme a mejorar como persona cada día.

A Francisco, por ser mi compañero durante tantos años, por quererme, cuidarme y apoyarme siempre en mi crecimiento personal y profesional.

A mis amigos Karla Lisset, Víctor Manuel y Bryam Gustavo, por acompañarme en los momentos maravillosos y difíciles de mi crecimiento, por su amistad sincera y nunca dejarme sola.

Contenido

1.Introducción	1
1.1 Epidemiología de la Candidosis	2
1.2. Características del género <i>Candida</i>	5
1.2.1 Características fenotípicas	5
1.2.2 Patogenia	8
1.2.2.1 Adhesión	8
1.2.2.2 Transición morfológica.....	10
1.2.2.3 Enzimas.....	11
1.2.2.4 Adaptación al pH	12
1.2.2.5 Proteínas de choque térmico.....	13
1.2.2.6 Formación de biopelículas	13
1.2.2.7 Cambio fenotípico	15
1.3 Locus MTL	18
2.Antedentes	23
3. Justificación.....	24
4. Planteamiento del problema	25
5.Objetivos	26
5.1 General	26
5.2 Particulares.....	26
6.Diagrama de trabajo	27
7.Material y métodos	28
7.1 Aislados clínicos y cultivo primario.....	28
7.2 Identificación en CHROMagar® <i>Candida</i>	28
7.2.1 Caracterización fenotípica	29
7.3 Identificación molecular por PCR especie específica	30
7.4 Identificación y determinación del tipo de apareamiento del <i>locus</i> MTL.....	32
8. Resultados	36
8.1 Aislados Clínicos	36
8.2 Identificación de CHROMAgar <i>Candida</i>	36
8.2.1 Caracterización fenotípica	38
8.3 Identificación molecular por PCR especie específica	41

8.4. Identificación y determinación del tipo de apareamiento del <i>locus</i> MTL	43
9. Discusión	50
10. Conclusión	55
11. Perspectivas	56
12. Referencias.....	57
13. Anexos.....	64

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Especies de <i>Candida</i> recuperadas en micosis superficiales más frecuentes en México.	4
Figura 2 Especies de <i>Candida</i> aisladas con mayor frecuencia en candidosis invasivas en México.	4
Figura 3 Ciclo de formación de biopelículas en especies de <i>Candida</i>	14
Figura 4 Morfología microscópica de células blancas y células opacas	15
Figura 5 Regulación del cambio fenotípico de blanco a opaco.	16
Figura 6 Proceso de apareamiento entre células opacas α y α en especies de <i>Candida</i>	17
Figura 7 Fenotipos de "core switching" de <i>Candida glabrata</i>	18
Figura 8 Representación esquemática de los idiomorfos estructurales del locus MTL en <i>Candida albicans</i> y <i>Candida tropicalis</i>	19
Figura 9 Representación esquemática comparativa de la información genética de <i>Candida glabrata</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en el locus de apareamiento MTL y MAT.....	22
Figura 10 Morfología colonial macroscópica en CHROMAgar <i>Candida</i> para <i>Candida albicans</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida glabrata</i>	28
Figura 11 Sitios anatómicos de los aislados clínicos obtenidos.	36
Figura 12 Morfología colonial en CHROMAgar <i>Candida</i> de las especies de interés.	37
Figura 13 Morfología microscópica observada en fresco a 40X.....	38
Figura 14 Formación de túbulos germinales.	39
Figura 15 Prueba de formación de clamidoconidios positiva en <i>Candida albicans</i>	39

Figura 16 Comparación de los resultados de la prueba de producción de biopelículas por especie.....	40
Figura 17 Análisis en gel de agarosa al 1.5 % de los amplificados de 273 pb, correspondientes a la identificación de <i>Candida albicans</i> por PCR especie específica.	42
Figura 18 Análisis en gel de agarosa al 1.5% de los amplificados de 357 pb, correspondientes a la identificación de <i>Candida tropicalis</i> por PCR especie específica.	42
Figura 19 Análisis en gel de agarosa de los amplificados de 406 pb, correspondientes a la identificación de <i>Candida glabrata</i> por PCR especie específica.	43
Figura 20 Análisis en gel de agarosa al 1.5% de los amplificados de $\alpha 1$ de 535 pb y de $\alpha 2$ de 615 pb en la determinación del locus MTL en cepas de <i>Candida albicans</i>	44
Figura 21 Análisis en gel de agarosa al 1.5% de los amplificados de 253 pb de $\alpha 1$ y de 525 pb de $\alpha 2$ obtenidos de la determinación del locus MTL en cepas de <i>Candida tropicalis</i>	44
Figura 22 Genotipos del locus MTL obtenidos en las cepas de <i>Candida albicans</i> y <i>Candida tropicalis</i>	45
Figura 23 Análisis en geles de agarosa al 0.8% de la determinación del locus MTL1 en cepas de <i>Candida glabrata</i>	46
Figura 24 Análisis en gel de agarosa al 0.8% de la determinación del locus MTL2 en cepas de <i>Candida glabrata</i>	47

Figura 25 Análisis en gel de agarosa al 0.8 % de los resultados de la determinación del locus MTL3 en cepas de <i>Candida glabrata</i>	47
Figura 26 Información genética en los locus MTL de <i>Candida glabrata</i>	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Resumen de las características fenotípicas y del genoma de <i>C. albicans</i> , <i>Candida tropicalis</i> y <i>Candida glabrata</i>	7
Tabla 2 Oligonucleótidos empleados en la identificación molecular por PCR especie específica para <i>Candida albicans</i> , <i>Candida tropicalis</i> y <i>Candida glabrata</i>	31
Tabla 3 Oligonucleótidos empleados para la identificación del locus MTL en <i>Candida albicans</i> y <i>Candida tropicalis</i>	32
Tabla 4 Oligonucleótidos empleados para la identificación del locus MTL en <i>Candida glabrata</i>	33
Tabla 5 Condiciones de ampliación del locus MTL en <i>Candida glabrata</i>	34
Tabla 6 Resumen de resultados obtenidos de las pruebas de caracterización fenotípicas.....	41
Tabla 7 Resultados de la configuración del locus MTL en <i>Candida glabrata</i>	48

Resumen

Las infecciones fúngicas tienen una amplia distribución en México y el mundo, las levaduras de género *Candida* representan un importante agente causal de micosis oportunistas e infecciones asociadas a la atención de la salud. La especie *C. albicans* ha sido la más frecuente durante un largo periodo de tiempo, sin embargo, la presencia de especies como *C. tropicalis* y *C. glabrata* ha cobrado relevancia conforme se incrementa su incidencia.

En el género *Candida* se describe la presencia de diversos mecanismos de adaptación a su entorno y que incrementan su virulencia, uno de ellos es la presencia del locus de apareamiento denominado "Mating Tipe-Like (MTL)" que se ve implicado en la reproducción parasexual de estas levaduras, dicho apareamiento favorece la recombinación genética entre levaduras y su adaptación al entorno y potencialmente incrementando su patogenicidad.

En este estudio, se analizaron 250 aislados clínicos provenientes de pacientes con candidosis de diversos sitios anatómicos, se obtuvieron 87 cepas de *Candida* las cuales fueron identificadas por fenotipo en CHROMAgar *Candida* y caracterizadas con pruebas fenotípicas, identificando 30 cepas de *C. albicans*, 30 cepas de *C. tropicalis* y 28 cepas de *C. glabrata* las cuales se identificaron molecularmente por PCR especie- específica. Se continuó con la identificación del locus MTL en cada una de las cepas, en *C. albicans* se identificaron 28 heterocigotos a/α que poseen los genes $MTLa1$ y $MTL\alpha2$, un homocigoto a/a y un homocigoto α/α , en *C. tropicalis* se identificaron 26 heterocigotos a/α y 4 cepas homocigotas a/a , las cepas homocigotas son competentes para realizar apareamiento y obtener mayor variabilidad genética.

En *C. glabrata* la identificación de su locus MTL (MTL1, MTL2, MTL3) permitió obtener la configuración de su información genética, se identificaron 10 cepas $\alpha\alpha$, 7 cepas aa , 7 cepas $\alpha\alpha\alpha$ y 3 cepas aaa .

1.Introducción

A partir de 1980 se ha descrito un incremento en la incidencia y prevalencia de las infecciones fúngicas, esta tendencia se ha mantenido hasta la actualidad e incluye micosis superficiales, subcutáneas, sistémicas, oportunistas e infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS) (Cornistein *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2012). Diversos factores se han visto implicados en el incremento de las micosis, entre los que se incluyen los tratamientos con inmunosupresores, el uso de antibióticos de amplio espectro, los tratamientos con corticosteroides, la colocación de vías de alimentación, catéteres y otros instrumentales a nivel hospitalario y ambulatorio. (Hernández *et al.*, 2009)

Entre los hongos causales de micosis oportunistas en humanos, las levaduras del género *Candida* se destacan por ser las levaduras aisladas con mayor frecuencia, dentro de las más de 200 especies de este género solo unas cuantas se ven implicadas en candidosis humana y tienen interés clínico (Trujillo *et al.*, 2015). *Candida albicans* se ha considerado durante varios años como la especie de mayor impacto e importancia médica, ya que es la especie aislada en más de 80% de los casos, tanto en pacientes que presentan micosis sintomática, como en pacientes que se encuentran aparentemente sanos (Silva *et al.*, 2012; Trujillo, *et al.*, 2015).

A pesar de haberse mantenido durante varias décadas el predominio de *C. albicans* en los aislamientos realizados a partir de muestras de pacientes, a nivel mundial se ha descrito en las últimas tres décadas un incremento significativo en el aislamiento de otras especies en los casos de candidosis (Silva *et al.*, 2012), dentro de las cuales se ha aislado *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis* y *Candida krusei*, presentándose como agentes causales en enfermedades oportunistas (Arendrup *et al.*, 2017; Seyoum *et al.*, 2020) y relacionándose con un incremento en el uso de antifúngicos azoles (Ahmad *et al.*, 2021).

Adicionalmente, en 2009 se describió por primera vez en el mundo la especie *Candida auris*, la cual adquirió su importancia como patógeno emergente al presentar multirresistencia a antimicóticos y supervivencia al uso de desinfectantes, que en conjunto con sus diversos factores de virulencia demostraron generar infecciones invasivas graves y de alta mortalidad (Ahmad *et al.*, 2021; González *et al.*, 2022)

Las levaduras del género *Candida* han sido responsables durante varias décadas de la mayoría de las micosis humanas, y continúan incrementando su incidencia con el tiempo. A pesar de que se ha mantenido la tendencia de aislar *C. albicans* en la mayoría de los casos, también ha incrementado la incidencia de especies, como

C. tropicalis y *C. glabrata* (Seyoum *et al.*, 2020). Sin embargo, uno de los desafíos que existen actualmente es que en comparación de la diversidad de estudios que existen sobre *C. albicans*, el estudio de especies como *C. tropicalis* y *C. glabrata* es escaso.

Adicionalmente, las candidosis han demostrado ser un reto para la salud pública, con la creciente manifestación de resistencia a antifúngicos y mayor supervivencia en el ambiente, las opciones de tratamiento se han visto limitadas y en conjunto con un incremento en la incidencia de las candidosis, se ha demostrado ser necesario un mayor estudio de todas las especies de *Candida*.

1.1 Epidemiología de la Candidosis

Las micosis producidas por *Candida* comprenden una amplia gama de afecciones, cuya localización en el organismo está relacionada al tropismo de los microorganismos por ciertos sitios anatómicos, encontrando variaciones entre especies para establecerse en distintos nichos, además de relacionarse con factores de riesgo que pueden incrementar la morbilidad y mortalidad (Westwater *et al.*, 2007)

C. albicans ha sido descrita como la especie mayormente aislada del género, una de las características que contribuye a esta incidencia es el poli tropismo que presenta, ya que puede adaptarse a diversos microambientes dentro del organismo humano. Mientras que en especies como *C. tropicalis* y *C. glabrata* se ha descrito un tropismo por la mucosa vaginal, broncopulmonar e intestinal, además de haber sido aislada en torrente sanguíneo, tracto urogenital, sistema nervioso central y el sistema osteoarticular (Trujillo *et al.*, 2015). El tropismo de estas levaduras tiene un efecto directo en las manifestaciones clínicas de las micosis que ocasionan.

Dentro de las infecciones por *Candida*, el desarrollo de una forma invasiva o no invasiva se ve influenciado por diversas características del hospedero, principalmente por la presencia de factores de riesgo y comorbilidades.

Los principales factores de riesgo descritos incluyen la presencia concomitante de otra infección, el uso de dispositivos médicos como sondas o catéteres, los tratamientos previos con antibióticos de amplio espectro, glucocorticoides y terapia antirretroviral, así como procedimientos quirúrgicos recientes y tratamientos médicos como la diálisis y hemodiálisis (Pemán *et al.*, 2013).

En el ambiente hospitalario, se ha descrito que la edad es un factor de riesgo importante, ya que las infecciones por *Candida* se presentan mayormente en las poblaciones en los extremos de la edad, principalmente menores de 1 año y mayores de 65 años. Otros factores de riesgo importantes a nivel hospitalario incluyen las estadías prolongadas en unidades de cuidados intensivos, la recepción

de transfusiones múltiples, la estancia en unidades de quemados y la presencia de politraumatismos (Pemán *et al.*,2013).

Así mismo, las comorbilidades asociadas a infecciones por *Candida* incluyen la presencia de tumores sólidos y oncohematológicos, quimioterapia, diabetes mellitus tipo 2, VIH-SIDA y la inmunosupresión inducida para la recepción de trasplantes de órganos y médula ósea (Cornistein *et al.*,2013).

Respecto a las especies más relevantes causales de candidosis, en *C. albicans* se ha descrito una mortalidad global entre el 30 y el 65%, influenciado por la gravedad de la enfermedad presente y el desarrollo de choque séptico. Mientras tanto, en *C. glabrata* se ha descrito con una mortalidad global del 45% y en *C. tropicalis* una mortalidad global entre el 33 y el 90% de los casos (Pemán *et al.*,2013).

A través de estudios epidemiológicos longitudinales a nivel global se ha descrito que en los casos de candidosis oral, candiduria y candidemia, el agente etiológico más frecuente es *C. albicans*, seguido de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* en diferentes regiones del mundo (Silva *et al.*,2012).

En nuestro país, se ha observado que se mantiene la tendencia global de encontrar un predominio en la especie *C. albicans* en las muestras clínicas de candidosis, con un incremento en la frecuencia de aislamiento de especies no albicans. En estudios realizados a lo largo de 30 años, se ha descrito lo siguiente:

Las poblaciones entre las cuales se describe la mayoría de los casos de infecciones por *Candida* incluyen pacientes inmunosuprimidos, menores con malnutrición, pacientes oncológicos, pacientes con diabetes mellitus tipo 2, neonatos, pacientes pediátricos y pacientes de minorías étnicas como los miembros de la comunidad tarahumara (Reyes *et al.*, 2017).

En lo que respecta a las micosis superficiales en el país, se observa el predominio de 4 formas clínicas, siendo la más frecuente la candidosis genital, seguido de candidosis oral, onicomicosis y candidosis cutánea. La especie mayormente aislada fue *C. albicans* en estas formas clínicas de micosis y se observó una variación en la proporción aislada de otras especies, como se observa en la figura 1 que ilustra el porcentaje de recuperación de especies de *Candida* en las formas clínicas de micosis más frecuentes en el país (Reyes *et al.*, 2017).

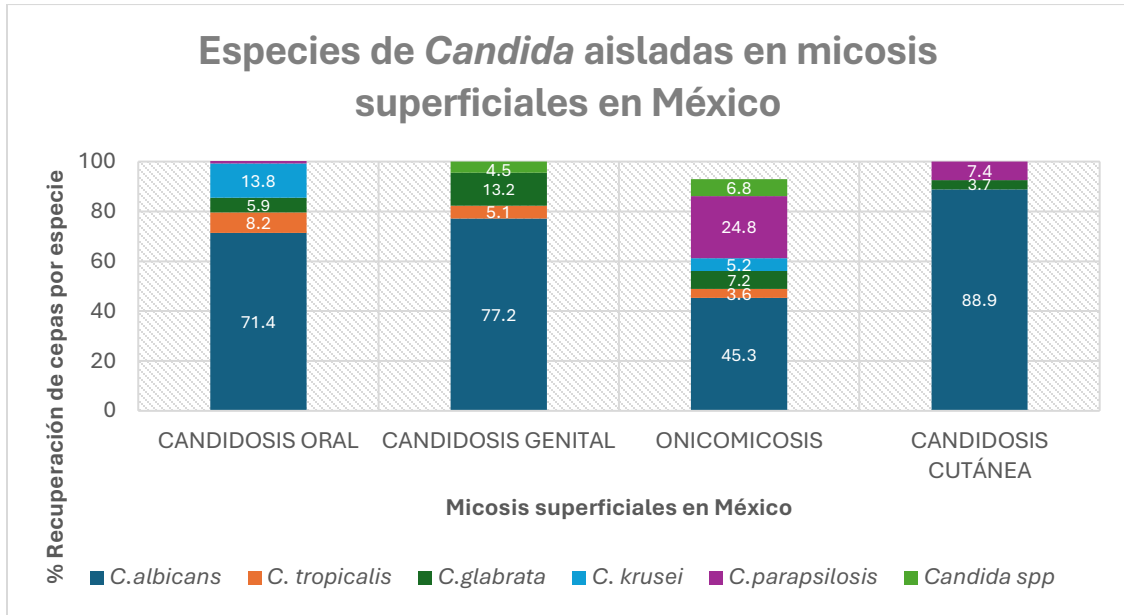


Figura 1 Especies de *Candida* recuperadas en micosis superficiales más frecuentes en México. Tomado y adaptado de Reyes et al., 2017.

De igual forma, se describe que en nuestro país se aisló predominantemente *C. albicans* en las formas clínicas de candidosis invasiva, seguido en frecuencia por la especie *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis* respectivamente. (Reyes et al., 2017). En la figura 2 se representa el porcentaje de aislados identificados por especie en los casos de candidosis invasiva.

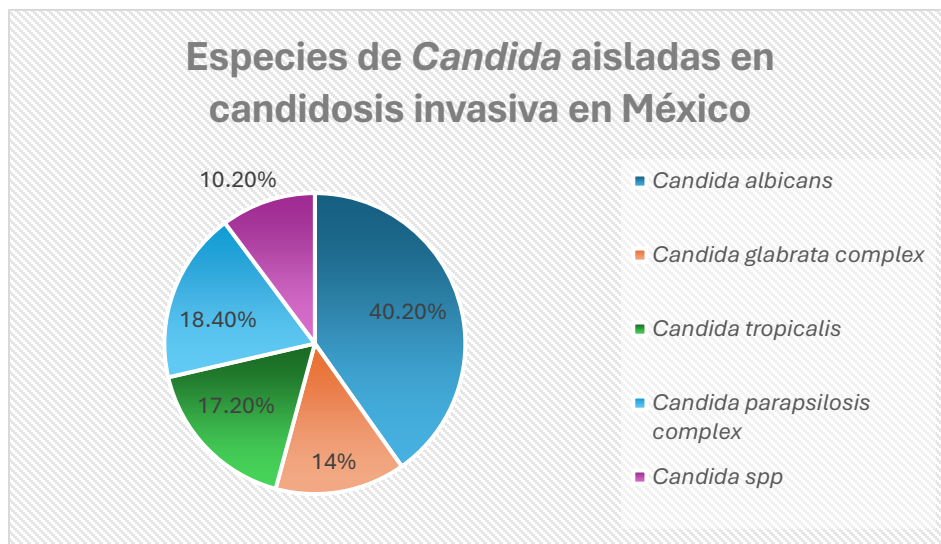


Figura 2 Especies de *Candida* aisladas con mayor frecuencia en candidosis invasivas en México. Tomado y adaptado de Reyes et al., 2017

Recientemente las infecciones por *Candida* en el país han tomado importancia en el ambiente hospitalario, en el año 2024 la Red Hospitalaria de Vigilancia epidemiológica (RHoVE) ha describió que *C. albicans* y *C. tropicalis* se encuentran entre los primeros 15 microorganismos aislados en casos de infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS) (DGE, 2024).

1.2. Características del género *Candida*

Las especies del género *Candida* tienen una distribución geográfica mundial, esto debido principalmente a que su principal hospedero es el ser humano y algunos otros animales homeotérmicos, presentándose en el organismo desde los primeros días posteriores al nacimiento en sitios anatómicos tales como el intestino grueso, intestino delgado, mucosas genitales, y vías respiratorias superiores, por lo cual se le ha considerado como parte de la microbiota (Trujillo *et al.*, 2015).

Las levaduras del género *Candida* son consideradas saprobios en distintos sitios anatómicos y generan micosis como microorganismos oportunistas, por lo tanto, se considera que la principal vía de entrada de estas levaduras es mediante la vía endógena, al habitar en el organismo de su hospedero, un conjunto de factores endógenos y la predisposición del hospedero conducen al desarrollo de infecciones (Pemán *et al.*, 2013).

Por otro lado, se describe la vía de entrada exógena a través de un inóculo con una concentración considerable de levaduras, esta vía de infección se ha descrito principalmente a nivel hospitalario con el uso de dispositivos médicos como catéteres, sondas, y jeringas (Trujillo *et al.*, 2015).

Así mismo, las especies de *Candida* poseen una amplia capacidad de adaptación a diferentes hábitats dentro del organismo humano, lo que amplía considerablemente las formas de candidosis que puede generar, esta habilidad proviene de los diversos factores de virulencia que posee *Candida* que favorecen el desarrollo de infecciones bajo las condiciones idóneas (Polke *et al.*, 2015).

1.2.1 Características fenotípicas

Las levaduras del género *Candida* comprenden un amplio número de especies, con morfologías diversas tanto microscópicas como macroscópicas. Bajo condiciones de crecimiento estándar en agar dextrosa Sabouraud las especies de *Candida* desarrollan colonias de color entre crema, siendo la principal variación por especie la textura y aspecto de las colonias ya que estas pueden ser suaves, brillantes, y también no brillosas, secas o rugosas. Microscópicamente crecen como

blastoconidios, células esféricas u ovals cuyas medidas de ancho se encuentre entre 2-6 μm y el largo entre 3-10 μm dependiendo de la especie (Silva *et al.*,2012).

Algunas especies, desarrollan las formas filamentosas de hifas verdaderas y pseudohifas, las cuales que diferencian entre sí por su génesis. Las hifas verdaderas se forman de levaduras a partir de una proyección conocida como tubo germinal que se elonga y ramifica, con la presencia de septos que permiten su división en unidades fúngicas separadas (Silva *et al.*, 2012).

Por otra parte, las pseudohifas se forman de blastoconidios mediante gemación, donde el crecimiento fúngico de las células hijas permanece adherido a la célula madre, elongándose y formando filamentos con la presencia de constricciones en las uniones celulares sin presentar septos entre cada estructura (Silva *et al.*, 2012).

Entre las especies del género, *C. albicans* y *C. dubliniensis* se consideran polimórficas al presentar blastoconidios, hifas verdaderas y pseudohifas, mientras que el resto de las especies forman blastoconidios y ocasionalmente pseudohifas. Estas características morfológicas, así como la capacidad de formar tubos germinales se consideran útiles en la caracterización de las especies y su identificación (Silva *et al.*, 2012).

Candida albicans

La especie *C. albicans* es una levadura diploide (Sachivkina *et al.*,2021) cuya morfología de blastoconidios tiene un tamaño ente 4-6 por 6-10 μm y una forma ovoide. Es polimórfica ya que presenta la estructura de hifas y pseudohifas (Silva *et al.*, 2012). Bajo condiciones de crecimiento desfavorables desarrollan la estructura morfológica de clamidoconidios (Panizo *et al.*, 2001).

Su morfología macroscópica en medios convencionales como el agar Sabouraud expresa colonias blanquecinas, lisas o rugosas mientras que en agar Biggy se observan colonias de color café oscuro y en agares especializados como el agar cromogénico, se observa el crecimiento de colonias de color verde azulado (Trujillo *et al.*, 2015).

Como auxiliar en la caracterización de esta levadura, se han descrito sus patrones de oxidación y fermentación de diversos carbohidratos (Lobaina *et al.*, 2010) destacándose su capacidad de fermentar y oxidar glucosa, galactosa y manosa y una incapacidad de metabolizar lactosa y rafinosa por ambas vías metabólicas (Trujillo *et al.*, 2015).

Candida glabrata

C.glabrata es una levadura con genoma haploide que se desarrolla morfológicamente como blastoconidios en la mayoría de los aislados, con un tamaño entre 1 - 4 μm (Silva *et al.*, 2012). Menos frecuente se ha descrito la morfología filamentosa de pseudohifas (Srikantha *et al.*,2003).

La morfología macroscópica de esta especie es casi indistinguible de las colonias de otras especies del género en medios habituales como sabouraud, ya que son color crema, lisas y brillante, aunque suelen desarrollar colonias de menor diámetro que otras especies. (Silva *et al.*,2012) Por otra parte, el desarrollo de esta especie en medio cromogénico se caracteriza por desarrollar colonias de tonos morados, lo que permite una distinción de otras especies (Trujillo *et al.*, 2015).

En lo que respecta a sus características metabólicas, *C. glabrata* es capaz de metabolizar por vía aerobia y anaerobia carbohidratos como glucosa y trealosa (Silva *et al.*,2012) pero es incapaz de hacerlo por ambas vías para el caso de la galactosa, manosa, sacarosa, lactosa y rafinosa (Trujillo *et al.*,2015).

Candida tropicalis

Las levaduras de *C. tropicalis* tienen genoma diploide y son dimórficas, ya que presentan morfología de blastoconidios y de la estructura filamentosa de pseudohifas, aunque con menor frecuencia, se ha descrito que también es capaz de formar hifas verdaderas (Ann-Chai *et al.*, 2010).

Su morfología microscópica en agares convencionales muestra colonias blanquecinas, opacas, suaves, lisas y cremosas y en algunos casos de aspecto rugoso, mientras que en medios cromogénicos desarrollan un distintivo color azul metálico (Ann-Chai *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2012).

Dentro de sus características metabólicas más distintivas encontramos su capacidad de metabolizar por vía aerobia y anaerobia carbohidratos como la glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa y manosa. En contraste, esta especie es incapaz de metabolizar carbohidratos como lactosa y rafinosa (Trujillo *et al.*,2015; Silva *et al.*, 2012)

A continuación, la tabla 1 resume las principales características fenotípicas de las tres especies *Candida* mencionadas, así como de la estructura de su genoma.

Tabla 1 Resumen de las características fenotípicas y del genoma de C. albicans, C. tropicalis y C. glabrata.

	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C.glabrata</i>
Genoma	Diploide	Diploide	Haploide
Ancho de blastoconidios (μm)	4 - 6	4 - 8	1
Largo de blastoconidios (μm)	6 -10	5 -10	4

Formación de hifas verdaderas	+	±	-
Formación de pseudohifas	+	+	±
Formación de tubo germinal	+	-	-
Formación de clamidoconidios	+	-	-
Color de las colonias en agar cromogénico	Verde	Azul metálico	Morado

1.2.2 Patogenia

Las especies de *Candida*, son saprobios en distintos sitios anatómicos de su hospedero, diversos factores se ven involucrados en la patogénesis de este microorganismo incluyendo la presencia de diversos reguladores transcripcionales, su capacidad de generar cambios morfológicos y fenotípicos, la formación de biopelículas, la presencia de hidrolasas, proteasas y enzimas citolíticas, así como su flexibilidad metabólica, adhesinas e invasinas, resistencia a antifúngicos y una serie de mecanismos adaptativos a fluctuaciones de pH, disponibilidad de nutrientes y temperaturas, en conjunto con su capacidad de agregarse con la microbiota residente del sitio anatómico y evadir la respuesta inmunológica del hospedero, se consideran como los mayores determinantes patogénicos para este género de levaduras, ya que permiten su supervivencia y adaptación dentro de su hospedero (Mba *et al.*,2020).

Generalmente, la patogénesis inicia con la adhesión de las levaduras a las células epiteliales y la consiguiente colonización del tejido, presentando una micosis superficial, a continuación, ocurre la invasión del epitelio, principalmente por la forma filamentosa, posterior a este proceso se puede presentar la diseminación vascular y la colonización endotelial. Las formas de candidosis diseminada surgen principalmente cuando *Candida* ha evadido la respuesta del sistema inmunológico y logra penetrar el tejido vascular e ingresar al torrente sanguíneo, aunque también se han observado al ingresar un inóculo considerable de microorganismos, principalmente mediante el uso de dispositivos médicos como catéteres y sondas (Mba *et al.*,2020).

1.2.2.1 Adhesión

Uno de los primeros pasos para potenciar la formación de hifas, reconocidas como la estructura patógena de estas levaduras, es el anclaje a las células epiteliales, por lo que tiene un papel crucial en este proceso de patogénesis, de igual forma las adhesinas implicadas en este primer reconocimiento celular participan también en la construcción de la primera capa de las biopelículas (Polke *et al.*,2015).

Previo a la interacción entre el epitelio y *Candida* mediada por receptores, factores del medio como los cambios de temperatura, disponibilidad de nutrientes, estrés oxidativo, estrés osmótico y pH son sondeados por la levadura y estos activan las vías de señalización de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), vías basadas en AMP cíclico y señales de transducción Rim101 entre otras, que en consecuencia inducen la expresión de genes asociados al cambio morfológico de blastoconidios a hifas o bien de hifa a blastoconidios (Mba *et al.*,2020).

El proceso de adhesión inicia con la interacción de las adhesinas con los receptores de las células del epitelio del hospedero, sin embargo, se ha descrito que se puede generar endocitosis inducida, regulada por la interacción del receptor del factor de crecimiento epidérmico en las células epiteliales (EGFR/HER2) con las proteínas celulares Als3p y Ssa1p de las levaduras de *Candida*. (Mba *et al.*,2020).

Dentro de las primeras horas posteriores al contacto inicial con el epitelio, se puede generar la endocitosis inducida, en conjunto con la interacción de los receptores celulares de E-cadherina con las invasinas del microorganismo, se produce una modificación en la actina del citoesqueleto que permite ingresar por endocitosis a la levadura. (Mba *et al.*,2020).

Las principales adhesinas implicadas en el proceso de adhesión de *Candida* a las células del epitelio en su hospedero incluyen:

- **Hwp-1p:** La proteína de pared hifal, es la principal proteína expresada en el tubo germinal y superficie de las hifas en las especies de *Candida*, la cual es un sustrato para las transglutaminasas y esto lleva a generar un enlace covalente entre la levadura y las células hospederas, permitiendo así la adhesión con células de la mucosa. Aunque también se ven implicadas en la agregación celular y la formación de biopelículas en superficies no biológicas (Abastabar *et al.*, 2016; Polke *et al.*, 2015).
- **Als1p, Als3p y Als5p:** Son parte de una familia de proteínas asociadas a hifas que tienen un anclaje de glicofosfatidilinositol, una región similar a tallo que es rica en serina y treonina, secuencias repetitivas en tándem y una región N-terminal que, en conjunto, brindan propiedades adhesivas (Polke *et al.*, 2015). Estas glicoproteínas median la adherencia y floculación a células endoteliales *in vitro* (Fu *et al.*, 2002). Además, tienen capacidad de adhesión a diversas proteínas, péptidos y otras moléculas (Polke *et al.*,2015) como es el caso de la adhesión de la levadura a matriz extracelular y la agregación célula-célula para formar microcolonias (Klotz *et al.*, 2004).

Se considera a Als3 y Hwp1 las adhesinas más importantes en el proceso ya que en estudios donde se trabajó con mutantes de *Candida*, se encontró que ante una disminución considerable de estas adhesinas (-70%) las levaduras fueron incapaces de adherirse a las células huésped y de producir hifas (Wächtler *et al.*, 2011).

1.2.2.2 Transición morfológica

Uno de los factores implicados en el inicio del desarrollo de candidosis es la transición morfológica, ya que cambia de blastoconidios, a la forma filamentosa de hifas, lo que ocurre posterior a la adhesión con el epitelio y una serie de vías de señalización que desencadenan el cambio morfológico que permite una posterior penetración en los tejidos del hospedero a través de la secreción de enzimas extracelulares (Mba *et al.*, 2020).

Esta característica hace referencia a la capacidad de estas levaduras de cambiar su morfología de blastoconidio a pseudohifa e hifa de acuerdo con los cambios ambientales que experimente (Trujillo *et al.*, 2015). El cambio observado va de una estructura redonda u ovoide a una forma filamentosa y elongada que otorga mayor virulencia. Los blastoconidios se asocian con la forma comensal de *Candida*, sin embargo, favorecen la diseminación al adherirse a las células endoteliales, mientras que la forma de hifas se asocia más a la invasión celular (De la Calle *et al.*, 2012). Lo anterior ha sido confirmado por diversos estudios, en los que se ha encontrado que las cepas que carecen de forma filamentosa manifiestan una disminución considerable de su virulencia (Mba *et al.*, 2020).

Las hifas tienen mayor capacidad de penetrar las membranas mucosas y por tanto pueden invadir fácilmente los tejidos e incluso llegar al torrente sanguíneo, lo que facilita infecciones como la candidemia. Actualmente se tiene reportado que solo las especies *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* y *C. auris* son formadoras de hifas, lo que puede relacionarse con la frecuencia en la que estas especies generan candidosis diseminada (Mba *et al.*, 2020).

La formación de hifas depende de condiciones adversas en el ambiente, tales como los incrementos de temperatura, pH neutro, escases de nutrientes, cambios en las concentraciones de CO₂ y O₂ (Polke *et al.*, 2015). La formación de esta estructura filamentosa también se ve influenciada por moléculas como inhibidores del ciclo celular, moléculas de señalización, eicosanoides, péptidos, proteínas y diversos ácidos grasos, los cuales pueden proceder propiamente de la levadura o bien ser parte del ambiente en el hospedero (Shareck *et al.*, 2011).

Se ha descrito a detalle un mecanismo de inducción de la formación de hifas en respuesta a los cambios de temperatura, implicando la represión de Nrg1, y la

expresión de los genes asociados a hifas (HAGs). Posteriormente se une el factor transcripcional Brg1 en esta región y recluta una histona desacetilasa (Hda1), desencadenando la transición a la forma filamentosa (Lu *et al.*, 2011). Sin embargo, también se han identificado, aunque no descrito ampliamente, al menos otros 2 mecanismos independiente de Brg1 y Hda1 basados en sensores de O₂ y CO₂ (Polke *et al.*,2015).

1.2.2.3 Enzimas

Existen diversas enzimas producidas por las diferentes especies de *Candida* que están consideradas como factores de virulencia, ya que permiten la degradación de componentes extracelulares y por lo tanto favorecen la supervivencia e invasión de las levaduras.

- **Hemolisinas**

Al tener requerimientos nutricionales de hierro y no encontrarse este mineral de forma libre en el organismo de los hospederos, una de las estrategias desarrolladas para su obtención consiste en la lisis de la hemoglobina, una proteína transportadora que contiene hierro.

Se ha demostrado que las especies de *Candida* son productoras de una hemólisis completa (beta-hemólisis). La producción de estas enzimas facilita la supervivencia del microorganismo al facilitar la adquisición de nutrientes, y la invasión hifal en candidosis diseminada (Mba *et al.*,2020).

- **Fosfolipasas**

Estas fosfolipasas catalizan la degradación de los fosfolípidos de membrana en ácidos grasos y otras sustancias lipofílicas al romper los enlaces éster, permitiendo la penetración y lisis celular. Esta característica se ha considerado como un criterio para diferenciar a las especies invasivas de las no invasivas.

Las diferentes especies de *Candida* poseen un número distinto de genes codificantes para diversos tipos de fosfolipasas y cada especie expresa una actividad enzimática distinta, entre las especies *C. albicans* se destaca por poseer genes codificantes para 6 tipos distintos de fosfolipasas y por poseer una alta producción de estas enzimas. En contraste, otras especies no *albicans* muestran una actividad baja de fosfolipasas baja (Mba *et al.*,2020).

- **Aspartil proteinasa secretora (SAP)**

La producción de esta enzima permite incrementar la colonización y penetración en los tejidos al degradar los tejidos del hospedero, es esencial

para la formación de hifas y brinda protección contra el sistema inmune. La producción de SAP se ha reportado en cepas de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. dubliniensis* (Naglik *et al.*,2003).

Esta enzima favorece la adherencia a los tejidos del hospedero, la degradación de sus proteínas, potencia la diseminación, la formación de biopelículas y del cambio fenotípico. Además, protege a la levadura de la respuesta inmunológica de su hospedero al degradar componentes del complemento, citocinas e inmunoglobulinas (Mba *et al.*,2020).

- **Lipasas**

Estas enzimas facilitan la degradación lipídica que incrementa la asimilación de nutrientes, cataliza la hidrólisis de los enlaces éster en los triglicéridos, permitiendo la liberación de ácidos grasos y glicerol y favoreciendo la asimilación de nutrientes para la levadura, potenciado su adherencia a los tejidos del hospedero y promoviendo la invasión de los tejidos, además de interactuar con otras enzimas para favorecer la señalización celular y la penetración de partículas infecciosas. La enzima se reportó primeramente en *C. albicans*, pero se ha demostrado la presencia de genes codificadores para lipasas ortólogas en *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* (Mba *et al.*,2020).

- **Proteína citolítica (Candidalisina)**

La candidalisina es un péptido con actividad de toxina citolítica, producida por *C. albicans* y otras especies que tiene la capacidad de incrementar la permeabilidad y facilitar la lisis celular del epitelio del hospedero, y se ha demostrado que es esencial para el desarrollo de infecciones sistémicas. (Mba *et al.*,2020).

1.2.2.4 Adaptación al pH

Las levaduras del género *Candida* tienen una capacidad de adaptarse a una variedad de medios en el organismo del hospedero, tolerando de mejor manera los cambios de pH, la principal afectación producida por las variaciones de pH es la reducción en las funciones de sus proteínas y la asimilación de nutrientes. Por lo tanto, la regulación del pH es vital para regular la fisiología de las levaduras. La regulación es concedida por los genes PHR1 y PHR2, cuya activación es dependiente de pH (Trujillo *et al.*, 2015; Mba *et al.*,2020)

Los cambios en el pH son censados por los receptores de membrana Dfg16 y Rim21 que activan cascadas de señalización que activan la transcripción de Rim101. La adaptación al pH requiere de dos β -glicosidasas de la pared celular que son funcionalmente redundantes, PHR1 y PHR2 (Polke *et al.*,2015)

PHR1 se activa en condiciones de pH cercanas al neutro y se inactiva en condiciones ácidas, este gen codifica una glicoproteína de superficie celular con anclaje a membrana por moléculas de glicosilfosfatidilinositol (GPI) que se ha considerado clave en los procesos de morfogénesis de *Candida* (Saporito *et al.*, 1995).

Por otra parte, PHR2 se activa en condiciones de pH ácido, por lo que es considerado un homólogo funcional del gen PHR1 con funcionalidad en condiciones inversas, es decir, se expresa en condiciones pH ácidas (Mühlschlegel *et al.*,1997).

1.2.2.5 Proteínas de choque térmico

Las especies de *Candida* usualmente se establecen en nichos con temperaturas estables, sin embargo, las respuestas funcionales al choque térmico se han mantenido en estos organismos, dichas respuestas son inducidas por factores de estrés que tienen como resultado el mal plegamiento de las proteínas y la agregación no específica de las mismas, concluyendo en la muerte celular de la levadura. (Polke *et al.*,2015). En la mayoría de los casos, las proteínas de choque térmico (Hsps) se inducen en respuesta al estrés térmico y oxidativo, deficiencias nutricionales, variaciones en la presión osmótica y el estrés generado por cambios en el pH, posteriormente interactúan en diversas vías de señalización que le permiten regular diversas actividades celulares (Mba *et al.*,2020).

La función de estas proteínas es actuar como chaperonas moleculares, reconocen y se unen con polipéptidos nacientes y proteínas parcialmente plegadas, lo que previene su agregación y mal plegamiento (Mba *et al.*,2020).

Dentro de las proteínas de choque térmico, se considera dentro de las más relevantes a Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp12 y Hsp21 ya que se ven involucradas en una amplia variedad de funciones que incluyen la tolerancia térmica, regulación del ciclo celular, transición morfológica, incremento de la adherencia celular, control de la homeostasis, formación de biopelículas e intervención contra la respuesta inmunológica (Mba *et al.*,2020).

1.2.2.6 Formación de biopelículas

La formación de biofilms o biopelículas es un factor de virulencia que se asocia a la mayoría de las infecciones producidas por *Candida*, potencializa el proceso de adhesión, la formación de hifas y la penetración de las levaduras, además de proveer protección en contra de la respuesta inmunológica del hospedero. Sin embargo, la formación de estas biopelículas no se da únicamente dentro del

organismo sino también en superficies abióticas (Mba *et al.*,2020), como suelen ser los dispositivos médicos dentro de los entornos hospitalarios, por lo cual se asocian a las infecciones relacionadas con la atención de la salud.

La eficiencia en la formación de biofilms depende de muchos factores, de la textura de la superficie, las condiciones del microambiente, la disponibilidad de oxígeno, el pH del entorno, niveles de CO₂ y la habilidad intrínseca de la levadura para desarrollarlos (Polke *et al.*, 2015).

El proceso de formación de las biopelículas es largo y requiere de múltiples fases, primeramente se requiere de la adhesión de las células a una superficie, mediado por adhesinas, principalmente Als3 y Hwp1, las células adheridas comienzan a proliferarse y a adherirse entre sí, la biopelícula comienza a crecer y madurar, formando hifas y pseudohifas que en conjunto con la secreción de una matriz extracelular por parte de las células asociadas a la biopelícula para finalmente liberar levaduras que permitan formar nuevos biofilms, tal como se ilustra en la figura 3, donde se esquematiza el ciclo de formación de biopelículas en levaduras de *Candida* (Mba *et al.*,2020).

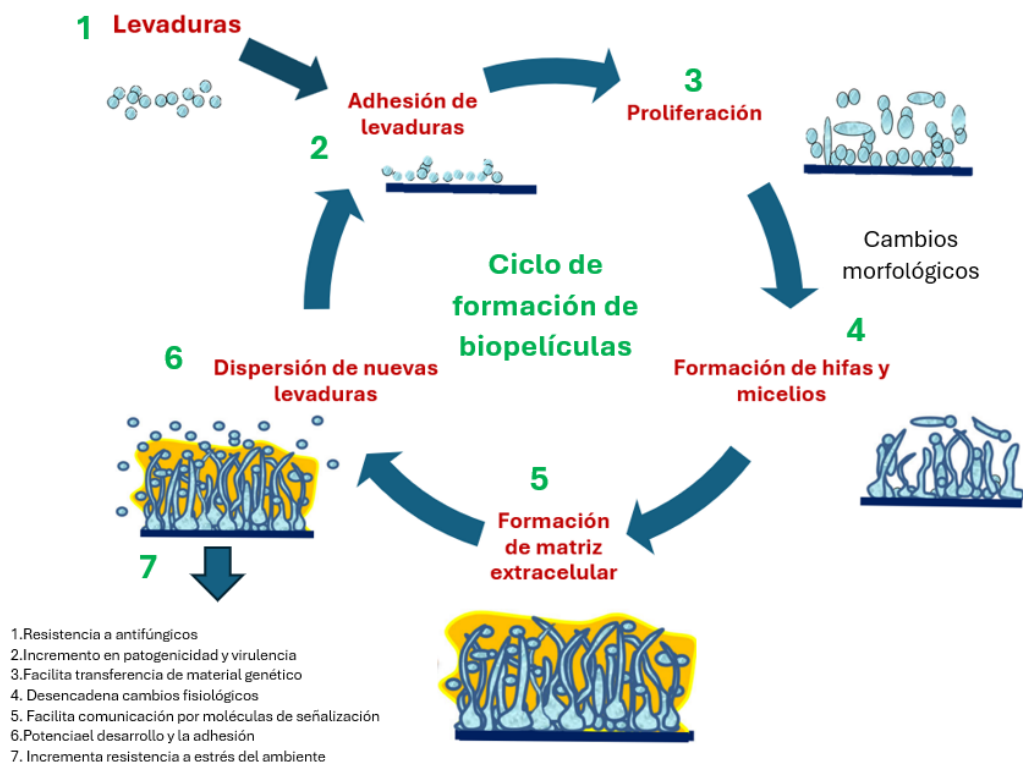


Figura 3 Ciclo de formación de biopelículas en especies de *Candida*. Tomado y adaptado de Mba *et al.*, 2020.

1.2.2.7 Cambio fenotípico

El término de “cambio fenotípico” fue definido por primera vez en 1985 y se describió como la capacidad de especies de *Candida* para generar transiciones espontáneas entre un cierto número de colonias, siendo la transición de blanco a opaco, la transición morfológica más estudiada en la que se describen cambios macroscópicos como la aparición de colonias lisas y rugosas, así como cambios en su antigenicidad (Polke *et al.*,2015; Soll *et al.*,2014; Trujillo *et al.*,2015).

El cambio fenotípico de blanco-opaco, descrito en las especies de *C. albicans* y *C. tropicalis*, influencia su virulencia y patogénesis, además de que les ha permitido evadir el reconocimiento celular dependiendo del microambiente y alterar las interacciones hospedero-patógeno (Mba *et al.*,2020).

Estudios han demostrado que los fenotipos opacos son menos virulentos que los fenotipos blancos, sin embargo, los fenotipos blancos son los que se diseminan más fácilmente y colonizan mejor en su ambiente (Mba *et al.*,2020). Así mismo, la transición de blanco a opaco facilita el apareamiento de las levaduras, esto debido a que las células opacas tienen la capacidad de realizar apareamiento competente con una frecuencia alrededor de 10^6 veces mayor respecto a las células blancas. (Miller *et al.*,2002)

Desde hace algunos años se tiene descrito que el proceso de cambio fenotípico es heredable, espontáneo y reversible. De igual forma se tienen reportadas las diferencias morfológicas microscópicas y macroscópicas entre las células blancas y opacas. Por una parte, las células blancas tienen una morfológica microscópica redonda u ovoide y sus colonias en medios sólidos convencionales se observan blancas, brillantes y elevadas. Por el contrario, las células opacas se observan al microscopio con morfología alargada y pequeñas vacuolas en su interior, además de doblar en tamaño a las células blancas, tal como se muestra en la figura 4 (Soll *et al.*,1987).

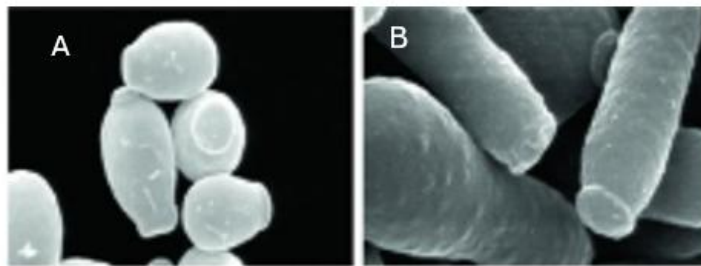


Figura 4 Morfología microscópica de células blancas (A) y células opacas (B) de levaduras del género *Candida*. Tomado y adaptado de Morschhäuser *et al.*,2010.

Regulación del Cambio fenotípico blanco- opaco

Este proceso está mayormente controlado por el regulador blanco-opaco (WOR1) que codifica un factor de transcripción, generalmente el fenotipo base de las levaduras de *Candida* es el fenotipo blanco (Mba *et al.*, 2020; Bennet *et al.*, 2003). En las células blancas encontramos un represor transcripcional $\alpha 1$ - $\alpha 2$ sobre WOR1, el cual está conformado por un heterodímero formado por proteínas $\alpha 1$, codificadas por MTL α y $\alpha 2$, codificadas por MTL α y que impide el cambio del fenotipo blanco al opaco (Miller *et al.*, 2002), esta característica se ha señalado como un mecanismo de *Candida* para cambiar de un estadio de comensal al de patógeno oportunista. Se debe destacar que diversos factores, incluyendo las configuraciones genéticas de los locus de apareamiento (MTL) influyen la regulación de estos cambios fenotípicos (Mba *et al.*, 2020).

A pesar de que Wor1 se considera el principal regulador al actuar sobre WOR1, también se une a los promotores de otros factores de transcripción como Efg1, Czf1 y Wor2 controlando su expresión. Efg1 actúa como un regulador negativo del cambio blanco a opaco, se ha demostrado que la delección del gen *EFG1* inhibe la fase opaca en cepas de *C. albicans* mientras que su sobreexpresión se asocia al cambio del fenotipo opaco al blanco. Por otra parte, se ha identificado el papel del gen *CZF1* como un inhibidor de la expresión de *EFG1* y *WOR2*, los cuales son esenciales para el cambio al fenotipo opaco y mantenerlo. (Domínguez, 2018)

En la mayoría de los casos, las levaduras de *Candida* que tienen la capacidad de realizar este cambio, son heterocigotas del tipo MTL α /MTL α y expresan el represor $\alpha 1$ - $\alpha 2$ que impide el cambio a células opacas, pero bajo circunstancias como la pérdida completa del cromosoma 5, la recombinación mitótica o una duplicación del cromosoma homólogo 5 pueden convertirse en homocigotas MTL α /MTL α ó MTL α /MTL α que carecen de la expresión del represor $\alpha 1$ - $\alpha 2$ y permiten la expresión de WOR1 para realizar el cambio fenotípico de blanco a opaco (Wu *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2005; Domínguez, 2018). Ver figura 5.

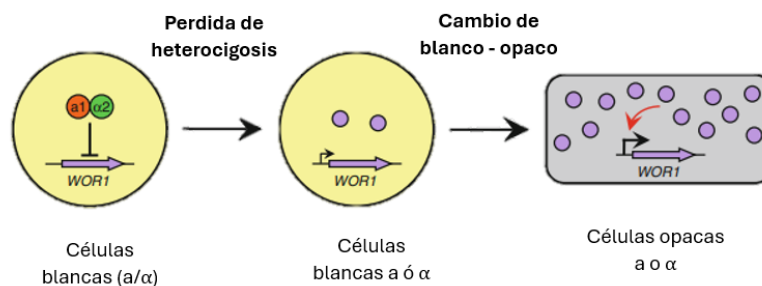


Figura 5 Regulación del cambio fenotípico de blanco a opaco. Tomado y adaptado de Domínguez, 2018

Una de las principales implicaciones del cambio de blanco a opaco, es la modificación en la capacidad de realizar apareamiento competente, el apareamiento se puede dar únicamente entre una célula opaca a y una célula opaca α , como primer paso de este proceso, se requiere la pérdida de un alelo MTLa o MTL α para obtener una célula homocigota de tipo MTLa o MTL α que llevará a cabo el cambio de blanco a opaco, con este cambio las células opacas liberan feromonas que son detectadas por células opacas con el genotipo opuesto para su apareamiento, iniciando la producción de filamentos sexuales y el consiguiente apareamiento. Ver figura 6. (Noble *et al.*, 2017). Como resultado del apareamiento se obtienen células tetraploides que expresan el represor a1- α 2 y son capaces de revertir el fenotipo a la fase blanca. (Bennett *et al.*, 2003)

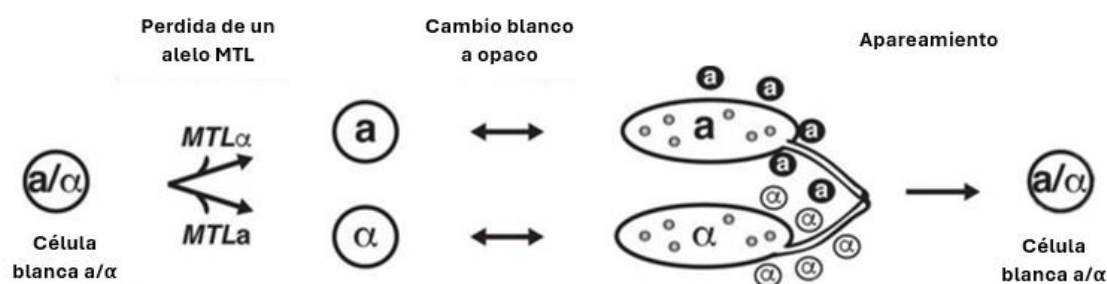


Figura 6 Proceso de apareamiento entre células opacas a y α en especies de *Candida*, Tomado y adaptado de Noble *et al.*, 2017.

Si bien el cambio fenotípico de blanco a opaco suele ser el más estudiado en especies como *C. albicans* y *C. tropicalis*, en especies como *C. glabrata* se ha descrito el “core switching” (Srikantha *et al.*, 2005), el cual es un cambio fenotípico reversible y de alta frecuencia que genera colonias blancas (Wh), marrón claro (LB) y marrón oscuro (DB) que son distinguibles entre sí en agar indicador con 1 mM de CuSO_4 , ilustradas en la figura 7 (Lachke *et al.*, 2000).

Este cambio fenotípico se asocia a cambios en la transcripción de genes de metalotioneína (MT-II) y un gen similar a la hemolisina (HLP), se ha descrito que los fenotipos blancos tienen transcriben en menor proporción MT-II y HLP respecto a los fenotipos marrón claro y marrón oscuro, siendo el fenotipo marrón oscuro el que transcribe en mayor proporción ambos genes (Lachke *et al.*, 2000).

Si bien no se cuenta con extensos estudios sobre este cambio fenotípico en *C. glabrata*, se plantea que al igual que el cambio fenotípico en *C. albicans*, este cambio les proporciona a las levaduras la plasticidad fenotípica necesaria para adaptarse rápidamente a la fisiología variable dentro de su hospedero, a los

tratamientos antifúngicos y la respuesta inmunológica del hospedero al regular genes involucrados la patogénesis (Lachke *et al.*, 2000).

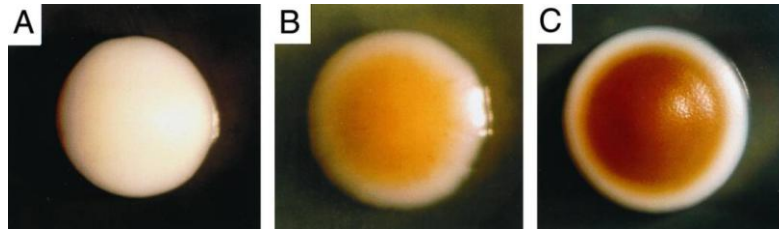


Figura 7 Fenotipos de "core switching" de *C. glabrata*. (A) Blanco. (B) Marrón claro. (C) Marrón oscuro. Tomado y adaptado de Lackle *et al.*, 2000

1.3 Locus MTL

Dentro de los hongos, aquellos que cuentan con un ciclo de reproducción sexual contienen la información genética que regula este proceso dentro del locus genético de apareamiento (MAT), el principal microorganismo en el que encontramos descrito este locus es en *Saccharomyces cerevisiae*, un microorganismo haploide en el que se describen genes de tipo α y tipo α que codifican para reguladores transcripcionales, particularmente los tres tipos celulares asociados al ciclo sexual (Hull *et al.*, 1999).

En *S. cerevisiae*, para los haploides MAT α , no hay una función conocida del producto del gen MAT α 1, pero en el caso del haploide MAT α , Mat α 1 actúa como activador para genes específicos de tipo α , mientras que Mat α 2 puede inhibir genes de apareamiento específicos. En la forma diploide, tanto MAT α /MAT α se encuentran presentes y las proteínas que codifican conforman un heterodímero que tiene como función reprimir genes específicos del estadio haploide (Rustad *et al.*, 2002).

La reproducción sexual de los hongos regulada por los genes del locus MAT, resulta clave para la recombinación genética debido a que se favorece la adaptación y supervivencia de los microorganismos en su entorno (Núñez, 2016).

Actualmente, no se ha descrito en ninguna especie del género *Candida* un ciclo sexual o de formación de esporas (Rustad *et al.*, 2006) sin embargo, si se ha descrito el locus de apareamiento "Mating-Type-Like (MTL)" en diversas especies del género, considerando que estas levaduras han tomado amplia relevancia como causantes de micosis humanas, un ciclo de apareamiento les proporciona características que favorecen su adaptación a su entorno, por lo que se destaca la importancia de estudiar el locus MTL en estas levaduras.

Candida albicans* y *Candida tropicalis

En *C. albicans* hay genes homólogos a los que se encuentran en el locus MAT de *S. cerevisiae*, con la diferencia de que en *C. albicans* se encuentran dos copias de dicha información dado que es un organismo diploide (Salas, 2008). Dentro de este grupo de genes, se incluyen homólogos de reguladores transcripcionales en los genes de apareamiento clave, como lo son MATa1, MAT α 1 y MAT α 2, los cuales se localizan en el mismo locus de apareamiento (Rustad, *et al* ,2006). De igual manera, *C. tropicalis* posee una estructura genómica similar a la de *C. albicans* en el locus de apareamiento MTL (Porman *et al.*, 2013).

Recapitulando, el cambio fenotípico de blanco a opaco permite la formación de células opacas, las cuales son las que poseen la capacidad de llevar cabo el apareamiento de forma eficaz (Porman *et al.*,2013), por lo que existe una estrecha relación entre el locus MTL y el cambio fenotípico en estas especies de *Candida*. En estas especies, el locus MTL contiene los genes homólogos al MATa1, MAT α 1 and MAT α 2 de *S. cerevisiae*, con el mismo arreglo genético, sin embargo, en *C. albicans* y *C. tropicalis* encontramos también genes únicos del locus de apareamiento que incluyen una Proteína de Unión a Oxisterol (OBP), una Polimerasa Poli(A) (PAP) y una Fosfoinositol Quinasa (PIK), representados en la figura 8 (Rustad *et al.*,2002).

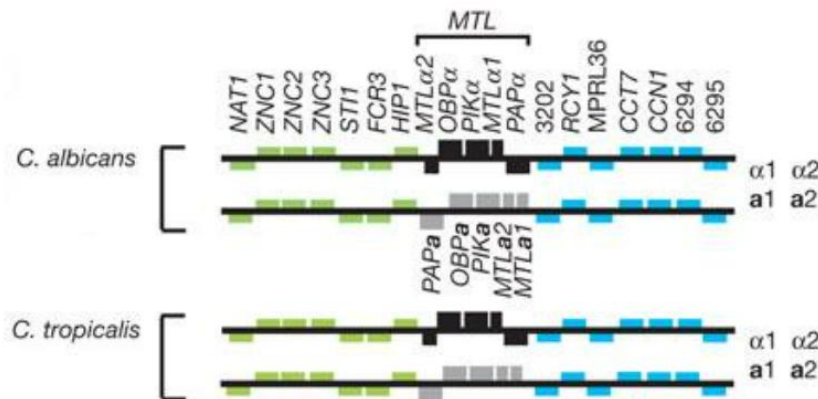


Figura 8 Representación esquemática de los idiomorfos estructurales del locus MTL en *C. albicans* y *C. tropicalis*. Tomado y adaptado de Domínguez, 2018.

En el modelo de *C. albicans*, se ha descrito que los genes contenidos en el locus MTL controlan el cambio blanco-opaco, solo las formas homocigotas a o α pueden transformarse a formas opacas ya que un complejo entre las proteínas de MTLa1 y MTL α 2 bloquea el cambio entre células heterocigotas *a/α* en un proceso de

represión regulado por Wor1, cuya sobreexpresión induce la formación de células opacas (Porman *et al.*,2013).

WOR1 resulta clave en el proceso de apareamiento ya que una vez activo, permanece así durante varias generaciones ya que al producir Wor1, esta actúa sobre su promotor activando su transcripción continua, resultando en la acumulación de esta proteína en las formas opacas, mientras que en las formas blancas se encuentran niveles muy bajos de Wor1 (Salas, 2008).

Los genes de apareamiento que se expresan en el locus MTL también controlan el proceso de cambio fenotípico, para poder llevarse a cabo el apareamiento entre levaduras es necesario primeramente que se haya realizado el cambio fenotípico de blanco a opaco y que la célula sea homocigota en el locus MTL con información de tipo a o de tipo α (Salas, 2008).

A diferencia de las células heterocigotas, los organismos homocigotos tanto para MTL α como para MTL a de *Candida* pueden realizar apareamiento tanto *in vivo* como *in vitro* y en *C. albicans*, la mayoría de los heterocigotos MTL no pueden inducir el cambio blanco-opaco ni realizar un proceso de apareamiento ya que es el estadio opaco el que lo facilita drásticamente y que incrementa la eficiencia del apareamiento (Srikantha *et al.*,2003; Salas, 2008).

Se ha identificado que las cepas homocigotas tienen una ventaja respecto a las cepas heterocigotas, tanto en virulencia como en colonización de tejidos durante un proceso infeccioso, siendo esto parte de lo que permite una colonización en diversos tejidos (Salas, 2008).

En estudios sobre *C. tropicalis* se ha demostrado que, aunque el cambio blanco-opaco también regula el proceso de apareamiento, existen diferencias en la eficiencia de apareamiento respecto a *C. albicans*. Por una parte, las células opacas en *C. albicans* se aparean hasta un millón de veces más que las blancas, mientras que en *C. tropicalis* las formas opacas se aparean apenas unas cien veces más que las formas blancas (Porman *et al.*, 2013).

Otro aspecto relevante de este locus de apareamiento es la asociación con la resistencia a los antifúngicos azoles, esta relación se ha planteado y estudiado debido a que el gen ERG11 que codifica para la enzima diana de los fármacos azólicos se encuentra sobre el mismo cromosoma, el cromosoma 5. Anteriormente se demostró que la recombinación mitótica en ERG11 está asociada con dicha resistencia, y se ha planteado el estudio de los efectos que esta recombinación pudiera tener sobre el locus MTL (Rustad *et al.*,2002).

Se realizaron estudios en los que se reveló que el apareamiento inicial entre cepas competentes (células opacas homocigotas MTL a o MTL α) no generaba mayor

resistencia a fluconazol respecto a las células parentales, sin embargo, después de someter las cepas a tratamiento con antifúngicos y ser analizadas nuevamente, se observó que estas desarrollaron resistencia a dicho tratamiento, lo que sugirió el desarrollo de modificaciones genéticas y se planteó que la progenie de las cepas de *Candida* competentes para realizar apareamiento, pueden desarrollar mayor resistencia antifúngica (Popp *et al.*, 2019).

Candida glabrata

Esta especie de *Candida* es un organismo haploide (Tapia *et al.*, 2008) al cual se le ha descrito la presencia de tres loci ortólogos a los que regulan el apareamiento sexual en *S. cerevisiae*, MTL1, MTL2 y MTL3 (Núñez, 2016).

C. glabrata, también efectúa apareamientos a y α , pero se ha descrito que carece de un cambio fenotípico que resulte en un apareamiento espontáneo sin embargo se sabe que una expresión ectópica del gen OH que codifica una endonucleasa en *S. cerevisiae*, resulta en una mejora en la eficiencia en los cambios de apareamiento y un incremento en su letalidad (Kumar *et al.*, 2019).

C. glabrata al ser un haploide, tiene mayor similitud con la estructura genética de *S. cerevisiae* que con *C. albicans*, aunque comparte mayor número de semejanzas patogénicas con *C. albicans* (Kaplan *et al.*, 2019; Srikantha *et al.*, 2003). En esta levadura no se tiene descrito un ciclo sexual, sin embargo, se ha descrito que contiene genes relacionados con el proceso de apareamiento y meiosis dentro de su locus MTL (Kaplan *et al.*, 2019).

Se ha demostrado que *C. glabrata* tiene 3 loci con genes similares a los de apareamiento, MTL1 y MTL2 se describen con una configuración MTL α 1-MTL α 2 o bien MTL α 1-MTL α 2 con diferentes patrones de expresión y pueden tener información de apareamiento de tipo a o de tipo α . A pesar de tener descritos tres MTL, solo uno de ellos expresa información de tipo de apareamiento (Kaplan *et al.*, 2019).

La estructura y funciones asociadas al locus MTL de *C. glabrata* son similares a las del locus MAT en *S. cerevisiae*, el cual contiene un alelo a1, que codifica un factor de transcripción, además de alelos α 1 y α 2 en células α que codifican un factor de transcripción con un dominio alfa, siendo este locus el equivalente a MTL1 de *C. glabrata* (Kaplan *et al.*, 2019).

Además del alelo a1, *S. cerevisiae* tiene otros dos loci del tipo de apareamiento con información silenciada, las cuales son conocidas como regiones HML y región HMR, ambas poseen alelos con información de tipo a o α ; estas regiones son los homólogos de MTL3 y MTL2 respectivamente en *C. glabrata*. Estas similitudes estructurales se visualizan en la figura 9 (Kaplan *et al.*, 2019).

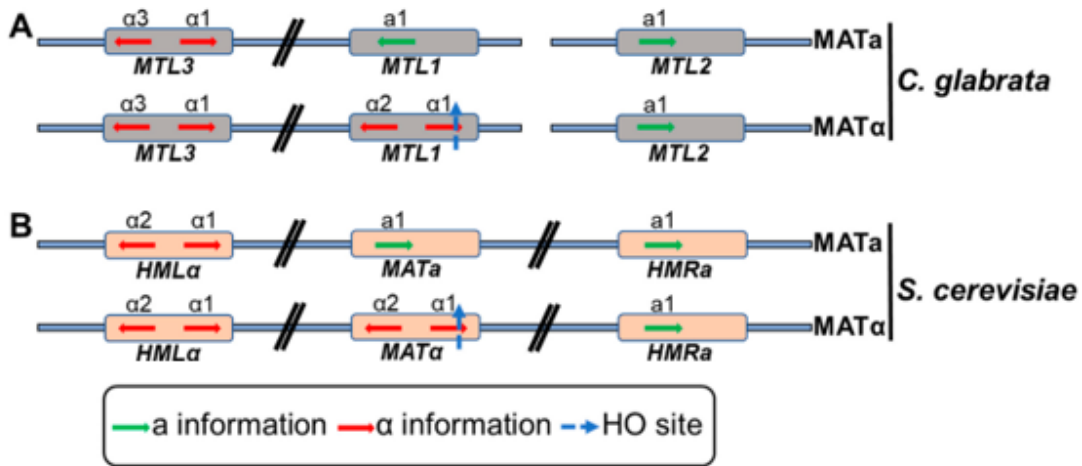


Figura 9 Representación esquemática comparativa de la información genética de *C. glabrata* y *S. cerevisiae* en el locus de apareamiento MTL y MAT, respectivamente. Tomado y adaptado de Kumar *et al.*, 2019.

Dentro del genoma de *C. glabrata*, los MTL1 y MTL3 se localizan dentro del cromosoma B, mientras que el MTL2 se localiza en el cromosoma E. Se ha descrito que en los tres MTL descritos para *C. glabrata* es posible hallar información de tipo **a** y **α**, en contraste con *S. cerevisiae*, solo la información en MTL3 se encuentra silenciada. También se ha planteado la actividad de mecanismos de regulación post transcripcional sobre MTL2, esto debido a que de forma inadvertida ocurre el empalme de intrones durante el procesamiento del ARNm de a1 (Kaplan *et al.*,2019).

Las implicaciones patogénicas de la configuración de la información genética de tipo **a** y de tipo **α** en los loci MTL de *C. glabrata*, se tiene planteado que contienen factores de transcripción que regulan el apareamiento y posiblemente otros procesos importantes en la patogénesis, se ha propuesto que, en este locus, *C. glabrata* regule la expresión de genes involucrados en la resistencia intrínseca de estas levaduras a antifúngicos (Lavaniegos *et al.*,2009).

Para las especies *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*, la información genética asociada a un ciclo parasexual, cambios fenotípicos y meiosis, tal como la que se ha descrito en sus loci MTL, favorece la recombinación genética, brindando a estas levaduras ventajas evolutivas ante la presencia de condiciones de desarrollo adversas (Kaplan *et al.*,2019).

2. Antecedentes

Las infecciones fúngicas en humanos tienen como principal agente causal a las levaduras del género *Candida* (Silva *et al.*, 2012), en su mayoría causadas por la especie *C. albicans* (Trujillo *et al.*, 2015), recientemente se ha notado un incremento en la frecuencia de aislamiento de especies como *C. tropicalis* y *C. glabrata* en muestras clínicas, afectando principalmente a pacientes inmunocomprometidos (Ahmad *et al.*, 2021; Pemán *et al.*, 2013). Esto se refleja en nuestro país al encontrar que dentro de los primeros 15 microorganismos causales de infecciones asociadas a la atención de la salud se encuentran *C. albicans* y *C. tropicalis* (DGE, 2024).

Las especies del género *Candida* poseen una amplia variedad de factores de virulencia, sin embargo, uno de los más relevantes es su capacidad de llevar a cabo un cambio fenotípico, las cepas que realizan este proceso muestran cambios de su forma blanca a opaca, de lo anteriormente mencionado se destaca que las formas opacas pueden realizar un proceso de conjugación eficaz que brinda una mayor variabilidad genética (Porman *et al.*, 2013).

El apareamiento en las especies de *Candida*, se regula por genes expresados en el locus MTL, estos genes también intervienen en el Cambio fenotípico y para que este proceso se lleve a cabo se necesita que la célula sea homocigota en el locus MTL, expresando tipos de apareamiento a o α . Adicionalmente se ha de considerar que a las cepas homocigotas en MTL se les atribuye una mayor virulencia (Salas, 2008). El locus MTL se ha reportado en la estructura genética de *C. albicans* y *C. tropicalis*, mientras que en *C. glabrata* se ha reportado que posee tres loci MTL que son ortólogos a los que regulan el apareamiento sexual en *S. cerevisiae* (Núñez, 2016). En esta especie, su locus MTL1 es el que ha sido señalado como el homólogo a MAT de *S. cerevisiae*, donde se localizan las funciones de apareamiento (Kaplan, *et al.*, 2019).

En el CICM del ICUAP en 2018, Domínguez Domínguez, M. realizó un estudio en el que determinó el locus MTL en cepas de *C. albicans* y *C. tropicalis* a partir de aislados clínicos y comparó la efectividad de diversos inductores para inducir el cambio fenotípico de blanco a opaco, dando un precedente para la realización de este trabajo.

En nuestro país existen pocos estudios relacionados a la investigación del locus MTL en *C. glabrata*, de los existentes, la investigación se centra en poder analizar la relación de la configuración genética de los loci MTL con la resistencia a antifúngicos, lo que resalta la importancia de continuar su estudio.

3. Justificación

En los últimos 40 años se ha observado un incremento persistente en la incidencia de micosis en el humano, causando micosis superficiales, subcutáneas, sistémicas y oportunistas; los hongos aislados con mayor frecuencia de micosis en humanos corresponden a las levaduras del género *Candida*. Las micosis oportunistas son las más frecuentes, esto debido a que la población más susceptible a las infecciones por *Candida* son pacientes inmunocomprometidos, sin embargo, en años recientes se han reportado también casos de candidosis en pacientes considerados inmunocompetentes, lo que levanta importantes preguntas en lo que respecta a la patogenicidad y virulencia de las especies del género *Candida*.

Dentro de las candidosis, la especie aislada con mayor frecuencia es *Candida albicans*, siendo el microorganismo aislado en muestra clínicas hasta en 85% de los casos, sin embargo, en años recientes se ha observado una variación en este comportamiento, aislándose cada vez con mayor frecuencia las especies no albicans (NAC), dentro de las cuales se destacan *Candida tropicalis* y *Candida glabrata* como agentes etiológicos de micosis oportunistas.

Las especies del género *Candida* poseen diversas características patogénicas y factores de virulencia, uno de los más importantes es su capacidad de generar cambios fenotípicos, la información genética que regula estos cambios se encuentra en el locus de apareamiento “mating-type like (MTL)” que es homólogo al locus de apareamiento (MAT) en *Saccharomyces*, responsable del apareamiento sexual fúngico que brinda una mayor variabilidad genética y adaptación al ambiente, lo que en *Candida*, contribuye a incrementar su virulencia.

Considerando los beneficios evolutivos que aporta en *Candida* el apareamiento de sus especies, principalmente el incremento de la virulencia que esto proporciona, este estudio se enfoca en identificar la presencia y configuración genética del locus MTL en *Candida albicans*, *Candida tropicalis* y *Candida glabrata*, frecuentemente aisladas en muestras clínicas, para lo cual se realizará la caracterización fenotípica, genotípica e identificación del locus MTL en aislados clínicos de diversos sitios anatómicos provenientes de diferentes estados del país.

4. Planteamiento del problema

Las levaduras pertenecientes al género *Candida* son microorganismos saprobios de diversos sitios anatómicos en humanos por lo que las infecciones ocasionadas por estas levaduras son en mayor frecuencia oportunistas, afectando a individuos con deficiencias en la respuesta inmunológica, siendo la colonización previa un factor importante para el desarrollo de estas micosis.

A pesar de considerarse un microorganismo oportunista, *Candida* posee diversas características adaptativas que contribuyen a su patogenia y virulencia, particularmente en hospederos inmunocomprometidos. Reflejo de su virulencia y capacidad adaptativa es que en años recientes han surgido cada vez con mayor frecuencia reportes de candidosis en individuos inmunocompetentes, así como el surgimiento de especies multirresistentes a antifúngicos como *Candida auris*.

Dentro de las especies del género *Candida*, *Candida albicans* se ha considerado la más relevante debido a que es la especie más frecuentemente aislada en candidosis, sin embargo, otras especies como *C. glabrata* y *C. tropicalis* han adquirido mayor importancia al verse incrementada su incidencia, lo que da relevancia a su estudio.

Aunado a esto, se debe considerar que el incremento en las infecciones por *Candida*, representa un problema de salud pública que afecta no solo a los pacientes, también repercute en las instituciones de salud al prolongar la estadía hospitalaria y aumentar los costos de atención, en México se tiene reportado a *C. albicans* y *C. tropicalis* dentro de los 14 principales microorganismos causales de infecciones asociadas a la atención de la salud. (IAAS)

Como parte de las características que contribuyen a incrementar la virulencia de *Candida*, se encuentra la información genética contenida en el locus MTL que regula el cambio de blanco a opaco (cambio fenotípico), siendo las células opacas competentes para realizar apareamiento, lo que contribuye al intercambio de información e incremento de variabilidad genética en *Candida*, lo que se plantea puede contribuir a incrementar su virulencia, motivo por el cual el estudio de este locus en las especies *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* cobra relevancia.

Actualmente hay escasos estudios en México sobre el locus MTL en estas tres especies, por lo cual es necesario hacer este estudio a partir de aislados clínicos provenientes de población mexicana, realizando la caracterización fenotípica y genotípica para tener una mejor comprensión de la situación actual del microorganismo y contribuir a su monitoreo epidemiológico.

5.Objetivos

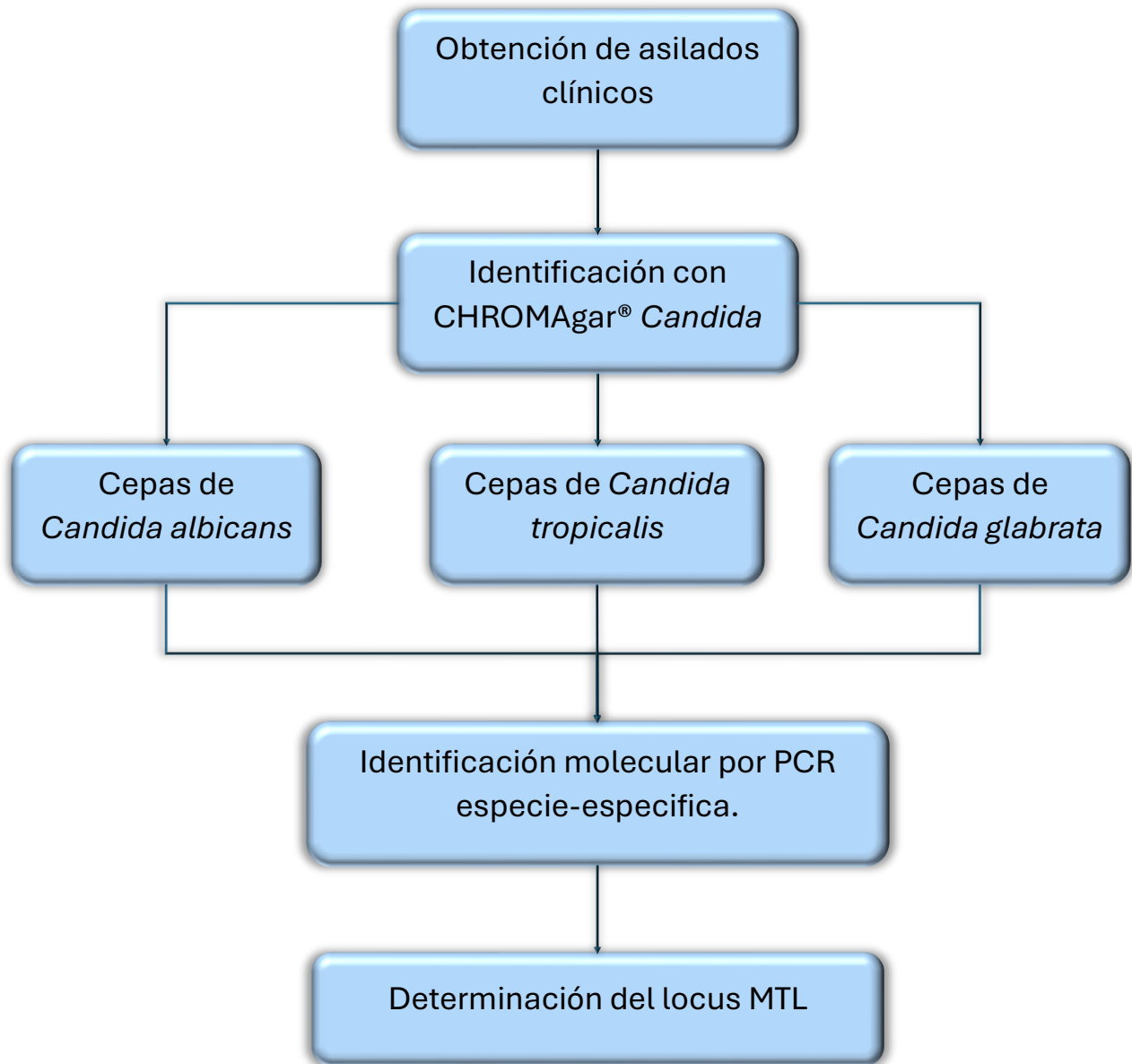
5.1 General

Obtener el tipo de apareamiento del locus MTL de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* y *Candida glabrata* a partir de diversos aislados clínicos.

5.2 Particulares

- Caracterizar fenotípicamente las especies de diversos aislados clínicos del género *Candida* empleando (CHROMagar® *Candida*)
- Caracterizar las especies del género *Candida* de los aislados clínicos empleando un método molecular (PCR especie específica)
- Identificar y determinar el tipo de apareamiento del locus MTL de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* y *Candida glabrata*

6. Diagrama de trabajo



7. Material y métodos

7.1 Aislados clínicos y cultivo primario

Se realizó la recuperación de cepas a partir de muestras del cepario, se trabajó con alrededor de 250 muestras de aislados clínicos provenientes de diversos sitios anatómicos, las cuales procedían del Hospital Universitario de Puebla (HU), el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), la Unidad de estomatología de la Facultad de Medicina de la BUAP y de laboratorios particulares de la ciudad de Puebla

Las cepas se inocularon en agar YPD (20 g/L de glucosa, 20 g/L de peptona, 10 g/L de extracto de levadura y agar bacteriológico al 2%) y se incubaron a 37°C por 24-72 horas. Posteriormente, las cepas se inocularon en caldo YPD con glicerol al 50% para conservarlas a -70°C.

Se realizó el mismo procedimiento para las cepas de referencia *C. albicans* CAF2, *C. tropicalis* MYA-3404 y *C. glabrata* ATCC 2001.

7.2 Identificación en CHROMagar® *Candida*

Las cepas provenientes de los aislados clínicos obtenidos fueron sembradas en tubos de agar YPD y tras un crecimiento de 24 h a 37°C, fueron resembradas con la técnica de estría cruzada en placas de CHROMagar *Candida* para la obtención de colonias aisladas.

El agar cromogénico permite hacer una identificación presuntiva de acuerdo con los pigmentos descritos por el fabricante, se identifican como *Candida albicans* las cepas que desarrollaron un pigmento verde, aquellas que desarrollaron un pigmento azul metálico se identificaron como *Candida tropicalis* y finalmente las que presentaron una coloración morada fueron identificadas como *Candida glabrata*, ilustrados en la figura 10.

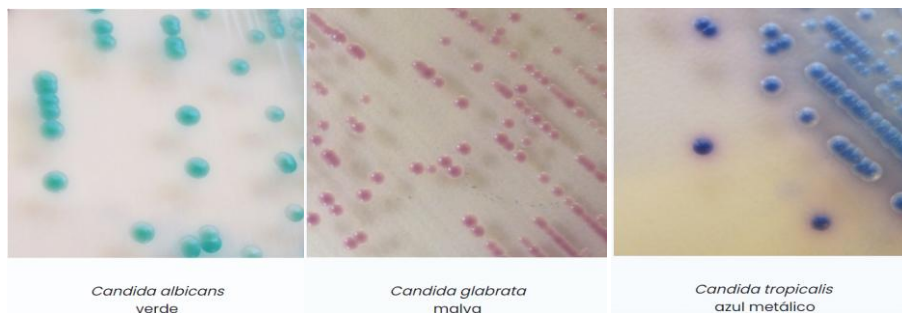


Figura 10 Morfología colonial macroscópica en CHROMagar *Candida* para *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*. Tomado y adaptado de CHROMAgar™

Una vez identificadas por fenotipo en agar cromogénico, se tomó una colonia aislada de cada cepa y se resembró cada una en agar YPD a 37°C por 24 horas para posteriormente realizar pruebas de caracterización fenotípica y la identificación molecular por PCR especie específica.

7.2.1 Caracterización fenotípica

A partir de las cepas identificadas en CHROMAgar *Candida* como *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*, se realizaron otras pruebas de caracterización fenotípica, incluyendo observación microscópica en fresco, producción de túbulos germinales, producción de clamidoconios y producción de biopelículas.

Observación microscópica

A partir de colonias aisladas, se realizó una suspensión de levaduras a partir de los tubos con agar YPD con una asada de colonia en 40 µL de solución salina isotónica sobre un portaobjetos para su observación microscópica con objetivo seco débil (10X) y posteriormente con objetivo seco fuerte (40X) para realizar la observación y descripción de la morfología microscópica en cada cepa de las especies de *Candida* de interés.

Producción de túbulos germinales

En esta prueba se realizó en tubos Eppendorf estériles, añadiendo 100 µL de suero humano estéril y posteriormente se adicionó una asada de colonia de cada cepa. A continuación, se incubaron los tubos entre 35-37°C durante 48 horas y se observó la morfología microscópica en objetivo de 40X en búsqueda en la estructura de túbulos germinales.

Producción de clamidoconidios

Empleando colonias aisladas de cada cepa, se sembró cada una en placas de agar papa dextrosa y agar harina de maíz para inducir la producción de clamidoconidios, se incubaron de 35-37°C durante 24-72 h y se revisó la morfología microscópica a 40X cada 24 h.

Producción de biopelículas

Para la prueba se realizó una suspensión de levaduras (cepa) en caldo YPD, a una concentración de 1×10^7 células/mL, posteriormente se añadió 200 µL de cada suspensión en placas de poliestireno por duplicado.

Posteriormente se incubaron las placas de poliestireno a 30°C con agitación a 90 revoluciones por minuto en cámara húmeda durante 48 h.

Transcurrido el tiempo de incubación, se adicionó en cada pocillo 40 μL de solución de cristal violeta a una concentración del 0.5% sobre cada una de las muestras y se dejó reposar durante 30 minutos, a continuación, se decantó el sobrenadante y se resuspendió la biopelícula para su lectura en espectrofotómetro a 595 nm, se registran los datos de las absorbancias obtenidas.

7.3 Identificación molecular por PCR especie específica

Para la identificación por PCR de cada especie, se realizó la extracción de DNA y posteriormente se seleccionaron oligonucleótidos específicos para identificar cada especie basados en la identificación fenotípica previamente realizada.

Extracción de DNA

Para la extracción de DNA de las levaduras del género *Candida*, se realizó el procedimiento descrito por Ruiz-Gaitán. Se emplearon colonias de cada cepa con crecimiento de 24 h a 37°C en agar YPD y se tomó una porción de colonia con asa estéril y se suspendió en tubos Eppendorf que contenían 20 μL de NaOH a una concentración de 20 mM de reciente preparación.

Posteriormente las suspensiones de levaduras fueron incubadas a 95°C por 15 minutos. Una vez obtenido el extracto de DNA, se purificó mediante la adición de una RNasa y el posterior tratamiento con la técnica de fenol-cloroformo, una vez obtenidas las muestras de DNA purificadas, se determinó su concentración a través de lecturas espectrofotométricas de una dilución 1:100 de cada muestra, haciendo lecturas a tres longitudes de onda, 260 nm, 280 nm y 230 nm, para posteriormente calcular la concentración de DNA en $\mu\text{g}/\text{mL}$. (Equivalencia 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ = ng/ μL). A partir de esta concentración obtenida, se estandarizaron las muestras de DNA a una concentración de 50 ng/ μL .

Oligonucleótidos

Para las especies de *C. albicans* y *C. tropicalis*, se emplearon oligonucleótidos especie-específica dirigidos a identificar regiones conservadas de ARNr, específicamente de las regiones ITS1 e ITS2, descritos en el trabajo de Lou, *et al* en 2002.

Para *C. glabrata* se emplearon oligonucleótidos dirigidos al gen intrón *RPS0* que codifica una proteína que es un componente de la maquinaria de traducción y que está conservada, descritos en el trabajo de García *et al* (2010).

A continuación, se describen las secuencias de oligonucleótidos empleados.

Tabla 2 Oligonucleótidos empleados en la identificación molecular por PCR especie específica para *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*.

Especie	Nombre	Secuencia (5' – 3')	Amplificado	Referencia
<i>C.albicans</i>	CALB1 F	TTCATCAACTTGTCACACCAGA	273 pb	Lou <i>et al.</i> , 2002
	CALB1 R	ATCCCGCCTTACCACTACCG		
<i>C.tropicalis</i>	CTR F	CAATCCTACCGCCAGAGGTTAT	357 pb	Lou <i>et al.</i> , 2002
	CTR R	TGGCCACTAGCAAATAAGCGT		
<i>C.glabrata</i>	CG F	ACATATGTTTGCTGAAAAGGC	406 pb	García <i>et al.</i> , 2010.
	CG R	ACTTTTTCTTAGTGTTCAAGACTTC		

Amplificación por PCR

La identificación por PCR especie-específica de cada cepa se realizó empleando una mezcla de reacción a un volumen final de 12.5 µL, se incluyó para cada muestra 2 µL de extracto de DNA (50 ng/µL), 0.5 µL de cada oligonucleótido específico a una concentración de 10 µM, 6.25 µL de “DreamTaq Green PCR Master Mix” y se completó el volumen con agua libre de nucleasas.

La amplificación se comenzó con una desnaturalización inicial a 96°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos con 3 fases: primera, de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, segunda fase de alineación a 58°C por 30 segundos y tercera fase de elongación a 72°C por 30 segundos, concluyendo con una cuarta fase de elongación final a 72°C por 10 minutos.

Para cada ensayo de amplificación se incluyó un control negativo sin DNA y un control positivo con DNA de las cepas de referencia correspondiente por especie, las cuales fueron *C. albicans* CAF2, *C. tropicalis* MYA-3404 y *C. glabrata* ATCC 2001

Electroforesis y visualización de bandas en gel de agarosa

Una vez obtenidos los amplificados, las muestras se visualizaron en gel de agarosa al 1.5%, para la tinción de las bandas añadió a cada carril 3 µL de “GelRed Nucleic Acid Gel Stain” y se incluyó un marcador de peso molecular de 1 Kb “GeneRuler 1Kb DNA Ladder, Thermofisher”. La electroforesis se realizó a 95V durante 75 minutos empleando Tris-Borato-EDTA (TBE) a 1X con pH 8.0.

7.4 Identificación y determinación del tipo de apareamiento del *locus* MTL

Extracción de DNA

Una vez identificadas por especie, se procedió con la determinación del *locus* MTL en cada una de las cepas, empleando para estos ensayos la metodología de extracción de DNA de nitrógeno líquido-fenol-cloroformo y al igual que en el ensayo anterior, una vez obtenido el DNA, se purificó y cuantificó para finalmente estandarizar las concentraciones de las muestras en 50 ng/ μ L de DNA (Equivalencia 1 μ g/mL = ng/ μ L).

Oligonucleótidos

Para las especies de *C. albicans* y *C. tropicalis*, se emplearon oligonucleótidos específicos descritos por Rustad *et al.* (2002) así como los diseñados por Xie *et al.* (2012) respectivamente (tabla 3) dirigidos a secuencias codificantes para α 1 y α 2.

Tabla 3 Oligonucleótidos empleados para la identificación del locus MTL en *C. albicans* y *C. tropicalis*

Especie	Nomenclatura	Secuencia (5'-3')	Pb	Referencias
<i>C.albicans</i>	MTLa1 F	TAAGAATGAAGACAACGAGG	535	Rustad <i>et al.</i> ,2002
	MTLa1 R	CGTGTTTTCTGCTATCAATTCC		
	MTL α 2 F	ATGAATTCACATCTGGAGGC	615	Rustad <i>et al.</i> ,2002
<i>C.tropicalis</i>	MTL α 2 R	CTGTTAATAGCAAAGCAGCC		
	MTLa1 F	GCTCAAAGGAAGAGGGAGGAA	253	Xie <i>et al.</i> , 2012
	MTLa1 R	TCAATTCTCTTTCCCGTCTGTT		
	MTL α 2 F	CCGTTTTTCTGACTCAAAGAG	525	Xie <i>et al.</i> , 2012
	MTL α 2 R	AGCAAGTTCCGGAGACACCT		

Para el caso de *C. glabrata* se emplearon oligonucleótidos específicos dirigidos a cada uno de los loci MTL (MTL1, MTL2 y MTL 3), diseñados por Lavaniegos *et al.* (2009) y adaptados por Kaplan *et al.* (2019) para diferir el tipo de información de cada locus en “a” y “ α ” (tabla 4).

Tabla 4 Oligonucleótidos empleados para la identificación del locus MTL en *C. glabrata*

Especie	Nomenclatura	Secuencia (5'-3')	Tamaño esperado de fragmentos (Kb)	Referencias
<i>C.glabrata</i>	MTL 1 F	CTGCTGAACTGTGACGACCATC	2.302 Tipo a	Kaplan <i>et al.</i> , 2019
	MTL 1 R	GCGTCTTTCCTGTGATTATGATG	2.488 Tipo α	Kaplan <i>et al.</i> , 2019
	MTL 2 F	CTATTCTAATTGAGATCCGAAAC	1.850 Tipo a	Lavaniegos <i>et al.</i> , 2009
	MTL 2 R	CCTTAGTGATTCATTTGTATCC	2.038 Tipo α	Lavaniegos <i>et al.</i> , 2009
	MTL 3 F	GAAGTTTAAAATTTCTTTAGG	2.339 Tipo a	Lavaniegos <i>et al.</i> , 2009
	MTL 3 R	GAATTGTCACATTGATAAAAC	2.530 Tipo α	Lavaniegos <i>et al.</i> , 2009

Amplificación por PCR

Candida albicans* y *Candida tropicalis

La identificación del locus MTL para las cepas identificadas como *C. albicans* y *C. tropicalis* se realizó empleando una mezcla de reacción a un volumen final de 12.5 μ L, se incluyó para cada muestra 2 μ L de extracto de DNA (50 ng/ μ L), 0.5 μ L de cada oligonucleótido específico (10 μ M), 6.25 μ L de “DreamTaq Green PCR Master Mix” y se aforó el resto del volumen con de agua libre de nucleasas.

La amplificación para la identificación del locus MTL en cepas de *C. albicans* y *C. tropicalis* se inició con una fase de desnaturalización inicial a 94°C por 10 minutos, seguido de 30 ciclos compuestos de 3 fases: una fase de desnaturalización a 94°C por 60 segundos, una segunda fase de alineación a 55°C por 60 segundos y una tercera fase de elongación a 72°C por 60 segundos, finalizando con una fase de elongación final a 72°C por 10 minutos.

Candida glabrata

La amplificación de los locus MTL de *C. glabrata* se realizó bajo condiciones distintas para MTL1, MTL2 y MTL3. Se ensayaron acorde a lo propuesto por Lavaniegos y Kaplan y se adaptaron las temperaturas de alineamiento y los tiempos propuestos por los autores, a las condiciones del laboratorio.

Para cada ensayo de amplificación para la identificación de cada una de las especies, se incluyó un control negativo que incluía volumen de agua libre de nucleasas en lugar de ADN y un control positivo con el material genético extraído

de la cepa de referencia correspondiente por especie, las cuales fueron *C. albicans* CAF2, *C. tropicalis* MYA-3404 y *C. glabrata* ATCC 2001.

MTL1

La mezcla de reacción se preparó a un volumen final de 25 μ L que incluyó para cada muestra 1 μ L de DNA (50 ng/ μ L), 0.5 μ L de cada oligonucleótido específico (10 μ M), 12.5 μ L de “DreamTaq Green PCR Master Mix” y resto se aforó con de agua libre de nucleasas.

MTL2

La mezcla de reacción se preparó a un volumen final de 25 μ L que incluyó para cada muestra 1 μ L de DNA (50 ng/ μ L), 0.5 μ L de cada oligonucleótido específico (10 μ M), 12.5 μ L de “DreamTaq Green PCR Master Mix” y resto se aforó con de agua libre de nucleasas.

MTL3

La mezcla de reacción se preparó a un volumen final de 25 μ L que incluyó para cada muestra 0.5 μ L de DNA (50 ng/ μ L), 0.2 μ L de cada oligonucleótido específico (100 μ M), 0.5 μ L de dNTPs, 0.75 μ L de MgCl₂ (50 μ M), 2.5 μ L de buffer y 0.5 μ L de Taq polimerasa y resto se aforo con de agua libre de nucleasas.

Las mezclas de reacción fueron sometidas a 30 ciclos de amplificación bajo las siguientes condiciones de temperatura y tiempo.

Tabla 5 Condiciones de ampliación del locus MTL en Candida glabrata.

<i>Fases del ciclo</i>	MTL1		MTL2		MTL3	
	Temperatura	Tiempo	Temperatura	Tiempo	Temperatura	Tiempo
<i>Desnaturalización inicial</i>	94°C	5 min	94°C	5 min	94°C	5 min
<i>Desnaturalización</i>	94°C	60 s	94°C	60 s	94°C	60 s
<i>Alineación</i>	55.4°	60 s	53°C	60 s	41 °C	60 s
<i>Elongación</i>	72°	60 s	72°	60 s	72°	60s
<i>Elongación final</i>	72°	5 min	72°	5 min	72°	5 min

Electroforesis y visualización de bandas en gel de agarosa.

Una vez obtenidos los amplificadores, para las muestras de *C. albicans* y *C. tropicalis* se empleó gel de agarosa al 1.5% y se cargaron los pozos con una mezcla de 6 μ L de muestra con 3 μ L de "GelRed Nucleic Acid Gel Stain" para su visualización; de igual manera para cada gel se incluyó un marcador de peso molecular de 1 Kb "GeneRuler 1Kb DNA Ladder, Thermofisher". A continuación, se realizó el corrimiento electroforético a 95 V durante 75 minutos, empleando un buffer de Tris-Borato-EDTA (TBE) a 1X.

Por otra parte, los amplificadores de los MTL de *C. glabrata* se observaron en gel de agarosa al 0.8% empleando 6 μ L de muestra con 3 μ L de "GelRed Nucleic Acid Gel Stain" para su visualización; de igual manera para cada gel se incluyó un marcador de peso molecular de 1 Kb "GeneRuler 1Kb DNA Ladder, Thermofisher". El corrimiento electroforético se realizó a 95V durante 75 minutos empleando buffer TBE a 1X.

8. Resultados

8.1 Aislados Clínicos

Se trabajó con alrededor de 250 aislados clínicos, provenientes de muestras de pacientes aisladas en distintas unidades médicas, de dichas muestras se logró recuperar 87 cepas viables, las cuales posteriormente fueron procesadas para su identificación. De acuerdo con los registros las muestras son provenientes de cavidad oral, exudado orofaríngeo, hemocultivos, uñas, urocultivo, exudado vaginal, secreciones de herida, punta de catéter, pliegue interdigital, sin embargo, para algunos aislados no se tiene información del sitio anatómico de aislamiento ni el lugar de origen. Ver figura 11.

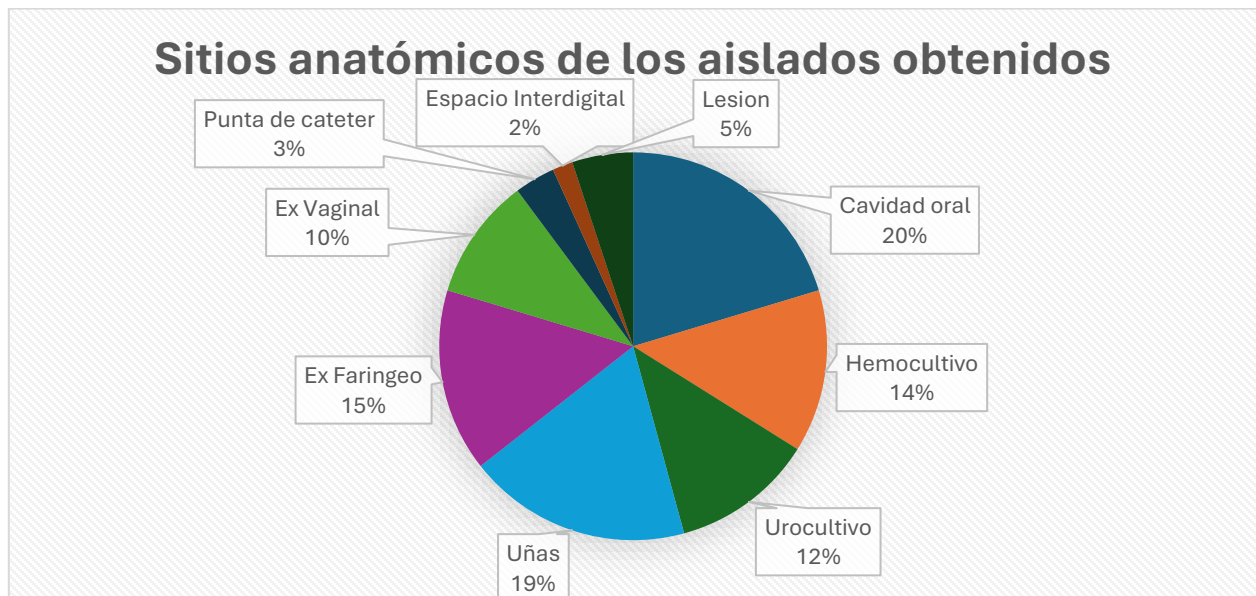


Figura 11 Sitios anatómicos de los aislados clínicos obtenidos.

8.2 Identificación de CHROMAgar *Candida*

A partir de las cepas recuperadas, se realizó la identificación de las especies por el fenotipo expresado en CHROMAgar *Candida*.

Las cepas que desarrollaron colonias de color verde claro fueron identificadas como *Candida albicans*, mientras que las cepas que desarrollaron colonias color azul intenso se identificaron como *Candida tropicalis*, finalmente aquellas cepas que desarrollaron colonias de color malva se identificaron como *Candida glabrata*.

Se identificaron 30 cepas de *C. albicans*, 30 cepas de *C. tropicalis* y 27 cepas de *C. glabrata*; se incluyeron las cepas de referencia *C. albicans* CAF2, *C. tropicalis* MYA-

3404 y *C. glabrata* ATCC 2001. En la figura 12 se muestra comparación de los resultados obtenidos en las cepas de referencia y en las cepas problema.

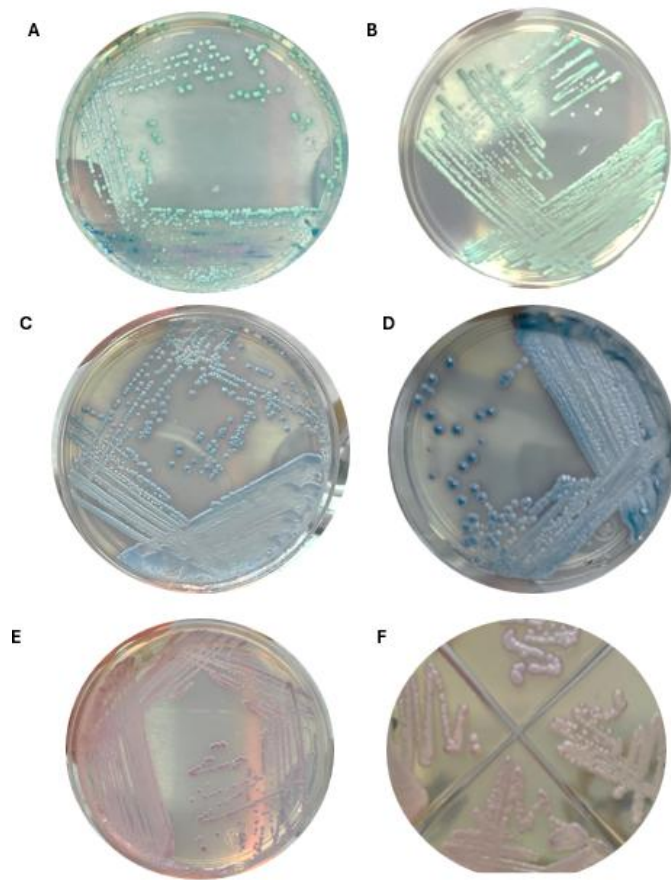


Figura 12 Figura 8 Morfología colonial en CHROMAgar *Candida* de las especies de interés. A) cepa de referencia *C. albicans* CAF2 B) cepa problema identificada como *C. albicans*. C) cepa de referencia *C. tropicalis* MYA-3404. D) cepa problema identificada como *C. tropicalis*. E) cepa de referencia *C. glabrata* ATCC 2001. F) cepas problema identificadas como *C. glabrata*.

8.2.1 Caracterización fenotípica

Observación microscópica

A la observación microscópica de las cepas a 10X y 40X se describió la morfología en cada cepa de las especies de estudio. En las cepas de *Candida albicans* y *Candida tropicalis* se observaron tanto blastoconidia como hifas y pseudohifas mientras que en *Candida glabrata* solo se observaron blastoconidios. En la figura 13 se presentan algunas de las morfologías observadas.

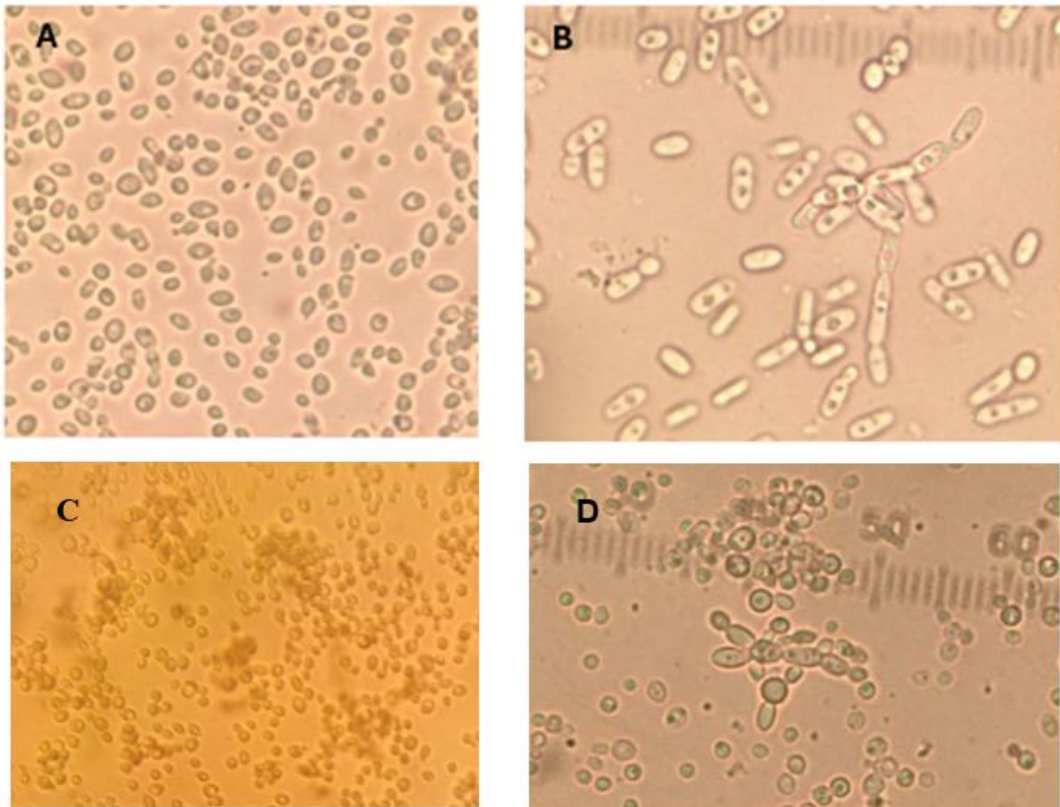


Figura 13 Morfología microscópica observada en fresco a 40X. Se observan: A) Blastoconidios de *C. albicans* cepa Ca3 B) blastoconidios alargados en *C. albicans* con la presencia de pequeñas vacuolas en su interior, morfología compatible con el fenotipo opaco, cepa Ca52 C) Blastoconidios observados en *C. glabrata*, cepa J1 D) Pseudohifas observadas en *C. tropicalis*, cepa Ct5.

Producción de túbulos germinales

En esta prueba se evaluaron los resultados de la prueba a las 48 h de incubación para cada cepa analizada, se observó que las cepas de *Candida albicans* producían túbulos germinales mientras que las especies de *C. tropicalis* y *C. glabrata* no produjeron dicha estructura. Se muestra en la figura 14 una comparación de los resultados de la prueba

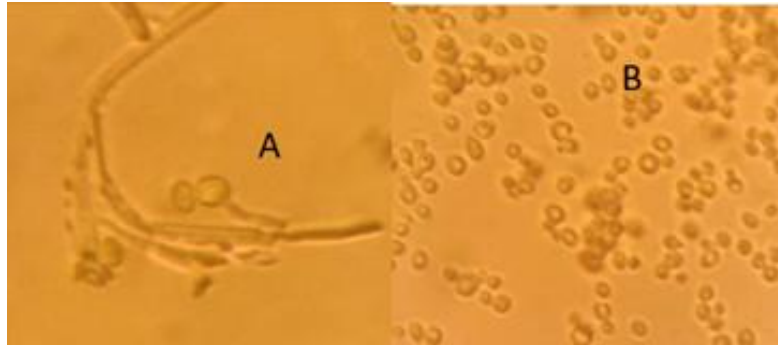


Figura 14 Figura 10 Formación de túbulos germinales en el examen en fresco a 40X. En A) Túbulo germinal producido por *Candida albicans*, cepa Ca25 y B) Blastoconidios de *Candida tropicalis*, cepa Ct1

Producción de clamidoconidios

A partir de los cultivos se realizó la observación microscópica de los cultivos, en las especies de *Candida tropicalis* y *Candida glabrata* no se observó el desarrollo de esta morfología, mientras que en las cepas de *C. albicans* si se logró desarrollar esta estructura. Se observó la formación de clamidoconidios en agar harina de maíz, agar papa dextrosa y en el suero humano inoculado en la prueba de producción de túbulos germinales. En la figura 15 se observan los clamidoconidios producidos por *C. albicans*.

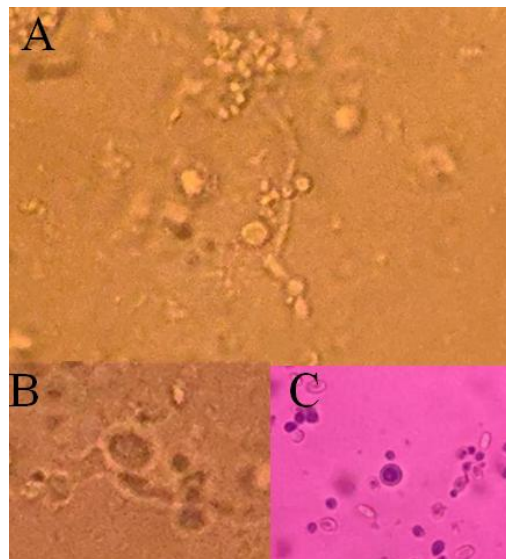


Figura 15 Prueba de formación de clamidoconidios positiva en *C. albicans* (Cepa Ca3) observada en: A) Suero humano incubado a 37°C por 72 h, examen en fresco, 40X. B) Agar papa dextrosa a las 72 h de incubación, examen en fresco, 40X. C) Agar harina de maíz a las 72 h de incubación

Producción de biopelículas

Se realizó la lectura de la prueba de producción de biopelícula en espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm, se programó el equipo para realizar 10 lecturas de cada pozo y se obtuvo la absorbancia promedio de cada uno de los pozos de la placa de poliestireno sustrayendo la absorbancia del blanco, obteniendo el resultado. Posteriormente se realizó la comparación de la producción de biopelícula entre las tres especies empleando la absorbancia promedio.

De acuerdo con los datos obtenidos, en las cepas de *C. albicans* se obtuvo un promedio de la absorbancia mayor respecto a las otras especies, indicativo de su mayor producción de biopelícula, seguido de *C. tropicalis* y finalmente de *C. glabrata*, siendo esta última especie en la que se detectó la menor cantidad de biopelícula. Ver figura 16.

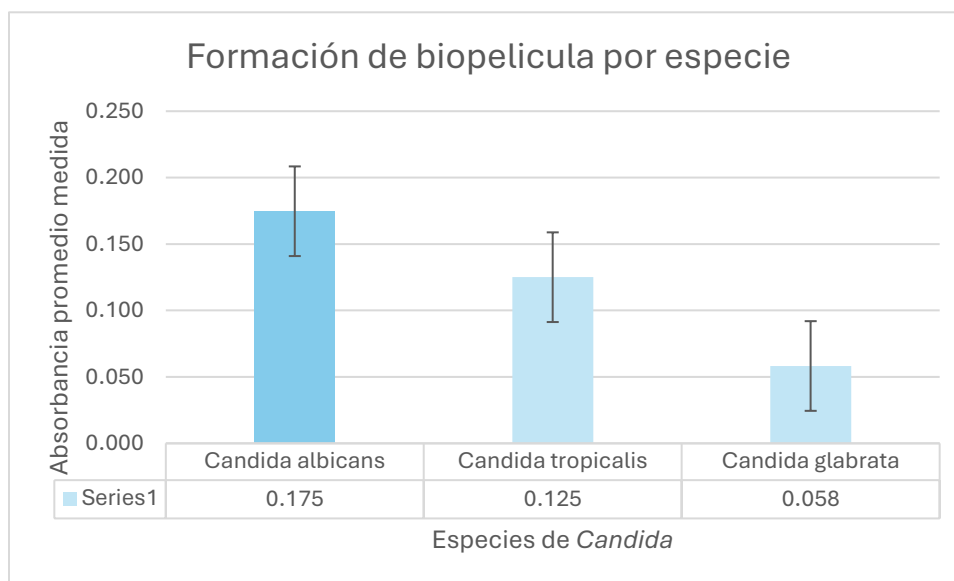


Figura 16 Comparación de los resultados de la prueba de producción de biopelículas por especie

A continuación, se presenta en la tabla 5 un resumen de los resultados de las pruebas de caracterización fenotípicas realizadas a las tres especies de interés para este estudio.

Tabla 6 Resumen de resultados obtenidos de las pruebas de caracterización fenotípicas.

Prueba realizada	<i>C.albicans</i>	<i>C.tropicalis</i>	<i>C.glabrata</i>
Morfología microscópica	Blastoconidios, hifas, pseudohifas.	Blastoconidios, pseudohifas.	Blastoconidios
Producción de clamidoconidios	Positivo	Negativo	Negativo
Producción de túbulos germinales	Positivo	Negativo	Negativo
Producción de biopelícula (ABS)	0.175	0.125	0.058

8.3 Identificación molecular por PCR especie específica

A partir de las cepas identificadas por fenotipo en CHROMAgar *Candida*, se realizó la extracción de DNA y posteriormente se realizó la identificación especie específica por PCR.

A través de este método se confirmó por PCR la identidad de las cepas previamente identificadas por fenotipo como *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*.

En las cepas de *C. albicans* se obtuvieron amplificadores de 273 pb, mientras que para *C. tropicalis* se obtuvieron amplificadores de 357 pb y finalmente, para *C. glabrata* se obtuvieron amplificadores de 406 pb; los amplificadores obtenidos corresponden al tamaño de bandas esperado de acuerdo para los oligonucleótidos empleados. Se incluyó en cada ensayo como control positivo las cepas de referencia *C. albicans* CAF2, *C. tropicalis* MY34-04 y *C. glabrata* ATCC 2001. Se presentan los amplificadores en las figuras 17, 18 y 19 a continuación.

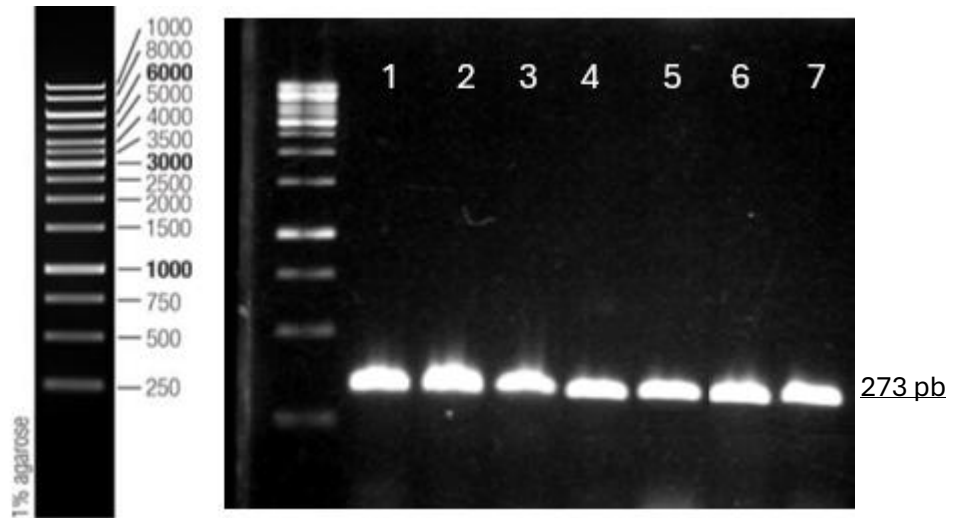


Figura 17 Análisis en gel de agarosa al 1.5 % de los amplificados de 273 pb, correspondientes a la identificación de *C. albicans* por PCR especie específica. De izquierda a derecha se observa en el carril 1: Control positivo (CAF2), carril 2: Cepa Ca12, carril 3: Cepa Ca7, carril 4: Cepa Ca56, carril 5: Cepa Ca38, carril 6: Cepa Ca16, carril 7: Cepa Ca40

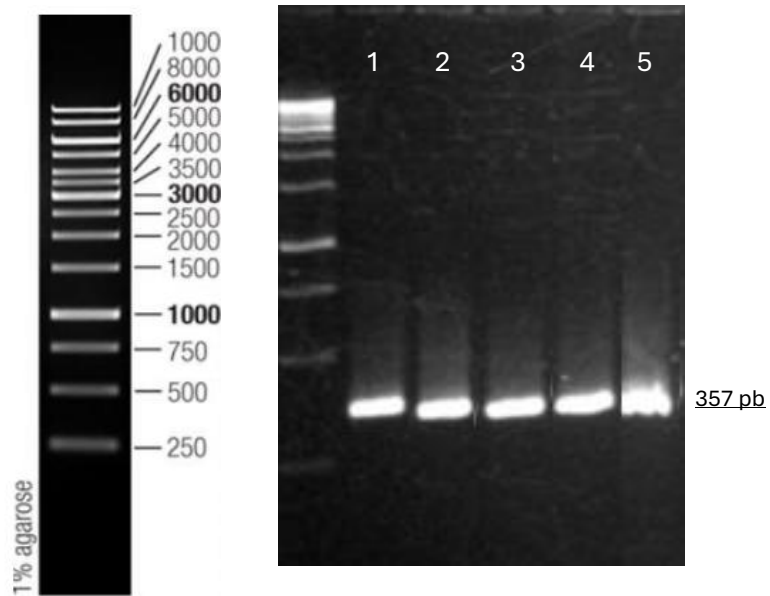


Figura 18 Análisis en gel de agarosa al 1.5% de los amplificados de 357 pb, correspondientes a la identificación de *C. tropicalis* por PCR especie específica. De izquierda a derecha se observa en el carril 1: Control positivo (MYA 34-04), carril 2: Cepa Ct 76-04, carril 3: Cepa Ct66, carril 4: Cepa Ct002, carril 5: Cepa Ct5

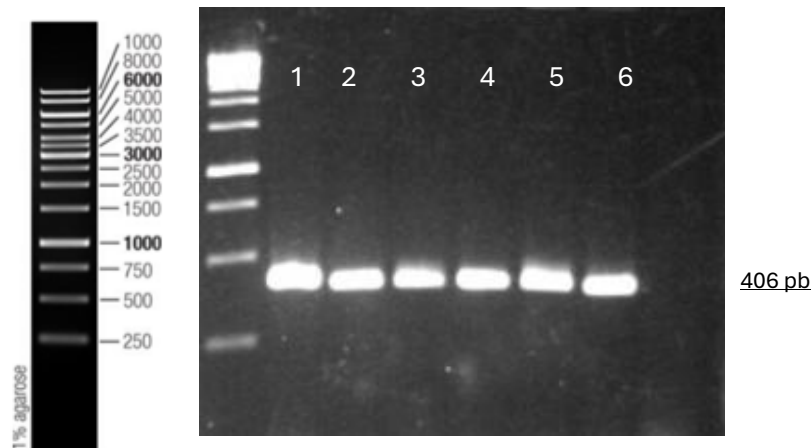


Figura 19 Análisis en gel de agarosa de los amplificadores de 406 pb, correspondientes a la identificación de *C. glabrata* por PCR especie específica. De izquierda a derecha se observa en el carril 1: Control positivo (ATCC2001), carril 2: Cepa CgJ1, carril 3: Cepa CgJ2, carril 4: Cepa Cg05-03, carril 5: Cepa Cg8

8.4. Identificación y determinación del tipo de apareamiento del locus MTL

Candida albicans

A partir de las amplificaciones por PCR para el locus MTL con los oligonucleótidos específicos, se identificó en el material genético de 28 cepas identificadas como *C. albicans*, las secuencias codificantes para $\alpha 1$ y $\alpha 2$, en conjunto, dicha información genética conforma el heterodímero $\alpha 1$ - $\alpha 2$ que actúa como principal represor genético sobre WOR1 (White-Opaque regulator). Dichas cepas se consideran heterocigotas para el MTL, ya que contienen información genética de tipo a y de tipo α .

En contraste, se identificaron 2 cepas homocigotas, en la cepa Ca152 se identificó únicamente información de tipo α , lo que sugiere es homocigota α/α en el locus MTL; a la par, en la cepa Ca52 se identificó información de tipo a , por lo que se considera a la cepa homocigota a/a en el locus MTL.

Como resultado de la determinación del locus MTL en las 30 cepas de estudio, de identificaron 28 cepas heterocigotas a/α , 1 cepa homocigota a/a y 1 cepa homocigota α/α . En figura 20 se presentan resultados representativos la determinación del locus MTL en *C. albicans*.

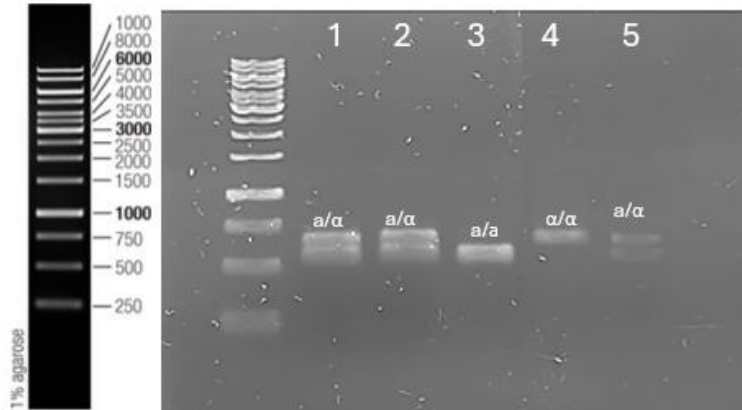


Figura 20 Análisis en gel de agarosa al 1.5% de los amplificados de a1 de 535 pb y de α2 de 615 pb en la determinación del locus MTL en cepas de *C. albicans*. En carril 1: Control positivo (CAF2), carril 2: cepa Ca12, carril 3: cepa Ca52, carril 4: cepa Ca56, carril 5: cepa Ca152 y carril 6: cepa Ca16.

Candida tropicalis

En las 30 cepas de *C. tropicalis* estudiadas se identificó en el material genético las secuencias codificantes para a1 y α2, que conforma a1- α2. Se encontró en 26 cepas información de tipo a y de tipo α, considerándose heterocigotos a/α mientras que solo en 4 cepas se identificó únicamente información de tipo a, por lo tanto, son homocigotos a/a. En figura 21 se presentan resultados representativos la determinación del locus MTL en *C. tropicalis*.

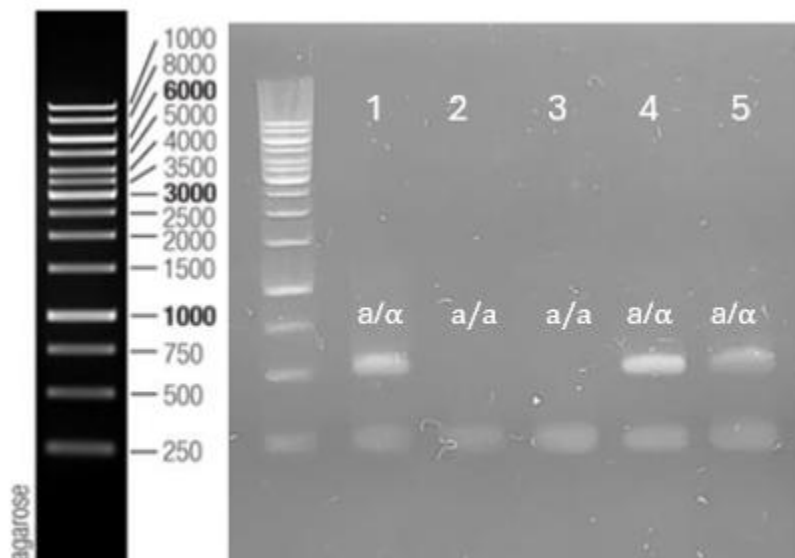


Figura 21 Análisis en gel de agarosa al 1.5% de los amplificados de 253 pb de a1 y de 525 pb de α2 obtenidos de la determinación del locus MTL en cepas de *C. tropicalis*. Carril 1: control positivo (MYA-3403), control 2: Cepa Ct 176, carril 3: cepa Ct417, carril 4: cepa Ct1, carril 5: cepa Ct25

De las 30 cepas de cada especie en estudio se identificó que 93.3 % de las cepas de *C. albicans* fue heterocigota a/α y el 6.6% fue homocigota (a/a y α/α), mientras que para *C. tropicalis*, el 86.6 % de las cepas fue heterocigota a/α y el 13.3% de las cepas fue homocigota a/a , se ilustra la frecuencia de los genotipos encontrados en el gráfico 5 a continuación.

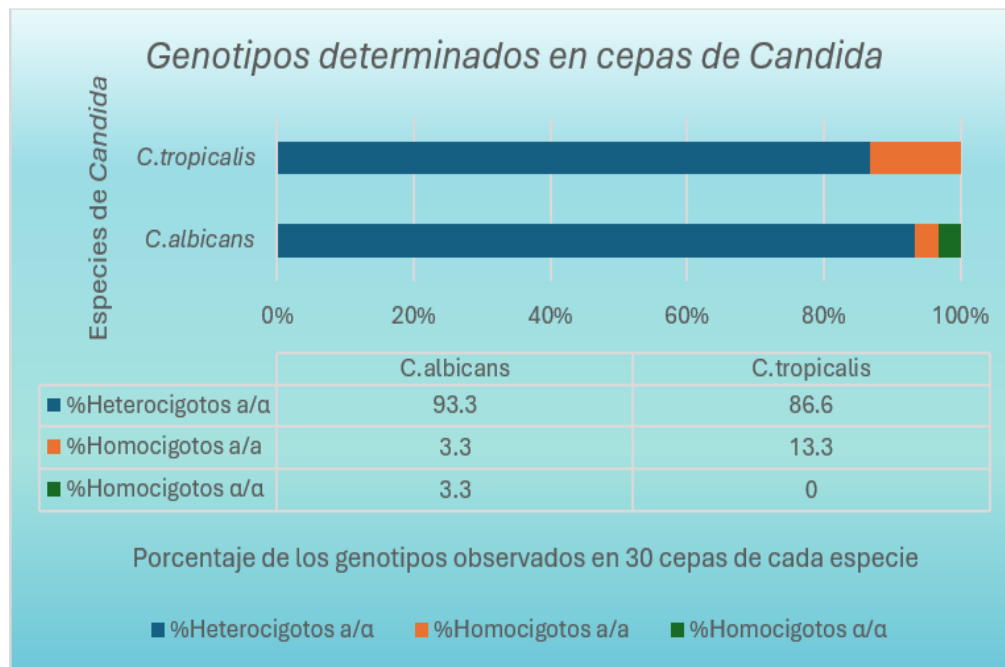


Figura 22 Genotipos del locus MTL obtenidos en las cepas de *C. albicans* y *C. tropicalis*.

En *Candida albicans* se encontró un homocigoto a/a y un homocigoto α/α , los cuales son competentes para realizar el apareamiento y el intercambio de información genética entre sí, tanto *in vivo* como *in vitro*. Por otra parte, en las cepas de *C. tropicalis* se encontraron cuatro homocigotos a/a , dichas cepas, aunque son competentes, no pueden realizar apareamiento entre sí, esto debido a que este solo se produce entre tipos de apareamiento contrarios, es decir entre un a/a y un α/α .

Candida glabrata

De las 27 cepas incluidas en este trabajo se obtuvo el resultado de la información del locus MTL1, MTL2 y MTL3, así como la configuración presente en cada cepa. En el locus MTL1 se obtuvieron 10 cepas con información de tipo *a* y 17 cepas de tipo α , por su parte en el locus MTL2 se obtuvieron 16 cepas con información de tipo *a* y 11 con información de tipo α y para el caso de MTL3 se encontró que todas las cepas de *C. glabrata* expresaban información de tipo α . Se incluyen a continuación representaciones de los resultados en las figuras 23, 24 y 25.

MTL1

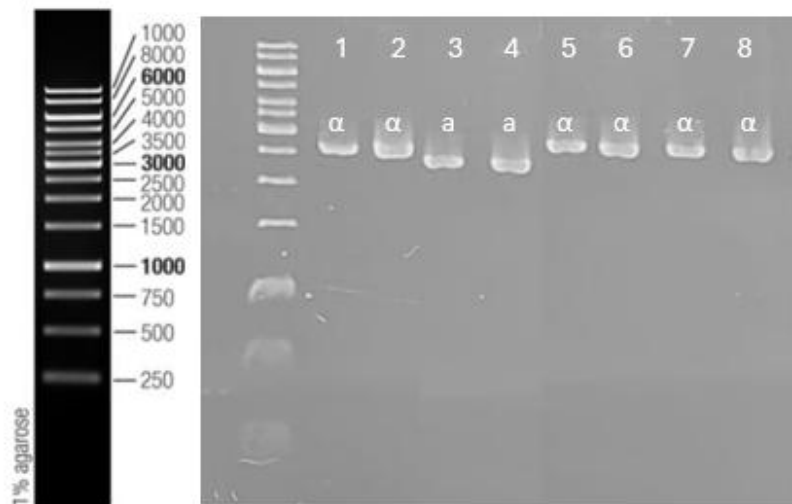


Figura 23 Análisis en geles de agarosa al 0.8% de la determinación del locus MTL1 en cepas de *C. glabrata*. Con 2,302 pb se visualizan las bandas de información tipo *a*, mientras que con 2,488 se visualizan las bandas de la información de tipo α . Carril 1: Cepa *C. glabrata* ATCC 2001, carril 2: cepa Cg J2, carril 3: cepa CgJ4, carril 4: cepa CgJ5, carril 5: cepa CgP1, carril 6: cepa Cg05-03, carril 7: cepa Cg17, carril 8: cepa Cg26.

MTL 2

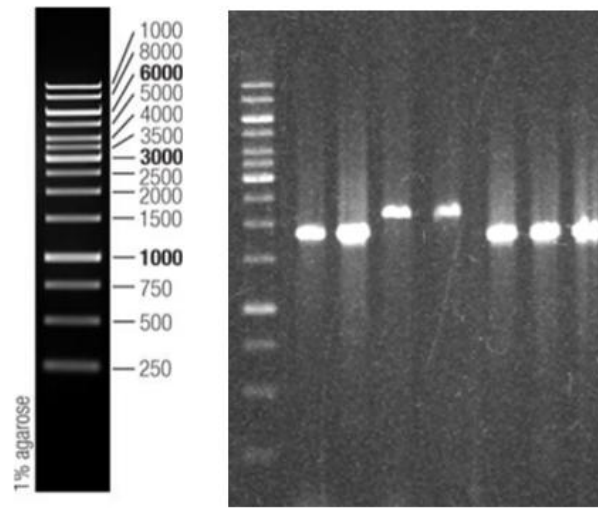


Figura 24 Análisis en gel de agarosa al 0.8% de la determinación del locus MTL2 en cepas de *C. glabrata*, con 1,850 pb se visualizan las bandas de información tipo α , mientras que con 2,038 pb se visualizan las bandas de la información de tipo α . Carril 1: Cepa *C. glabrata* ATCC 2001, carril 2: cepa Cg J2, carril 3: cepa CgP1, carril 4: cepa Cg05-01, carril 5: cepa CgP2, carril 6: cepa Cg8, carril 7: cepa Cg17, carril 8: cepa Cg26

MTL3

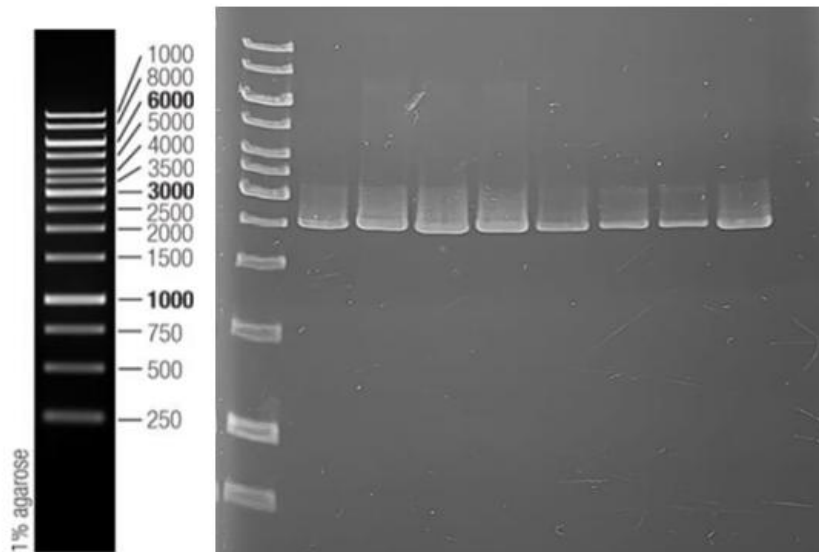


Figura 25 Análisis en gel de agarosa al 0.8 % de los resultados de la determinación del locus MTL3 en cepas de *C. glabrata*, con 2,530 pb se visualizan las bandas de información tipo α . Carril 1: Cepa *C. glabrata* ATCC 2001, carril 2: cepa Cg166, carril 3: cepa Cg176, carril 4: cepa Cg442, carril 5: cepa Cg2112, carril 6: cepa Cg2131, carril 7: cepa Cg2228, carril 8: cepa Cg2664.

Las cepas de *C. glabrata* ensayadas expresaron 4 configuraciones *del locus MTL* (MTL1, MTL2, MTL3), siendo la más frecuente *aaa*, seguida por *aaα* y *αaa*, siendo la menos frecuente la configuración *ααα*, en la tabla 6 se resumen los resultados de las configuraciones MTL de *C. glabrata*.

Tabla 7 Resultados de la configuración del locus MTL en *C. glabrata*.

Configuración MTL (MTL1, MTL2, MTL3)	Frecuencia	Porcentaje (%)
<i>aaa</i>	0	0.0
<i>aaα</i>	7	25.9
<i>aaa</i>	0	0.0
<i>aaa</i>	3	11.1
<i>aaa</i>	0	0.0
<i>aaa</i>	10	37.0
<i>aaa</i>	0	0.0
<i>aaa</i>	7	25.9

En *C. glabrata* se ha planteado que la información contenida en cada MTL que posee puede ser de tipo “a” o bien, de tipo “α”, de acuerdo con los resultados de este estudio, en el locus MTL 1 se obtuvieron 10 cepas con información de tipo a y 17 cepas con información de tipo α, mientras que en el locus MTL2 se determinó la presencia de 16 cepas con información de tipo a y 11 cepas con información de tipo α, finalmente en MTL3 se encontró exclusivamente información de tipo α en las 27 cepas de estudio, como se ilustra en la figura 26 a continuación.

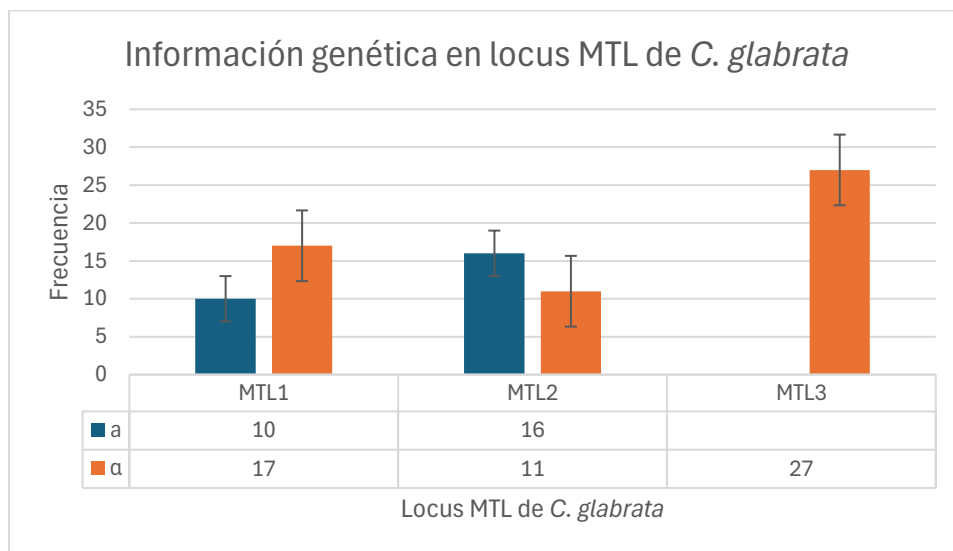


Figura 26 Información genética en los locus MTL de *C. glabrata*

Los resultados obtenidos en los ensayos demuestran que en las cepas de *C. glabrata* ensayadas, la información genética del locus MTL1 de tipo α es ligeramente más frecuente que la de tipo a , de forma similar en el locus MTL2 se observó el ligero predominio de la información de tipo a , mientras que en el caso de MTL3 se encontró el completo predominio de la información de tipo α .

9. Discusión

Se trabajó con especies de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* al ser especies frecuentes y de relevancia médica en nuestro país. *C. albicans* y *C. tropicalis* son importantes microorganismos en el ambiente hospitalario al ser causales de infecciones asociadas a la atención de la salud. En otros estudios longitudinales en el país se describe la misma tendencia en la que las tres especies seleccionadas para el estudio se encuentran como las tres especies mayormente aisladas en casos de candidosis (Reyes *et al.*, 2017), lo que destaca la importancia del estudio de *Candida* en nuestro país, principalmente para el monitoreo de cepas virulentas y para poder plantear estrategias que permitan reducir la incidencia de estas micosis.

Diversos estudios asocian factores de riesgo y comorbilidades como la diabetes mellitus de tipo II (DMII) con la aparición de candidosis, lo que en nuestro país resulta clave al ser la diabetes un problema de salud reconocido por el Instituto Nacional de Salud Pública, por lo cual se puede considerar que gran parte de la población es más susceptible a padecer infecciones por *Candida*, siendo imprescindible el estudio de las características patógenas de estas levaduras que permiten realizar el cambio de comensal a patógeno.

Dada la relevancia que poseen las levaduras del género *Candida*, uno de los primeros pasos cruciales para poder llegar un tratamiento es el aislamiento e identificación de las cepas, los métodos fenotípicos permiten caracterizar a cierto grado las especies, algunos con mayor eficiencia que otros, sin embargo, dentro de estudios comparativos se ha encontrado que no todos sus resultados permiten determinar inequívocamente la especie encontrada (López *et al.*, 2005).

El cultivo en medios habituales, aunque permite visualizar características morfológicas macroscópicas no permiten hacer distinciones entre especies ya que muestran morfología colonial muy similar (Silva *et al.*, 2012). Otras pruebas de caracterización fenotípica como la observación microscópica, permite visualizar si las cepas presentan un estadio filamentosos o de blastoconidios, sin embargo, esta prueba no distingue si la cepa tiene la capacidad de realizar esta transición morfológica bajo condiciones distintas (López *et al.*, 2005).

De forma muy similar, la prueba de formación de túbulos germinales permite demostrar su capacidad de producir dicha estructura bajo condiciones específicas, esta prueba permite principalmente distinguir principalmente a *C. albicans* de otras especies a cierto grado, ya que aproximadamente un 5% de las cepas de *C. albicans* da resultados falsos negativos.

Así mismo, la prueba de detección de clamidoconidios solo permite distinguir a la especie *C. albicans* de otras especies (Linares *et al.*, 2007). Aunque dichas pruebas nos permiten caracterizar a las especies del género *Candida*, los resultados que arrojan no permiten realizar una identificación inequívoca a nivel de especie.

El uso de medios de cultivo especializados como el CHROMAgar *Candida*, permite realizar una mejor identificación basada en el fenotipo que expresan en dicho medio ya que poseen una mayor sensibilidad y especificidad para la distinción de las especies de *Candida*. En estudios realizados por Huang *et al* (2001) y por Daef *et al* (2014) se encontró que este medio cromogénico posee una sensibilidad entre el 96.6 - 100% y una especificidad de 97.9 -100% para identificar a *C. albicans*, en el caso de *C. tropicalis* posee una sensibilidad de 97.9 -100% y una especificidad entre 98.5 -98.8% y finalmente en el caso de *C. glabrata* posee una sensibilidad del 97.7 – 100% y una especificidad del 98.4- 100%. Los resultados del presente trabajo apoyan el valor del uso de agar cromogénico para la distinción de las especies de estudio, sin embargo, también se debe tomar en consideración que estos medios de cultivo no permiten distinguir todas las especies del género.

En estudios comparativos realizados por López *et al* (2005), se demostró que el uso de pruebas fenotípicas permite aproximar los resultados de identificación, pero no permite determinar inequívocamente la especie, a diferencia de la identificación molecular con PCR, que en el presente trabajo permitió identificar todas las cepas de su estudio. Para que dicha identificación molecular es vital uso de las secuencias diana apropiadas y la ejecución adecuada de la técnica de identificación.

Para la identificación especie específica en las cepas incluidas en este estudio, se incluyó para *C. albicans* y *C. tropicalis* el uso de secuencias dirigidas a ITS1 e ITS2 diseñados y probados en los estudios realizados por Lou *et al* (2002), en los que se demostró que ambos pares de oligonucleótidos poseen una especificidad del 100% y no presentaron interferentes con otras especies de *Candida* ni con otros hongos levaduriformes ni hongos filamentosos, durante el desarrollo de este estudio, dichos oligonucleótidos demostraron un 100% de especificidad.

En el caso de los oligonucleótidos empleados para la identificación de *C. glabrata*, los estudios realizados por García, J. (2010), demostraron una alta especificidad del 100%, a pesar de la alta homología entre las secuencias de levaduras empleadas dentro de su estudio, de igual manera en el presente trabajo los oligonucleótidos fueron específicos para la identificación de esta especie.

Por lo tanto, en este trabajo el uso de técnicas moleculares permitió obtener resultados más confiables en la identificación, sin embargo, la caracterización fenotípica permitió describir las características del microorganismo, algunas de las cuales se relacionan con su patogenicidad, tal como su polimorfismo, la producción de biopelículas y el desarrollo de estructuras de resistencia.

En las especies de *Candida* estudiadas se describe un ciclo parasexual que se explica con la presencia de genes de apareamiento en el locus MTL, los cuales también tienen un papel en la regulación de sus cambios fenotípicos. Dicho apareamiento resulta en recombinación genética, generando una progenie con mayor variación genética, lo cual contribuye a la supervivencia de los linajes al permitir una adaptación al entorno fluctuante y reducir la acumulación de mutaciones en el genoma, lo que podría explicar la aparición de cepas con mayor virulencia y resistencia a antifúngicos, tal como el caso de la especie *C. auris*.

Las especies *C. albicans* y *C. tropicalis*, que son organismos diploides, poseen dos alelos en el locus MTL, MTL α y MTL α , se ha descrito que más del 90% de los aislados clínicos poseen una configuración genética MTL α /MTL α y se consideran heterocigotos. Una baja proporción de cepas de *C. albicans* y *C. tropicalis* son homocigotos en este locus, ya que para serlo se requiere de la expresión de un solo tipo de información, ya sea de tipo a o bien de tipo α , para que esto ocurra se requiere de la pérdida de información de un tipo, lo que ocurre con la pérdida completa del cromosoma 5, con su duplicación o bien por recombinación mitótica (Srikantha *et al.*, 2003).

Las cepas de *Candida albicans* del presente estudio, presentaron en el 93.3% de los casos alelos a/α , en contraste, de forma congruente con lo reportado por Legrand (2004), menos del 7% de las cepas analizadas fueron naturalmente homocigotas en este locus. De forma similar en las cepas de *C. tropicalis* el 86.6 % de las cepas se identificaron como heterocigotas a/α y alrededor del 13% como homocigotas del tipo a/a , una mayor proporción respecto a *C. albicans*.

A pesar de que en frecuencia, se identificó un mayor número de cepas homocigotas en *C. tropicalis*, la diferencia más relevante entre ambas especies es la eficiencia en el apareamiento que presentan cada especie, de acuerdo con Porman *et al* (2013) en las cepas de *C. albicans* el apareamiento es hasta un millón de veces mayor en las cepas homocigotas respecto de las heterocigotas, mientras que en la especie *C. tropicalis* el apareamiento es apenas cien veces mayor en las cepas homocigotas que en las heterocigotas, por lo tanto, a pesar de que en el estudio se encontró una menor proporción de cepas homocigotas de *C. albicans*, estas llevan a cabo de forma más eficiente el apareamiento que las cepas de *C. tropicalis*.

La relevancia de las cepas homocigotas en el locus MTL radica en que se ha descrito una mayor virulencia ya que llevan a cabo una mayor colonización de tejidos y se asocian con una mayor resistencia a antifúngicos azólicos (Salas, 2008; Legrand *et al.*, 2004). Por lo tanto, la detección de estas cepas permite obtener un panorama de la virulencia de las cepas circulantes.

Una revisión de los datos obtenidos de las pruebas de caracterización fenotípica de estas mismas cepas nos revela que en las cepas identificadas como homocigotas, se observaron blastoconidios alargados y con la presencia de vacuolas en su interior, que en primera instancia fue sugerente de un fenotipo opaco, la posterior determinación del locus MTL permitió confirmar que estas cepas eran homocigotas de tipo a/a y de tipo α/α , de los datos recabados de estas cepas, se destaca su origen, ya que provienen de muestras en centros de atención clínica y centros de referencia, en los que se favorece la interacción entre cepas homocigotas con información genética complementaria, lo que permitiría en dichos ambientes les permitiría realizar el apareamiento.

Adicionalmente, en las cepas homocigotas de *C. albicans* y *C. tropicalis* se observó la presencia de su morfología filamentosa, esta estructura es sugerente de su cambio del estadio de comensal al de patógeno ya que las hifas y pseudohifas de ambas especies poseen mayor capacidad de invadir los tejidos en su hospedero. De forma similar, se encontró en las cepas homocigotas de ambas especies una mayor producción de biopelículas respecto a las que se identificaron como heterocigotas.

En *C. glabrata*, una levadura con genoma haploide, los genes MTL se encuentran distribuidos en dos cromosomas distintos, el MTL1 se tiene identificado como el equivalente a la región MAT de *S. cerevisiae*, el cual controla el proceso de apareamiento, por lo que se considera el más relevante de los tres loci. Por otra parte, no se encuentra descrita la función de los genes expresados en el locus MTL2 y se ha identificado que en el MTL3 la información se encuentra silenciada.

En los tres locus MTL de *C. glabrata* encontramos información genética ya sea de tipo a o bien de tipo α , y se ha planteado que la configuración de la distribución genética de ambos tipos de información en los tres loci permite regular no solo el apareamiento, si no posiblemente otros mecanismos de patogénesis como la resistencia intrínseca a antifúngicos (Lavaniegos *et al.*, 2009)

Un estudio realizado por Kaplan *et al.* (2019) analizó la distribución de la configuración de la información genética contenida en el locus MTL de *C. glabrata*, donde encontró que la mayor parte de la información de MTL1 corresponde a alelos de tipo a , mientras que la configuración predominante fue la $a/a/\alpha$, en comparación con otros estudios realizados por Srikantha *et al.* (2003) y por Brisse *et al.* (2009) se ha encontrado que existe un predominio variable en el tipo de información en cada locus. De forma muy similar entre los estudios mencionados, se describió un predominio de la información de tipo “ a ” en el locus MTL1 y MTL2, mientras que en MTL3 se describió el predominio de la información de tipo “ α ”.

En lo que respecta a nuestro estudio, en nuestras cepas coincide el predominio de información de tipo “ a ” en MTL2 y el predominio total de la información de tipo “ α ” en MTL3, sin embargo, se observó una variación en MTL1, donde la información

predominante en este trabajo fue de tipo “ α ”, esta diferencia podría ser explicada por variaciones geográficas, ya que el trabajo Kaplan *et al.*(2019), corresponde a muestras provenientes de Turquía se encontró un predominio de la información de tipo “ a ”, mientras que en el estudio realizado por Lavaniegos *et al.* (2009) en distintas zonas geográficas de México mostró una proporción similar en la frecuencia de información de tipo “ a ” y de tipo “ α ” en MTL1, indicando que en los aislados clínicos de pacientes hospitalarios de nuestro país, ambos tipos de información en MTL1 se encuentran presentes.

A pesar de que teóricamente es posible la expresión de 8 distintos patrones de información en los tres MTL de *C. glabrata*, tanto los resultados obtenidos por Kaplan *et al.* (2019) y Lavaniegos *et al.* (2009) coinciden con los resultados de este trabajo el que se identificaron en las cepas únicamente 4 arreglos distintos en los alelos, siendo estos “ aaa ”, “ $\alpha\alpha\alpha$ ”, “ $a\alpha\alpha$ ”, y “ $\alpha a\alpha$ ”

Respecto a la distribución de la información en los loci MTL en *C. glabrata*, en el estudio realizado por Kaplan *et al.*(2019) se encontró que no hay una correlación directa entre el tipo de información encontrada y la resistencia a fluconazol y 5-fluorocitosina, además, el trabajo realizado por Lavaniegos *et al.*(2009) no encontró evidencia de que los distintos tipos de configuraciones del MTL tengan efectos significativos en la susceptibilidad o resistencia a fluconazol, pero si encontró diferencias significativas respecto a la caspofungina.

En este estudio los resultados de las pruebas fenotípicas de las distintas configuraciones del locus MTL en *C. glabrata* no mostró indicios de que alguna de las configuraciones de los alelos tuviera características consideradas más virulentas.

En nuestro país es de suma importancia el estudio de las especies de *Candida*, esto debido al problema de salud pública que representan, principalmente como microorganismos causantes de infecciones asociadas a la salud. Con el propósito de caracterizar y analizar las cepas circulantes en nuestro país es necesario estudiar las características patogénicas de estas levaduras, así como aquellos factores de virulencia que facilitan su adaptación y supervivencia, esto con el propósito de reducir las tasas de mortalidad de las infecciones causadas por *Candida*.

10. Conclusión

- Se identificó de forma efectiva mediante el fenotipo expresado en CHROMAgar *Candida* aislados clínicos de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*.
- Se confirmó la identidad de las cepas como *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*.
- En los aislados clínicos de *C. albicans* se identificó que el 93.3% de las cepas son heterocigotas a/α para el locus MTL, mientras que 3.3% son homocigotas a/a y un 3.3% corresponden a homocigotas α/α .
- En los aislados clínicos de *C. tropicalis* se identificó que el 86.6% de las cepas son heterocigotas a/α para el locus MTL y el 13.3% corresponde a cepas homocigotas a/a .
- Se encontró con mayor frecuencia la presencia de cepas homocigotas en MTL en la especie *C. tropicalis* respecto a *C. albicans*.
- En *C. glabrata* se encontró que la información genética predominante en MTL1 fue de tipo α , mientras que en MTL2 se encontró predominio de la información genética de tipo a y finalmente, en MTL3 se encontró el predominio de información genética de tipo α .
- En los aislados clínicos de *C. glabrata* se encontraron cuatro configuraciones distintas del locus MTL, 10 cepas se identificaron con la configuración $a\alpha$, 7 cepas con la configuración aa , 7 cepas $\alpha\alpha$ y finalmente, 3 cepas con la configuración $a\alpha\alpha$.

11. Perspectivas

- Realizar pruebas de apareamiento in vitro entre las cepas homocigotas a/a y α/α de *Candida albicans* para obtener progenie recombinante.
- Realizar estudios comparativos de características patógenas entre cepas homocigotas y heterocigotas de *C. albicans* y *C. tropicalis*, para el caso de *C. glabrata* se plantea comparar las distintas configuraciones del locus MTL, se propone la comparativa de la capacidad de producir biopelículas.
- Realizar análisis comparativos de los perfiles de resistencia de diferentes tipos de antifúngicos para cepas homocigotas y heterocigotas en el caso de las especies de *C. albicans* y *C. tropicalis*. Por otra parte, se plantea analizar los perfiles de resistencia entre cepas de *C. glabrata* con distintas configuraciones del locus MTL.
- Realizar la secuenciación de los amplificadores de los locus MTL de las cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* para posteriores estudios de las secuencias.
- Emplear un modelo murino para observar los efectos patógenos de las cepas homocigotas en MTL de *C. albicans* y *C. tropicalis* y realizar comparaciones con las cepas heterocigotas.

12. Referencias

- Abastabar, M., Hosseinpour, S., Hedayati, M. T., Shokohi, T., Valadan, R., Mirhendi, H., Mohammadi, R., Aghili, S. R., Rahimi, N., Aslani, N., Haghani, I., & Gholami, S. (2016). Hyphal wall protein 1 gene: A potential marker for the identification of different *Candida* species and phylogenetic analysis. *Current medical mycology*, 2(4), 1–8. <https://doi.org/10.18869/acadpub.cmm.2.4.1>
- Ahmad, S., & Alfouzan, W. (2021). *Candida auris*: Epidemiology, Diagnosis, Pathogenesis, Antifungal Susceptibility, and Infection Control Measures to Combat the Spread of Infections in Healthcare Facilities. *Microorganisms*, 9(4), 807. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040807>
- Chai, L. Y., Denning, D. W., & Warn, P. (2010). *Candida tropicalis* in human disease. *Critical reviews in microbiology*, 36(4), 282–298. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2010.489506>
- Arendrup, M. C., & Patterson, T. F. (2017). Multidrug-Resistant *Candida*: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. *The Journal of infectious diseases*, 216(suppl_3), S445–S451. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix131>
- Bennett, R. J., & Johnson, A. D. (2003). Completion of a parasexual cycle in *Candida albicans* by induced chromosome loss in tetraploid strains. *The EMBO journal*, 22(10), 2505–2515. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdq235>
- Bonifaz Trujillo, A., (2015) *Micología médica básica (5a. ed.)* Distrito Federal: McGraw-Hill Interamericana, pp.85-86, 322-344.
- Brisse, S., Pannier, C., Angoulvant, A., de Meeus, T., Diancourt, L., Faure, O., Muller, H., Peman, J., Viviani, M. A., Grillot, R., Dujon, B., Fairhead, C., & Hennequin, C. (2009). Uneven distribution of mating types among genotypes of *Candida glabrata* isolates from clinical samples. *Eukaryotic cell*, 8(3), 287–295. <https://doi.org/10.1128/EC.00215-08>
- Cornistein, W., Mora, A., Orellana, N., Capparelli, F. J., & del Castillo, M. (2013). *Candida*: epidemiología y factores de riesgo para especies *no albicans*. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 31(6), 380–384. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.09.011>
- Daef, E., Moharram, A., Eldin, S. S., Elsherbiny, N., & Mohammed, M. (2014). Evaluation of chromogenic media and seminested PCR in the identification of *Candida* species. *Brazilian journal of microbiology* .45(1), 255–262. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014005000040>
- De La Calle Rodríguez, Natalia, Santa Vélez, Catalina, & Cardona Castro, Nora. (2012). Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por

Candida albicans y hongos dermatofitos. CES Medicina, 26(1), 43-55.
Recuperado de:
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-87052012000100005&lng=en&tlng=es.

Dominguez Dominguez, M. (2018). Cambio fenotípico y locus de apareamiento (MTL) de aislados clínicos de *Candida albicans* y *Candida tropicalis*. [Tesis de Maestría, BUAP]

Frias- De León, M. G., Rodriguez-Vizcaino, A. C., Torres-Paez, Ó. U., Acosta-Altamirano, G., & Martinez-Herrera, E. (2020). Epidemiological data of candidiasis in a tertiary hospital in the State of Mexico. Revista Mexicana de dermatología, 109-114. Recuperado de: <https://dermatologiarevistamexicana.org.mx/article/datos-epidemiologicos-de-la-candidiasis-en-un-hospital-de-tercer-nivel-en-el-estado-de-mexico/>

Fu, Y., Ibrahim, A. S., Sheppard, D. C., Chen, Y. C., French, S. W., Cutler, J. E., Filler, S. G., & Edwards, J. E., Jr (2002). *Candida albicans* Als1p: an adhesin that is a downstream effector of the EFG1 filamentation pathway. Molecular microbiology, 44(1), 61–72. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02873.x>

Martínez, J. M., Gómez, E. V., Pemán, J., Cantón, E., García, M. G., & del Castillo Agudo, L. (2010). Identification of pathogenic yeast species by polymerase chain reaction amplification of the RPS0 gene intron fragment. Journal of applied microbiology, 108(6), 1917–1927. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04595.x>

Hernández Sierra, B., Prieto Palomino, M. A., Curiel Balsera, E., Muñoz Bono, J., Quesada García, G., & Arias Verdú, M. D. (2009). Perfil clínico-epidemiológico y taxonómico de la candidiasis sistémica en una unidad de cuidados intensivos Medicina intensiva, 33(3), 144–147. [https://doi.org/10.1016/s0210-5691\(09\)70948-9](https://doi.org/10.1016/s0210-5691(09)70948-9)

Huang, L. U., Chen, C. H., Chou, C. F., Lu, J. J., Chi, W. M., & Lee, W. H. (2001). A comparison of methods for yeast identification including CHROMagar *Candida*, Vitek system YBC and a traditional biochemical method. Chinese medical journal; Free China .ed, 64(10), 568–574. Obtenido de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11791943/>

Hull, C., & Johnson, A. (1999). Identification of a Mating Type-Like Locus in the Asexual Pathogenic Yeast *Candida albicans*. Science, 285(5431), 1271-1275. <https://doi.org/10.1126/science.285.5431.1271>

Mba, I. E., Nweze, E. I., Eze, E. A., & Anyaegbunam, Z. K. G. (2022). Genome plasticity in *Candida albicans*: A cutting-edge strategy for evolution, adaptation, and survival. Infection, genetics and evolution. Journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases, 99, 105256. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105256>

- Klotz, S. A., Gaur, N. K., Lake, D. F., Chan, V., Rauceo, J., & Lipke, P. N. (2004). Degenerate peptide recognition by *Candida albicans* adhesins Als5p and Als1p. *Infection and immunity*, 72(4), 2029–2034. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.4.2029-2034.2004>
- Kumar, K., Askari, F., Sahu, M., & Kaur, R. (2019). *Candida glabrata*: A Lot More Than Meets the Eye. *Microorganisms*, 7(2), 39. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7020039>
- Lachke, S. A., Srikantha, T., Tsai, L. K., Daniels, K., & Soll, D. R. (2000). Phenotypic Switching in *Candida glabrata* involves phase-specific regulation of the metallothionein gene MT-II and the newly discovered hemolysin gene HLP. *Infection and immunity*, 68(2), 884–895. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.2.884-895.2000>
- Legrand, M., Lephart, P., Forche, A., Mueller, F. M., Walsh, T., Magee, P. T., & Magee, B. B. (2004). Homozygosity at the MTL locus in clinical strains of *Candida albicans*: karyotypic rearrangements and tetraploid formation. *Molecular microbiology*, 52(5), 1451–1462. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04068.x>
- Linares, S. M.J., Solis, C.F.(2007) Identificación de levaduras. Revista Iberoamericana de Micología. 2 (11). SBN: 978-84-611-8776-8. Recuperado de: <https://www.guia.reviberoammicol.com/>
- Lobaina Rodríguez, T., Zhurbenko, R., Rodríguez Martínez, C., Zayas Ruíz, Y., & Rodríguez Rodríguez, A. (2010). Identificación de especies de *Candida* de importancia clínica con un método auxonograma modificado. *Revista Cubana De Medicina Tropical*, (62), 66-81. Recuperado de: <https://www.imbiomed.com.mx/articulo.php?id=71632>
- López, C.; Giro, L.; Ramos, L.; Ramadán, S.; Bulacio, L. (2005). Comparación de diferentes métodos para la identificación de especies del género *Candida* Revista Argentina de Microbiología, vol. 37, núm. 1, marzo, 2005, pp. 16-21. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/2130/213016778003.pdf>
- Lu, Y., Su, C., Wang, A., & Liu, H. (2011). Hyphal Development in *Candida albicans* requires two temporally linked changes in promoter chromatin for initiation and maintenance. *Plos Biology*, 9(7), e1001105. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001105>
- Luo, G., & Mitchell, T. G. (2002). Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*, 40(8), 2860–2865. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.8.2860-2865.2002>
- Mba, I. E., & Nweze, E. I. (2020). Mechanism of *Candida* pathogenesis: revisiting the vital drivers. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*

- : official publication of the European Society of Clinical Microbiology, 39(10), 1797–1819. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03912-w>
- Miller, M. G., & Johnson, A. D. (2002). White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell*, 110(3), 293–302. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00837-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00837-1)
- Morschhäuser, J. (2010). Regulation of white-opaque switching in *Candida albicans*. *Med Microbiol Immunol* 199, 165–172 <https://doi.org/10.1007/s00430-010-0147-0>
- Mühlschlegel, F. A., & Fonzi, W. A. (1997). PHR2 of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-regulated gene PHR1 with an inverted pattern of pH-dependent expression. *Molecular and cellular biology*, 17(10), 5960–5967. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.10.5960>
- Munro, C., Bates, S., Buurman, E., Hughes, H., MacCallum, D., & Bertram, G. . (2005). *mnt1p* and *mnt2p* of *Candida albicans* are partially redundant α -1,2-mannosyltransferases that participate in o-linked mannosylation and are required for adhesion and virulence. *Journal Of Biological Chemistry*, 280(2), 1051-1060. <https://doi.org/10.1074/jbc.m411413200>
- Naglik, J. R., Rodgers, C. A., Shirlaw, P. J., Dobbie, J. L., Fernandes-Naglik, L. L., Greenspan, D., Agabian, N., & Challacombe, S. J. (2003). Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. *The Journal of infectious diseases*, 188(3), 469–479. <https://doi.org/10.1086/376536>
- Noble, S. M., Gianetti, B. A., & Witchley, J. N. (2017). *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. *Nature reviews. Microbiology*, 15(2), 96–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.157>
- Núñez Reza, K. (2016). Caracterización de los genes MTL de *Candida glabrata* en *Saccharomyces cerevisiae* (Tesis de Maestría, INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.)
- Panizo, M., & Reviákina, V. (2001). *Candida albicans* y su efecto patógeno sobre las mucosas. *Revista De La Sociedad Venezolana De Microbiología*, (21), 38-45. Recuperado de: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562001000200011&lng=es.
- Pemán, J., Zaragoza, R., & Salavert, M. (2013). Control y prevención de las infecciones nosocomiales y asociadas a cuidados sanitarios causadas por especies de *Candida* y otras levaduras. *Revista española de quimioterapia: publicacion oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia*, 26(4), 298–311. Recuperado de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24399344/>

- Polke, M., Hube, B., & Jacobsen, I. D. (2015). *Candida* survival strategies. *Advances in applied microbiology*, *91*, 139–235. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.12.002>
- Popp, C., Ramírez-Zavala, B., Schwanfelder, S., Krüger, I., & Morschhäuser, J. (2019). Evolution of Fluconazole-Resistant *Candida albicans* Strains by Drug-Induced Mating Competence and Parasexual Recombination. *mBio*, *10*(1), e02740-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.02740-18>
- Porman, A., Hirakawa, M., Jones, S., Wang, N., & Bennett, R. (2013). MTL–Independent Phenotypic switching in *Candida tropicalis* and a Dual Role for Wor1 in Regulating switching and Filamentation. *Plos Genetics*, *9*(3), e1003369. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003369>
- Reyes-Montes, M. D. R., Duarte-Escalante, E., Martínez-Herrera, E., Acosta-Altamirano, G., & Frías-De León, M. G. (2017). Status of the etiology of candidiasis in Mexico. *Revista iberoamericana de micología*, *34*(4), 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2017.05.001>
- Ruiz-Gaitán, A. C., Fernández-Pereira, J., Valentin, E., Tormo-Mas, M. A., Eraso, E., Pemán, J., & de Groot, P. W. J. (2018). Molecular identification of *Candida auris* by PCR amplification of species-specific GPI protein-encoding genes. *International journal of medical microbiology: IJMM*, *308*(7), 812–818. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.06.014>
- Rustad, T. R., Stevens, D. A., Pfaller, M. A., & White, T. C. (2002). Homozygosity at the *Candida albicans* MTL locus associated with azole resistance. *Microbiology (Reading, England)*, *148*(Pt 4), 1061–1072. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-4-1061>
- Rustad, T., Choiniere, J., Howard, D., & White, T. (2006). The *Candida albicans* mating type like locus [MTL] is not involved in chlamydospore formation. *Medical Mycology*, *44*(7), 677-681. <https://doi.org/10.1080/13693780600840914>
- Sachivkina, N., Podoprigora, I., & Bokov, D. (2021). Morphological characteristics of *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, and *Candida glabrata* biofilms, and response to farnesol. *Veterinary World*, 1608-1614. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1608-1614>
- Salas, G. (2008). Construcción de cepas de *Candida glabrata* con deleciones en los loci MTL y análisis del estado transcripcional en el locus MTL1. Implicaciones en un posible ciclo sexual (Tesis de maestría, INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C)
- Saporito-Irwin, S. M., Birse, C. E., Sypherd, P. S., & Fonzi, W. A. (1995). PHR1, a pH-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. *Molecular and cellular biology*, *15*(2), 601–613. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.2.601>

- Seyoum, E., Bitew, A., & Mihret, A. (2020). Distribution of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species isolated in different clinical samples and their in vitro antifungal susceptibility profile in Ethiopia. *BMC infectious diseases*, 20(1), 231. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-4883-5>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x>
- Soll D. R. (2014). The role of phenotypic switching in the basic biology and pathogenesis of *Candida albicans*. *Journal of oral microbiology*, 6, 10.3402/jom.v6.22993. <https://doi.org/10.3402/jom.v6.22993>
- Soll, D. R., Langtimm, C. J., McDowell, J., Hicks, J., & Galask, R. (1987). High-frequency switching in *Candida* strains isolated from vaginitis patients. *Journal of clinical microbiology*, 25(9), 1611–1622. <https://doi.org/10.1128/jcm.25.9.1611-1622.1987>
- Srikantha, T., Lachke, S., & Soll, D. (2003). Three Mating Type-Like Loci in *Candida glabrata*. *Eukaryotic Cell*, 2(2), 328-340. <https://doi.org/10.1128/ec.2.2.328-340.2003>
- Srikantha, T., Zhao, R., Daniels, K., Radke, J., & Soll, D. R. (2005). Phenotypic switching in *Candida glabrata* accompanied by changes in expression of genes with deduced functions in copper detoxification and stress. *Eukaryotic cell*, 4(8), 1434–1445. <https://doi.org/10.1128/EC.4.8.1434-1445.2005>
- Tapia P, Cecilia. (2008). *Candida glabrata*. *Revista chilena de infectología*, 25(4), 293. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182008000400009>
- Wächtler, B., Wilson, D., & Hube, B. (2011). *Candida albicans* Adhesion to and Invasion and Damage of Vaginal Epithelial Cells: Stage-Specific Inhibition by Clotrimazole and Bifonazole. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 55(9), 4436-4439. <https://doi.org/10.1128/aac.00144-11>
- Westwater, C., Schofield, D., Nicholas, P., Paulling, E., & Balish, E. (2007). *Candida glabrata* and *Candida albicans*; dissimilar tissue tropism and infectivity in a gnotobiotic model of mucosal candidiasis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 51(1), 134-139. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695x.2007.00287.x>
- Wu, W., Lockhart, S. R., Pujol, C., Srikantha, T., & Soll, D. R. (2007). Heterozygosity of genes on the sex chromosome regulates *Candida albicans* virulence. *Molecular microbiology*, 64(6), 1587–1604. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05759.x>
- Wu, W., Pujol, C., Lockhart, S. R., & Soll, D. R. (2005). Chromosome loss followed by duplication is the major mechanism of spontaneous mating-type locus

homozygosis in *Candida albicans*. *Genetics*, 169(3), 1311–1327.
<https://doi.org/10.1534/genetics.104.033167>

Xie, J., Du, H., Guan, G., Tong, Y., Kourkoumpetis, T. K., Zhang, L., Bai, F.-yan, & Huang, G. (2012). *n*-acetylglucosamine induces white-to-opaque switching and mating in *Candida tropicalis*, providing new insights into adaptation and fungal sexual evolution. *Eukaryotic Cell*, 11(6), 773–782.
<https://doi.org/10.1128/ec.00047-12>

13. Anexos

1. Agar YPD

Para 1000 mL:

Reactivo	Cantidad (g)
Extracto de levadura	10
Peptona	20
Dextrosa	20
Agar	20

2. Caldo YPD

Para 1000 mL:

Reactivo	Cantidad (g)
Extracto de levadura	10
Peptona	20
Dextrosa	20

3. Solución TBE 10X

Para 1000 mL

Reactivo	Cantidad
Tris	108.0 g
Ácido bórico	55.0 g
EDTA 0.5 M	40.0 mL
Agua destilada	cbp

4. Solución TBE 1X

Reactivo	Cantidad
solución TBE 10X	100 mL
Agua destilada	900 mL

Nota: Se verifica el pH, de ser necesario se realiza ajuste de pH para llevarlo a 8.0

5.Solución NaOH 20 mM

Para 1000 mL:

Reactivo	Cantidad
Hidróxido de Sodio	0.79 g
Agua destilada	cbp

6.Extracción de DNA por método de Fenol-Cloroformo

1. Cultivas las cepas de levaduras en 50 mL de caldo YPD por 48 h a 37°C en tubos cónicos Falcón.
2. Centrifugar los tubos a 3000 rpm por 10 minutos y decantar el caldo YPD sobrenadante para obtener una pastilla de masa fúngica.
3. En nitrógeno líquido, congelar las pastillas obtenidas en el fondo de los tubos Falcón y mantener en congelación a -70°C hasta su procesamiento.
4. En un mortero estéril, colocar la pastilla obtenida del cultivo y añadir nitrógeno líquido, se realiza la molienda adicionando nitrógeno líquido cuando este se evapora para continuar la molienda hasta obtener un polvo blanquecino fino y seco, procurando evitar la pérdida de este.
5. Traspasar el polvo obtenido de la molienda a un tubo Falcón nuevo y añadir 3 mL de buffer de lisis, se deja reposar unos 5 minutos y se mezcla en agitador hasta obtener una mezcla homogénea de aspecto viscoso.
6. En cada tubo falcón, se adiciona a la muestra con buffer de lisis 2 mL de fenol y se mezcla en vortex.
7. Posteriormente se centrifugan los tubos a 11000 rpm durante 10 minutos.
8. Una vez centrifugadas, se separa con ayuda de pipetas automáticas la fase superior observada en los tubos y se traspasa a un tubo eppendorf estéril.
9. A cada tubo que contiene la fase superior se añade 1 mL de cloroformo y se mezcla en vortex, para posteriormente centrifugarlos a 11000 rpm por 10 minutos.
10. Se repite el paso 8 dos veces y al terminar, la fase superior se pasa a tubos eppendorf estériles, donde se añade 0.1 volúmenes de acetato de potasio 7.5 M y 0.6 volúmenes de isopropanol, posteriormente se mezcla en vortex.
11. Los tubos se centrifugan a 11000 rpm durante 10 minutos.
12. Posterior a la centrifugación, se decanta el sobrenadante y se deja secar el isopropanol para obtener una pastilla pequeña de DNA.
13. Se resuspendió la pastilla de DNA en 100 µL de agua inyectable estéril y se mantiene en congelación hasta su uso.

7.Purificación de muestras de DNA

1. A muestras de DNA resuspendidas en 100 μL de agua estéril, se adicionan 2 μL de RNAsa y se incuba durante 30 minutos a 37°C.
2. Se lleva a un volumen de 300 μL con agua estéril y se añaden 150 μL de acetato de amonio 7.5 M y se mezcla en vortex.
3. Se añaden 450 μL de fenol y se centrifugan a 11000 rpm durante 10 minutos, posteriormente se separa la fase superior y se pasa a otro tubo eppendorf.
4. A cada tubo que contiene la fase superior, se añade 450 μL de cloroformo, se mezcla en vortex y se centrifuga a 11000 rpm por 10 minutos.
5. Posteriormente la fase superior se pasa a otro tubo eppendorf y se repite el paso 4.
6. Después de repetir el paso 4, la fase superior se adiciona con 450 μL de etanol absoluto y se mantiene a -20°C durante 30 minutos.
7. Los tubos se centrifugan a 11000 rpm por 10 minutos y se obtiene una pastilla de DNA.
8. Se realizan dos lavados con etanol al 70%, se realiza añadiendo 1 mL de etanol y posteriormente centrifugando a 11000 rpm por 10 minutos para finalmente decantar el sobrenadante.
9. Posterior a decantar el etanol, se deja secar la pastilla y una vez seca, se resuspendió la pastilla en 100 μL de agua estéril para finalmente conservarla en congelación a -70°C hasta su uso.

8.Cuantificación de DNA y estandarización de las muestras.

- A partir de los extractos de DNA obtenidos y resuspendidos en agua estéril se preparan en tubos eppendorf 500 μL de diluciones 1:100.
- Para determinar la concentración de DNA de cada muestra, se procede a realizar la lectura de la absorbancia de cada dilución preparada a tres longitudes de onda distintas, a 260 nm, 280 nm y 230 nm. Se emplea un blanco de agua.
- A partir de las lecturas de absorbancia, se calcula la concentración en $\mu\text{g}/\text{mL}$ con la siguiente formula:

$$\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = \frac{(50\mu\text{g})(\text{Abs a } 260\text{nm})(\text{factor de dilución})}{1000}$$

- A partir de la concentración de cada muestra, se preparó una solución de 500 ng/mL de DNA empleando agua estéril para la dilución.
- A partir de las muestras a 500 ng/ μL se prepararon diluciones 1:10 para obtener suspensiones de DNA a una concentración de 50 ng/ μL para los ensayos de amplificación.

9. Resultados de *Candida albicans*

CEPA	Sitio anatómico de aislamiento	Origen de muestra	morfología microscopia			Túbulos germinales	Clamidoconidios	Biopelículas (ABS)	Configuración MTL		
			Blastoconidios	Hifas	Pseudohifas						
Ca	CAF2	NA									
Ca	3	Ex Vaginal	HUP	+	+	+	+	+	0.138	a/α	heterocigoto
Ca	5	Ex Vaginal	HUP	+	+	+	+	+	0.147	a/α	heterocigoto
Ca	7	NE	HUP	+	+	-	+	+	0.198	a/α	heterocigoto
Ca	12	Cavidad bucal	Estomatología, BUAP	+	+	-	+	+	0.121	a/α	heterocigoto
Ca	14	Cavidad bucal	Estomatología, BUAP	+	+	+	+	+	0.156	a/α	heterocigoto
Ca	16	Cavidad bucal	Estomatología, BUAP	+	+	-	+	+	0.168	a/α	heterocigoto
Ca	25	Hemocultivo	InDRE	+	+	+	+	+	0.081	a/α	heterocigoto
Ca	26	Uña	HUP	+	-	-	+	+	0.221	a/α	heterocigoto
Ca	27	Uña	HUP	+	+	-	+	+	0.216	a/α	heterocigoto
Ca	31	Ex faríngeo	HUP	+	+	-	+	-	0.188	a/α	heterocigoto
Ca	33	Ex faríngeo	HUP	+	+	-	+	+	0.091	a/α	heterocigoto
Ca	37	Ex faríngeo	HUP	+	-	+	+	+	0.185	a/α	heterocigoto
Ca	38	Ex faríngeo	HUP	+	+	+	+	+	0.139	a/α	heterocigoto
Ca	39	Cavidad bucal	Estomatología, BUAP	+	+	+	+	+	0.211	a/α	heterocigoto
Ca	40	Cavidad bucal	Estomatología, BUAP	+	-	-	+	+	0.169	a/α	heterocigoto
Ca	41	Cavidad bucal	Estomatología, BUAP	+	+	-	+	-	0.234	a/α	heterocigoto
Ca	45	Cavidad bucal	Estomatología, BUAP	+	+	-	-	+	0.193	a/α	heterocigoto
Ca				+	+	-	-	+	0.181	a/α	heterocigoto

Ca	50	Cavidad bucal	Estomatología, BUAP	+	+	+	+	-	0.178	a/α	heterocigoto
Ca	52	Cavidad bucal	Estomatología, BUAP	+	+	+	+	+	0.218	a/a	homocigoto
Ca	53	Uña	HUP	+	+	+	+	+	0.187	a/α	heterocigoto
Ca	54	Uña	HUP	+	+	-	+	+	0.197	a/α	heterocigoto
Ca	56	Cavidad bucal	Estomatología, BUAP	+	-	+	+	+	0.138	a/α	heterocigoto
Ca	57	NE	HUP	+	-	-	+	+	0.193	a/α	heterocigoto
Ca	58	Cavidad bucal	Estomatología, BUAP	+	+	-	+	+	0.234	a/α	heterocigoto
Ca	67	NE	HUP	+	+	-	-	+	0.144	a/α	heterocigoto
Ca	147	NE	HUP	+	+	+	+	+	0.167	a/α	heterocigoto
Ca	152	Hemocultivo	InDRE	+	+	+	+	+	0.248	α/α	homocigoto
Ca	516	Hemocultivo	InDRE	+	+	-	+	+	0.189	a/α	heterocigoto
Ca	J01	Urocultivo	Particular	+	-	-	+	+	0.109	a/α	heterocigoto
Ca	MU1	Urocultivo	Particular	+	-	-	+	+	0.177	a/α	heterocigoto

NA: No aplica, NE: No especificado, HUP: Hospital Universitario de Puebla

10. Resultados de *C. tropicalis*

Cepa	Sitio anatómico de aislamiento	Origen de muestra	morfología microscópica			Tubos germinales	Clamidoconidios	biopelícula (ABS)	Configuración MTL		
			Blastoconidios	Hifas	Pseudohifas						
Ct	MYA-3404	NA	HUP	+	-	+	-	-	0.075	a/a	heterocigoto
Ct	1	Espacio interdigital	HUP	+	-	-	-	-	0.079	a/a	heterocigoto
Ct	2	Ex faríngeo	InDRE	+	-	-	-	-	0.186	a/a	heterocigoto
Ct	4	Ex faríngeo	InDRE	+	-	-	-	-	0.114	a/a	heterocigoto
Ct	5	Ex faríngeo	InDRE	+	-	+	-	-	0.088	a/a	heterocigoto
Ct	7	urocultivo	InDRE	+	-	+	-	-	0.095	a/a	heterocigoto
Ct	25	uña	InDRE	+	-	+	-	-	0.087	a/a	heterocigoto
Ct	65	uña	InDRE	+	-	+	-	-	0.102	a/a	heterocigoto
Ct	66	NE	InDRE	+	-	+	-	-	0.121	a/a	heterocigoto
Ct	71	NE	InDRE	+	-	-	-	-	0.113	a/a	heterocigoto
Ct	129	urocultivo	InDRE	+	-	+	-	-	0.097	a/a	heterocigoto
Ct	144	NE	InDRE	+	-	-	-	-	0.107	a/a	heterocigoto
Ct	170	Hemocultivo	InDRE	+	-	-	-	-	0.187	a/a	heterocigoto
Ct	171	Ex faríngeo	InDRE	+	-	-	-	-	0.103	a/a	heterocigoto
Ct	176	NE	InDRE	+	-	+	-	-	0.203	a/a	Homocigoto
Ct	217	Cavidad bucal	InDRE	+	-	+	-	-	0.134	a/a	heterocigoto
Ct	417	Hemocultivo	InDRE	+	-	+	-	-	0.188	a/a	Homocigoto
Ct	2076	NE	InDRE	+	-	-	-	-	0.108	a/a	heterocigoto
Ct	2112	Uñas	InDRE	+	-	-	-	-	0.087	a/a	heterocigoto
Ct	2126	Hemocultivo	InDRE	+	-	-	-	-	0.183	a/a	Homocigoto
Ct	2129	Ex faríngeo	InDRE	+	-	+	-	-	0.137	a/a	heterocigoto
Ct	2138	Hemocultivo	InDRE	+	-	+	-	-	0.097	a/a	heterocigoto

Ct	8661	Urocultivo	InDRE	+	-	+	-	-	0.123	a/a	heterocigoto
Ct	28-sep	Uñas	InDRE	+	-	-	-	-	0.108	a/a	heterocigoto
Ct	261-05	urocultivo	InDRE	+	-	-	-	-	0.107	a/a	heterocigoto
Ct	358-03	Hemocultivo	InDRE	+	-	+	-	-	0.134	a/a	heterocigoto
Ct	76-04	NE	HUP	+	-	+	-	-	0.173	a/a	heterocigoto
Ct	76-09	Punta de cánula	InDRE	+	-	+	-	-	0.188	a/a	Homocigoto
Ct	78-05	Uña	HUP	+	-	-	-	-	0.108	a/a	heterocigoto
Ct	M01	Uña	HUP	+	-	+	-	-	0.102	a/a	heterocigoto
Ct	Sara	Uña	HUP	+	-	+	-	-	0.143	a/a	heterocigoto

NA: No aplica, NE: No especificado, HUP: Hospital Universitario de Puebla

11.Resultados de *C. glabrata*

Cepa	Sitio anatómico de aislamiento	Origen de muestra	morfología microscópica	Tubos germinales	Clamidoconidios	biopelícula (ABS)	MTL1	MTL2	MTL3	CONFIGURACION MTL	
Cg	ATCC 2001	NA	NA	Blastoconidios	-	-	0.068	α	a	α	ααα
Cg	J01	Urocultivo	Particular	Blastoconidios	-	-	0.049	a	α	α	ααα
Cg	J02	Lesión	Particular	Blastoconidios	-	-	0.066	α	a	α	ααα
Cg	J03	Lesión	Particular	Blastoconidios	-	-	0.038	α	a	α	ααα
Cg	J04	Punta de catéter	Particular	Blastoconidios	-	-	0.071	α	a	α	ααα
Cg	J05	Lesión	Particular	Blastoconidios	-	-	0.055	α	a	α	ααα
Cg	J06	Ex vaginal	Particular	Blastoconidios	-	-	0.052	a	a	α	ααα
Cg	P1	Ex vaginal	Particular	Blastoconidios	-	-	0.045	α	α	α	ααα
Cg	P2	Ex vaginal	Particular	Blastoconidios	-	-	0.059	a	a	α	ααα
Cg	5.10	NE	NE	Blastoconidios	-	-	0.051	a	α	α	ααα
Cg	5.3	NE	NE	Blastoconidios	-	-	0.068	α	a	α	ααα
Cg	8	NE	NE	Blastoconidios	-	-	0.045	a	a	α	ααα
Cg	17	Ex vaginal	NE	Blastoconidios	-	-	0.067	α	a	α	ααα
Cg	26	NE	NE	Blastoconidios	-	-	0.057	α	a	α	ααα
Cg	43-04	NE	NE	Blastoconidios	-	-	0.058	α	α	α	ααα
Cg	57	NE	NE	Blastoconidios	-	-	0.082	a	a	α	ααα
Cg	88	NE	NE	Blastoconidios	-	-	0.044	α	a	α	ααα
Cg	143	NE	NE	Blastoconidios	-	-	0.074	a	α	α	ααα
Cg	152	NE	NE	Blastoconidios	-	-	0.051	α	a	α	ααα
Cg	166	NE	NE	Blastoconidios	-	-	0.047	α	α	α	ααα
Cg	176	NE	NE	Blastoconidios	-	-	0.066	α	α	α	ααα
Cg	442	NE	NE	Blastoconidios	-	-	0.064	a	a	α	ααα
Cg	2112	NE	NE	Blastoconidios	-	-	0.042	α	α	α	ααα
Cg	2131	NE	NE	Blastoconidios	-	-	0.074	α	α	α	ααα
Cg	2228	NE	NE	Blastoconidios	-	-	0.053	a	a	α	ααα

Cg	2623	NE	NE	Blastoconidios	-	-	0.068	α	a	α	ααα
Cg	2664	NE	NE	Blastoconidios	-	-	0.049	a	a	α	ααα
Cg	130440	NE	NE	Blastoconidios	-	-	0.067	α	α	α	ααα

NA: No aplica, NE: No especificado.