



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**ESCUELA DE POSTGRADO**

**“CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENÉTICA  
DE LA FILAMENTACIÓN DE CEPAS CLÍNICAS DE  
*Candida albicans*”**

**RUTH ELSY PÉREZ BALL**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y  
CIENCIAS MÉDICAS CON MENCIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

**Director de Tesis**

**Prof. Dr. GERMÁN HERMOSILLA DÍAZ**

**2011**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**

## **INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina,  
que la Tesis de Magíster presentada por la candidata

**RUTH ELSY PÉREZ BALL**

**ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como  
requisito para optar al Grado de Magíster en Ciencias Biológicas y  
Ciencias Médicas con mención Microbiología en el Examen de  
Defensa de Tesis rendido el día 17 de Junio de 2011**

**Prof. Dr. Germán Hermosilla D.**

**Director de Tesis**

Programa de Microbiología y Micología, ICBM  
Facultad de Medicina, Universidad de Chile

### **COMISION INFORMANTE DE TESIS**

**Prof. Dr. Juan Carlos Salazar**

**Prof. Dr. Víctor Cifuentes**

**Prof. Dr. Antonio Castillo**

**Prof. Dr. Gonzalo Osorio**

**Presidente Comisión**

## **I. DEDICATORIA**

*A Dios que ha sido mi guía en este andar y nunca me ha abandonado  
A mi familia que siempre ha estado ahí...  
A Mario, por ser un regalo de Dios para mi...*

## II. AGRADECIMIENTOS

A Dios por guiarme y colocar en el camino a personas hermosas que me acompañaron en esta aventura.

A mi familia por levantarme cuando estaba caída, por darme ánimos y creer en mi. A mi mamá por siempre estar conmigo así sea en la distancia, por enseñarme lo que realmente vale en la vida, cuidar el ALMA. A mi papá por ser un motivo de admiración, un ejemplo en mi vida el cual quiero seguir no sólo por su intelecto sino por su rectitud y valores

Al Profesor Germán Hermosilla por convertirse en mi amigo y tenerme la paciencia de un padre, por haber contribuido no sólo al crecimiento de la mente sino del espíritu.

A Liu (Liudmila Mora) por ser una gran amiga, por darle emoción al laboratorio y compartir conmigo hermosos momentos, por hacerme reír a carcajadas y enseñarme a burlarme de situaciones de la vida para hacer más amable la realidad.

A las chiquillas (chileno) o las pelás (colombiano) de los laboratorios, Marce (Marcela Molina), Tania Henríquez, Bárbara Ávila, Luisa Núñez, Paulina Torres, Eta (Margareta Muhlhauser), Vivi (Vivian Bobadilla) y a los muchachos, Jorge y Harolillo (Harold), a todos ellos les doy las gracias por los momentos de alegría y acompañarme en aquellos no tan felices. Los extrañaré.

A la Profe Mari T (María Teresa Ulloa) por estar siempre pendiente al saber que la familia estaba lejos. Y al Profe Gonzalo por hacerme reír de vez en cuando con sus locuras.

Al Profesor Roberto Vidal por siempre estar dispuesto a ayudarme en lo que hacía falta y prestarme el equipo para realizar los PCR en tiempo real. Al profesor Juan Carlos Salazar por colaborar con lo que estaba a su alcance

A Patricio Valenzuela (pato) que me hacía reír y siempre estuvo dispuesto no sólo a brindarme consejo en temas intelectuales, sino a ser amigo en los momentos de dificultad.

A todas las personas que conocí en Microbiología, personas de los laboratorios de arriba, que de alguna forma me ayudaron en las cosas que necesitaba

A Mario por apoyarme, sostenerme, regañarme cuando debía y caminar conmigo no adelante ni atrás, sino a mi lado.

### III. ÍNDICE GENERAL

I.	DEDICATORIA .....	2
II.	AGRADECIMIENTOS.....	2
III.	ÍNDICE GENERAL .....	4
IV.	ÍNDICE DE FIGURAS .....	5
V.	ÍNDICE DE TABLAS.....	6
VI.	RESUMEN .....	7
1.	INTRODUCCIÓN .....	11
2.	HIPÓTESIS.....	24
3.	OBJETIVO GENERAL .....	24
4.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
5.	MATERIAL Y MÉTODOS .....	25
5.1.	Cepas.....	25
5.2.	Reguladores transcripcionales para análisis de expresión génica.....	26
5.3.	Pruebas cuantitativas de filamentación.....	27
5.4.	Análisis de expresión por RT-PCR.....	28
5.5.	Confirmación por PCR en tiempo real.....	34
5.6.	Eficiencia de Amplificación de PCR.....	35
5.7.	Validación de los Experimentos.....	36
5.8.	Métodos estadísticos.....	36
6.	RESULTADOS.....	37
6.1.	Reidentificación de cepas.....	37
6.2.	Filamentación en medios inductores.....	37
6.3.	Análisis de expresión por RT-PCR semicuantitativo.....	41
6.4.	Análisis de expresión por PCR en tiempo real.....	47
6.4.1.	Eficiencia de amplificación y especificidad de los partidores.....	47
6.4.2.	Validación de los experimentos por PCR en tiempo real.....	48
6.4.3.	Análisis de los genes <i>EFG1</i> y <i>NRG1</i> por PCR en tiempo real.....	49
7.	DISCUSIÓN .....	52
7.1.	Diferencias de la filamentación en diferentes medios Inductores.....	52
7.2.	Expresión de reguladores transcripcionales en cepas de alto y bajo grado de filamentación por RT-PCR semicuantitativo.....	54
7.3.	Expresión de <i>EFG1</i> y <i>NRG1</i> en cepas de alto y bajo grado de filamentación por PCR en tiempo real.....	56
8.	CONCLUSIONES.....	65
9.	PROYECCIONES.....	66
10.	BIBLIOGRAFÍA .....	67

#### IV. ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Regulación de la morfogénesis en <i>C. albicans</i> por múltiples vías de señalización. ....	17
<b>Figura 2:</b> Confirmación de las cepas clínicas de <i>C. albicans</i> mediante CHROMagar-Candida.....	37
<b>Figura 3:</b> Filamentación de cepas clínicas <i>C. albicans</i> en medios inductores. ....	38
<b>Figura 4:</b> Extracción de RNA en medio LEE de las cepas SC5314, CVV5 y CVV22 de <i>C. albicans</i> . ....	41
<b>Figura 5:</b> Electroforesis en gel de agarosa para determinar el ciclo óptimo de PCR para el gen <i>NRG1</i> en la cepa SC5314. ....	43
<b>Figura 6:</b> Análisis de RT-PCR semicuantitativo de las cepas de <i>C. albicans</i> SC5314, CVV5 y CVV22. Análisis de RT-PCR de mRNA de <i>CPH1</i> y <i>EFG1</i> .....	44
<b>Figura 7:</b> Análisis de RT-PCR semicuantitativo de las cepas de <i>C. albicans</i> SC5314, CVV5 y CVV22. Análisis de RT-PCR de mRNA de <i>NRG1</i> y <i>RIM101</i> . ....	46
<b>Figura 8:</b> Curvas de “melting” de PCR en tiempo real a partir del cDNA de los genes <i>ACT1</i> , <i>EFG1</i> y <i>NRG1</i> . ....	47
<b>Figura 9:</b> Experimento de validación de PCR en tiempo real. ....	48
<b>Figura 10:</b> Análisis de los genes <i>EFG1</i> y <i>NRG1</i> de cepas de <i>C. albicans</i> SC5314, CVV5, CVV22 y CD 36 ( <i>C. dubliniensis</i> ) por PCR en tiempo real.....	50

## V. ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Cepas de <i>Candida</i> sp. utilizadas en este estudio. ....	26
<b>Tabla 2:</b> Reguladores transcripcionales y gen de referencia seleccionados para este estudio. ....	27
<b>Tabla 3:</b> Partidores para los genes <i>CPH1</i> , <i>EFG1</i> , <i>NRG1</i> , <i>RIM101</i> y <i>ACT1</i> utilizados en RT-PCR semicuantitativo. ....	32
<b>Tabla 4:</b> Partidores para los genes <i>EFG1</i> , <i>NRG1</i> y <i>ACT1</i> para PCR en tiempo real. ....	35
<b>Tabla 5:</b> Clasificación de cepas de <i>C. albicans</i> según su filamentación en medios inductores. ....	40
<b>Tabla 6:</b> Ciclos óptimos de PCR de los distintos genes en la cepa SC5314. ....	42
<b>Tabla 7:</b> Eficiencia de partidores utilizados en PCR tiempo real. ....	47
<b>Tabla 8:</b> Resumen del análisis de expresión de <i>EFG1</i> y <i>NRG1</i> por RT-PCR semicuantitativo y PCR en tiempo real en las cepas SC5314, CVV5 y CVV22. ....	51

## VI. RESUMEN

*Candida albicans* es el principal patógeno fúngico oportunista del hombre, capaz de causar desde infecciones superficiales, en individuos sanos, hasta micosis severas en pacientes inmunocomprometidos, con compromiso vital. Esta levadura bajo determinadas condiciones (pH, crecimiento a 37°C, microaerofilia, suero, macrófagos, entre otras), puede dar origen a estructuras filamentosas, del tipo hifas y pseudohifas. La filamentación ha sido considerada como un factor de virulencia importante de *C. albicans*.

Considerando la importancia de la morfogénesis en la patogénesis de la levadura, nosotros estudiamos la expresión diferencial de algunos reguladores transcripcionales involucrados en filamentación (*CPH1*, *EFG1*, *RIM101* y *NRG1*). Nuestros resultados mostraron diferencias en filamentación en 10 cepas clínicas de *C. albicans* cuando crecieron en medios inductores de filamentación (LEE, SPIDER, YPS y SLAD). Entre estas cepas, *C. albicans* CVV5 fue altamente filamentadora (87,4% en LEE y 66,8 en YPS), mientras que CVV22 mostró una baja filamentación (4,2% en LEE y 6,9 en YPS). Por lo tanto, estas dos cepas fueron escogidas para un análisis de expresión transcripcional de los reguladores en los medios YPS y LEE.

El estudio de los genes *CPH1* y *RIM101* por RT-PCR semicuantitativo en CVV22 y CVV5 no mostró cambios en los niveles transcripcionales y no hubo asociación con el grado de filamentación en este estudio. Por otra parte, dado que

los niveles de *EFG1* y *NRG1*, mostraron cambios transcripcionales, estos genes fueron analizados por PCR en tiempo real.

Con respecto a *EFG1*, ensayos de PCR en tiempo real no revelaron cambios significativos en su expresión en los medios LEE e YPS. Sin embargo, el nivel de expresión transcripcional del gen represor de la filamentación *NRG1* en la cepa CVV22 tuvo un aumento significativo en el medio LEE (4,9 veces) y en el medio YPS (4,2 veces), como era esperado considerando su fenotipo de baja filamentación. Sin embargo, en la cepa de alta filamentación CVV5 y la cepa de referencia SC5314, donde se esperaba una disminución de los niveles transcripcionales, no se observaron cambios en el nivel de expresión de *NRG1* en el medio LEE. Por lo tanto, considerando el comportamiento de *CPH1*, *RIM101*, *EFG1* y *NRG1* en todas las cepas analizadas, no fue posible correlacionar sus niveles de expresión transcripcional con los grados de filamentación exhibidos por las cepas CVV5, CVV22 y SC5314, en los medios LEE e YPS..

## VII. ABSTRACT

*Candida albicans* is the major opportunistic fungal pathogen in man, causing from superficial infections in healthy individuals to severe fungal infections in immunocompromised patients with life-long commitment. Under certain conditions (pH, 37°C, microaerophilia, serum, macrophages, etc.) this yeast may originate filamentous structures, like hyphae and pseudohyphae. Filamentation has been considered an important virulence factor in *C. albicans*.

Considering the importance of morphogenesis in *C. albicans* pathogenesis, we studied the differential expression of some transcriptional regulators involved in filamentation (*CPH1*, *EFG1*, *RIM101*, *NRG1*). Our results showed differences in filamentation in 10 isolates of *C. albicans* when grow in filamentation inducing media (LEE, SPIDER, YPS and SLAD). Among these strains, *C. albicans* CVV5 was highly filamentary (87.4% in LEE and 66.8% in YPS), whereas CVV22 showed low filamentation (4.2% in LEE and 6.9% in YPS). Therefore these two strains were chosen for further analysis of transcriptional level of regulators in YPS and LEE media.

Semiquantitative RT-PCR study of *RIM101* and *CPH1* genes in CVV22 and CVV5 strains showed no changes in transcriptional levels and no association with the degree of filamentation in this study. On the other hand, because *EFG1* and *NRG1* levels showed transcriptional changes they were further analyzed by real-time PCR.

With respect to *EFG1*, real-time PCR assays revealed no significant changes in its expression in LEE and YPS media. However, the expression level of filamentation repressor *NRG1* in CVV22 strain had a significant increase in LEE (4.9 fold) and YPS (4.2 fold) media, as expected because of its low filamentation phenotype. However, in the high filamentation strain CVV5 and reference strain SC5314, where decreased transcriptional levels of *NRG1* were expected, no changes in its expression were observed in LEE medium. Therefore, considering the behavior of *CPH1*, *RIM101*, *EFG1* y *NRG1* in all strains analyzed, it was not possible to correlate its levels of transcriptional expression with the degree of filamentation exhibited by CVV5, CVV22 and SC5314 strains in LEE and YPS media.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Candida albicans* es un hongo pleomórfico, que forma parte de la microbiota normal humana, encontrándose en la cavidad oral, el tracto gastrointestinal y la mucosa génito-urinaria, sin embargo, puede comportarse como un hongo patógeno oportunista en individuos con un sistema inmune alterado, como en personas VIH(+), pacientes transplantados o personas bajo tratamientos inmunosupresores (Mathews and Witek-Janusek, 2002). Las presentaciones clínicas son variadas y pueden ir desde infecciones superficiales hasta micosis sistémicas, con compromiso vital, siendo *Candida albicans* la especie aislada con mayor frecuencia (Mathews and Witek-Janusek, 2002; Pfaller and Diekema, 2007). Según el sistema nacional de vigilancia de infecciones nosocomiales de Estados Unidos, las especies del género *Candida* son responsables del 78% de las infecciones fúngicas intrahospitalarias, constituyendo el 6<sup>to</sup> patógeno más común en este tipo de infecciones y el 4<sup>to</sup> agente más frecuente en casos de sepsis (Marol and Yucesoy, 2008). Uno de los cuadros superficiales más frecuentes es la candidiasis vulvovaginal y se estima que cerca del 70% de las mujeres han presentado un episodio de candidiasis vaginal en algún momento de su vida, de las cuales un 20% llega a ser recurrente (Sobel, 2007; Tapia, 2008a). En Chile, *C. albicans* ocupa el tercer lugar de los agentes que causan infecciones intrahospitalarias del tracto sanguíneo, asociado a nutrición parenteral, en pacientes pediátricos (8,5%) y el cuarto agente en adultos (6,1%) (Otaíza *et al.*, 2005).

## **Factores de Virulencia.**

Se han descrito diversos factores de virulencia que contribuyen a la patogenicidad de *C. albicans* (Cutler, 1991; Calderone and Gow, 2002) algunos de los cuales incluyen la producción y secreción de proteinasas, fosfolipasas y otras enzimas líticas (Schaller *et al.*, 2005; Chaffin, 2008); características de su pared celular relacionadas con adhesión (Calderone and Fonzi, 2001; Calderone and Gow, 2002); y la capacidad de esta levadura de experimentar cambios morfogénéticos (Ernst, 2000; Whiteway and Bachewich, 2007).

Esta última característica se considera como uno de los factores más importantes en *C. albicans* e involucra la transformación de la levadura en un hongo filamentoso, por lo que pasa de un estado unicelular a uno “pluricelular”. La filamentación en *C. albicans* puede ocurrir bajo una variedad de condiciones *in vivo* e *in vitro* (Ernst, 2000) y da origen a estructuras alargadas y ramificadas del tipo hifas y pseudohifas (Berman, 2006). Las primeras, corresponden a tubos de longitud variable, con un diámetro de 3 a 5  $\mu\text{m}$ , paredes paralelas y presencia de septos, mientras que las pseudohifas se originan por un proceso de gemación anómalo, con paredes no paralelas y que en lugar de septos presentan puntos de constricción (Bastidas and Heitman, 2009).

Se ha propuesto que la forma levaduriforme de *C. albicans* es importante para la diseminación y multiplicación de células viables en el cuerpo humano,

confiriéndole la capacidad para colonizar nuevos tejidos. Por otro lado, la formación de hifas y/o pseudohifas sería indispensable para penetrar tejidos, permitiéndole al hongo invadir los mismos (Sundstrom, 2006).

La transición morfológica de *C. albicans* es completamente reversible y la virulencia del hongo depende estrictamente de que este proceso esté finamente regulado a nivel molecular y genético, involucrando sensores de las señales adecuadas para filamentación, vías de transducción de señales dedicadas, reguladores transcripcionales y sus correspondientes genes blancos (Biswas *et al.*, 2007). Mutaciones que reducen la filamentación, o que por el contrario, la exacerbaban (mutaciones hiperfilamentadoras), provocan que la cepa mutante exhiba una virulencia reducida (Madhani and Fink, 1998; Mitchell, 1998; Lengeler *et al.*, 2000; Whiteway and Bachewich, 2007). Estos resultados son una clara evidencia de la relación que existe entre el proceso de filamentación de *C. albicans* y su virulencia (Madhani and Fink, 1998).

### **Inductores de la filamentación en *C. albicans*.**

La transición de levadura a un hongo filamentoso en *C. albicans* es promovida por una variedad de condiciones *in vitro*, tales como, la exposición a glucosa, prolina, metionina, N-acetilglucosamina (Land *et al.*, 1975), hemoglobina (Pendrak and Roberts, 2007) y peróxido de hidrógeno en niveles subtóxicos (Nasution *et al.*, 2008). También el crecimiento en presencia de suero; cultivo a pH neutro o la temperatura de 37°C (Ernst, 2000). En algunos casos, inductores específicos han sido

relacionados con una o varias vías de transducción de señales (Brown, 2002). Las señales *in vivo* que determinan el cambio morfogénético de *C. albicans* aún son desconocidos.

### **Vías de transducción de señales asociadas al proceso de filamentación.**

Una vez que la levadura percibe la señal externa que induce la filamentación, ocurren una serie de eventos moleculares en cascada que transmiten la señal desde la pared celular hasta los genes que en última instancia determinan el cambio morfogénético (Brown, 2002). Participan en este evento vías de transducción de señales que desembocan normalmente sobre reguladores transcripcionales, esto es, activadores o represores de la transcripción, cuya acción concertada sobre genes blancos, desencadenan la filamentación de *C. albicans*.

Al menos 5 vías de transducción de señales han sido identificadas en *C. albicans*, dos de las cuales han sido bien caracterizadas, la vía MAPKinasa y la vía de la proteína kinasa A dependiente de AMP cíclico (cAMP). Ambas vías están relacionadas con un estímulo particular, pero existe evidencia que sugiere fuertemente la comunicación cruzada (“cross talking”) entre éstas, a través de algunos de sus componentes (Biswas *et al.*, 2007).

## Vía de transducción de señales MAPKinasa.

La vía de transducción de señales MAPKinasas (“Mitogen-activated protein kinases”) ha sido asociada a la regulación transcripcional de la filamentación, como respuesta frente a estímulos del ambiente (Monge *et al.*, 2006). Comprende proteínas kinasas conservadas, que son fosforiladas en cascada, transfiriendo secuencialmente la señal externa a los factores transcripcionales (Lengeler *et al.*, 2000).

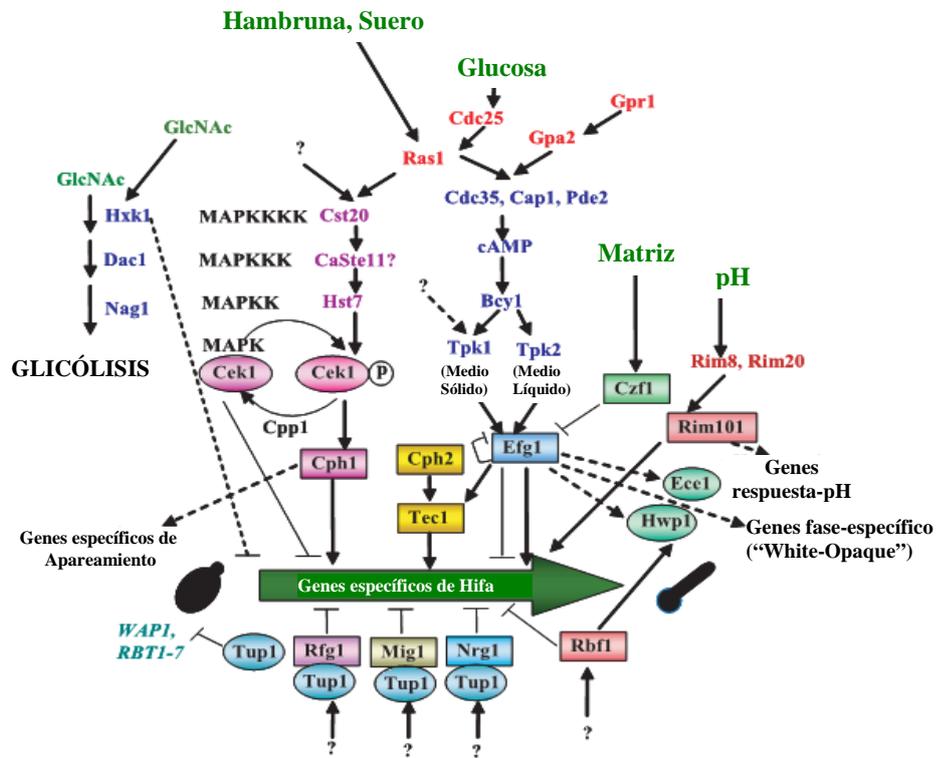
En *C. albicans*, la identificación de los componentes de esta vía ha sido posible por estudios de proteínas homólogas previamente caracterizadas en *Saccharomyces cerevisiae*. Estos componentes han sido asociados al apareamiento sexual, filamentación, osmoregulación, y respuesta a feromonas en cepas “White” y “Opaque” en *C. albicans* (Brown, 2002; Yi *et al.*, 2008).

La cascada consta de las proteínas kinasas Cst20, Hst7 y Cek1, homólogas a Ste20, Ste7 y Fus3/Kss1 de *S. cerevisiae*, respectivamente, y del factor transcripcional Cph1, homólogo a Ste12 (Figura 1). También son importantes pequeñas proteínas GTPasas, como Cdc42, la cual es responsable de activar la vía por unión con la proteína kinasa Cst20 (Kohler and Fink, 1996; Csank *et al.*, 1998; Biswas *et al.*, 2007). Mutaciones en cualquiera de los genes que codifican a las proteínas antes mencionadas, causan un defecto en el crecimiento y formación de hifas en medios sólidos inductores (Madhani and Fink, 1998; Monge *et al.*, 2006). Sin embargo, estas mutantes aún son capaces de filamentar cuando se exponen a suero

humano, lo que sugiere que la morfogénesis inducida por suero depende de otra vía de transducción (Kohler and Fink, 1996; Brown, 2002).

### **Vía de la proteína kinasa A dependiente de AMP cíclico (cAMP).**

Esta vía depende de la acumulación de AMP cíclico en respuesta a escasez de nutrientes y a la presencia de suero humano (Feng *et al.*, 1999; Borges-Walmsley and Walmsley, 2000). Ésta vía es iniciada a través de la proteína receptora Gpr1, acoplada a una proteína G (Gpa2), la cual interactúa con la región carboxi-terminal de Gpr1. Mutaciones en los genes de estas proteínas, resultan en defectos de la filamentación, que pueden ser restaurados por la adición de cAMP exógeno o la sobreexpresión de componentes río abajo de Gpa2 (Maidan *et al.*, 2005; Biswas *et al.*, 2007). Otros componentes también han sido identificados por homología con proteínas de *S. cerevisiae* que participan en la misma vía (Brown, 2002). Experimentos de epistasis han sido útiles para determinar el orden de los componentes de esta cascada (Figura 1). Proteínas como Ras1, Cdc35, Cap1 (adenilato ciclasa) provocan la acumulación de cAMP intracelular en presencia del estímulo adecuado, lo que finalmente permite la activación de las proteínas kinasas Tpk1 y Tpk2, dependientes de cAMP (Bahn and Sundstrom, 2001; Bockmuhl *et al.*, 2001; Rocha *et al.*, 2001). A través de estas kinasas, se activa por fosforilación el factor transcripcional Efg1, el que expresará los genes blancos necesarios para el proceso de filamentación (Figura 1).



**Figura 1:** Regulación de la morfogénesis en *C. albicans* por múltiples vías de señalización (Biswas *et al.*, 2007).

De la misma forma que ocurre en la vía MAPKinasa, mutaciones en los diversos componentes de esta vía resultan en un defecto en el proceso de filamentación, incluso en medios inductores fuertes, como el medio LEE, la presencia de suero humano y el contacto con macrófagos (Cassola *et al.*, 2004; Doedt *et al.*, 2004). Adicionalmente, estas mutantes también tienen una virulencia reducida, como ha sido comprobado en modelos de micosis sistémica murino (Rocha *et al.*, 2001; Maidan *et al.*, 2008).

### **Otras vías de transducción asociadas a filamentación.**

Otras vías han sido identificadas (Figura 1), entre ellas se encuentra una vía que responde a variaciones de pH, en la que intervienen las proteínas Rim8 y Rim20, cuyo regulador transcripcional asociado es Rim101 (Baek *et al.*, 2008). Por otro lado, la filamentación inducida por crecimiento embebido en una matriz sólida involucra al factor transcripcional Czf1, que a su vez reprime a Efg1 (Vinces and Kumamoto, 2007). Una vía menos caracterizada involucra los activadores transcripcionales de filamentación Cph2 y Tec1 (Figura 1), cuyo inductor específico aún se desconoce (Lane *et al.*, 2001). Además, el cambio morfogénico en *C. albicans* también involucra reguladores negativos, los que actúan de forma concertada con los activadores transcripcionales. Se han identificados las proteínas represoras Nrg1, Mig1 y Rfg1, las cuales pueden reclutar el represor global Tup1 e interactuar con secuencias específicas del DNA de genes blancos relacionados con la morfogénesis, inhibiendo su expresión (Figura 1) (Braun and Johnson, 1997; Zaragoza *et al.*, 2000; Murad *et al.*, 2001; Kebaara *et al.*, 2008).

### **Factores de transcripción asociados a la filamentación.**

Las vías de transducción de señales que participan en la morfogénesis de *C. albicans* desembocan en reguladores de la expresión génica, que dan cuenta por la regulación del proceso a nivel transcripcional. Se han identificado varios de estos reguladores, entre los que se puede destacar por su importancia a Cph1, Efg1 y

Rim101, como activadores de filamentación; y a Nrg1 y Rbf1 como represores de ésta (Figura 1). Existen otros reguladores menos caracterizados, los cuales pueden ser revisados en Whiteway y Bachewich (2007).

A continuación se describen algunos de los factores de transcripción más destacados en filamentación:

**Cph1:** El gen *CPH1* de *C. albicans* codifica para un factor transcripcional perteneciente a la vía MAPKinasa, homólogo a *STE12* de *S. cerevisiae*. Su rol en el proceso de filamentación ha sido evidenciado por ensayos de complementación en cepas de *S. cerevisiae* deficientes de *STE12*, en los cuales *CPH1* de *C. albicans* restaura el defecto en la formación de hifas y el defecto de apareamiento exhibido por estos mutantes (Liu *et al.*, 1994). Así mismo, la disrupción génica de *CPH1* en *C. albicans*, provoca defectos en la formación de hifas en el medio inductor agar Spider, pero su filamentación es normal en respuesta al suero (Liu *et al.*, 1994; Braun and Johnson, 2000). Esta mutante (*cph1/cph1*) también presenta defectos en la colonización de catéteres venosos (Lewis *et al.*, 2002). Cph1 contribuye a la regulación de genes específicos de hifa como *ALS3*, *ECE1*, *HWP1*, *SAP5*, *SAP6*, *YPL184*, *YJL79*, *HYR1*, *WH11*, *HSP12* y *YPL184* (Argimon *et al.*, 2007).

**Efg1:** Es un factor transcripcional perteneciente a la familia de proteínas APSES, homólogo a Sok de *S. cerevisiae*. Presenta una región con la conformación hélice-loop-hélice (HLH), que se une a secuencias E-box (CANNTG) (Stoldt *et al.*, 1997; Noffz *et al.*, 2008). Su residuo 206 es treonina, el que es potencialmente

fosforilado por las kinasas Tpk1 y Tpk2 (Bockmuhl and Ernst, 2001). Efg1 no se sintetiza constitutivamente, sino que su expresión está regulada negativamente por acción de las proteínas kinasas Tpk y por sí mismo (Tebarth *et al.*, 2003).

El rol de Efg1 en *C. albicans* ha sido asociado tanto a la filamentación (Lo *et al.*, 1997; Doedt *et al.*, 2004; Noffz *et al.*, 2008), como a la transición “white-opaque” (Zordan *et al.*, 2007) y la formación de clamidosporas (Sonneborn *et al.*, 1999a; Noffz *et al.*, 2008). Mutantes *efg1/efg1* presentan baja virulencia en modelos sistémicos murinos, lo que demuestra su importancia en la patogénesis (Doedt *et al.*, 2004; Noffz *et al.*, 2008). Entre los genes blancos que regula, se encuentran los genes específicos de hifa *ALS1*, *ECE1*, *HWP1*, *HYR1*, *RBT1* y *RBT4* (Braun and Johnson, 2000).

**Rim101:** Es un factor transcripcional que interviene en la vía de respuesta a cambio de pH. Sus funciones han sido asociadas a la represión de genes de respuesta a pH ácido, activación de genes de respuesta a pH alcalino y estimulación de la transición levadura-hifa (Davis *et al.*, 2000b). El gen *RIM101* codifica una proteína homóloga a Rim101 de *S. cerevisiae*, que presenta un dominio con dedos de zinc (Ramon *et al.*, 1999).

En condiciones ácidas la proteína Rim101 se encuentra en un estado “sin procesar” y la levadura permanece sin producir hifas. Cuando el pH ambiental se torna alcalino, ocurre un proceso proteolítico en su región carboxi-terminal y se obtiene la forma activa, la cual promueve la transición levadura a hifa (Li *et al.*, 2004).

Cepas mutantes *rim101/rim101* fallan en filamentación en medios inductores como Spider, M199 a pH alcalino y agar con 10% de suero, además exhiben una disminución de su virulencia en modelos murinos (Ramon *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 2000a; Bensen *et al.*, 2004).

Rim101 contribuye a la activación de genes específicos de hifa como *HWP1* y *RBT1* (Lotz *et al.*, 2004). Otros genes blancos de Rim101 son *ALS3*, *CHT2*, *PGA7/RBT6*, *SKN1* y *ZRT1* (Nobile *et al.*, 2008). Mediante ensayos de microarreglos con mutantes *rim101/rim110* se pudo observar la sobreexpresión de aproximadamente 154 genes de respuesta a pH alcalino (Bensen *et al.*, 2004).

**Nrg1:** El gen *NRG1* codifica para una proteína de unión a DNA secuencia específica de 34 KDa, con un dominio con dedos de zinc. El gen es homólogo a *NRG1* y *NRG2* de *S. cerevisiae* (Braun *et al.*, 2001). Corresponde a un represor negativo de la filamentación, actuando en conjunto con el represor global Tup1 y reconociendo secuencias específicas de respuesta a NRG1 (NRE) (Murad *et al.*, 2001). La inactivación de este gen induce la filamentación constitutiva en medios no inductores y la desrepresión de genes específicos de hifa como *HWP1* y *ALS8*, entre otros. Por otro lado, los mutantes homocigotos son avirulentos en modelos murinos (Braun *et al.*, 2001; Murad *et al.*, 2001). Mediante ensayos de microarreglo en *C. albicans*, se ha demostrado que cerca de 63 genes son inducidos en la transición levadura-hifa y aproximadamente la mitad de ellos son reprimidos por Nrg1, Rfg1 y Tup1 (Kadosh and Johnson, 2005).

## **Expresión diferencial de *NRG1* en *C. albicans* y *C. dubliniensis*.**

*Candida dubliniensis* es una levadura estrechamente relacionada a *C. albicans*. Ambas levaduras, comparten varias características tales como la habilidad para formar tubo germinativo, formación de hifas verdaderas, pseudohifas y clamidosporas (Sullivan *et al.*, 1995). Sin embargo, la prevalencia en cuadro clínicos de *C. dubliniensis* es mucho menor a la de *C. albicans* (Sullivan *et al.*, 2004). La razón de ello es que *C. dubliniensis* tiene una menor capacidad para filamentar que *C. albicans* en la mayoría de las condiciones inductoras, tanto *in vitro* como *in vivo* (Moran *et al.*, 2007; Stokes *et al.*, 2007). Sólo en el medio de cultivo agar Staib, *C. dubliniensis* es capaz de formar más clamidosporas que *C. albicans*, lo cual estaría relacionado con los bajos niveles de expresión de *NRG1* en contraste a lo que ocurre en *C. albicans* (Staib and Morschhauser, 2005). Interesantemente, durante ensayos de virulencia *in vitro*, (sobrevida frente a macrófagos, pruebas de invasividad en epitelios humanos reconstituidos) e *in vivo* (modelo de infección sistémica murino), en los que *C. dubliniensis* mostró siempre una menor capacidad de filamentación, el nivel de expresión de *NRG1* en esta levadura se reduce más lentamente que en *C. albicans* (Moran *et al.*, 2007). Este estudio demostró que la virulencia reducida de *C. dubliniensis* se debe, en parte, a que ésta especie no es capaz de modular la expresión de *NRG1* en respuesta a las mismas señales que inducen la filamentación en *C. albicans* (Moran *et al.*, 2007).

## **Filamentación diferencial en cepas clínicas de *C. albicans*.**

En nuestro laboratorio, hemos constatado que diferentes cepas clínicas, aisladas desde candidiasis vulvovaginal (Tapia, 2008b), exhiben distintos grados de filamentación en los medios inductores agar Slad e YPS-embebido (Mora and Hermosilla, 2008). Dada la comprobada relación entre filamentación y virulencia en *C. albicans*, sería interesante encontrar las bases moleculares que expliquen las diferencias encontradas en filamentación en cepas clínicas.

En consideración de los resultados que demuestran la expresión diferencial de *NRG1* en las especies *C. albicans* y *C. dubliniensis*, en esta Tesis se propone estudiar los niveles de expresión génica de algunos de los factores transcripcionales más importantes para la filamentación (*CPH1*, *EFG1*, *RIM101*, y *NRG1*), esperando demostrar que la expresión diferencial de algunos de ellos, se correlacione con los diferentes grados de filamentación exhibidos por cepas clínicas. Este estudio no descarta la posibilidad de que regulación diferencial a otros niveles, como postraducciona, también estén operando.

Los resultados de esta Tesis podrían contribuir al entendimiento de la modulación de la morfogénesis de *C. albicans* y además pueden llegar a constituir las bases para el desarrollo de una herramienta que podría predecir la evolución de un cuadro clínico de candidiasis de acuerdo a la capacidad de filamentación del agente aislado.

## **2. HIPÓTESIS**

La expresión génica diferencial de reguladores transcripcionales relevantes para la morfogénesis de *C. albicans*, se asocia con la capacidad de filamentación diferencial exhibida por cepas clínicas de esta levadura.

## **3. OBJETIVO GENERAL**

Correlacionar la expresión diferencial de activadores y represores transcripcionales de morfogénesis con las diferencias observadas en la capacidad de filamentación de cepas clínicas de *C. albicans*

## **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Seleccionar fenotípicamente dos cepas clínicas de *C. albicans*, una con alto grado de filamentación y otra con bajo grado de filamentación frente a diferentes medios inductores de filamentación
- b) Medir los niveles de expresión transcripcional de los genes *CPH1*, *EFG1*, *RIM101* y *NRG1* en cepas clínicas de *C. albicans*, bajo diferentes estímulos de filamentación
- c) Determinar si existe correlación entre los niveles de expresión transcripcional de *CPH1*, *EFG1*, *RIM101* y *NRG1* con el grado de filamentación exhibido por cada cepa clínica

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Cepas.

En la Tabla 1, se muestra las cepas utilizadas en este estudio. Se utilizaron 5 cepas de *Candida albicans*, aisladas desde embarazadas con candidiasis vulvovaginal (CVV3, CVV5, CVV9, CVV22 y CVV29) y 5 cepas aisladas desde cavidad oral en pacientes colonizados por *C. albicans* (PM13-1, PM31-2, PA30-1, PB17-1 y PC28-1), todas pertenecientes al cepario del laboratorio de Micología del Programa de Microbiología y Micología, ICBM, Universidad de Chile. Las levaduras fueron recuperadas desde un stock congelado a -80°C y crecidas en medio agar Sabouraud glucosado (pH 5,4), incubando a 37°C por 24 h.

Las cepas fueron reidentificadas por métodos convencionales, como formación de tubo germinativo en plasma y formación de clamidoconidios en agar maíz (microcultivo). Además todas las cepas fueron cultivadas en agar cromogénico CHROMagar-Candida (Tapia, 2008b).

Como controles, se utilizaron *C. albicans* SC5314 (cepa de referencia ATCC MYA-2876, como control positivo de filamentación), *C. dubliniensis* CD36 (cepa de referencia ATCC MYA-646, como control de expresión reducida del gen *NRG1*) y *C. glabrata* CG01 (cepa obtenida desde cavidad orofaríngea, como control negativo de filamentación). Todas estas fueron cultivadas y analizadas de manera similar a los aislados clínicos.

**Tabla 1:** Cepas de *Candida* sp. utilizadas en este estudio.

<b>Cepas</b>	<b>Característica</b>	<b>fuelle</b>
<b>Cepas <i>C. albicans</i></b>		
SC5314 (ATCC MYA-2876)	Cepa silvestre	Gillum <i>et al</i> 1984
CVV3	Candidiasis vulvovaginal	Lab. Micología Médica
CVV5	Candidiasis vulvovaginal	Lab. Micología Médica
CVV9	Candidiasis vulvovaginal	Lab. Micología Médica
CVV22	Candidiasis vulvovaginal	Lab. Micología Médica
CVV29	Candidiasis vulvovaginal	Lab. Micología Médica
PM13-1	Candidiasis oral	Lab. Micología Médica
PB17-1	Candidiasis oral	Lab. Micología Médica
PC28-1	Candidiasis oral	Lab. Micología Médica
PA30-1	Candidiasis oral	Lab. Micología Médica
PM31-2	Candidiasis oral	Lab. Micología Médica
<b>Cepa <i>C. dubliniensis</i></b>		
CD36 (ATCC MYA-646)	Cepa silvestre	Sullivan <i>et al.</i> , 1995
<b>Cepa <i>C. glabrata</i></b>		
CG01	Aislado Clínico	Lab. Micología Médica

## **5.2. Reguladores transcripcionales para análisis de expresión génica.**

Se estudió la expresión génica de aquellos genes que codifican reguladores transcripcionales con un rol relevante en el proceso de filamentación de *C. albicans* y en los que no existe evidencia de expresión constitutiva. En la Tabla 2 se consignan los reguladores seleccionados, su rol y vía de transducción en la que participa, junto con el gen de referencia utilizado.

**Tabla 2:** Reguladores transcripcionales y gen de referencia seleccionados para este estudio.

<b>Gen</b>	<b>Rol</b>	<b>Vía de transducción u otra característica</b>	<b>Número de Acceso GenBank</b>
<i>CPH1</i>	Activador	Vía MAPKinasa	U15152
<i>EFG1</i>	Activador	Vía proteína kinasa dependiente de AMP cíclico	XM_709104
<i>RIM101</i>	Activador	Regulador asociado a estrés por pH	AACQ01000092.1
<i>NRG1</i>	Represor	Regulador asociado a <i>TUP1</i>	AF321521
<i>ACT1</i>	Actina	Componente del citoesqueleto	NW_139430

### **5.3. Pruebas cuantitativas de filamentación.**

Se determinó la capacidad para filamentar de cada una de las cepas clínicas y cepas de referencias por los siguientes métodos cuantitativos:

**5.3.1. Formación de tubo germinal:** Un inóculo de cada cepa, conteniendo aproximadamente  $1 \times 10^5$  células, fue puesto en contacto con 1mL de plasma humano y luego se incubó a 37°C hasta 3 horas. Se tomaron alícuotas cada 60 min y se determinó el porcentaje de células que han formado tubo germinativo.

**5.3.2. Filamentación en medios inductores:** Se cuantificó la capacidad de filamentación de cada cepa, frente a diferentes medios de cultivo inductores

líquidos de filamentación. Los medios utilizados fueron: medio YPS [Extracto de levadura 1%, peptona 2%, sacarosa 2%, agar 1,35%], medio SLAD [YNB s/A'As y sulfato de amonio 0,17%, glucosa 2%], medio SPIDER [Caldo nutritivo 1%, Manitol 1%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2% y agar 1,35%], y medio LEE modificado [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5%, MgSO<sub>4</sub> 0,02%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,25%, NaCl 0,5%, Glucosa 0,125%, L-Metionina 0,01% y Biotina 0,0001%]. Para cada medio se emplearon condiciones específicas de tiempo y temperatura de incubación (Gimeno *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1999; Maidan *et al.*, 2005). Para ello, cada cepa fue cultivada en medio líquido no inductor YPD durante toda la noche y posteriormente a partir de estos cultivos se inocularon 2x10<sup>6</sup> células en volumen de 50mL de cada medio inductor de filamentación (LEE, SLAD, SPIDER, YPS). Los cultivos fueron incubados a 37°C, con agitación a 150rpm. Se tomaron alícuotas de los cultivos a diferentes tiempos post inducción (2, 3, 4, 5 y 24 horas) y se procedió a realizar el conteo de 200 células, observando su morfología como levadura o filamento. Se definió como filamento a aquel elemento fúngico que presentó una elongación dos veces el diámetro de su célula madre, no se realizó distinción entre pseudohifa e hifa verdadera.

#### **5.4. Análisis de expresión por RT-PCR.**

Se escogió una cepa que evidenció alto grado de filamentación y otra con bajo grado de filamentación y se determinó el nivel de expresión génica de los

reguladores transcripcionales indicados en la Tabla 2. Para ello, se utilizó el método semicuantitativo de RT-PCR.

**5.4.1. Extracción total de RNA de levaduras:** Para la extracción de RNA total, se utilizó el “RNeasy Mini Kit” (Quiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se aisló el RNA de cada cepa, creciendo en medio no inductor de filamentación (YPD) y en los medios inductores de filamentación (YPS y LEE) en los tiempos en que las cepas presentaron mayor porcentaje de filamentación. Se realizó la extracción de RNA en cada medio a  $5 \times 10^7$  células, Para ello se centrifugó 25 mL de cultivo, luego el precipitado de células fue lisado mecánicamente con 600 $\mu$ L de perlas de vidrio (0,5mm de diámetro) y 600 $\mu$ L de solución amortiguadora RLT, conteniendo  $\beta$ -mercaptoetanol como agente reductor. Se agitó energicamente con Vortex por 15min, enfriando cada 1 min en hielo por 30 s. El sobrenadante fue transferido a un tubo Eppendorf limpio y centrifugado a 13.000 rpm por 2 min, transfiriendo nuevamente el sobrenadante a un tubo Eppendorf limpio. Se adicionó 1 volumen de etanol al 70% y se homogenizó suavemente con micropipeta. El homogenizado se transfirió una minicolumna de “RNeasy” y se centrifugó por 15 s a 8.000 g, descartando lo recolectado. A la minicolumna se adicionó 700 $\mu$ L de solución amortiguadora RW1, centrifugando nuevamente a 8.000 g por 15 s. Se descartó lo recolectado y se adicionó 500 $\mu$ L de solución amortiguadora RPE, centrifugando a 8.000g

por 15 s. Este paso se repitió por segunda vez pero centrifugando por 2 min a 8.000g.

Finalmente, se centrifugó por 1 min a 13.000 rpm con el propósito de secar la minicolumna totalmente. El RNA contenido en la minicolumna fue eluido adicionando 40 $\mu$ L de agua libre de RNasa y centrifugando por 1 min a  $\geq$ 8,000g.

Para detectar contaminación con DNA genómico, una alícuota del RNA aislado fue sometido a una reacción de PCR para el gen actina (Tabla 3).

La integridad del RNA fue verificada utilizando geles de agarosa 0,7% con solución amortiguadora TAE 1X, por electroforesis buscando la presencia de las bandas correspondientes al RNA ribosomal. La concentración de RNA se cuantificó por lectura espectrofotométrica con el equipo Biophometer (Eppendorf). El RNA se almacenó a -80°C hasta su posterior uso en el análisis de RT-PCR y PCR en tiempo real.

**5.4.2. Tratamiento con DNasa I:** Las muestras de RNA fueron tratadas con DNasa I para eliminar completamente la posibilidad de contaminación con DNA genómico. Se utilizó DNasa I (Fermentas), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, se empleó 1U de DNasa I y 0,1 $\mu$ L de inhibidor de

RNasa por microgramo de RNA y solución amortiguadora DNasa 1X, completando un volumen final de 20 $\mu$ L con agua libre de nucleadas.

**5.4.3. Reacción de transcriptasa reversa (RT-PCR):** El RT-PCR se realizó con el “kit” comercial “Improm II Reverse Transcription System” (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se utilizó 1 $\mu$ g de RNA total de cada muestra y 0,5  $\mu$ g de Oligo(dT)<sub>15</sub>, para la síntesis de DNA complementario (cDNA), en un volumen de 5 $\mu$ L. La mezcla se incubó a 70°C por 5 min y luego fue puesta en frío inmediatamente, con el fin de eliminar estructuras secundarias. Luego se añadió a la mezcla 15 $\mu$ L de una solución conteniendo solución amortiguadora de Reacción Improm II 1x, dNTP a una concentración final de 0,5mM, RNAsin 20U, MgCl<sub>2</sub> a una concentración final de 4mM y 1 $\mu$ L de transcriptasa reversa; completando un volumen final de 20 $\mu$ L. La mezcla se incubó a 25°C por 5min para permitir la unión del Oligo(dT)<sub>15</sub>, seguido por 60 min a 42°C para llevar a cabo la síntesis de DNA complementario (extensión). Finalmente la inactivación de la enzima transcriptasa reversa se realizó por calor a 70°C por 15 min.

**5.4.3. Diseño de partidores para genes específicos:** Los partidores para los genes *CPH1*, *EFG1*, *NRG1* y *ACT1* fueron diseñados previamente en nuestro laboratorio (Mora and Hermosilla, 2008), con ayuda del software PRIMER 3 versión 0.4.0 (Rozen and Skaletsky, 2000). Los partidores para el gen *RIM101* fueron diseñados en esta Tesis, utilizando el mismo programa.

Todos los partidores fueron sintetizados por IDT “Integrated DNA Technologies” (USA).

En la Tabla 3, se indican los partidores, su secuencia, tamaño del amplicón y temperatura de hibridación para las reacciones de PCR.

**Tabla 3:** Partidores para los genes *CPH1*, *EFG1*, *NRG1*, *RIM101* y *ACT1* utilizados en RT-PCR semicuantitativo.

Gen	Secuencia partidores 5' → 3'	Tamaño del producto (pb)	Temperatura hibridación (°C)
<i>CPH1</i>	CPH1-S: AAACCAAGTTGCCTTCAACG CPH1-A: GGAAACCCAGAAGCGTCATA	492	60
<i>EFG1</i>	EFG1-S: GTATGCCCCAGCAAACAACT EFG1-A: TTGGTTGTTGCATTGTTCGAT	483	60
<i>NRG1</i>	NRG1-S: GAAACCTGGCAGTGGAAAAA NRG1-A: GGGAGTTGGCCAGTAAATCA	527	60
<i>RIM101</i>	RIM101_S: GGTAACAGTCCCCATTTCCT RIM101_A : GTCGTCACACAAATGATCG	521	57
<i>ACT1</i>	ACT1-S1: AAGCCCAATCCAAAAGAGGT ACT1-A: TGGTTTGGTCAATACCAGCA	663	55

**5.4.4. Reacción de PCR para genes específicos:** Para cada gen (*CPH1*, *EFG1*, *RIM101*, *NRG1* y *ACT1*) la reacción de PCR contenía solución amortiguadora de PCR 1x, MgCl<sub>2</sub> 2mM, dNTP 0,2mM, *Taq* DNA polimerasa 5U y los partidores correspondientes para cada gen a 0,2μM final. Se utilizó 1μL del cDNA (50ng/μL, aproximadamente) y se completó un volumen final

de 20 $\mu$ L con agua libre de nucleasas. El programa de amplificación consistió en un ciclo inicial de denaturación a 95°C por 3 min, seguido de 40 ciclos de denaturación a 92°C por 1 min, temperatura de hibridación 56°C, por 2 min y una extensión a 72°C por 2 min; terminando la reacción con una extensión final de 72°C por 10 min. Al cabo de cada 5 ciclos se procedió a sacar un tubo de reacción para determinar los ciclos óptimos de amplificación, con el fin de establecer la zona de amplificación exponencial, donde la cantidad de producto es directamente proporcional a la cantidad inicial de cDNA.

Las PCR se realizaron en un termociclador Eppendorf MasterCycler<sup>®</sup>. El tamaño molecular de los productos de amplificación fue determinado por electroforesis en geles de agarosa 1%, en buffer TAE 1X, con bromuro de etidio 0,5  $\mu$ g/mL, utilizando como estándar de tamaño molecular DNA Ladder 100 pb (Gibco, BRL). La electroforesis se realizó a 70 Volts por 1 h. Los geles fueron visualizados en un transluminador UV Vieber Lourmat y fueron registrados digitalmente con el sistema EDAS 290 de Kodak, utilizando el programa 1d v3.6 (Kodak).

**5.4.5. Normalización y procesamiento de datos:** Para cada gel la intensidad de cada amplicón fue transformada a densidad óptica utilizando el programa KODAK 1D, de acuerdo a la fórmula  $DO = -\log_{10}[(255-\text{valor del pixel sin procesar})/255]$ . Posteriormente, las densidades ópticas de los mRNA de cada gen fueron normalizadas contra el mRNA de actina. Finalmente, se

determinó cuantas veces cambió la expresión transcripcional de cada gen en los medios inductores en relación a su expresión en el medio no-inductor YPD.

### **5.5. Confirmación por PCR en tiempo real.**

Aquellos genes que mostraron una expresión diferencial entre cepas clínicas de *C. albicans*, con diferentes grados de filamentación, fueron analizados por el método cuantitativo  $\Delta\Delta$ CT de PCR en tiempo real (Livak and Schmittgen, 2001). Para ello se diseñaron partidores adecuados con el programa AmplifX 1.5.4 (Jullien, 2007). Los niveles de expresión génica fueron normalizados contra los niveles de expresión del gen constitutivo *ACT1*.

El PCR en tiempo real fue realizado utilizando “Maxima Sybr Green qPCR Master Mix” (Fermentas). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en capilares de vidrio (Roche) y contenían 10 $\mu$ L de “Maximix” (2x) para el gen de *ACT1* y 12,5 $\mu$ L para *EFG1* y *NRG1*, 2,0 $\mu$ L de partidores (5 $\mu$ M), 2,0 $\mu$ L de cDNA y agua libre de nucleasas, en un volumen final de 20 $\mu$ L.

El programa de amplificación consistió en un ciclo inicial de denaturación de 10 min a 95°C seguido de un programa de PCR de 40 ciclos: denaturación 95°C por 10s hibridación a 55°C por 10s y extensión a 72°C por 15s. Por último, para visualizar la amplificación de productos inespecíficos, se utilizó un programa de

“melting” que consistió en 95°C a 0s, 70°C por 10s y 95°C a 0s. Los datos fueron analizados con ayuda del programa “Light Cycler 4.0” de Roche.

**Tabla 4:** Partidores para los genes *EFG1*, *NRG1* y *ACT1* para PCR en tiempo real.

Gen	Secuencia partidores <sup>1</sup>	Tamaño del producto (pb)	Temp. (°C) hibridación
<i>EFG1</i>	EFG1 F1: CAGGTCAACAGACTGGACAGA EFG1 R1: AATGCTGAGGTTGTGGCTGTGAC	172	55,4
<i>NRG1</i>	NRG1 F1: GATTTACTGGCCAACTCCCTTGCT NRG1 R1: ACATGTTGGCCATGGACATTGGTG	177	55,5
<i>ACT1</i>	ACT F2: TGATTGATCTGTCCGGCAGTGGT ACT R2: TGTGTGCACTGAGCGTCGAAAA	248	54,9

<sup>1</sup> Partidores diseñados en esta Tesis

## 5.6. Eficiencia de Amplificación de PCR.

La eficiencia de cada par de partidores fue estimada utilizando la pendiente de una curva de regresión lineal. Esta curva fue construida utilizando distintas concentraciones de cDNA y gráficamente representada como el Ct vs el Log [cDNA]. Se realizaron diluciones de cDNA de 10<sup>-3</sup> a 10<sup>-8</sup> y la eficiencia se calculó con la siguiente fórmula:

$$E = (10^{-1/\text{Pendiente}} - 1) \times 100$$

Una pendiente de -3,32 indica una reacción de PCR con 100% de eficiencia. El coeficiente de correlación (R) indica cuanto se acercan los puntos obtenidos a la mejor recta, un valor R cercano a 1 indica una correlación aceptable.

### **5.7. Validación de los Experimentos.**

La validación de los experimentos se realizó según la guía de Applied Biosystem (2008) Para determinar si los cálculos del  $\Delta\Delta Ct$  son válidos, la eficiencia de amplificación del gen blanco y la eficiencia de amplificación del gen de referencia deben ser aproximadamente iguales. Para los ensayos de validación se realizaron PCRs en tiempo real para el gen blanco y para el gen de referencia utilizando diluciones de cDNA de  $10^{-3}$  a  $10^{-8}$ . Los cálculos del  $\Delta Ct$  (Ct blanco - Ct referencia) fueron utilizados para construir una curva de regresión lineal graficando los valores  $\Delta Ct$  vs Log [cDNA]. Los experimentos con una pendiente  $< 0,1$  fueron considerados válidos.

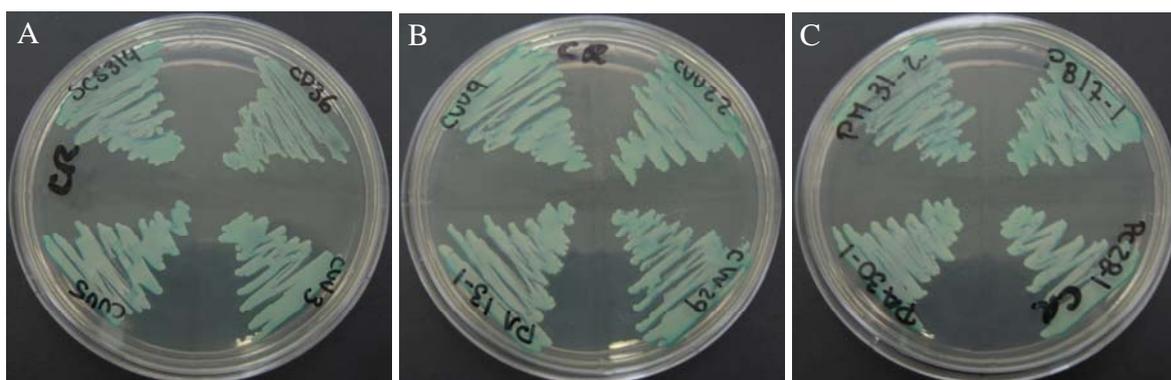
### **5.8. Métodos estadísticos.**

Para determinar si existen diferencias significativas en el grado de filamentación, entre cada una de las cepas clínicas y la cepa de referencia (SC5314), se aplicó un análisis estadístico por medio del Test de ANOVA de dos vías.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Reidentificación de cepas.

Las cepas en estudio fueron reidentificadas con el fin de corroborar la especie *C. albicans*. En la Figura 2, se muestra el resultado del cultivo en CHROMagar-Candida (CHROMagar Microbiology). Todas las cepas analizadas fueron de color verde en este medio, lo que confirma la especie *C. albicans*. Además, todas ellas generaron tubos germinativos y dieron origen a clamidoconidios en microcultivo.

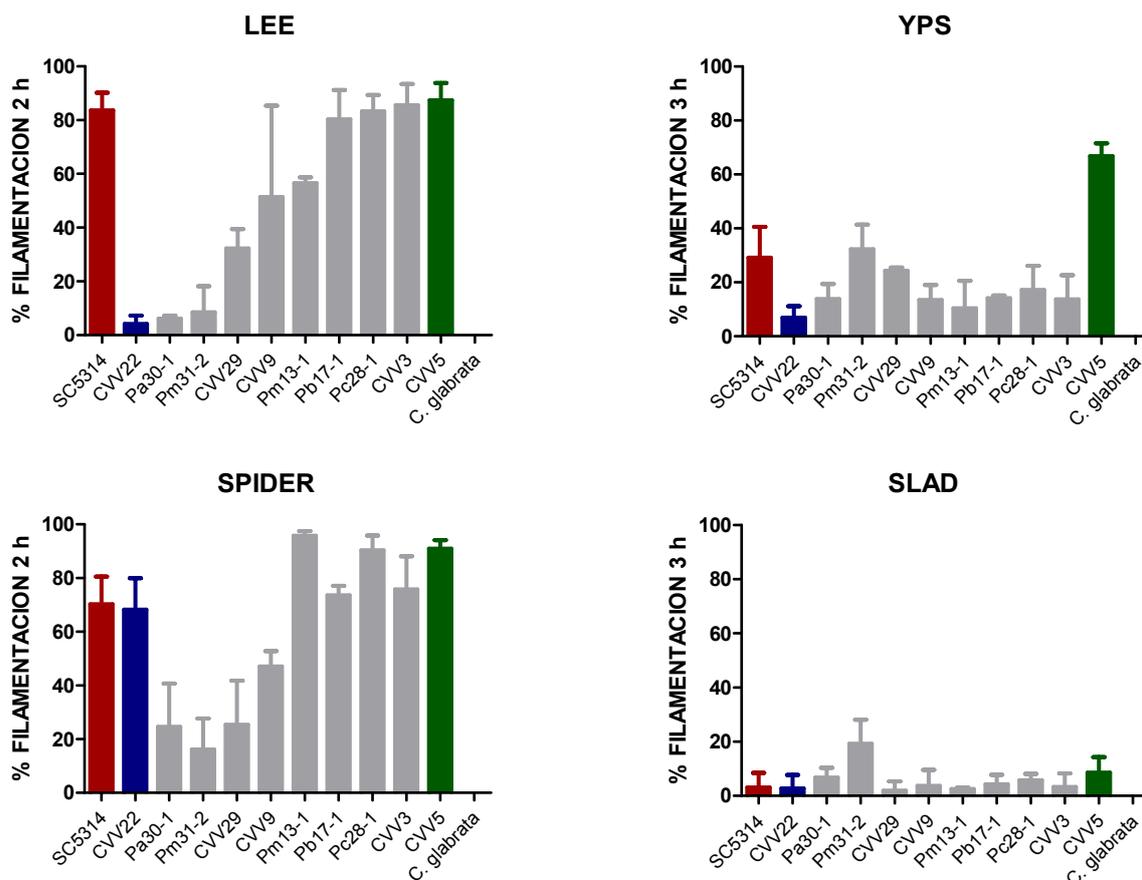


**Figura 2:** Confirmación de las cepas clínicas de *C. albicans* mediante CHROMagar-Candida. A) *C. albicans* SC5314, *C. dubliniensis* CD36, *C. albicans* CVV3 y CVV5. B) *C. albicans* CVV9, CVV2, CVV29 y PA13-1. C) *C. albicans* PM31-2, PB17-1, PC28-1 y PA30-1

### 6.2. Filamentación en medios inductores.

Para escoger una cepa con alto y bajo grado de filamentación respectivamente, se midieron los niveles de filamentación de las cepas en estudio en

los medios inductores LEE, SPIDER, SLAD e YPS. En la Figura 3, se muestra la capacidad de filamentación de cada cepa, frente a diferentes medios de cultivo. Los mayores porcentajes de filamentación se dieron a las 2 h después de la exposición a los medios LEE y SPIDER, mientras que fue de 3 h en los medios SLAD e YPS.



**Figura 3:** Filamentación de cepas clínicas *C. albicans* en medios inductores. Las barras rojas representan la cepa de referencia SC5314, las barras azules y verdes representan las cepas con alta y baja filamentación escogidas para su posterior estudio. Las barras de error representan la desviación estándar (SD).

Las cepas clínicas de *C. albicans* presentaron diferentes grados de filamentación en los diferentes medios inductores. En el medio SLAD las cepas de *Candida* sp. tuvieron un bajo porcentaje de filamentación, observándose en todos

los casos pseudohifas y levaduras multigemantes, excepto en *C. glabrata* donde se observó sólo levaduras. Por tal motivo este medio no fue considerado en los experimentos posteriores.

Se observaron variaciones en los grados de filamentación dependiendo del medio inductor utilizado, sin embargo el medio LEE permitió observar mejor las diferencias entre las cepas. En la Tabla 5, se muestra la categorización de las cepas de acuerdo a su capacidad para filamentar de la siguiente forma: cepas de filamentación baja, con un porcentaje de filamentación  $\leq 30\%$ ; cepas de filamentación intermedia, con un porcentaje de filamentación entre  $\geq 30$  y  $\leq 65\%$ ; y cepas de filamentación alta, con una filamentación  $\geq 65\%$ .

Distintas cepas mostraron un comportamiento diferente según el medio de inducción, por ejemplo la cepa PM13-1 en el medio SPIDER se comportó como una cepa altamente filamentadora, pero en medio YPS, en el mismo período de tiempo, presentó un bajo nivel de filamentación, 10,4%, (Figura 2 y Tabla 5).

La cepa CVV22 se destacó como una cepa de filamentación baja en los medios LEE, YPS y SLAD ( $< 30\%$  a las 2 o 3 h, dependiendo del medio); mientras que CVV5 presentó altos porcentajes de filamentación en los medios LEE, YPS y SPIDER ( $> 65\%$  a las 2 o 3 h, dependiendo del medio), correspondiendo a una cepa altamente filamentadora. Por tal motivo, se escogieron ambas cepas por representar extremos en la capacidad de filamentación, con el fin de medir los niveles de transcripción de los genes reguladores *CPH1*, *EFG1*, *NRG1*, *RIM101* y *ACT1*.

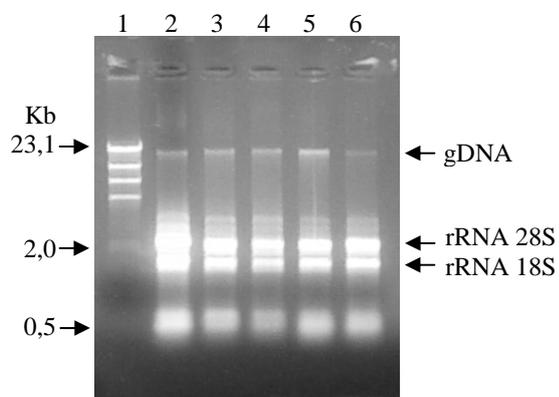
**Tabla 5:** Clasificación de cepas de *C. albicans* según su filamentación en medios inductores.

Medios	Filamentación Baja (% de filamentación)	Filamentación Intermedia (% de filamentación)	Filamentación Alta (% de filamentación)
LEE	PM31-2 (8,5%)	PM13-1 (56,5%)	CVV5 (87,4%)
	PA30-1 (6,1%)	CVV9 (51,3%)	CVV3 (85,6%)
	CVV22 (4,2%)	CVV29 (32,3%)	SC5314 (83,6%)
SPIDER			PC28-1 (83,3%)
			PB17-1 (80,3%)
	CVV29 (25,4%)	CVV9 (47,1%)	PM13-1 (95,8%)
	PA30-1 (24,6%)		CVV5 (90,9%)
	PM31-2 (16,2%)		PC28-1 (90,4%)
			CVV3 (75,8%)
			PB17-1 (73,6%)
			SC5314 (70,3%)
YPS			CVV22 (68,3%)
	SC5314 (29,1%)	PM31-2 (32,3%)	CVV5 (66,8%)
	CVV29 (24,3%)		
	PC28-1 (17,2%)		
	PB17-1 (14,1%)		
	PA30-1 (13,8%)		
	CVV3 (13,7%)		
	CVV9 (13,5%)		
	PM13-1 (10,4%)		
CVV22 (6,9%)			
SLAD	PM31-2 (19,3%)		
	CVV5 (6,8%)		
	PA30-1 (5,8%)		
	PC28-1 (4,3%)		
	PB17-1 (3,7%)		
	CVV9 (3,7%)		
	CVV3 (3,3%)		
	SC5314 (3,1%)		
	CVV22 (2,8%)		
	PM13-1 (2,5%)		
	CVV29 (2,0%)		

### 6.3. Análisis de expresión por RT-PCR semicuantitativo.

Para medir los niveles de transcritos de los genes *CPH1*, *EFG1*, *RIM101* y *NRG1* en las cepas SC5314 y las cepas clínicas CVV22 y CVV5, bajo diferentes estímulos de filamentación, se extrajo RNA en los tiempos de mayor porcentaje de filamentación.

En la Figura 4, se muestra una foto de un gel representativo con RNA extraído desde *C. albicans*, en ella se puede apreciar la aparición de las bandas de RNA ribosomales, indicadores de calidad e integridad del producto obtenido.

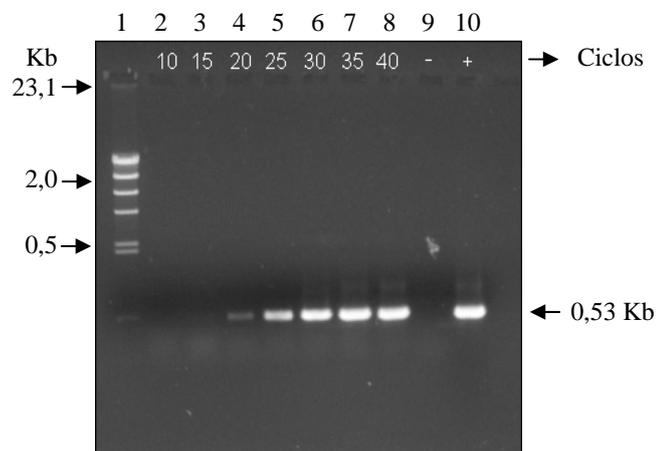


**Figura 4:** Extracción de RNA en medio LEE de las cepas SC5314, CVV5 y CVV22 de *C. albicans*. Carril 1, marcador de tamaño molecular Lambda *Hind*III. Carriles 2, RNA de SC5314; carriles 3 y 4, RNA de CVV5; carriles 5 y 6, RNA de CVV22.

Una vez tratados los RNA con DNasa y obtenidos los cDNA se determinó los ciclos en donde la PCR de cada gen se encontrara en la fase exponencial y no en fase de saturación. En la Tabla 6, se muestran los resultados obtenidos para los genes *CPH1*, *EFG1*, *RIM101*, *NRG1* y *ACT1* en la cepa de referencia SC5314 en los diferentes medios en estudio. Estos resultados fueron extrapolados a las cepas clínicas. La Figura 5 es una foto representativa de los ciclos utilizados para el análisis.

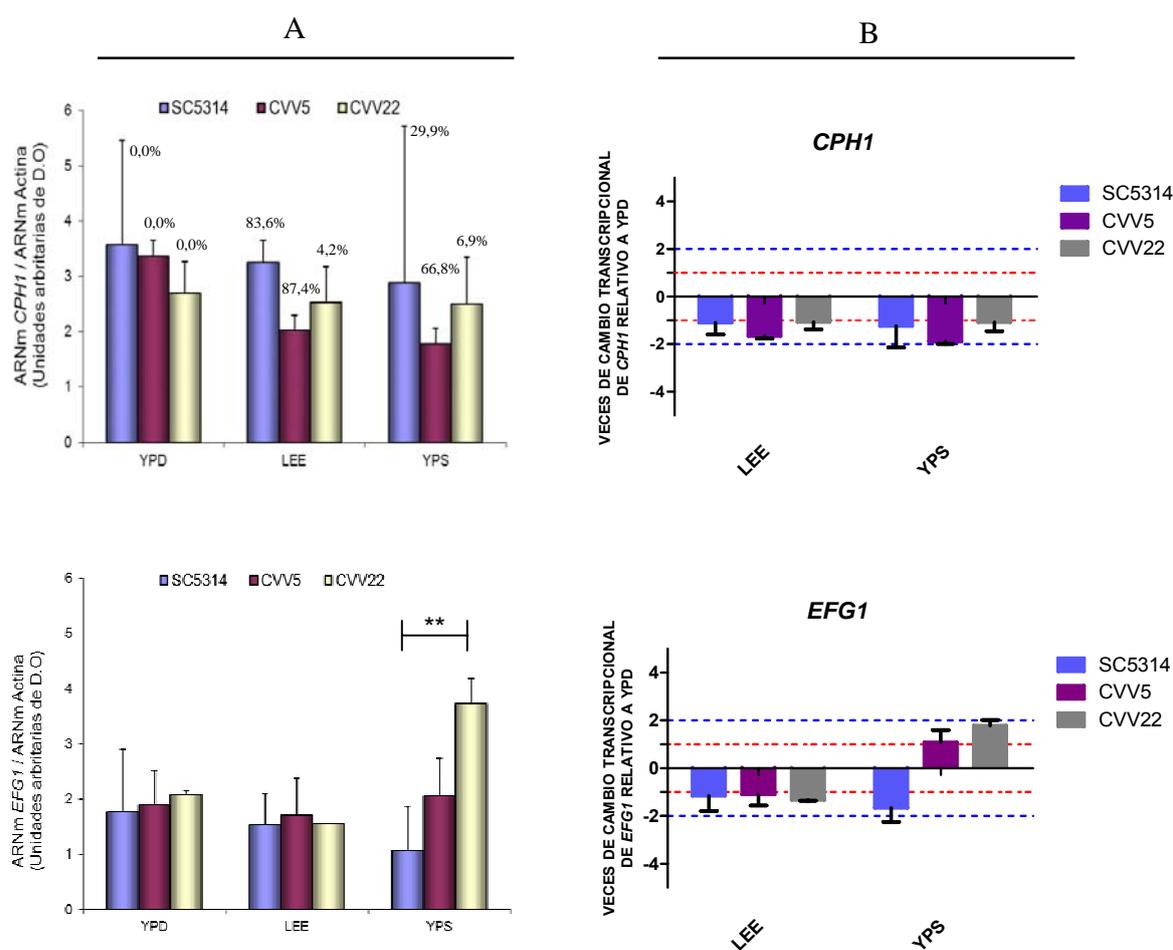
**Tabla 6:** Ciclos óptimos de PCR de los distintos genes en la cepa SC5314.

Gen	Medios		
	YPD	LEE	YPS
<i>ACT1</i>	25	25	25
<i>CPH1</i>	30	30	30
<i>EFG1</i>	25	25	25
<i>NRG1</i>	25	25	25
<i>RIM101</i>	25	25	25



**Figura 5:** Electroforesis en gel de agarosa para determinar el ciclo óptimo de PCR para el gen *NRG1* en la cepa SC5314. Carril 1, marcador de tamaño molecular Lambda *Hind* III; carriles 2 a 8, ciclos 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40, respectivamente; carril 9, control negativo; carril 10, control positivo.

El análisis de los niveles de transcritos para *CPH1* reveló un comportamiento similar en todas las cepas y condiciones. En los medios inductores *CPH1* tuvo pequeñas variaciones que no fueron significativas, según el test de ANOVA de dos vías (Figura 6A), tampoco se observaron cambios relevantes (unidades arbitrarias de 2 veces de cambio) de este gen en los medios inductores con respecto al medio no inductor YPD (Figura 6B).



**Figura 6:** Análisis de RT-PCR semicuantitativo de las cepas de *C. albicans* SC5314, CVV5 y CVV22. A) Análisis de RT-PCR de mRNA de *CPH1* y *EFG1* en medio no-inductor de filamentación (YPD) y medios inductores de filamentación (LEE e YPS). Los valores son expresados como la media  $\pm$  SD en unidades de densidad óptica arbitraria, normalizada contra mRNA de actina. B) Veces de cambio del nivel de expresión transcripcional de los genes *CPH1* y *EFG1*, relativo al medio no-inductor YPD. \*\* indica diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,01$ ). Los números consignados sobre las barras corresponden al porcentaje de filamentación de cada cepa.

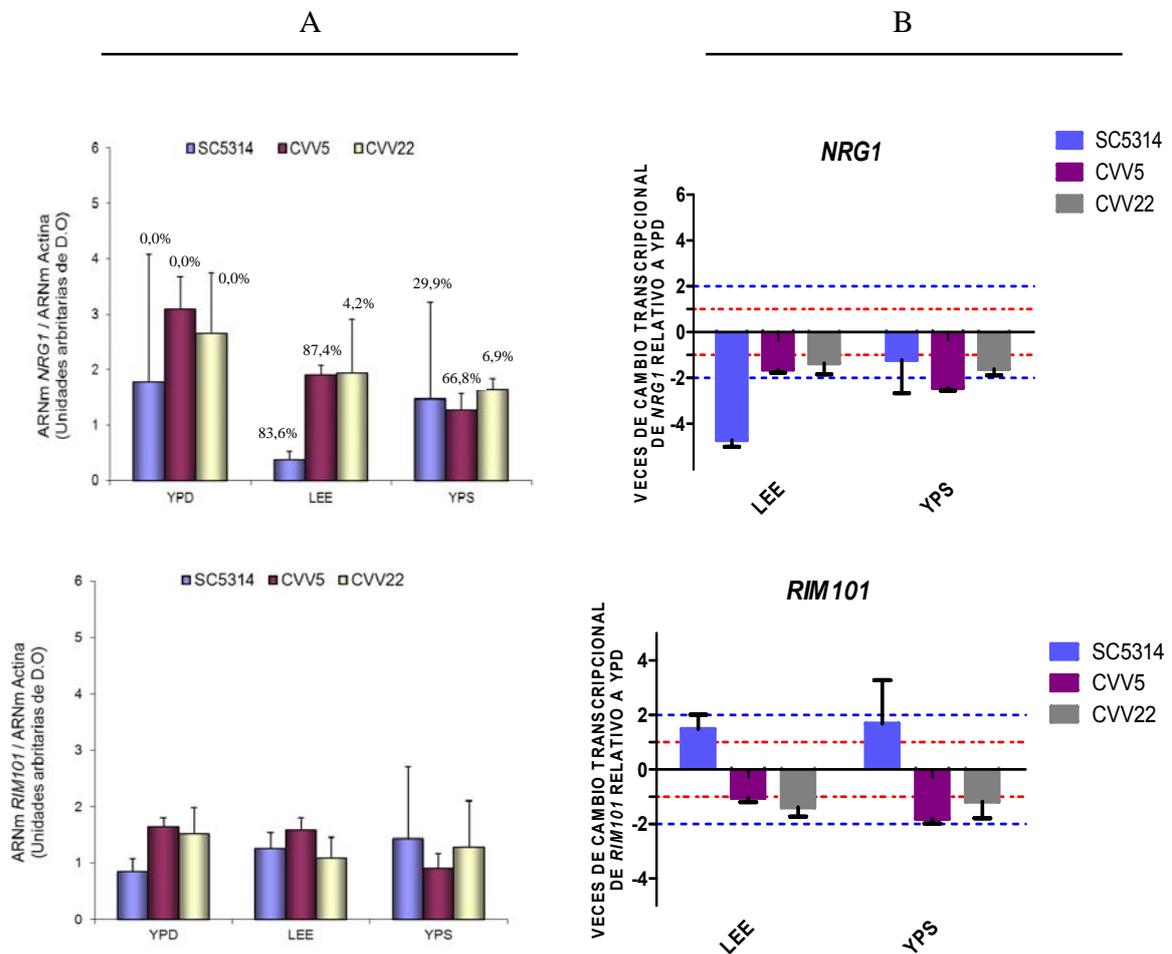
Con respecto a *EFG1*, aunque no se observaron cambios relevantes de este gen respecto al medio no inductor (Figura 6B), se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de *EFG1* en la cepa CVV22 con

respecto a SC5314, en el medio YPS, con un  $p < 0,01$ . En este medio los niveles de *EFG1* en la cepa SC5314 y CVV5 se corresponden con los niveles de filamentación observados 29,9% y 66,8%, respectivamente pero en la cepa CVV22 los altos niveles de *EFG1* no se corresponden con los niveles de filamentación (6,9%) en esta cepa (Ver Figura 6A).

Con respecto al gen *NRG1*, en medio YPS no se observaron cambios significativos entre ninguna de las cepas (Figura 7A). Sin embargo, en la cepa CVV5 hay un cambio significativo (reducción de 2,4 veces) lo cual se corresponde con su grado de filamentación en este medio (66,9%), mientras que en SC5314 (29,1% de filamentación) y CVV22 (6,9% de filamentación), *NRG1* disminuye de forma no significativa 1,2 veces y 1,6 veces, respectivamente (Figura 7B). En SC5314 la expresión de *NRG1* disminuye casi 5 veces en LEE, respecto a YPD, mientras que en CVV5 se redujo sólo 1,6 veces (Figura 7B).

Los resultados con *RIM101* no mostraron diferencias en los niveles de mRNA, ni cambio significativos de expresión entre ninguna de las cepas, para las condiciones ensayadas.

A la luz de estos resultados se decidió analizar por medio de PCR en tiempo real la expresión transcripcional de los genes *EFG1* y *NRG1* en las cepas SC5314, CVV5 y CVV22 en los medios no inductor YPD y los medios inductores LEE e YPS.



**Figura 7:** Análisis de RT-PCR semicuantitativo de las cepas de *C. albicans* SC5314, CVV5 y CVV22. A) Análisis de RT-PCR de mRNA de *NRG1* y *RIM101* en medio no-inductor de filamentación (YPD) y medios inductores de filamentación (LEE e YPS). Los valores son expresados como la media $\pm$ SD en unidades de densidad óptica arbitraria, normalizada contra mRNA de actina. B) Veces de cambio del nivel de expresión transcripcional de los genes *NRG1* y *RIM101*, relativo al medio no-inductor YPD. \*\* Indica diferencias estadísticamente significativas ( $p\leq 0.01$ ). Los números consignados sobre las barras corresponden al porcentaje de filamentación de cada cepa.

## 6.4. Análisis de expresión por PCR en tiempo real.

### 6.4.1. Eficiencia de amplificación y especificidad de los partidores.

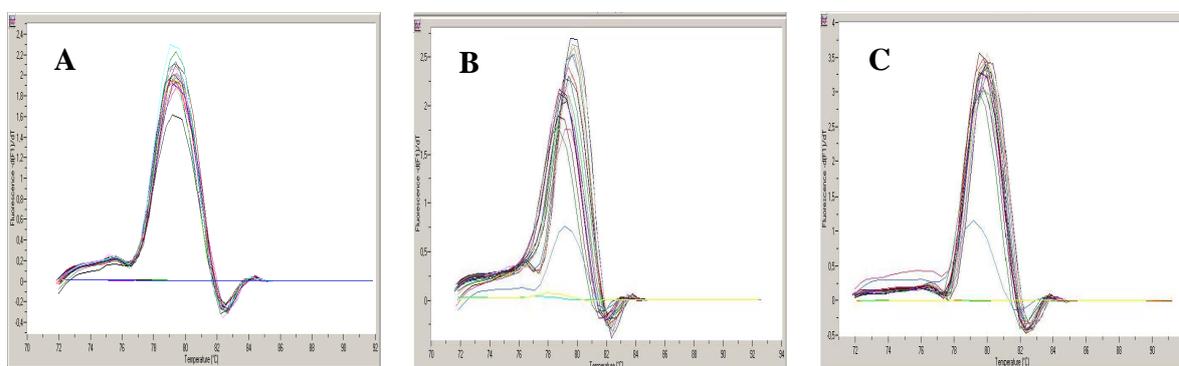
Las reacciones de PCR para cada partidor fueron optimizadas hasta obtener eficiencias cercanas al 100%, en la Tabla 7, se muestran las eficiencias y el coeficiente de correlación (R) obtenidas para *ACT1*, *EFG1* y *NRG1*

**Tabla 7:** Eficiencia de partidores utilizados en PCR tiempo real.

Partidores	Eficiencia	R
ACT1 F2-R2	100,63	0,99
EFG1 F1-R1	99,75	1,00
NRG1 F1-R1	101,35	1,00

R: coeficiente de correlación

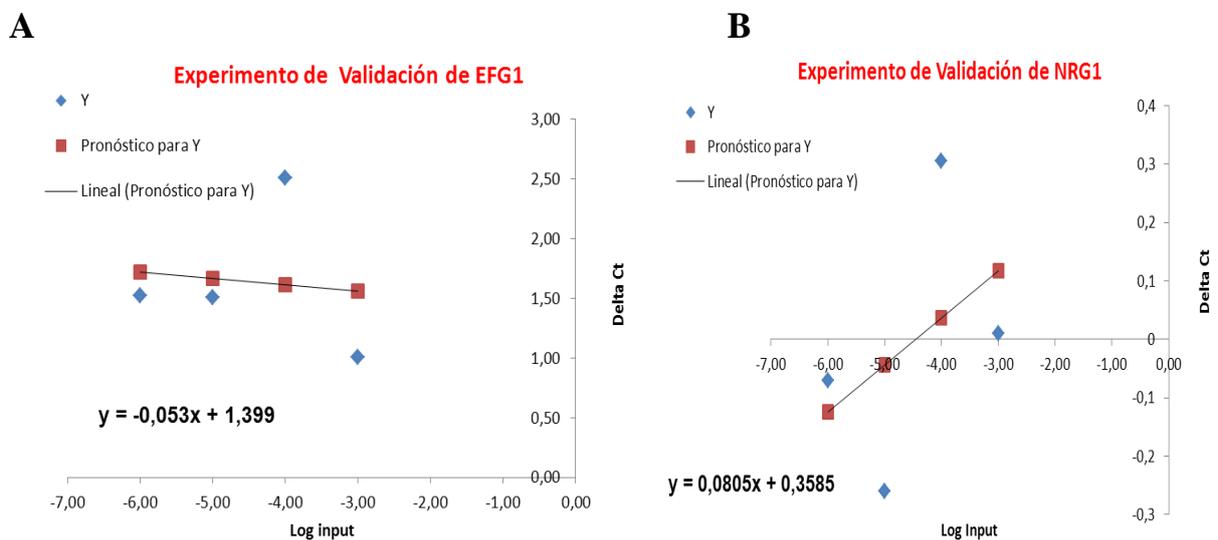
La especificidad de los partidores fue determinada por curvas de “melting”. Para cada gen (*ACT1*, *EFG1* y *NRG1*), se observó un solo pico de fluorescencia, lo que sugiere la presencia de un solo amplicón y por lo tanto la especificidad de los partidores (Figura 8).



**Figura 8:** Curvas de “melting” de PCR en tiempo real a partir del cDNA de los genes A) *ACT1*, B) *EFG1*, C) *NRG1*.

### 6.4.2. Validación de los experimentos por PCR en tiempo real.

El resultado de los ensayos de validación del método  $\Delta\Delta Ct$  se muestra en la Figura 9 en donde el valor absoluto de la pendiente  $\Delta Ct$  vs log de la concentración de mRNA debe ser  $<0,1$ . Los resultados para el experimento de *EFG1* y *NRG1* fueron 0,053 y 0,0805 respectivamente, considerándose válidos.

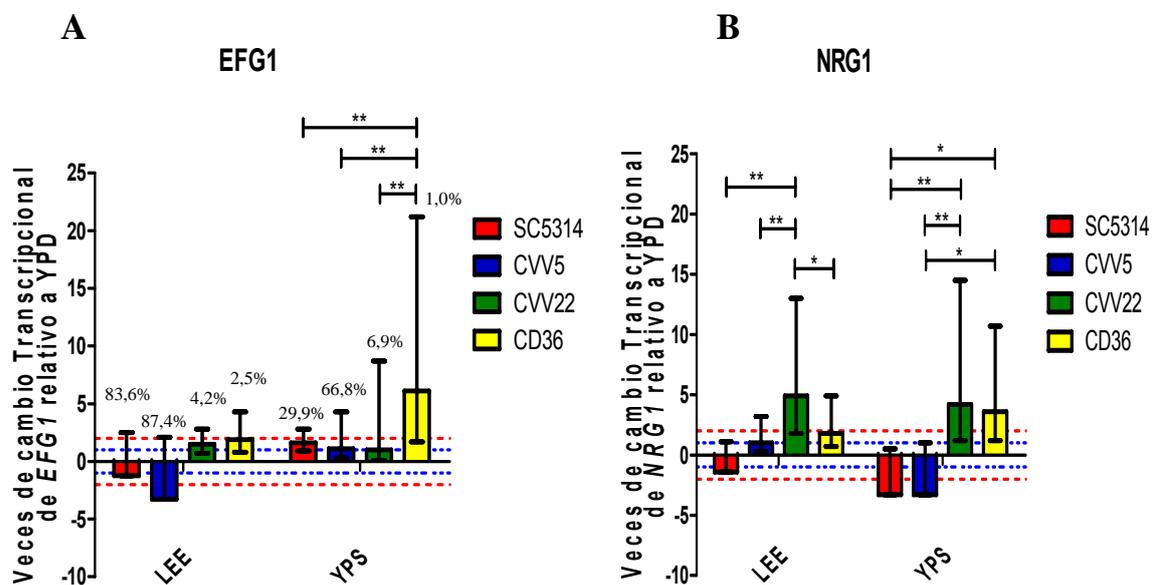


**Figura 9:** Experimento de validación de PCR en tiempo real. A) Experimento de validación de *EFG1* B) Experimento de validación de *NRG1*. Pendiente  $<1$  se consideran válidos

#### 6.4.3. Análisis de los genes *EFG1* y *NRG1* por PCR en tiempo real.

Para *EFG1*, el PCR en tiempo real mostró una disminución relevante de su expresión en la cepa CVV5 y un aumento en la cepa de *C. dubliniensis* CD36 en el medio LEE, respecto al medio no inductor YPD. Por otro lado, en YPS los niveles de *EFG1* no tuvieron cambios relevantes en ninguna de las cepas de *C. albicans*, pero en la cepa CD36 se puede observar un aumento relevante de 6,1 veces (ver Figura 10A). En este medio, la expresión de *EFG1* en CD36 mostró diferencias estadísticamente significativas con las cepas de SC5314, CVV5 y CVV22. Para la cepa de referencia CD36 de *C. dubliniensis* no existen reportes acerca del grado de filamentación, ni de la expresión de *EFG1* en el medio inductor YPS.

Con respecto a *NRG1*, en el medio LEE las cepas que presentaron altos niveles de filamentación SC5314 (83,6%) y CVV5 (87,4%) no presentaron cambios en los niveles de este transcrito. Por otro lado, la cepa poco filamentadora CVV22 (4,2%) presentó un aumento relevante de *NRG1* de 4,9 veces. El alto nivel de expresión de *NRG1* en la cepa CVV22 fue significativamente diferente con las cepas SC5314, CVV5 y CD36 (Figura 10B). En la cepa de referencia CD36, no hubo cambios en los niveles de *NRG1*, lo que concuerda con lo reportado por (Moran *et al.*, 2007). Por otro lado, en las cepas SC5314 y CVV5 el nivel de *NRG1* no se observaron cambios, mientras que ambas cepas exhibieron altos niveles de filamentación en LEE (83,6% y 87,4%, respectivamente).



**Figura 10:** Análisis de los genes *EFG1* y *NRG1* de cepas de *C. albicans* SC5314, CVV5, CVV22 y CD 36 (*C. dubliniensis*) por PCR en tiempo real. A) Los valores representan las veces de cambio del nivel de expresión transcripcional de los genes *EFG1* y B) *NRG1* relativo al medio no-inductor YPD. Las líneas rojas horizontales representan 2 veces de cambios considerados arbitrariamente como cambios relevantes. El rango de veces de cambio está representado como barras de error. \* indica diferencias estadísticamente significativas con  $p < 0,05$ . \*\* indica diferencias estadísticamente significativas con  $p < 0,01$ . Los números consignados sobre las barras corresponden al porcentaje de filamentación de cada cepa.

En el medio YPS los resultados muestran una disminución importante en los niveles de *NRG1* (3,3 veces) en las cepas SC5314 y CVV5 y un aumento significativo en las cepas CVV22 (4,2 veces) y CD36 (3,6 veces). Así mismo, se pueden observar diferencias estadísticamente significativas entre las cepas que presentaron mayor porcentaje de filamentación SC5314 y CVV5 (29,1% y 66,8%, respectivamente) y las cepas de baja filamentación CVV22 (6,9%) y CD36.

En la Tabla 8 se resumen los resultados del análisis de expresión de *EFG1* y *NRG1* en las cepas SC5314, CVV5 y CVV22, en los medios LEE e YPS, por el método de RT-PCR semicuantitativo y PCR en tiempo real.

**Tabla 8:** Resumen del análisis de expresión de *EFG1* y *NRG1* por RT-PCR semicuantitativo y PCR en tiempo real en las cepas SC5314, CVV5 y CVV22.

Medio LEE				
Cepa	Filamentación (%)	Genes	RT-PCR	PCR en tiempo real
SC5314	83,6	<i>EFG1</i>	-	-
		<i>NRG1</i>	↓(4,7x)	-
CVV5	87,4	<i>EFG1</i>	-	↓(3,3x)
		<i>NRG1</i>	-	-
CVV22	4,2	<i>EFG1</i>	-	-
		<i>NRG1</i>	-	↑(4,9x)

Medio YPS				
Cepa	Filamentación (%)	Genes	RT-PCR	PCR en tiempo real
SC5314	29,9	<i>EFG1</i>	-	-
		<i>NRG1</i>	-	↓(3,3x)
CVV5	66,8	<i>EFG1</i>	-	↓(2,5x)
		<i>NRG1</i>	↓(2,4x)	↓(3,3x)
CVV22	6,9	<i>EFG1</i>	-	-
		<i>NRG1</i>	-	↑(4,2x)

- No cambio en la expresión, ↓ disminución de la expresión, ↑ aumento de la expresión

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1. Diferencias de la filamentación en diferentes medios Inductores.

Los medios inductores utilizados en este estudio fueron LEE, YPS, SLAD y SPIDER, los cuales permitieron observar distintos grados de filamentación en cepas clínicas de *C. albicans* (Figura 3). Cada cepa analizada exhibió diferentes grados de filamentación de acuerdo al medio utilizado, por ejemplo la cepa CVV22 mostró un 4,2% de filamentación en LEE, mientras que en SPIDER filamentó en un 68,2% (Figura 3). Las diferencias de filamentación en estos medios probablemente responden a los distintos componentes presentes en cada uno de ellos. LEE es un medio sintético en el que los aminoácidos prolina y metionina parecen ser los inductores de filamentación (Maidan *et al.*, 2005). Sin embargo, el medio LEE utilizado en esta Tesis sólo contiene como único aminoácido a metionina (ver Materiales y Métodos, sección 5.3.2). En el medio SPIDER no es claro cuál o cuáles son los inductores, por un lado se propone que podría ser la privación de una buena fuente de carbono y nitrógeno, sin embargo, cuando se suplementa este medio con sales de amonio no se reduce la filamentación, lo que sugiere que la baja disponibilidad de nitrógeno no es el inductor (Ernst, 2000). Además, otros investigadores sugieren que la presencia del manitol en SPIDER es el inductor (Maidan *et al.*, 2005). Por otro lado, el medio YPS difiere del medio no inductor YPD sólo en la fuente de carbono, por lo que el probable inductor podría ser la sacarosa. La ausencia de glucosa en YPS no basta para inducir la formación de filamentos, dado que en medio YPG (conteniendo glicerol como fuente de carbono en lugar de glucosa) *C. albicans* no es capaz de filamentar (Gow *et al.*, 1995). Finalmente, el medio

SLAD induciría la filamentación por una baja concentración de nitrógeno (Biswas and Morschhauser, 2005; Maidan *et al.*, 2005).

Por otra parte, estos medios inductores pueden activar diferentes vías de transducción de señales relacionadas con la morfogénesis. Por ejemplo, los medios LEE y SPIDER inducen la filamentación a través de las vías de transducción MAPKinasa y cAMP-PKA (Kohler and Fink, 1996; Bockmuhl and Ernst, 2001). En LEE, la metionina activaría fuertemente la vía cAMP-PKA, utilizando el receptor Gpr1, acoplado a proteína G (Maidan *et al.*, 2005; Cottier and Muhlschlegel, 2009). Mientras que en SLAD, la baja concentración de nitrógeno activaría al transceptor Mep2 y puede participar en la activación de la vía cAMP-PKA y MAPKinasa (Biswas and Morschhauser, 2005).

En las cepas clínicas analizadas de *C. albicans* cada uno de estos estímulos favorecieron el desarrollo de filamentos en mayor o menor medida, permitiendo su clasificación en tres categorías, cepas de filamentación baja, intermedia y alta (Tabla 5). Los medios que indujeron fuertemente la filamentación fueron LEE y SPIDER. Sin embargo, en el medio SPIDER la filamentación fue pleomórfica, observándose una gran variedad de morfologías en los filamentos, lo que sugiere una regulación de la filamentación más compleja de analizar. El medio SLAD no indujo notablemente la filamentación en ninguna de las cepas. Este medio en sólido se reporta como un buen inductor (Maidan *et al.*, 2005), pero en esta Tesis fue utilizado en fase líquida lo que podría explicar estos resultados.

De acuerdo a estos resultados, se decidió analizar el comportamiento de las cepas clínicas sólo en los medios LEE e YPS. Para ambos medios, la cepa CVV22 se comportó como una cepa con baja capacidad para filamentar, mientras que la cepa CVV5 fue altamente filamentadora (Figura 3, Tabla 5).

## **7.2. Expresión de reguladores transcripcionales en cepas de alto y bajo grado de filamentación por RT-PCR semicuantitativo.**

El análisis de genes reguladores de la filamentación *CPH1*, *EFG1*, *NRG1*, y *RIM101* por PCR-Transcriptasa Reversa semicuantitativo permitió realizar un tamizaje de los posibles genes implicados en determinar las diferencias en los grados de filamentación entre las cepas CVV5 y CVV22.

*CPH1*, asociado a la vía de transducción MAPKinasa (Liu *et al.*, 1994) y *RIM101*, asociado a la vía de transducción en respuesta al pH (Ramon *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 2000b), no mostraron cambios en su nivel de expresión estadísticamente significativos (Figura 6A y 7A), ni diferencias relevantes en las veces de cambios (cambio del nivel de expresión  $\geq 2$ ) en los medios LEE e YPS (Figura 6B y 7B). Dado que el medio LEE estimula la vía de transducción MAPKinasa, era esperable cambios en los niveles de expresión transcripcional de *CPH1*. Experimentos con mutantes  $\Delta cph1/\Delta cph1$  demostraron que este regulador es importante para la filamentación sólo en medio LEE sólido y no en medio LEE líquido (Liu *et al.*, 1994),

lo cual explicaría el comportamiento de *CPH1* en las cepas clínicas CVV22, CVV5 y SC5314 en esta Tesis.

Por otro lado, *RIM101* se comportó de acuerdo a lo esperado, dado que está descrito que su producto es importante para la respuesta de filamentación frente a cambios de pH, particularmente en pH alcalino (Davis *et al.*, 2000b). Mientras que los medios LEE e YPS tienen un pH de 7,04 y 6,56, respectivamente.

Estos resultados permiten proponer que *CPH1* y *RIM101* no están implicados en las diferencias observadas en la capacidad de filamentación de las cepas CVV22 y CVV5 en los medios YPS y LEE, al menos por regulación transcripcional. Sin embargo, no se puede descartar la regulación traduccional y/o post-traduccional de estos reguladores transcripcionales. Por ejemplo, Cph1 debe ser activado por fosforilación (Liu *et al.*, 1994; Kohler and Fink, 1996; Leberer *et al.*, 1996), mientras que Rim101 debe experimentar proteólisis para activarse (Xu and Mitchell, 2001; Li *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2004).

Es interesante mencionar que resultados similares han sido obtenidos con otros medios inductores, como YPD-50% de suero de ternero, en los que los niveles de transcritos de *CPH1* y *RIM101*, determinado por PCR en tiempo real, no sufren una variación significativa, (Bassilana *et al.*, 2005).

El gen *EFG1*, asociado a la vía de transducción cAMP-PKA, sólo mostró diferencias estadísticamente significativas en los niveles del transcrito entre la cepa

de referencia SC5314 y CVV22 en el medio YPS (Figura 6A). Mientras que no se observan diferencias estadísticamente significativas en las veces de cambio en LEE e YPS (Figura 6B). Considerando que *EFG1* es un regulador mayor de la filamentación (Noffz *et al.*, 2008) y dado su comportamiento en YPS en SC5314 y CVV22, se decidió analizar su expresión mediante PCR en tiempo real.

Por otra parte, *NRG1* no mostró diferencias estadísticamente significativas en los niveles de transcritos ni en las veces de cambio, pero se pudo apreciar una reducción relevante de más de cuatro veces en la cepa de referencia SC5314 en el medio LEE, mientras que en la cepa CVV5 se redujo más de dos veces en el medio YPS. La cepa CVV22 (cepa de filamentación baja) mantuvo los niveles de *NRG1* sin cambio relevante en todas las condiciones ensayadas. Considerando los reportes de Moran *et al.*, (2007), donde se observó una correlación entre los niveles de expresión transcripcional de *NRG1* y los grados de filamentación de *C. albicans* y *C. dubliniensis*, los cambios observados en la cepa SC5314 en LEE y CVV5 en YPS en esta Tesis, fueron confirmados mediante un análisis de PCR en tiempo real.

### **7.3. Expresión de *EFG1* y *NRG1* en cepas de alto y bajo grado de filamentación por PCR en tiempo real.**

El análisis por PCR en tiempo real de *EFG1* en las cepas clínicas de *C. albicans* no reveló cambios a nivel transcripcional a las dos horas post-inducción en los medios LEE e YPS (Figura 10A). Estos resultados son acordes con los reportes de Stoldt *et al.*, (1997) y Tebarth *et al.*, (2003), donde se registró una disminución de los

niveles de transcritos al momento de la aparición de las hifas, incrementándose a los 30 min y 60 min post-inducción. Esta regulación sería necesaria para permitir el desarrollo normal de las hifas, ya que al parecer *EFG1* es requerido sólo en los estadios tempranos de la formación de hifas (Stoldt *et al.*, 1997; Tebarth *et al.*, 2003).

De acuerdo a lo anterior, en la cepa CVV5, la reducción de *EFG1* de 3,3 veces en el medio LEE, favorecería la aparición de hifas, lo cual concuerda con el grado de filamentación observado en esta cepa (87,4%). Sin embargo, esto no ocurre con la cepa SC5314, en donde *EFG1* no sufre cambios relevantes y exhibe un 83,6% de filamentación. Tebarth *et al.*, (2003) han propuesto que la autorregulación negativa que experimenta *EFG1* es necesaria para permitir la elongación de las hifas, ya que en experimentos de sobreexpresión de *EFG1* se observa un desarrollo anormal de hifas, por lo que estos autores concluyen que si no se reducen los niveles de Efg1, éste interferiría con la elongación normal de la hifa. Una vez iniciada la formación de la hifa, el nivel transcripcional de *EFG1* comienza a incrementar, lo cual ha sido atribuido a la aparición de nuevas levaduras durante la inducción (Tebarth *et al.*, 2003). Alternativamente a esta explicación, los recientes hallazgos de genes involucrados en la formación del tubo germinativo y elongación de hifas, bajo la regulación de Efg1, como *EED1* (Martin *et al.*, 2011) y *UME6* (Zeidler *et al.*, 2009) podrían requerir el incremento de *EFG1* para ser activados y ejercer su función.

Efg1 es un regulador maestro que no sólo está implicado en el cambio morfológico sino que también en el cambio y mantención del tipo celular White-Opaque, regulación de genes de pared celular, adhesión, virulencia y

respuesta frente a citoquinas del hospedero (Sonneborn *et al.*, 1999b; Korting *et al.*, 2003; Li and Palecek, 2003; Sohn *et al.*, 2003; Zordan *et al.*, 2007). Genes que se encuentran regulados por este factor transcripcional o que interactúen con él, podrían estar enmascarando su rol en las diferencias observadas en las cepas clínicas de *C. albicans*, comportándose como genes epistáticos. Uno de estos genes, recientemente descrito, podría ser *EED1*, el cual es expresado en pacientes con candidiasis oral activa. *EED1* presenta un rol esencial en la extensión del tubo germinativo y mutantes  $\Delta efg1/\Delta efg1$  presentan una reducción de los transcritos de *EED1*. La sobreexpresión de *EED1* en  $\Delta efg1/\Delta efg1$  restaura parcialmente el defecto de la filamentación de la mutante (Martin *et al.*, 2011).

Por otro lado, el factor transcripcional UME6 (Banerjee *et al.*, 2008) ha sido asociado con la extensión de la hifa y la formación del tubo germinal. Mutaciones en este gen presentan un defecto en la extensión de las hifas, (Banerjee *et al.*, 2008; Zeidler *et al.*, 2009; Carlisle and Kadosh, 2010) y al parecer se encuentra regulado por Eed1 (Martin *et al.*, 2011). Un estudio de *UME6* reveló que contribuye a las diferencias de filamentación entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* (O'Connor *et al.*, 2010).

Tanto Ume6 como Eed1 estarían río abajo de Efg1 y probablemente representan factores comunes a otras vías de transducción de señales. Con estos antecedentes *EED1* y *UME6* son buenos candidatos para explicar diferencias de filamentación en cepas clínicas de *C. albicans*.

Con respecto a *NRG1* en el medio LEE, las cepas que presentaron mayor porcentaje de filamentación SC5314 (83,6%) y CVV5 (87,4%) no mostraron cambios en los niveles de transcritos (Figura 10B); este resultado difiere de los reportes de Moran *et al* (2007) y Braun *et al* (2001), en donde el comportamiento de *NRG1* en la cepa de referencia SC5314, bajo inducción con YPD-10% suero y co-cultivo con macrófagos, disminuyó rápidamente su expresión a niveles cercanos al 15% (60 min) y se mantuvo así hasta por 5 horas. Sin embargo, en el medio SPIDER esto no ocurre y los niveles de *NRG1* se mantienen constantes (Braun *et al.*, 2001). Las posibles causas referidas por los investigadores para explicar este comportamiento de *NRG1* en SPIDER fue que en este medio no se encuentra el 100% de las células filamentando, por lo que aquellas levaduras libres podrían enmascarar la reducción de *NRG1*. Sin embargo, nuestros resultados no podrían ser explicados de esta manera ya que en el medio LEE sólo el 24% y el 27% de las células no estarían formando filamentos (SC5314 y CVV5, respectivamente) y además no se observó una disminución de *NRG1*; mientras que en el medio YPS, donde se encuentra un mayor porcentaje de células como levaduras, 33% (SC5314) y 70% (CVV5), se observa una reducción de 3,3 veces los niveles de *NRG1*. Lo anterior sugiere que *NRG1* en LEE no estaría cumpliendo un rol importante para determinar el grado de filamentación de las cepas en estudio y serían otros los componentes implicados.

Por otra parte, la observación microscópica de la filamentación en las cepas SC5314 y CVV5 en LEE, mostró la presencia de pseudohifas más que hifas verdaderas, con lo que alternativamente se podría suponer que *NRG1* estaría reprimiendo la aparición de hifas pero no sería capaz de reprimir la formación de

pseudohifas, esto basado en los reportes de Cleary y Saville., (2010) donde la sobreexpresión de *NRG1* no fue capaz de reprimir la formación de pseudohifas en el medio SLAD, sugiriendo una fina diferencia en la regulación de hifas verdaderas y pseudohifas (Cleary and Saville, 2010).

El conocimiento que se tiene de la regulación de formación de pseudohifas es reducido, pero llama la atención que ciertas mutantes presenten fenotipos distintos dependiendo del medio en el que se cultiven. Mutantes de *NRG1* en YPD-25°C presentan un fenotipo filamentoso del tipo pseudohifas, mientras que frente a la inducción con suero a 37°C exhiben un fenotipo filamentoso en el que predominan hifas verdaderas (Murad *et al.*, 2001). Por otro lado, mutantes de *EFG1* y cepas que sobreexpresan este regulador, resultan en la formación de pseudohifas (Stoldt *et al.*, 1997; Tebarth *et al.*, 2003). Estos antecedentes sugieren que hay elementos que convergen en la formación de estos dos tipos de filamentos, pero también presentan diferencias en su regulación. El estudio de otros componentes que participen específicamente en la formación de pseudohifas podría aportar conocimiento sobre los resultados observados en las cepas SC5314 y CVV5 en el medio LEE, donde los niveles de *NRG1* no presentaron cambios. Uno de estos componentes podría ser la proteína represora Rfg1, a la que recientemente se atribuyó la función de propiciar y participar en el desarrollo de pseudohifas. Experimentos de sobreexpresión de *RFG1* en el medio no inductor de filamentación YPD, determinó la formación de pseudohifas (Cleary *et al.*, 2010).

La especie *C. dubliniensis* tiene poca capacidad para formar filamentos en la mayoría de las condiciones en estudio tanto *in vitro*, como *in vivo* (Stokes *et al.*, 2007). En este estudio, la baja capacidad de filamentación fue corroborada por los bajos porcentajes de filamentación en la cepa CD36 de *C. dubliniensis*, (2,5% y 1% en LEE e YPS, respectivamente). Moran *et al.*, (2007) reportaron que en *C. dubliniensis* los niveles de *NRG1*, frente a la inducción con suero, fueron reprimidos de manera más lenta que en *C. albicans*, mientras que frente a la inducción con macrófagos, *NRG1* se redujo sólo un 50% e incluso después de 5 h post-inducción se incrementó hasta un 70%, lo que explicaría la filamentación reducida en esta especie. De una forma similar, en esta Tesis los niveles de *NRG1* en CD36 experimentaron un cambio no relevante de 1,8 veces en LEE e incrementaron 3,6 veces en YPS, lo cual concuerda con el bajo nivel de filamentación exhibido en ambos medios. Cabe resaltar que en la cepa de baja filamentación CVV22 *NRG1* se comportó de forma similar a *C. dubliniensis*, dado que lejos de experimentar una reducción de sus niveles de transcrito, éstos se incrementaron 4,9 veces en LEE y 4,2 veces en YPS, correspondiéndose con el 4,2% y 6,9% de filamentación en ambos medios respectivamente.

En el medio YPS, se observó una mejor correlación de los niveles de *NRG1* en las cepas en estudio, así la cepa que presentó mayor porcentaje de filamentación (CVV5), mostró una reducción de 3,3 veces de los niveles de *NRG1*, mientras que la cepa de baja filamentación CVV22 presentó un aumento importante de *NRG1* (4,2 veces) (Figura 10B). Estos cambios resultaron estadísticamente significativos entre las cepas con alto y bajo grado de filamentación. Sin embargo, aunque se pudo

observar una represión de *NRG1* en cepas con mayor porcentaje de filamentación, este evento parece no determinar el grado de filamentación que exhiben; debido que habiendo diferencias en los grados de filamentación significativas entre SC5314 (29,1%) y CVV5 (66,8%), los niveles de reducción de *NRG1*, en ambas cepas fue el mismo (3,3 veces), lo que sugiere que otro u otros elementos pueden estar interfiriendo con el grado de filamentación en SC5314.

Dentro de los posibles elementos que podrían afectar el grado de filamentación en cepas clínicas de *C. albicans*, se puede considerar el factor transcripcional Rbf1, un regulador negativo de la formación de hifas verdaderas. Mutantes  $\Delta rbf1/\Delta rbf1$ , presentan un fenotipo constitutivamente filamentoso, caracterizado por la presencia de pseudohifas en medio no inductor líquido y exhibir una virulencia atenuada en un modelo sistémico murino (Ishii *et al.*, 1997a; Ishii *et al.*, 1997b; Sharkey *et al.*, 1999).

Otros activadores y represores han sido descritos en *C. albicans* como Tec1, asociado a la regulación negativa de la transición levadura-hifa. Su delección confiere defectos en la filamentación y virulencia atenuada en modelos murinos (Schweizer *et al.*, 2000). Más recientemente, se han descrito nuevos factores transcripcionales como Pes1 y Tor1. Pes1 es importante para la transición hifa-levadura y crítico para completar el ciclo de vida de la levadura, debido a que su delección sólo es tolerada en las formas hifales (Shen *et al.*, 2008). Tor1 juega un papel en la regulación de la expresión de genes específicos de hifa, incluyendo adhesinas y proteínas de pared

celular, junto con los represores transcripcionales Nrg1 y Tup1 (Bastidas *et al.*, 2009).

Alternativamente, otros elementos implicados en la filamentación, que no necesariamente son reguladores transcripcionales, también pueden dar cuenta por las diferencias en el grado de filamentación entre cepas clínicas, como por ejemplo, componentes de vías de transducción de señales o genes blancos asociados a la filamentación (Biswas *et al.*, 2007).

De acuerdo a los resultados presentados en esta Tesis, los reguladores transcripcionales *CPH1*, *RIM101*, *EFG1* y *NRG1* no jugarían un rol determinante en las diferencias de filamentación observadas entre las cepas CVV5, CVV22 y SC5314. Sin embargo, para *NRG1* en YPS, sus niveles transcripcionales se asocian a las diferencias en los grados de filamentación de CVV5 y CVV22, pero no con la cepa de referencia SC5314.

Finalmente, el número creciente de genes relacionados directa e indirectamente con la filamentación, como reguladores transcripcionales positivos y negativos, componentes de vías de transducción de señales y genes blancos relacionados al cambio morfogénico, apuntan a la naturaleza multifactorial de la regulación de este complejo proceso en *C. albicans*. Esto sugiere una baja probabilidad de que existan genes mayores que determinen las diferencias de filamentación en distintas cepas. Al contrario, sería el contexto genético de cada cepa lo que determinaría en última instancia su grado de filamentación frente a

diferentes estímulos. En otras palabras, la combinación de las variantes alélicas de los genes relacionados con la morfogénesis contribuiría de forma aditiva con la filamentación en esta especie.

## 8. CONCLUSIONES

- Las cepas clínicas de *C. albicans* exhibieron diferentes grados de filamentación. Destacándose la cepa CVV5 como un cepa altamente filamentadora (87,4% en medio LEE) y la cepa CVV22, como una cepa de baja filamentación (4,2% en medio LEE).
- El análisis semicuantitativo de la expresión de los genes *CPH1* y *RIM101* no mostró diferencias significativas, en las diferentes condiciones ensayadas y no hubo asociación con niveles de filamentación de SC5314, CVV5 y CVV22.
- El PCR en tiempo real reveló el aumento del nivel de expresión transcripcional de *NRG1*, en los medios LEE e YPS, para las cepas con menor porcentaje de filamentación (CVV22 y CD36).
- *EFG1* no parece estar asociado al grado de filamentación exhibido por las cepas de *C. albicans* en las condiciones ensayadas en este estudio.
- Los resultados del PCR en tiempo real sugieren que la expresión transcripcional de *EFG1* y *NRG1* no correlacionó con los niveles de filamentación en las cepas analizadas.

## 9. PROYECCIONES

- ❖ Para continuar con la línea de investigación se podrían realizar mediciones de niveles de la proteína *NRG1* en medio LEE en las cepas SC5314 y CVV5.
- ❖ Monitorear la expresión de genes que promueven la formación de pseudohifas (*RFG1*) en las cepas CVV5 y SC5314 en el medio LEE.
- ❖ Determinar el comportamiento de estas cepas en modelo de candidiasis sistémica in vivo (pez Zebra) y RHE, observando el comportamiento de *NRG1* y otros genes importantes para la filamentación (*EED1* y *UME6*)

## 10. BIBLIOGRAFÍA

**Argimon, S., Wishart, J.A., Leng, R., Macaskill, S., Mavor, A., Alexandris, T., Nicholls, S., Knight, A.W., Enjalbert, B., Walmsley, R., Odds, F.C., Gow, N.A. & Brown, A.J.** (2007) Developmental regulation of an adhesin gene during cellular morphogenesis in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **6**, 682-692.

**Baek, Y.U., Li, M. & Davis, D.A.** (2008) *Candida albicans* ferric reductases are differentially regulated in response to distinct forms of iron limitation by the Rim101 and CBF transcription factors. *Eukaryot Cell* **7**, 1168-1179.

**Bahn, Y.S. & Sundstrom, P.** (2001) *CAP1*, an adenylate cyclase-associated protein gene, regulates bud-hypha transitions, filamentous growth, and cyclic AMP levels and is required for virulence of *Candida albicans*. *J Bacteriol* **183**, 3211-3223.

**Banerjee, M., Thompson, D.S., Lazzell, A., Carlisle, P.L., Pierce, C., Monteagudo, C., Lopez-Ribot, J.L. & Kadosh, D.** (2008) *UME6*, a novel filament-specific regulator of *Candida albicans* hyphal extension and virulence. *Mol Biol Cell* **19**, 1354-1365.

**Bassilana, M., Hopkins, J. & Arkowitz, R.A.** (2005) Regulation of the Cdc42/Cdc24 GTPase module during *Candida albicans* hyphal growth. *Eukaryot Cell* **4**, 588-603.

**Bastidas, R.J. & Heitman, J.** (2009) Trimorphic stepping stones pave the way to fungal virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 351-352.

**Bastidas, R.J., Heitman, J. & Cardenas, M.E.** (2009) The protein kinase Tor1 regulates adhesin gene expression in *Candida albicans*. *PLoS Pathog* **5**, e1000294.

**Bensen, E.S., Martin, S.J., Li, M., Berman, J. & Davis, D.A.** (2004) Transcriptional profiling in *Candida albicans* reveals new adaptive responses to extracellular pH and functions for Rim101p. *Mol Microbiol* **54**, 1335-1351.

**Berman, J.** (2006) Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* **9**, 595-601.

**Biswas, K. & Morschhauser, J.** (2005) The Mep2p ammonium permease controls nitrogen starvation-induced filamentous growth in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **56**, 649-669.

**Biswas, S., Van Dijck, P. & Datta, A.** (2007) Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**, 348-376.

**Bockmuhl, D.P. & Ernst, J.F.** (2001) A potential phosphorylation site for an A-type kinase in the Efg1 regulator protein contributes to hyphal morphogenesis of *Candida albicans*. *Genetics* **157**, 1523-1530.

**Bockmuhl, D.P., Krishnamurthy, S., Gerads, M., Sonneborn, A. & Ernst, J.F.** (2001) Distinct and redundant roles of the two protein kinase A isoforms Tpk1p and Tpk2p in morphogenesis and growth of *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **42**, 1243-1257.

**Borges-Walmsley, M.I. & Walmsley, A.R.** (2000) cAMP signalling in pathogenic fungi: control of dimorphic switching and pathogenicity. *Trends Microbiol* **8**, 133-141.

**Braun, B.R. & Johnson, A.D.** (1997) Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor *TUP1*. *Science* **277**, 105-109.

**Braun, B.R. & Johnson, A.D.** (2000) *TUP1*, *CPH1* and *EFG1* make independent contributions to filamentation in *Candida albicans*. *Genetics* **155**, 57-67.

**Braun, B.R., Kadosh, D. & Johnson, A.D.** (2001) *NRG1*, a repressor of filamentous growth in *C. albicans*, is down-regulated during filament induction. *Embo J* **20**, 4753-4761.

**Brown, A.J.P.** (2002) Morphogenetic Signaling Pathway in *Candida albicans*. In Calderone, R. (ed) *Candida and Candidiasis*. ASM Press.

**Brown, D.H., Jr., Giusani, A.D., Chen, X. & Kumamoto, C.A.** (1999) Filamentous growth of *Candida albicans* in response to physical environmental cues and its regulation by the unique *CZF1* gene. *Mol Microbiol* **34**, 651-662.

**Calderone, R.A. & Fonzi, W.A.** (2001) Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **9**, 327-335.

**Calderone, R.A. & Gow, N.A.** (2002) Host Recognition by *Candida* Species. In Calderone, R. (ed) *Candida and Candidiasis*. ASM Press, pp. 67-86.

**Carlisle, P.L. & Kadosh, D.** (2010) *Candida albicans* Ume6, a filament-specific transcriptional regulator, directs hyphal growth via a pathway involving Hgc1 cyclin-related protein. *Eukaryot Cell* **9**, 1320-1328.

**Cassola, A., Parrot, M., Silberstein, S., Magee, B.B., Passeron, S., Giasson, L. & Cantore, M.L.** (2004) *Candida albicans* lacking the gene encoding the regulatory subunit of protein kinase A displays a defect in hyphal formation and an altered localization of the catalytic subunit. *Eukaryot Cell* **3**, 190-199.

**Cleary, I.A., Mulabagal, P., Reinhard, S.M., Yadev, N.P., Murdoch, C., Thornhill, M.H., Lazzell, A.L., Monteagudo, C., Thomas, D.P. & Saville, S.P.** (2010) Pseudohyphal regulation by the transcription factor Rfg1p in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **9**, 1363-1373.

**Cleary, I.A. & Saville, S.P.** (2010) An analysis of the impact of NRG1 overexpression on the *Candida albicans* response to specific environmental stimuli. *Mycopathologia* **170**, 1-10.

**Cottier, F. & Muhlschlegel, F.A.** (2009) Sensing the environment: response of *Candida albicans* to the X factor. *FEMS Microbiol Lett* **295**, 1-9.

**Csank, C., Schroppel, K., Leberer, E., Harcus, D., Mohamed, O., Meloche, S., Thomas, D.Y. & Whiteway, M.** (1998) Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase homolog, Cek1p, in hyphal development and systemic candidiasis. *Infect Immun* **66**, 2713-2721.

**Cutler, J.E.** (1991) Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* **45**, 187-218.

**Chaffin, W.L.** (2008) *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**, 495-544.

**Davis, D., Edwards, J.E., Jr., Mitchell, A.P. & Ibrahim, A.S.** (2000a) *Candida albicans* RIM101 pH response pathway is required for host-pathogen interactions. *Infect Immun* **68**, 5953-5959.

**Davis, D., Wilson, R.B. & Mitchell, A.P.** (2000b) RIM101-dependent and-independent pathways govern pH responses in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* **20**, 971-978.

**Doedt, T., Krishnamurthy, S., Bockmuhl, D.P., Tebarth, B., Stempel, C., Russell, C.L., Brown, A.J. & Ernst, J.F.** (2004) APSES proteins regulate morphogenesis and metabolism in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **15**, 3167-3180.

**Ernst, J.F.** (2000) Transcription factors in *Candida albicans* - environmental control of morphogenesis. *Microbiology* **146 ( Pt 8)**, 1763-1774.

**Feng, Q., Summers, E., Guo, B. & Fink, G.** (1999) Ras signaling is required for serum-induced hyphal differentiation in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **181**, 6339-6346.

**Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styles, C.A. & Fink, G.R.** (1992) Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* **68**, 1077-1090.

**Gow, N., Hube, B., Bailey, D., Schofield, D., Munro, C., Swoboda, R., Bertram, G., Westwater, C., Broadbent, I., Smith, R., Gooday, G. & Brown, A.** (1995) Genes associated with dimorphism and virulence of *Candida albicans*. *Canadian Journal of Botany* **73**, 335-342.

**Ishii, N., Yamamoto, M., Lahm, H.W., Iizumi, S., Yoshihara, F., Nakayama, H., Arisawa, M. & Aoki, Y.** (1997a) A DNA-binding protein from *Candida albicans* that binds to the RPG box of *Saccharomyces cerevisiae* and the telomeric repeat sequence of *C. albicans*. *Microbiology* **143** ( Pt 2), 417-427.

**Ishii, N., Yamamoto, M., Yoshihara, F., Arisawa, M. & Aoki, Y.** (1997b) Biochemical and genetic characterization of Rbf1p, a putative transcription factor of *Candida albicans*. *Microbiology* **143** ( Pt 2), 429-435.

**Jullien, N.** (2007) Software AmplifX 1.5.4. by Nicolas Jullien (<http://ifrijr.nord.univ-mrs.fr/AmplifX-Home-page>).

**Kadosh, D. & Johnson, A.D.** (2005) Induction of the *Candida albicans* filamentous growth program by relief of transcriptional repression: a genome-wide analysis. *Mol Biol Cell* **16**, 2903-2912.

**Kebaara, B.W., Langford, M.L., Navarathna, D.H., Dumitru, R., Nickerson, K.W. & Atkin, A.L.** (2008) *Candida albicans* Tup1 is involved in farnesol-mediated inhibition of filamentous-growth induction. *Eukaryot Cell* **7**, 980-987.

**Kohler, J.R. & Fink, G.R.** (1996) *Candida albicans* strains heterozygous and homozygous for mutations in mitogen-activated protein kinase signaling components have defects in hyphal development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13223-13228.

**Korting, H.C., Hube, B., Oberbauer, S., Januschke, E., Hamm, G., Albrecht, A., Borelli, C. & Schaller, M.** (2003) Reduced expression of the hyphal-independent *Candida albicans* proteinase genes *SAP1* and *SAP3* in the *efg1* mutant is associated with attenuated virulence during infection of oral epithelium. *J Med Microbiol* **52**, 623-632.

**Land, G.A., McDonald, W.C., Stjernholm, R.L. & Friedman, T.L.** (1975) Factors affecting filamentation in *Candida albicans*: relationship of the uptake and distribution of proline to morphogenesis. *Infect Immun* **11**, 1014-1023.

**Lane, S., Zhou, S., Pan, T., Dai, Q. & Liu, H.** (2001) The basic helix-loop-helix transcription factor Cph2 regulates hyphal development in *Candida albicans* partly via TEC1. *Mol Cell Biol* **21**, 6418-6428.

**Leberer, E., Marcus, D., Broadbent, I.D., Clark, K.L., Dignard, D., Ziegelbauer, K., Schmidt, A., Gow, N.A., Brown, A.J. & Thomas, D.Y.** (1996) Signal transduction through homologs of the Ste20p and Ste7p protein kinases can trigger hyphal formation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13217-13222.

**Lengeler, K.B., Davidson, R.C., D'Souza, C., Harashima, T., Shen, W.C., Wang, P., Pan, X., Waugh, M. & Heitman, J.** (2000) Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 746-785.

**Lewis, R.E., Lo, H.J., Raad, II & Kontoyiannis, D.P.** (2002) Lack of catheter infection by the *efg1/efg1 cph1/cph1* double-null mutant, a *Candida albicans* strain that is defective in filamentous growth. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 1153-1155.

**Li, F. & Palecek, S.P.** (2003) EAP1, a *Candida albicans* gene involved in binding human epithelial cells. *Eukaryot Cell* **2**, 1266-1273.

**Li, M., Martin, S.J., Bruno, V.M., Mitchell, A.P. & Davis, D.A.** (2004) *Candida albicans* Rim13p, a protease required for Rim101p processing at acidic and alkaline pHs. *Eukaryot Cell* **3**, 741-751.

**Liu, H., Kohler, J. & Fink, G.R.** (1994) Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a *STE12* homolog. *Science* **266**, 1723-1726.

**Livak, K.J. & Schmittgen, T.D.** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408.

**Lo, H.J., Kohler, J.R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A. & Fink, G.R.** (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**, 939-949.

**Lotz, H., Sohn, K., Brunner, H., Muhlschlegel, F.A. & Rupp, S.** (2004) *RBR1*, a novel pH-regulated cell wall gene of *Candida albicans*, is repressed by *RIM101* and activated by *NRG1*. *Eukaryot Cell* **3**, 776-784.

**Madhani, H.D. & Fink, G.R.** (1998) The control of filamentous differentiation and virulence in fungi. *Trends Cell Biol* **8**, 348-353.

**Maidan, M.M., De Rop, L., Relloso, M., Diez-Orejas, R., Thevelein, J.M. & Van Dijck, P.** (2008) Combined inactivation of the *Candida albicans* *GPR1* and *TPS2* genes results in avirulence in a mouse model for systemic infection. *Infect Immun* **76**, 1686-1694.

**Maidan, M.M., De Rop, L., Serneels, J., Exler, S., Rupp, S., Tournu, H., Thevelein, J.M. & Van Dijck, P.** (2005) The G protein-coupled receptor Gpr1 and the Galpha protein Gpa2 act through the cAMP-protein kinase A pathway to induce morphogenesis in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **16**, 1971-1986.

**Marol, S. & Yucesoy, M.** (2008) Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from clinical specimens of intensive care unit patients. *Mycoses* **51**, 40-49.

**Martin, R., Moran, G.P., Jacobsen, I.D., Heyken, A., Domey, J., Sullivan, D.J., Kurzai, O. & Hube, B.** (2011) The *Candida albicans*-Specific Gene *EED1* Encodes a Key Regulator of Hyphal Extension. *PLoS One* **6**, e18394.

**Mathews, H. & Witek-Janusek, L.** (2002) Host defense against oral, esophageal and gastrointestinal candidiasis. In Calderone, R. (ed) *Candida and Candidiasis*. ASM Press.

**Mitchell, A.P.** (1998) Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* **1**, 687-692.

**Monge, R.A., Roman, E., Nombela, C. & Pla, J.** (2006) The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans*. *Microbiology* **152**, 905-912.

**Mora, L. & Hermosilla, G.** (2008) Caracterización fenotípica y genética de la filamentación en cepas clínicas de *Candida albicans* Unidad de Investigación de Magíster en Ciencias Médicas. Programa de Microbiología y Micología, Universidad de Chile.

**Moran, G.P., MacCallum, D.M., Spiering, M.J., Coleman, D.C. & Sullivan, D.J.** (2007) Differential regulation of the transcriptional repressor *NRG1* accounts for altered host-cell interactions in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Mol Microbiol* **66**, 915-929.

**Murad, A.M., Leng, P., Straffon, M., Wishart, J., Macaskill, S., MacCallum, D., Schnell, N., Talibi, D., Marechal, D., Tekaia, F., d'Enfert, C., Gaillardin, C., Odds, F.C. & Brown, A.J.** (2001) *NRG1* represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. *Embo J* **20**, 4742-4752.

**Nasution, O., Srinivasa, K., Kim, M., Kim, Y.J., Kim, W., Jeong, W. & Choi, W.** (2008) Hydrogen peroxide induces hyphal differentiation in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **7**, 2008-2011.

**Nobile, C.J., Solis, N., Myers, C.L., Fay, A.J., Deneault, J.S., Nantel, A., Mitchell, A.P. & Filler, S.G.** (2008) *Candida albicans* transcription factor Rim101 mediates pathogenic interactions through cell wall functions. *Cell Microbiol* **10**, 2180-2196.

**Noffz, C.S., Liedschulte, V., Lengeler, K. & Ernst, J.F.** (2008) Functional mapping of the *Candida albicans* Efg1 regulator. *Eukaryot Cell* **7**, 881-893.

**O'Connor, L., Caplice, N., Coleman, D.C., Sullivan, D.J. & Moran, G.P.** (2010) Differential filamentation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* Is governed by nutrient regulation of UME6 expression. *Eukaryot Cell* **9**, 1383-1397.

**Otaíza, F., Pohlenz, M., Brenner, P. & Bustamante, R.** (2005) Informe de vigilancia de las infecciones intrahospitalarias. Ministerio de Salud de Chile, p. 59.

**Pendrak, M.L. & Roberts, D.D.** (2007) Hemoglobin is an effective inducer of hyphal differentiation in *Candida albicans*. *Med Mycol* **45**, 61-71.

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

**Ramon, A.M., Porta, A. & Fonzi, W.A.** (1999) Effect of environmental pH on morphological development of *Candida albicans* is mediated via the PacC-related transcription factor encoded by PRR2. *J Bacteriol* **181**, 7524-7530.

**Rocha, C.R., Schroppel, K., Marcus, D., Marcil, A., Dignard, D., Taylor, B.N., Thomas, D.Y., Whiteway, M. & Leberer, E.** (2001) Signaling through adenylyl cyclase is essential for hyphal growth and virulence in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **12**, 3631-3643.

**Rozen, S. & Skaletsky, H.** (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In Krawetz S, M.S. (ed) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press.

**Schaller, M., Borelli, C., Korting, H.C. & Hube, B.** (2005) Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* **48**, 365-377.

**Schweizer, A., Rupp, S., Taylor, B.N., Rollinghoff, M. & Schroppel, K.** (2000) The TEA/ATTS transcription factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **38**, 435-445.

**Sharkey, L.L., McNemar, M.D., Saporito-Irwin, S.M., Sypherd, P.S. & Fonzi, W.A.** (1999) *HWP1* functions in the morphological development of *Candida albicans* downstream of *EFG1*, *TUP1*, and *RBF1*. *J Bacteriol* **181**, 5273-5279.

**Shen, J., Cowen, L.E., Griffin, A.M., Chan, L. & Kohler, J.R.** (2008) The *Candida albicans* pescadillo homolog is required for normal hypha-to-yeast morphogenesis and yeast proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 20918-20923.

**Sobel, J.D.** (2007) Vulvovaginal candidosis. *Lancet* **369**, 1961-1971.

**Sohn, K., Urban, C., Brunner, H. & Rupp, S.** (2003) *EFG1* is a major regulator of cell wall dynamics in *Candida albicans* as revealed by DNA microarrays. *Mol Microbiol* **47**, 89-102.

**Sonneborn, A., Bockmuhl, D.P. & Ernst, J.F.** (1999a) Chlamydospore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect Immun* **67**, 5514-5517.

**Sonneborn, A., Tebarth, B. & Ernst, J.F.** (1999b) Control of white-opaque phenotypic switching in *Candida albicans* by the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect Immun* **67**, 4655-4660.

**Staub, P. & Morschhauser, J.** (2005) Differential expression of the *NRG1* repressor controls species-specific regulation of chlamydospore development in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Mol Microbiol* **55**, 637-652.

**Stokes, C., Moran, G.P., Spiering, M.J., Cole, G.T., Coleman, D.C. & Sullivan, D.J.** (2007) Lower filamentation rates of *Candida dubliniensis* contribute to its lower virulence in comparison with *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol* **44**, 920-931.

**Stoldt, V.R., Sonneborn, A., Leuker, C.E. & Ernst, J.F.** (1997) Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *Embo J* **16**, 1982-1991.

**Sullivan, D.J., Moran, G.P., Pinjon, E., Al-Mosaid, A., Stokes, C., Vaughan, C. & Coleman, D.C.** (2004) Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* **4**, 369-376.

**Sullivan, D.J., Westerneng, T.J., Haynes, K.A., Bennett, D.E. & Coleman, D.C.** (1995) *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology* **141** ( Pt 7), 1507-1521.

**Sundstrom, P.** (2006) *Candida albicans* hypha formation and virulence. In Heitman, J., Filler, S., Edwards, J. & Mitchell, A. (eds) *Molecular principles of Fungal Pathogenesis*. ASM PRESS, pp. 45-47.

**Tapia, C.** (2008a) Candidiasis vulvovaginal *Revista Chilena de Infectología* **25**, 310-312.

**Tapia, C.** (2008b) Efecto del tratamiento tópico con Clotrimazol en la resistencia a azoles y en la diversidad genética de poblaciones clonales de *Candida albicans* en un modelo de candidiasis vaginal y embarazo. Tesis doctoral, Universidad de Chile.

**Tebarth, B., Doedt, T., Krishnamurthy, S., Weide, M., Monterola, F., Dominguez, A. & Ernst, J.F.** (2003) Adaptation of the Efg1p morphogenetic pathway in *Candida albicans* by negative autoregulation and PKA-dependent repression of the *EFG1* gene. *J Mol Biol* **329**, 949-962.

**Vinces, M.D. & Kumamoto, C.A.** (2007) The morphogenetic regulator Czf1p is a DNA-binding protein that regulates white opaque switching in *Candida albicans*. *Microbiology* **153**, 2877-2884.

- Whiteway, M. & Bachewich, C.** (2007) Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* **61**, 529-553.
- Xu, W. & Mitchell, A.P.** (2001) Yeast PalA/AIP1/Alix homolog Rim20p associates with a PEST-like region and is required for its proteolytic cleavage. *J Bacteriol* **183**, 6917-6923.
- Xu, W., Smith, F.J., Jr., Subaran, R. & Mitchell, A.P.** (2004) Multivesicular body-ESCRT components function in pH response regulation in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **15**, 5528-5537.
- Yi, S., Sahni, N., Daniels, K.J., Pujol, C., Srikantha, T. & Soll, D.R.** (2008) The same receptor, G protein, and mitogen-activated protein kinase pathway activate different downstream regulators in the alternative white and opaque pheromone responses of *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **19**, 957-970.
- Zaragoza, O., Rodriguez, C. & Gancedo, C.** (2000) Isolation of the MIG1 gene from *Candida albicans* and effects of its disruption on catabolite repression. *J Bacteriol* **182**, 320-326.
- Zeidler, U., Lettner, T., Lassnig, C., Muller, M., Lajko, R., Hintner, H., Breitenbach, M. & Bito, A.** (2009) *UME6* is a crucial downstream target of other transcriptional regulators of true hyphal development in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* **9**, 126-142.
- Zordan, R.E., Miller, M.G., Galgoczy, D.J., Tuch, B.B. & Johnson, A.D.** (2007) Interlocking transcriptional feedback loops control white-opaque switching in *Candida albicans*. *PLoS Biol* **5**, e256.