



**EXPRESIÓN DEL GEN ALS3, FILAMENTACIÓN Y FORMACIÓN
DE BIOPELÍCULA EN AISLAMIENTOS DE *CANDIDA ALBICANS*
QUE COLONIZAN O INFECTAN LA MUCOSA BUCAL DE
PACIENTES CON ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA EN DIÁLISIS.**

IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN PATOLOGÍA Y MEDICINA BUCAL

P R E S E N T A

Karen Patricia Domínguez Gallagher

Comité tutorial:

Co-Directora: Dra. Estela de la Rosa García

Co-Directora: Dra. Saray Aranda Romo

Asesora: Dra. Aida Hamdan Partida

Asesora externa: Dra. Verónica Martínez Jiménez

Ciudad de México, febrero 2017.

**La Maestría en Patología y Medicina Bucal de la Universidad Autónoma
Metropolitana pertenece al Padrón Nacional de Posgrados de Calidad de CONACYT
y cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el registro 5020.**

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
de la Unidad Xochimilco aprobó la ICR que presentó:

KAREN PATRICIA DOMÍNGUEZ GALLAGHER

Comité Tutorial:

Co-Directora: Dra. Estela de la Rosa García

Co-Directora: Dra. Saray Aranda Romo

Asesora: Dra. Aida Hamdan Partida

Asesora externa: Dra. Verónica Martínez Jiménez

Jurado:

Dr. Adalberto Mosqueda Taylor (Presidente)

Dra. Velia Aydée Ramírez Amador (Secretario)

Dra. Ma. Esther Irigoyen Camacho (Vocal)

Dr. Luis Octavio Sánchez Vargas (Vocal)

ÍNDICE	Pág.
Abreviaturas	VII
Índice de Cuadros	X
Índice de Figuras	XI
Resumen	XII
1 Introducción	1
1.1 <i>Candida albicans</i>	3
1.2 Factores de virulencia	4
1.2.1 Polimorfismo	5
1.2.2 Adhesión, adhesinas e invasinas	6
1.2.3 Formación de biopelícula	7
1.3 Genoma de <i>Candida albicans</i>	8
1.4 Genes de la familia ALS	11
1.5 Gen ALS3	14
1.6 Proteína Als3	15
1.7 Interacción de <i>Candida albicans</i> con la mucosa bucal	18
1.8 Respuesta inmune a <i>Candida albicans</i>	19
1.9 La enfermedad renal crónica (ERC)	20
1.9.1 Definición	20
1.9.2 Estadios	21
1.9.3 Epidemiología	21
1.9.4 Etiología	22
1.9.5 Tratamiento	23
1.10 Condiciones sistémicas y disfunción inmune en pacientes con ERC	24
1.11 Manifestaciones bucales de los pacientes con ERC y su colonización e infección por <i>Candida spp.</i>	26
2. Planteamiento del problema	27
3. Justificación	28
4. Objetivos	29
4.1 Objetivo general	29

4.2	Objetivos específicos	29
5.	Materiales y métodos	30
5.1	Diseño de estudio	30
5.2	Universo, lugar y periodo de realización del estudio	30
5.3	Muestra	30
	Criterios de inclusión	31
	Criterios de eliminación	31
5.4	Procedimientos para recolección de información	31
5.5	Procedimientos de laboratorio	32
	Aislamientos de <i>C. albicans</i>	32
	Identificación de especie <i>albicans</i>	33
	Evaluación de filamentación	33
	Evaluación de formación de biopelícula	34
	Extracción de ARN	37
	Cuantificación de ARN	38
	Obtención de ADNc	39
	Cuantificación de ADNc	40
	Expresión del gen ALS3	41
5.6	Variables	43
5.7	Definición operacional de variables	43
5.8	Análisis estadístico	45
6.	Resultados	46
6.1	Características demográficas y clínicas	46
6.2	Características microbiológicas genotípicas	46
6.3	Características microbiológicas fenotípicas	47
6.4	Asociación del gen ALS3 con la filamentación y formación de biopelícula	47
7.	Discusión	52
8.	Fortalezas y debilidades.....	60
9.	Contribuciones	61
10.	Conclusiones	62
11.	Perspectivas	63

12.	Referencias bibliográficas	64
13	Anexos	75
	Anexo I Ficha de recolección de datos.....	75
	Anexo II Cuantificación de ARNm Nanodrop® y cálculo de volumen para obtener ADNc de cada muestra.....	77
	Anexo III Cuantificación de ADNc mediante Nanodrop® y cálculo de volumen para obtener concentración de 100 µl para cada muestra.....	80
	Anexo IV Expresión relativa del gen ALS3 en 66 aislamientos de <i>C. albicans</i> en grupos infectados y colonizados.....	83

ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Copia de ácido desoxirribonucleico
ADS	Agar dextrosa sabouraud
AHM	Agar harina de maíz
ALS	Agglutinin-like sequence
Als3p	Proteína Als3
ARN	Ácido ribonucleico
Ag	Antígeno
ATCC	American Type Culture Collection
C	Concentración
°C	Grados centígrados
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
cél.	Células
Cm	Centímetros
CR	Cuantificación relativa
Ct	Cycle threshold (valor umbral)
DEPC	Pirocarbonato de dietilo
DM	Diabetes mellitus
Dntp	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DP	Diálisis peritoneal
ERC	Enfermedad renal crónica
ERC-D	Enfermedad Renal Crónica en Diálisis
EE.UU.	Estados Unidos
Fe	Hierro
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HD	Hemodiálisis
Hs	Horas
HWP1	Hyphal wall protein 1

IL	Interleucina
ISSTE	Instituto de Seguridad Social para Trabajadores del Estado
K/DOQI	Kidney Disease Outcome Quality Initiative
LP	Lipasas
Min	Minutos
MIT	Instituto Tecnológico de Massachusetts
ml	Mililitros
μl	Microlitros
MRS	Secuencias de repetición
ng	Nanogramos
ORF	Marcos de lectura abiertos (Open Reading frames, por sus siglas en inglés)
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PAS	Ácido periódico de Schiff
pb	Pares de base
PBS	Tampón fosfato salino o buffer fosfato salino por sus siglas en ingles “phosphate buffered saline”
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (en inglés Polymerase Chain Reaction)
PCR-TR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (en inglés Real time Polymerase Chain Reaction)
pH	Potencial de hidrógeno o potencial de hidrogeniones
PL	Fosfolipasas por sus siglas en inglés “ phospholipases”
PRR	Receptores de reconocimiento de patógenos
RHE	Epitelio de reconstitución humana
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute-1640 (medio celular utilizado para cultivos celulares)
s	Segundos
SAP	Secretores de aspartil proteasa
Ser	Serina (aminoácido)
spp.	Especies de <i>Candida</i>
TFG	Tasa de filtración glomerular

Th	Linfocitos T helper
Thr	Treonina (aminoácido)
TLR	Receptores tipo Toll
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRI	Trizol
TRR	Terapia de reemplazo renal
USRDS	United States Renal Data System
V	Volumen
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
WO 1	Cepa salvaje de <i>C. albicans</i> , “White – opaque 1” por sus siglas en inglés
XTT	Sal de sodio 2,3-bis(2- metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2-h-tetrazolium-5-carboxanilide
YPD	Levadura peptona dextrosa por sus siglas en inglés “Yeast Peptone Dextrose”

ÍNDICE DE CUADROS		Pág
Cuadro 1.	Distribución de los genes ALS en los diferentes cromosomas de <i>Candida albicans</i> ...	13
Cuadro 2.	Etapas de la enfermedad renal crónica, según la tasa de filtración glomerular.....	21
Cuadro 3.	Alteraciones del sistema inmune en pacientes con enfermedad renal crónica, relacionados con la uremia.....	25
Cuadro 4.	Programación del termociclador para obtener el ADNc por PCR, basado en protocolo del kit Thermo Scientific®.....	40
Cuadro 5.	Clasificación de la formación de biopelícula por <i>Candida</i> spp. basada en ensayos de reducción colorimétrica con XTT.....	44
Cuadro 6.	Valores dicotomizados para medir la expresión del gen ALS3 en base a la cuantificación relativa de la cepa control: <i>C. albicans</i> ATCC.....	44
Cuadro 7.	Características demográficas y clínicas de los pacientes con enfermedad renal crónica en diálisis.....	48
Cuadro 8.	Filamentación, formación de biopelícula y expresión del gen ALS3 en 66 aislamientos de <i>Candida albicans</i>	49
Cuadro 9.	Filamentación, formación de biopelícula y expresión del gen ALS3 en 66 aislamientos de <i>Candida albicans</i>	50
Cuadro 10.		
Cuadro 11.		
Cuadro 12.		

ÍNDICE DE FIGURAS		Pág
Figura 1.	Diferencia entre colonización e infección.....	1
Figura 2.	Polimorfismo de <i>C. albicans</i>	5
Figura 3.	Formación de biopelícula por <i>C. albicans</i>	7
Figura 4.	Esquema de cromosomas diploides de <i>C. albicans</i>	9
Figura 5.	Comparación de cromosomas de <i>Candida albicans</i> de la cepa SC5314 y WO1.....	10
Figura 6.	Esquema representativo de todos los genes miembros de la familia ALS.....	12
Figura 7.	Esquema de estructura de los genes de la familia ALS.....	13
Figura 8.	Esquema del locus de ALS3 en cromosoma RA.....	13
Figura 9.	Esquema de la estructura de la proteína Als3.....	14
Figura 10.	Pasos descritos para la infección por <i>C. albicans</i>	19
Figura 11.	Expresión del gen ALS3 en 66 aislamientos clínicos de <i>C. albicans</i> en pacientes con enfermedad renal crónica en diálisis.....	51

RESUMEN

Introducción. Además de los factores inherentes al huésped (mucosa bucal), el hongo *Candida albicans* presenta diversos factores de virulencia tanto genotípicos y fenotípicos, que le permiten el paso de microorganismo comensal a patógeno. Dentro de sus factores genotípicos se ha descrito al gen ALS3, el cual es importante para la infección, ya que regula la adhesión, invasión, filamentación y formación de biopelícula. Hasta la fecha se desconoce el papel que juegan estos factores en el paso de la colonización a infección de la mucosa bucal de pacientes con enfermedad renal crónica en diálisis (ERC-D).

Objetivo. Comparar la expresión del gen ALS3, filamentación y formación de biopelícula en aislamientos de *C.albicans* que colonizan o infectan la mucosa bucal de pacientes con ERC-D.

Materiales y método. Estudio transversal, observacional y comparativo, en el que se incluyeron 66 aislamientos obtenidos de 46 pacientes, agrupados en colonizados (25) e infectados (41). La infección fue confirmada con identificación de hifas en frotis citológicos teñidos con PAS. La identificación de *C.albicans* fue por cultivo y pruebas bioquímicas. La filamentación se evaluó por cultivos con técnica de Dalmau, tinción PAS y observación microscópica. Para la formación de biopelícula se hicieron ensayos de reducción colorimétrica con XTT y se utilizó la técnica de PCR-TR para la expresión del gen ALS3. Para el análisis estadístico se utilizó JMP.V11

Resultados. Los 66 aislamientos estudiados correspondieron a 24 hombres (52.2%) y 22 mujeres (47.8%), con una mediana de edad de 64 años. La nefropatía diabética fue la causa más frecuente de ERC, la mayoría de los pacientes tenían hemodiálisis. La frecuencia de expresión del gen ALS3, así como el promedio su expresión relativa fue mayor en infectados (88%/14.33) que en colonizados (24.4%/1.21) $p<0.001$. En tanto que la filamentación y formación de biopelícula no mostró diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

Conclusiones: La mayor expresión del gen ALS3 de *Candida* sp. encontrada en muestras infectadas de la mucosa bucal de pacientes con ERC-D sugiere su importante papel en la patogénesis de esta infección. En contraste, la filamentación y la formación de biopelícula parecen depender de otros factores relacionados al huésped, como la inmunidad local.

Introducción

Los hongos del género *Candida* incluyen alrededor de 150 especies y son de los hongos patógenos más comunes en el ser humano (Cavalcanti y cols. 2015; Kim y Sudbery, 2011). Típicamente, estos microorganismos se encuentran colonizando las superficies mucocutáneas y forman parte de la microbiota normal humana. Se consideran inocuos, pero en ocasiones pueden tener un comportamiento oportunista y producir infección si las condiciones son favorables o la inmunidad del huésped está comprometida (Mayer y cols., 2013; Liu, 2002; Farah y cols., 2000).

El término colonización se define como el equilibrio entre adquisición y mantenimiento de una población estable de células de *Candida* spp., sin producir enfermedad en el huésped (Soll, 2002; Cannon y Chaffin, 1999). Mientras que infección hace referencia a un desequilibrio en el que se ve un aumento en la proliferación del hongo, causando daño al epitelio y generando síntomas y signos clínicos (Theberge y cols. 2013; Gow y cols., 2012).

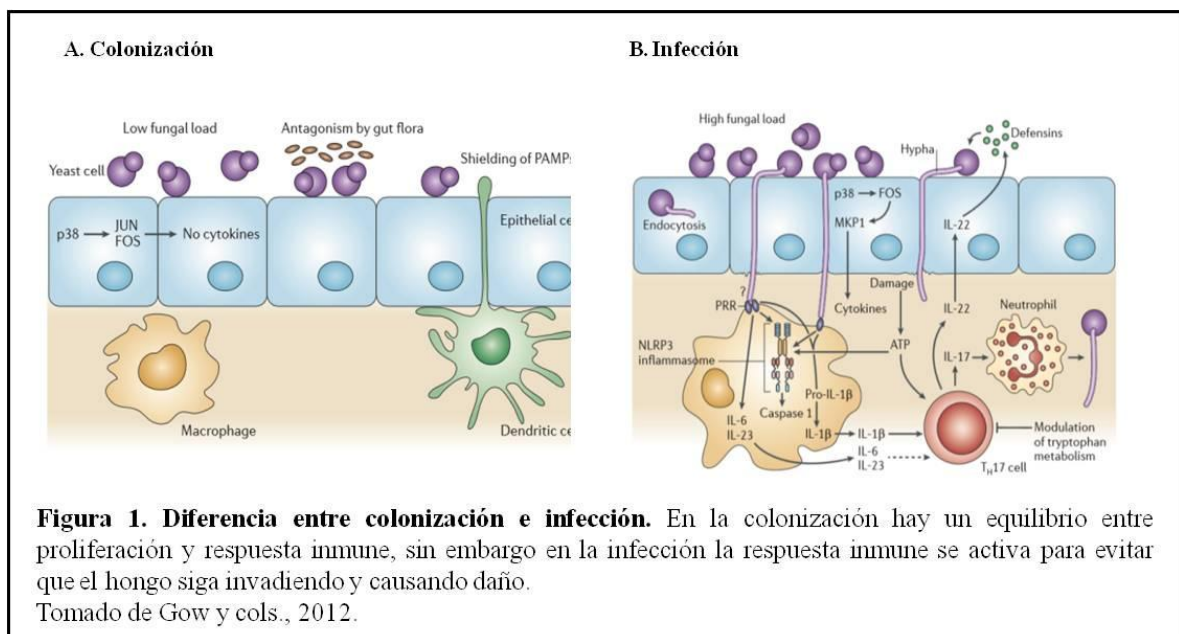


Figura 1. Diferencia entre colonización e infección. En la colonización hay un equilibrio entre proliferación y respuesta inmune, sin embargo en la infección la respuesta inmune se activa para evitar que el hongo siga invadiendo y causando daño. Tomado de Gow y cols., 2012.

La patogenicidad de *Candida* spp., es un proceso complejo y multifactorial, para el cual se requiere de factores locales y sistémicos relacionados al huésped, así como alteraciones del microambiente y características virulentas propias del microorganismo (De la Rosa-García y cols., 2013; Brown y cols., 2007; Hube, 2004; Soll, 2002; Farah y cols. 2000).

En las últimas décadas se ha reportado que los genes presentes en el hongo regulan la expresión de sus factores de virulencia y que la transición de comensal a patógeno está vinculada a cambios transcripcionales que favorecen el proceso de infección permitiendo que *Candida* spp., sobreviva a las modificaciones del ambiente y a las condiciones del huésped, que se adapte al estrés y evada la respuesta inmune (Nailis y cols. 2010). La gran mayoría de las infecciones causadas por este microorganismo se dan principalmente en las mucosas, tanto vaginal como bucal (Naglik y cols., 2014).

La prevalencia de colonización por *Candida* spp., en la cavidad bucal varía en los diversos grupos estudiados. En la población general aparentemente sana varía del 20 al 60% (Pallavan y cols, 2014; Samaranayake, 2013; Ghannoum y cols., 2010; Negróni M y cols., 2002). En individuos infectados con VIH o en etapa de SIDA, la prevalencia varía de 33% a 90% (Owotade y Patel, 2014; Cassone y Cauda, 2012; Sánchez y cols. 2005), en pacientes que reciben radioterapia se ha reportado una prevalencia de hasta 75% (Bulacio y cols. 2012). En individuos con enfermedad renal crónica en tratamiento de diálisis varía de 53 a 75% (De la Rosa-García y cols., 2013) En pacientes que padecen diabetes mellitus tipo 2 varía de 18 a 87% (Suárez y cols. 2013; Premkumar y cols. 2014).

Las variaciones en la prevalencia de colonización por *Candida* spp. se asocian a diversos factores como la edad, terapia con antibióticos, estados de inmunosupresión, malnutrición,

enfermedades crónicas como diabetes y factores locales como hiposalivación, uso de prótesis dentales y mala higiene bucal (Coronado y Jiménez, 2013; García C y cols, 2014).

La candidosis bucal es una de las infecciones oportunistas más frecuentes de la mucosa bucal. Se trata de una infección superficial, clínicamente detectable. Es frecuente en edades extremas y en individuos inmunocomprometidos (Patil y cols., 2015; Singh y cols., 2014; De la Rosa-García y cols., 2013; Wilson y cols., 2009).

Las formas clínicas incluyen: la candidosis pseudomembranosa (aguda/crónica), la candidosis eritematosa (aguda/crónica) y la candidosis hiperplásica crónica (Tooyama y cols., 2015; Lalla y cols., 2013). Otros autores como Feller y cols., 2014; describen también la queilitis angular y la candidosis subprotésica como presentaciones clínicas de la infección por *Candida* spp.

1.1 *Candida albicans*

Es la especie del género *Candida* más aislada de la mucosa bucal, tanto en individuos sanos como en inmunosuprimidos. (Tooyama y cols., 2015; Herwald y Kumamoto, 2014; De la Rosa-García y cols., 2013). Aunque también se puede hallar en piel, mucosa genital y tracto gastrointestinal en un porcentaje que varía 30 - 80% de los individuos sanos (Williams y Lewis, 2011). Además se ha visto que es la especie más prevalente en las candidosis bucales, aislada en alrededor del 50% a 70% de los casos (Gow y cols., 2012; Williams y Lewis, 2011; Rautemaa y Ramage, 2011).

Es un hongo polimórfico que dependiendo de las condiciones del ambiente, puede estar en forma de blastoconidia (blastosporos o yema), como pseudohifa (filamentos septados) o hifas (filamentos no septados) de longitud variable. Estas tres formas difieren en los

antígenos de superficie, la adherencia epitelial y los mecanismos de crecimiento (Feller y cols., 2014).

En la forma de blastosporo su tamaño puede variar entre 2 y 8 μm x 3 a 14 μm , pero en estado de hifas puede extenderse hasta un poco más de 100 μm . No poseen un ciclo reproductivo sexual, pero se reproducen por fisión binaria (De la Rosa-García y cols., 2013; Gow y cols., 2012; Farah y cols. 2000).

1.2 Factores de virulencia de *Candida albicans*

Los factores de virulencia son las habilidades con las cuales el agente patógeno, en este caso *Candida albicans*, puede llegar a producir en el ser humano: invasión, infección, modulación de la respuesta inmune a su favor y resistencia al tratamiento (De la Calle – Rodríguez, Santa- Vélez y Cardona-Castro, 2012).

Este hongo oportunista posee ciertas particularidades que favorecen la infección de la mucosa bucal. Entre estas características se encuentran: la transición morfológica de blastosporos a pseudohifas e hifas conocida también como capacidad de filamentación o polimorfismo, la expresión de adhesinas e invasinas en la superficie celular, el tigmotropismo (capacidad que permite al hongo encontrar discontinuidad entre las células y penetrar al interior de los tejidos), la formación de biofilm, cambio fenotípico y la producción de enzimas hidrolíticas (Hube, 2004). A estos factores se puede agregar la habilidad que posee *Candida albicans* para adaptarse a las fluctuaciones del pH, su flexibilidad metabólica, así como también su efectivo sistema de adquisición de nutrientes y la respuesta apropiada al estrés (Mayer y cols., 2013; De la Calle – Rodríguez, Santa- Vélez y Cardona-Castro, 2012).

1.2.1 Polimorfismo

Uno de los factores de virulencia de *C. albicans* mejor estudiado ha sido el polimorfismo o transición polimórfica que consiste en la capacidad que tiene este hongo de pasar de yema a pseudohifa o hifa. La forma de hifa le permite adherirse con mayor firmeza al epitelio, penetrar a los tejidos para adquirir los nutrientes, producir daño e incluso escapar de la respuesta inmune (Theberge y cols. 2013; Wächtler y cols., 2011).

Por otra parte, los blastosporos o yemas por mucho tiempo se han descrito como forma comensal de este microorganismo; sin embargo, en publicaciones más recientes se menciona que su forma de blastosporo le permite a *C. albicans* diseminarse con mayor facilidad al torrente sanguíneo, provocando candidosis sistémica (Marin y cols., 2015).

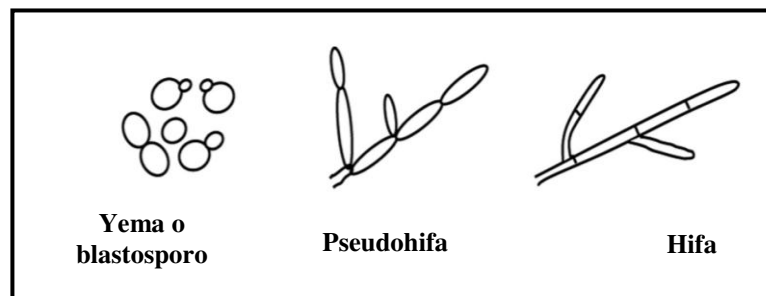


Figura 2. Polimorfismo de *C. albicans*. Figura tomada del artículo de Thompson y cols., 2011, en la que se representa esquemáticamente cada una de las formas que puede adoptar este hongo.

1.2.2 Adhesión e invasión, mediadas por adhesinas e invasinas.

Una característica de *Candida albicans* que se correlaciona de forma positiva con su patogenicidad es la capacidad que tiene para adherirse a las células del huésped. La pared celular es el sitio de interacción primaria entre el hongo patógeno y el huésped; se trata de una estructura con múltiples capas de quitina que se localiza externamente a la membrana plasmática del microorganismo y es responsable de mantener la forma del hongo ya sea en estado de blastosporo o de hifa y contiene múltiples proteínas requeridas para la adhesión, invasión, evasión inmune y la integridad estructural (Hiller y cols. 2011).

Una adhesina, se define como una proteína que promueve la adherencia de *Candida albicans* a las células del huésped o bien, a sus receptores específicos. Una invasina es aquella proteína que induce la endocitosis del hongo por los queratinocitos y células endoteliales, permitiendo la penetración del hongo al epitelio y su diseminación sistémica por vía sanguínea. Estas proteínas median ambos mecanismos de invasión: la penetración activa y la pasiva (endocitosis). Por lo tanto, la colonización e infección por *C. albicans* dependen de su capacidad de adhesión e invasión (Liu y Filler 2011; Hiller y cols. 2011; Phan y cols., 2007).

Se han descrito diferentes tipos de adhesinas de *C. albicans* que se unen a varias proteínas de la matriz extracelular de las células de mamífero, como fibronectina, laminina, fibrinógeno y colágeno tipo I y IV (Chaffin, 1998; Sturtevant y Calderone, 1997; Hostetter, 1994).

1.2.3 Formación de biopelícula

Las biopelículas son comunidades de microorganismos asociadas a superficies bióticas o abióticas, dentro de una matriz extracelular y son el tipo más prevalente de crecimiento microbiano. Cada vez es más claro que la infección por *Candida albicans*, está casi siempre asociada a la formación de biopelícula, la cual se forma en varios pasos: inicialmente se produce la adhesión de levaduras al epitelio, seguida por la germinación y formación de microcolonias, filamentación, desarrollo de una monocapa, proliferación y maduración de la misma (Desai y Mitchel 2015; Theberge y cols. 2013; Nailis y cols., 2010).

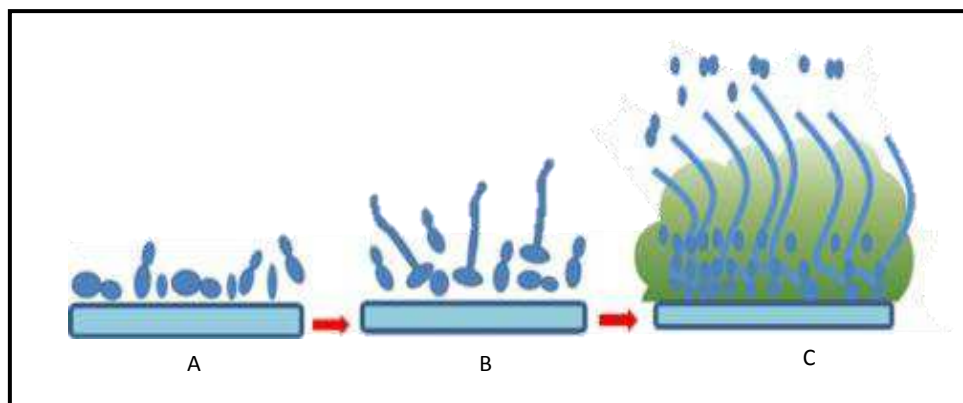


Figura 3. Formación de biopelícula por *C. albicans*. En esta figura se muestran los pasos en la formación de biopelícula: **A.** adhesión y formación de monocapa, **B.** filamentación y formación de microcolonias, **C.** maduración y producción de matriz extracelular, esta última representada con color verde. Tomado de Sun, Liao y Wang 2015.

La formación de biopelícula constituye un importante factor de virulencia para *C. albicans* y otras especies del género *Candida*, ya que actúa como una especie de barrera y limita la penetración de antifúngicos, confiriendo resistencia significativa a la terapia, además de

protección frente a la respuesta inmune del huésped (Herwald y Kumamoto, 2014; Theberge y cols. 2013; Ramage y cols., 2012).

La clave para que este microorganismo pueda manifestar todos los factores de virulencia mencionados y prolifere como patógeno en la cavidad bucal, se asocia con la expresión de ciertos genes presentes en el hongo que regulan sus características virulentas (Nasution, 2013; Carlisle y Kadosh, 2013; Pérez, Kumamoto y Johnson, 2013).

1.3 Genoma de *Candida albicans*

La plasticidad genómica de *Candida albicans*; es decir, su variabilidad de mecanismos genéticos de adaptación, es una característica diferencial de este patógeno, lo cual facilita su adaptación al huésped y a las alteraciones del ambiente. Esta plasticidad incluye extensos rearrreglos cromosómicos, aneuploidía y pérdida de la heterocigosidad que resultan en cambios fenotípicos de la levadura que los hacen más aptos al medio en el que se encuentran. Por lo general, es aislado como diploide, pero también se pueden encontrar en forma haploide o tetraploide (Anderson y Benett, 2016; Selmecki y cols., 2010).

Su genoma está compuesto por cerca de 1.6×10^7 pb (pares de bases) y se han identificado la presencia de ocho pares de cromosomas homólogos cuyo tamaño varía de 1.03 pb hasta 4.3 pb. Los mismos se encuentran numerados del 1 (el más largo) al 7 (el más corto) más uno, denominado R que contiene el ADN ribosomal. Este cromosoma R presenta tamaño variable, dependiendo del número de ADN ribosomales que se repitan (Anderson y Benett, 2016; Odds, Brown y Gow, 2004; De Backer y cols., 2000).

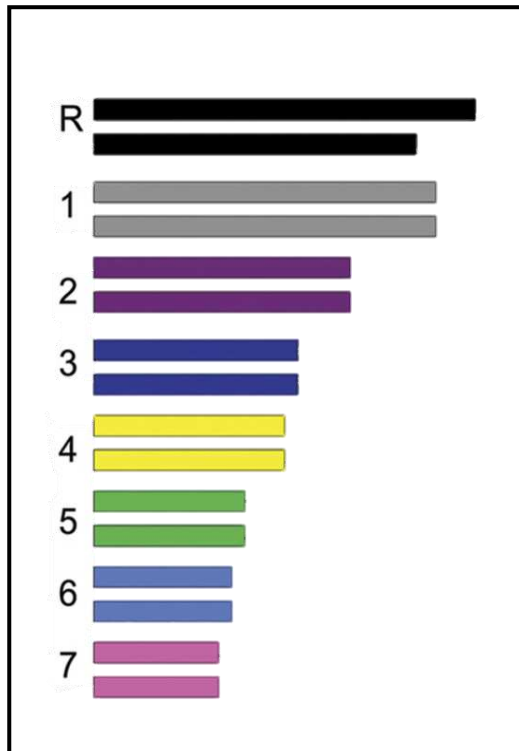


Figura 4. Esquema de cromosomas diploides que componen el genoma de *Candida albicans*, siendo el cromosoma 1 el más largo, el 7 el más corto y el R de longitud variable. Tomado de Selmecki, Forche y Berman, 2010.

Hasta la fecha se han caracterizado el genoma en la "especie SC5314", que proviene de un aislado clínico y que fue secuenciado en el Centro de Tecnología y Secuenciación del ADN de Stanford y el genoma de la cepa WO1, considerada como "wild type" o tipo salvaje que fue secuenciado por el Instituto Broad de MIT y de la Universidad Harvard (Van het Hoog y cols., 2007; Odds, Brown y Gow, 2004).

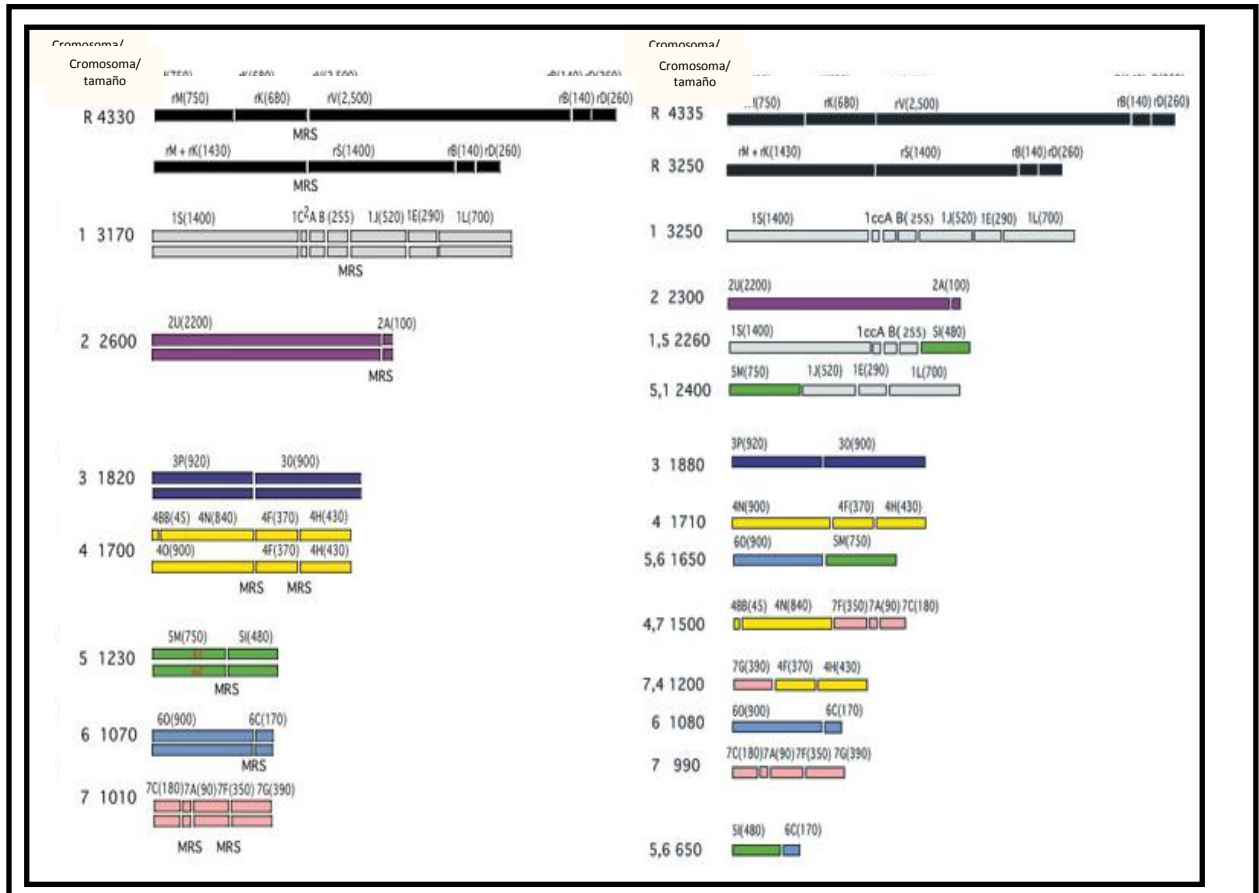


Figura 5. Comparación de cromosomas de *C. albicans* de la cepa SC5314 (izquierda) y WO1 (derecha). El tipo WO-1 difiere de la cepa SC5314 en que tiene tres translocaciones recíprocas (7 y 4, 6 y 5, y 5 y 1). Las translocaciones tienen ocurrieron en o cerca de las principales secuencias de repetición (MRS por sus siglas en inglés). Los cromosomas están codificados por color para que sea más fácil visualizar las translocaciones. Tomado de <http://cbs.umn.edu/candida-albicans/home>.

Candida albicans, posee varias familias de genes que codifican para proteínas involucradas en su patogenicidad y virulencia (Anderson y Benett, 2016; Zhao y cols., 2004). En un estudio realizado por Butler y cols. (2009), se reportó que aproximadamente 21 familias de genes de este hongo tienen un papel activo para la patogénesis. Estas familias codifican para lipasas, transportadores de oligopéptidos y adhesinas, los cuales están involucrados en el proceso de infección.

En un trabajo realizado por Wilson y cols. (2014), describieron 65 genes específicos de *C. albicans* que se expresan durante la infección. Muchos de estos genes son requeridos para una interacción óptima entre patógeno y huésped.

Esta levadura es capaz de adherirse a las células y tejidos del huésped, por esta razón presenta en su superficie, proteínas como las adhesinas, las cuales están codificadas por los genes de la familia ALS, HWP y la familia Iff/Hyr (Marin y cols., 2015).

Otros factores de patogenicidad, como la secreción de enzimas hidrolíticas que degraden el tejido, están reguladas por los genes de la familia SAP (secretoras de aspartil proteasa), LP (lipasas) y PL (fosfolipasas) (Nailis y cols., 2010).

Las mencionadas familias de genes también están involucradas en la formación de biopelícula, uno de los principales factores de virulencia del microorganismo que ha sido descrito y estudiado en los últimos años (Marin y cols., 2015; Desai y Mitchell 2015; Nailis y cols., 2010).

1.4 Genes de la familia ALS

Los genes de la familia ALS de sus siglas en inglés (Agglutinin-like sequence), fueron descritos primeramente en *Candida albicans* (Butler y cols., 2009). En esta familia se incluyen ocho miembros: ALS1, ALS2, ALS3, ALS4, ALS5, ALS6, ALS7 y ALS9; los cuales codifican para proteínas de adhesión presentes en la pared celular y en las hifas (Cleary y cols., 2011; Liu y Filler, 2011).

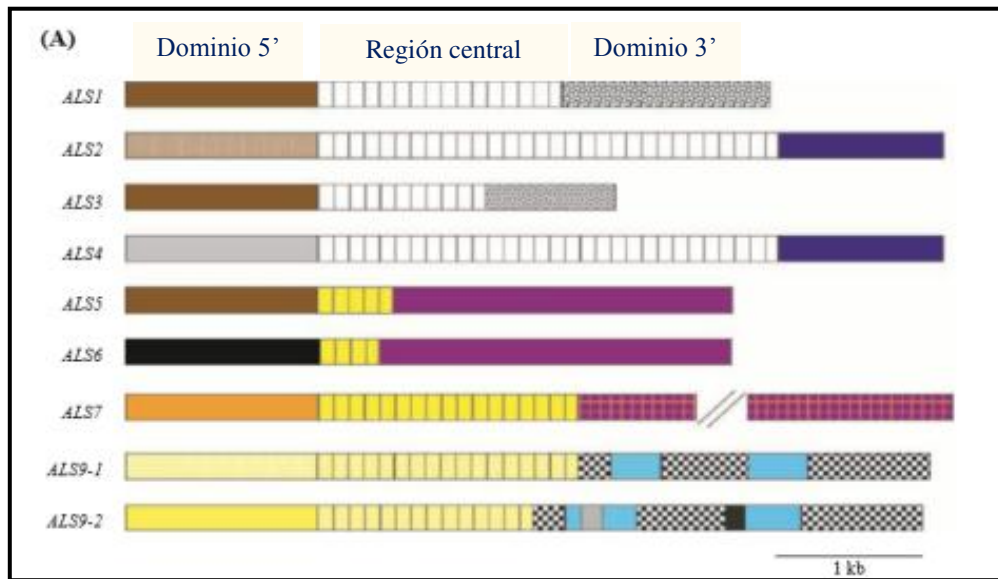


Figura 6. Esquema representativo de todos los genes miembros de la familia ALS. En la figura se muestran las tres porciones: dominio 5', la región central variable y dominio 3' para cada gen. A pesar de ser el de menor longitud, se describe al gen ALS3 como un gen fundamental para la adhesión ya que al realizar deleciones del mismo, el hongo no puede adherirse al epitelio. Tomado de Hoyer y cols., 2008.

Cada gen ALS tiene una estructura similar de tres dominios, que incluyen un dominio 5' de 1299 a 1308 pb, que es similar en 55 a 90% entre los componentes de la familia, un dominio central con un número variable de secuencias repetidas de 108 pb y un dominio 3' que es relativamente variable en longitud y secuencia, pero que en todos los casos codifica para proteínas ricas en Ser/Thr con muchos sitios de N-glicosilación (Hoyer y cols., 2008). Cada locus de ALS codifica para numerosos alelos con una variación de secuencia que ocurre primeramente en la porción tándem (Hoyer y Cota, 2016).

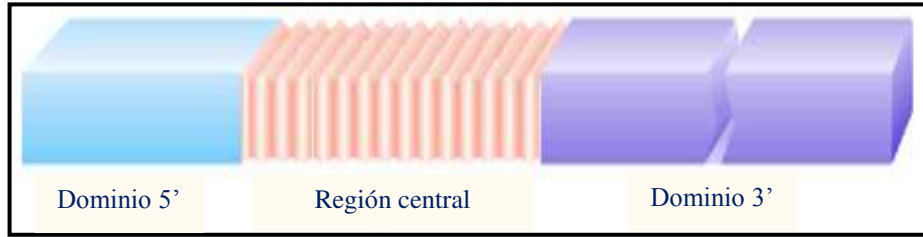


Figura 7. Esquema de la estructura de los genes ALS (Hoyer y cols., 2008).

Los genes ALS están regulados diferencialmente en *C. albicans* por condiciones fisiológicas relevantes como cambios en el medio de cultivo (ALS1), morfología (ALS3) y fase de crecimiento (Hoyer y Cota, 2016). Mediante mapas físicos se ha demostrado la presencia de genes ALS localizados en tres de 8 cromosomas de *C. albicans* (Hoyer y cols., 2008; Hoyer y Hecht, 2001; Hoyer y cols., 1998).

Cuadro 1. Distribución de los genes ALS en los diferentes cromosomas de *Candida albicans*

Genes ALS	Localización
ALS1, ALS2, ALS4, ALS5 y ALS9	Cromosoma 6
ALS 6 y ALS7	Cromosoma 3
ALS 3	Cromosoma RA

Hoyer y cols., 2008.

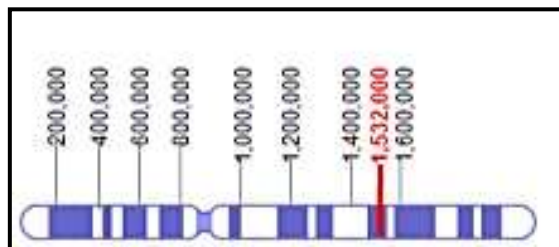


Figura 8. Esquema del locus de ALS3 en cromosoma RA construido con los datos tomados de <http://www.candidagenome.org>

1.5 Gen ALS3

De todos los miembros de la familia ALS, el gen ALS3, es el de principal interés en la infección de la mucosa bucal. Aunque también se ha demostrado su participación en las candidosis de mucosa vaginal. Es un gen específico que se expresa en las hifas y pseudohifas de *Candida albicans* y en comparación a otras especies de *Candida*, este gen está presente solamente en las especies *albicans*, lo cual contribuye a un factor de virulencia único para esta especie (Lin y cols., 2014; Liu y Filler, 2011).

El gen ALS3 codifica para la proteína Als3, la cual interviene en la adhesión, participa en la formación de biopelícula, media la invasión epitelial y endotelial, induce el daño tisular y permite la captación de hierro (Lin y cols., 2014; Murciano y cols., 2012; Liu y Filler, 2011).

Se han realizado estudios, tanto *in vitro*, *in vivo* y en ratones; así como en modelos de epitelios de reconstitución humana (RHE), en los cuales se ha demostrado la alta expresión del gen ALS3 en las infecciones por *Candida albicans* (Roudbarmohammadi 2016; Monroy-Pérez y cols. 2012; Cleary y cols., 2011; Paniagua-Contreras, 2010; Cheng y cols. 2005; Green y cols. 2004; Zhao y cols. 2004); También existen investigaciones realizadas a partir de muestras de pacientes con candidosis bucofaríngea, como en el trabajo de Yang y cols. (2014); en el que se reportó también una elevada expresión de ARNm del gen ALS3.

En las investigaciones realizadas por Lin y cols. (2014) y Wilson y cols. (2009), describen la infección en tres etapas: una temprana (adhesión), una de invasión y otra de daño o tardía, demostrando que el gen ALS3 se expresa ya desde las etapas tempranas y se asocia con adhesinas presentes en las hifas.

En un estudio que realizaron Zakikhany y cols. (2007), describieron la alta expresión de ALS3 tanto en el modelo de candidosis bucal, como en las muestras de pacientes con candidosis bucofaríngea, concluyendo que es importante su participación en la infección de la mucosa bucal por *Candida albicans*.

La expresión del gen ALS3 en muestras provenientes de mucosa vaginal infectada también es alta (Roudbarmohammadi y cols., 2016). El estudio realizado por Monroy-Pérez y cols. (2012); así como el de Cheng y cols. (2005), demuestran que más de la mitad de las muestras tenían una elevada expresión del gen. En el primer estudio se expresó con un porcentaje del 87.5% de las muestras de candidosis vaginales y en el segundo estuvo alrededor del 90%.

Así mismo, Paniagua-Contreras y cols. (2010), compararon la expresión de genes de la familia ALS en la mucosa bucal y vaginal de pacientes infectados no inmunocomprometidos y encontraron que el gen ALS3 estuvo entre los expresados con mayor frecuencia (92.5%), junto con ALS6 (97.5%), ALS4 (95%) y ALS9 (72.5%), en las muestras de candidosis bucal. Mientras que en la candidosis vaginal, los genes ALS1, ALS2, ALS3, ALS4 y ALS6 se identificaron en el 100% de los casos.

Cabe resaltar en este punto, que cuando el gen ALS3 sufre mutaciones, el hongo no puede adherirse a las células del epitelio, de ahí su importancia en el desarrollo de infección (Bamford y cols., 2015; Hoyer y cols. 2008).

1.6 Proteína Als3

Als3 es una proteína regulada por el gen ALS3, la cual juega un papel importante en múltiples procesos que son necesarios tanto para la colonización como para la infección por

Candida albicans. Entre estos procesos se incluye: la adherencia a células epiteliales, la formación de biopelícula, la invasión de células del hospedero y la adquisición de hierro. También se ha visto que Als3 media la adherencia a células endoteliales e induce la invasión de las células fúngicas al promover la endocitosis por los queratinocitos. (Lin y cols., 2014; Liu y Filler, 2011; Almeida y cols.; 2008).

Como se muestra en la Figura 8, cada proteína Als3 posee un dominio N- Terminal, un dominio central y uno que es C-Terminal (Beaussart y cols., 2012; Phan y cols., 2007).

La región N-terminal es la que corresponde a la unión de sustratos, se compone de péptidos, seguido de un dominio tipo inmunoglobulina y otro dominio rico en treonina que contiene cadenas β -antiparalelas (Yang y cols., 2014; Phan y cols., 2007).

El dominio central consiste en un número variable de 36 aminoácidos de repeticiones tándem. Este dominio es rico en serina y treonina y es indispensable para la función de adherencia (Yang y cols., 2014; Beaussart y cols., 2012; Phan y cols., 2007).

El extremo C-terminal también es rico en serina/treonina y está más glicosilado ya que se relaciona con la superficie celular (Yang y cols., 2014; Phan y cols., 2007).

La estructura del dominio N-Terminal del Als3 es similar a la estructura de la E- y N-cadherina, es por eso que se cree que la unión de Als3 con las cadherinas, es similar a la unión cadherina-cadherina (Yang y cols., 2014).

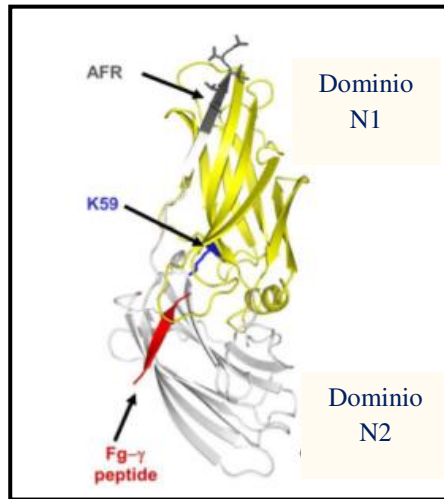


Figura 9. Esquema de la estructura de la proteína Als3. Tomado de Hoyer y Cota, 2016.

Esta proteína ha sido el foco de considerables investigaciones ya que provee una probable intersección entre la función adhesiva y la formación de hifas. De hecho, Als3 está presente en las hifas y es un receptor de ferritina que facilita la capacidad de *Candida albicans* de obtener hierro del huésped (Liu y Filler, 2011).

Según Murciano y cols., 2012; Als3 contribuye de manera importante a la adhesión de *C. albicans* a las células del epitelio bucal, ocasionando subsecuentemente daño celular. También se ha visto que en ausencia de esta proteína, no se desencadena la producción de citosinas y hay reducción del daño epitelial, este hecho apoya la idea de que de todas las proteínas Als; la Als3, es la que tiene mayor participación e importancia en la interacción con las células del epitelio bucal (Murciano y cols., 2012; Almeida y cols.; 2008).

El trabajo de Phan y cols., 2007 reportó que Als3 actúa también como invasina que se une a las cadherinas tanto de las células endoteliales como epiteliales y que además induce la endocitosis por las células del hospedero. Incluso, por su capacidad de unión a las N-

cadherinas de las células endoteliales, se ha vinculado a esta proteína como la principal responsable de la diseminación sistémica (Hoyer y Cota, 2016; Phan y cols., 2007).

Debido al importante papel que desempeña esta proteína en la adhesión del hongo al epitelio y en la producción de infección, varios estudios *in vitro* han sido realizados, en donde se demuestra que el bloqueo de Als3p por medio de anticuerpos monoclonales, impide la adhesión del microorganismo al epitelio y por lo tanto imposibilita el desarrollo de infección. A pesar de que estas investigaciones aún no son concluyentes, todos reportan que en un futuro, esta proteína puede ser un blanco terapéutico importante (Liu Y y Filler, 2011; Coleman y cols. 2009; Laforce-Nesbitt y cols. 2008).

1.7 Interacción de *Candida albicans* con la mucosa bucal

La mucosa bucal está compuesta por células epiteliales (queratinocitos) que constituyen la primera barrera física que protege a los tejidos profundos de la invasión de microorganismos o la penetración de sustancias exógenas. Los queratinocitos son capaces de reconocer a *Candida albicans* tanto en su forma de yema, como de hifas y pseudohifas, por medio de patrones moleculares asociados al patógeno (PAMPs) y receptores de reconocimiento de estos patrones (PRRs). Discriminando así el estado de colonización e infección del microorganismo. Este reconocimiento constituye el primer paso en la respuesta inmune antifúngica (Moyes, Richardson y Naglik, 2015; Feller y cols., 2014).

Para el establecimiento de infección en la cavidad bucal se requieren tres etapas: primeramente la adhesión de *Candida albicans* a los queratinocitos, la cual está mediada por la formación de hifas y adhesinas producidas por el hongo que se unen a la superficie de las células epiteliales. Posteriormente, le sigue una etapa de invasión al tejido que puede

producirse por dos mecanismos distintos: la endocitosis inducida o la penetración activa (Wächtler y cols., 2012; Wächtler y cols., 2011). Para esta última es necesario el crecimiento de las hifas que permitan al hongo penetrar al epitelio. Asimismo, la secreción de proteínas invasinas es importante en esta etapa para que induzcan la endocitosis del hongo por los queratinocitos, por medio de la interacción con la E- caderina (Naglik, Richardson y Moyes, 2014; Feller y cols., 2014; Wächtler y cols., 2011).

Por último se desencadena el daño tisular, que puede estar dado por necrosis o apoptosis, para ello se requiere principalmente de la participación de las enzimas hidrolíticas que van degradando las uniones intercelulares y provocan así la destrucción del epitelio (Feller y cols., 2014; Wächtler y cols., 2012).

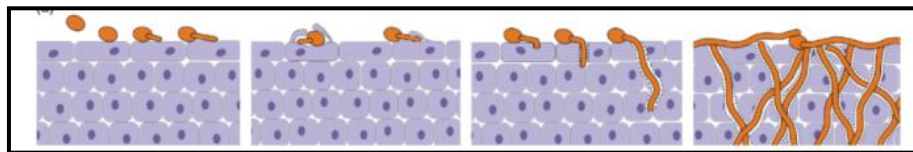


Figura 10. Pasos descritos para la infección por *C. albicans*. Se muestran las etapas de: adhesión, invasión y daño tisular (izquierda a derecha). Tomado de Feller y cols., 2014.

1.8 Respuesta inmune a *Candida albicans*

La respuesta inmune ante *Candida albicans* involucra tanto a los mecanismos de defensa innatos y adquiridos. Los innatos están mediados primeramente por barreras físicas y químicas, como el epitelio y ciertas proteínas presentes en la saliva, así como también por neutrófilos y células presentadoras de antígenos que actúan fagocitando a este microorganismo; mientras que las citocinas y células T, principalmente Th17, participan en la defensa adquirida (Williams y Lewis, 2011; Mayer y cols., 2013; Albuquerque y Casadevall, 2012).

En cuanto al epitelio, los queratinocitos poseen receptores que permiten distinguir las proteínas presentes en la pared celular del hongo, tanto en forma de yemas como de hifas. Es en el estado de hifa en el que se estimula la producción de citocinas por los queratinocitos y por lo tanto se desencadena la respuesta inmune (Mayer y cols., 2013; Netea y cols., 2008; Poulain y Jouault, 2004)

En la saliva, se encuentran presentes varias proteínas, algunas con funciones antifúngicas y otras que se unen a *Candida albicans* para impedir su adhesión al epitelio; o bien aglomerarlas para que sean barridas por la saliva (Salvatori y cols., 2016).

En cuanto a las células de defensa, son principales protagonistas de la inmunidad innata, tanto los macrófagos como los neutrófilos, por sus propiedades fagocíticas. Así como también las células dendríticas que actúan como células presentadoras de antígeno. Todas ellas poseen en su superficie de membrana varios receptores que permiten reconocer a *Candida albicans*. Estos receptores se agrupan en tres: tipo TLR, principalmente TLR-2,4 y 6; receptores de manosa y los receptores delectina 1 y 2 presentes principalmente en células dendríticas (Naglik y cols. 2011; Netea y cols., 2008; Poulain y Jouault, 2004)

La inmunidad adaptativa está mediada principalmente por los linfocitos Th17 que son activados por las Th1, que a su vez son activados por las células presentadoras de antígenos. Estos Th17 secretan IL-17 e IL-22 que actúan sobre los queratinocitos y otras células inflamatorias para el desarrollo y mantenimiento de la respuesta inmune ante este hongo (Richardson y Moyes, 2015; Naglik y cols. 2011).

1.9 La enfermedad renal crónica (ERC)

1.9.1 Definición

En el año 2002, la Fundación Nacional del Riñón de los Estados Unidos, en las guías K/DOQI (Kidney Disease Outcome Quality Initiative), definió a la enfermedad renal crónica como la disminución de la función renal (expresada por una tasa de filtración glomerular (TFG) < 60 ml/min por 1.73 m²) o daño en la estructura renal (evidenciado por alteraciones histológicas, albuminuria-proteinuria, alteraciones del sedimento urinario o alteraciones de pruebas de imagen) que persiste durante tres meses o más (Levey y Coresh, 2012; Levey y cols., 2003).

1.9.2 Estadios

Para conocer el nivel de función renal se estudia la concentración de creatinina sérica y la velocidad o tasa de filtración glomerular (TFG), estimada mediante la prueba de depuración renal de creatinina (López-Giacoman y Madero, 2015). De acuerdo a esta TFG; se puede clasificar a los enfermos renales en cinco etapas como se describe en el siguiente cuadro:

Cuadro 2. Etapas de la enfermedad renal crónica, según la tasa de filtración glomerular.

Descripción		Tasa de filtración glomerular (TFG) ml/min/1.73 m ²
-	Riesgo incrementado	≥ 60 ml/min por 1.73 m ² .
1	Daño renal con TFG normal o incrementada	≥ 90 ml/min por 1.73 m ² .
2	Daño renal con leve disminución TFG	60-89 ml/min por 1.73 m ² .
3	Moderada disminución de TFG	30-59 ml/min por 1.73 m ² .
4	Severa disminución de TFG	15-29 ml/min por 1.73 m ² .
5	Falla renal	<15 ml/min por 1.73 m ² .

Tadakamadla y cols. 2014

A partir de la etapa 5, se considera la fase terminal de la enfermedad, en la que el paciente requiere terapia de reemplazo renal (TRR) o trasplante de riñón para poder sobrevivir (Jha y cols., 2013; Sandilands y cols., 2013; Slee, 2012; Pérez-Martínez y cols., 2005).

1.9.3

Epidemiología

El incremento mundial en la incidencia de la ERC la ha llevado a representar por sí misma un serio problema de salud pública tanto en países desarrollados, como en vías de desarrollo, no solo por el riesgo de mortalidad que conlleva, sino también por el costo elevado que implica para el estado (Meguid y Bello, 2005; Levey y col., 2003). Dos de los factores que explican esta tendencia son entre otros: el envejecimiento de la población, ya que la incidencia de la ERC es más alta en el grupo de edad de 65 a 75 años y la epidemia global de la diabetes mellitus (DM), la cual es una de las principales responsables del daño renal en estos pacientes (Jha y cols., 2013; Levey y Coresh, 2012; Zhang y Rothenbacher, 2008; Kurokawa y cols., 2002).

La incidencia y prevalencia de ERC en etapa 5 es variable, en muchos países llega a los 200 casos por millón de habitantes, mientras que en EE.UU., Taiwán y varias regiones de México se ha reportado cerca de 400 casos por millón de habitantes (Levey y Coresh, 2012).

En México, hasta el momento no se cuenta con un registro de pacientes con ERC, por lo que se desconoce el número preciso de pacientes en cualquiera de sus estadios, los grupos de edad y sexo más afectados. Se estima una incidencia de 377 casos por millón de habitantes y la prevalencia de 1142; cuenta con alrededor de 52000 pacientes en terapias

sustitutivas, de los cuales el 80% son atendidos en el Instituto Mexicano del Seguro Social – IMSS (Méndez-Durán y cols., 2010; Paniagua y cols., 2007; Amato y cols., 2005).

1.9.4

Etiología

Son diversas las causas de ERC y se relacionan principalmente con la edad y las enfermedades crónico degenerativas (Correa-Rotter y cols., 2008), como son la DM e hipertensión arterial que llevan a la glomeruloesclerosis diabética y la nefrosclerosis hipertensiva, respectivamente (Levey y Coresh, 2012; Méndez-Durán y cols., 2010; Amato y cols., 2005). Existen reportes que indican que hasta un 45% de los pacientes diabéticos y un 27% de los que padecen hipertensión, serán nefrópatas en algún momento de su vida (Collins y cols., 2007). También se ha descrito su asociación con la obesidad, enfermedades cardiovasculares y la glomerulonefritis (Jha y cols., 2013; Levey y Coresh, 2012).

Según la clasificación del Sistema de Datos Renales de los EE.UU. (USRDS por sus siglas en inglés) existen otras dos categorías que entran dentro de las causas de la ERC y son: otras causas conocidas y las causas desconocidas; las primeras engloban las malformaciones congénitas de las vías urinarias, nefropatía lúpica, nefropatía túbulo-intersticial, litiasis urinarias, causas vasculares inespecíficas y la uropatía obstructiva; mientras que las segundas constituyen aquellas que no han podido ser determinadas durante la historia de la enfermedad renal del paciente (Méndez-Durán y cols., 2010).

1.9.5

Tratamiento

Los individuos con ERC que se encuentran en una etapa 5 necesitan de terapia de reemplazo renal (TRR), también conocida como diálisis, la cual puede ser de dos tipos:

hemodiálisis (HD) o diálisis peritoneal (DP) o bien, requieren de transplante renal (Slee, 2012)

Muchos autores describen a la hemodiálisis como el tratamiento de elección y el más frecuente en estos pacientes (Swapna y cols., 2013; Ortiz y cols. 2014; Bots y cols. 2006). Sin embargo, a nivel mundial, México es el país que más recurre a la DP como TRR, alrededor del 60 a 80% de los pacientes, reciben esta modalidad de terapia sustitutiva debido a que es la que cuenta con mayor apoyo financiero por parte del sistema de seguridad social y las instituciones públicas. Aunque cabe destacar que en los últimos años, ha habido una tendencia a promover el financiamiento de la hemodiálisis en este país (Rojas-Campos y cols. 2013; Méndez-Durán y cols., 2010; Correa-Rotter, 2001; Su-Hernández y cols., 1996).

1.10 Condiciones sistémicas y disfunción inmune en los pacientes con ERC

El paciente con ERC desarrolla problemas hematológicos, endocrinológicos, dermatológicos, cardiovasculares, neurológicos, musculares y gastrointestinales asociados a la albuminuria, proteinuria y al estado urémico que presentan (Swapna y cols., 2013; Levey y Coresh, 2012; Kato y cols., 2008). Adicionalmente a estas complicaciones, tanto la frecuencia elevada de anemia y desnutrición así como el deterioro inmunológico multifactorial que sufren estos pacientes, los convierten en personas con cierto grado de inmunosupresión (De la Rosa García y cols., 2013).

La disfunción del sistema inmune en este grupo de individuos, se debe principalmente a los niveles de uremia elevados, presentándose alteraciones que se dan tanto en la inmunidad

innata como en la adquirida como se señala en el Cuadro 3 (Cohen y Hörl., 2012; Hauser y cols., 2008; Swako y cols., 2008).

Cuadro 3. Alteraciones del sistema inmune en pacientes con enfermedad renal crónica, relacionados con la uremia.

Inmunidad innata	Alteraciones
- <i>Receptores de reconocimiento de patrones PRR`s</i>	Sobreestimulados o desactivados
- <i>Monocitos</i>	Hiporeactivos
- <i>Neutrófilos</i>	Actividad fagocítica disminuida.
- <i>Citocinas</i>	Niveles elevados debido a: un clareamiento renal disminuido, producción estimulada por infecciones recurrentes, procedimientos de diálisis, etc. Producción ineficiente para proteger contra infecciones.
Inmunidad adaptativa	Alteraciones
- <i>Linfocitos T</i>	Alteración en la activación Aumento de la relación Th1/Th2
- <i>Linfocitos B</i>	Función preservada pero disminución del número
- <i>Células presentadoras de Ag</i>	Son estimuladas pero su función está alterada

Swako y cols., 2008

Por un lado, la hipercitoquinemia es una característica típica de la uremia y se caracteriza por la acumulación de citosinas pro-inflamatorias en sangre, como consecuencia de la función de eliminación renal disminuida. Por otro lado, la uremia se asocia con inmunosupresión debido a las alteraciones que produce en los componentes de la reacción inmunitaria (Swako y cols., 2008).

Adicionalmente se puede agregar que hay una alteración de los receptores tipo TLR`s, especialmente en los TLR4 cuya expresión se ve disminuida y por lo tanto, hay una

reducción en la síntesis de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 (Cohen y cols., 2012; Swako y cols., 2008).

Esta inmunosupresión asociada a uremia contribuye al aumento de la prevalencia de infecciones en este grupo de pacientes (Cohen y cols., 2012).

1.11 Condiciones bucales de los pacientes con ERC y su colonización e infección por *Candida spp.*

En el contexto bucal, se ha descrito que los pacientes con ERC-D presentan disminución del flujo salival, xerostomía, mucosas atróficas, aliento urémico, petequias, equimosis, hiperpigmentación de la mucosa bucal, queilitis angular, gingivitis, candidosis, lengua saburral y además muchos de ellos son portadores de prótesis dental (Oyetola y cols., 2015; Kuashik y cols., 2013; Swapna y cols., 2013; Murali y cols., 2012; de la Rosa y cols., 2005)

Tanto las alteraciones sistémicas como las condiciones de la cavidad bucal de estos pacientes, favorecen la colonización de la mucosa bucal por *Candida spp.*, lo cual constituye una condición de riesgo para su transformación en infecciones superficiales como candidosis bucal u otras de mayor importancia como las invasivas (Pieralisi y cols. 2014; De la Rosa García y cols., 2013).

Se ha reportado que la prevalencia de colonización por *Candida spp.* en estos pacientes varía entre 39% al 51.2%, mientras que la candidosis bucal se presenta con una frecuencia variable entre el 5.7% y 32%, siendo en ambas situaciones; *Candida albicans*, la especie aislada en la mayoría de los casos con un porcentaje de 51.7% al 69.23% (Pieralisi y cols., 2016; Pieralisi y cols. 2014; De la Rosa García y cols., 2013).

2. Planteamiento del problema

El hongo *Candida albicans* es comensal de la cavidad bucal del 20% al 60% de individuos sanos y del 39% al 51.2% de los pacientes con ERC, quienes pueden presentar infección por este hongo en una frecuencia variable de 5.7% a 32%. Los pacientes con ERC presentan inmunosupresión y condiciones bucales (hiposalivación, uso de prótesis) que favorecen la infección por *C. albicans*, cuya virulencia está dada por su capacidad de: adhesión, filamentación, formación de biopelícula, secreción de enzimas y otros, que están regulados por genes presentes en su genoma.

Estudios *in vitro* en murinos y en pacientes con candidosis bucal o vaginal han descrito la importancia del gen ALS3 (uno de los ocho genes de la familia ALS), ya que codifica la proteína Als3p, permitiendo la adhesión y endocitosis del hongo al epitelio, la formación de biopelícula y su conversión en hifas que favorecen el daño al hospedero. Se han informado frecuencias de expresión del gen en ¿% de pacientes con...?. La proteína ALS3 ha sido considerada como un probable blanco terapéutico, ya que su delección o bloqueo impide la adhesión del hongo al epitelio.

Por lo tanto, se propone comparar los estados de colonización o infección a través de la expresión del gen ALS3, filamentación y formación de biopelícula en aislamientos de *C. albicans* provenientes de la mucosa bucal de pacientes con ERC utilizando técnicas de cultivo, ensayos de reducción colorimétricos y PCR-TR.

3. Justificación

~~Debido a que la mayoría de los estudios revisados fueron realizados a partir de modelos de infección y no en colonización, y que son escasas las investigaciones acerca de los mecanismos de infección de este hongo en pacientes con ERC;~~ La finalidad del presente estudio es comparar tanto el estado de colonización como de infección considerando la expresión del gen ALS3, la filamentación y formación de biopelícula en aislamientos de *C. albicans* que provienen de la mucosa bucal de pacientes con ERC; de tal modo que con los resultados obtenidos se pueda contribuir a explicar de manera más clara cómo intervienen estos factores en la patogenicidad de este microorganismo en este grupo de individuos.

Así también, si los hallazgos confirman diferencias de la expresión de este gen en la infección o colonización, se podría contribuir con datos que aporten a la realización de otras investigaciones, especialmente a aquellas enfocadas en la proteína Als3 como blanco terapéutico en busca de otras alternativas de tratamiento.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

Comparar la expresión del gen ALS3, la filamentación y formación de biopelícula en aislamientos de *Candida albicans* que colonizan o infectan la mucosa bucal de pacientes con ERC-D.

4.2 Objetivos específicos

- Describir las características de los pacientes con ERC-D de los cuales provienen los aislamientos de *Candida albicans*.
- Comparar la expresión del gen ALS3 en los aislamientos de *C. albicans* que colonizan o infectan la mucosa bucal de pacientes con ERC-D.
- Comparar la filamentación en los aislamientos de *C. albicans* que colonizan o infectan la mucosa bucal de pacientes con ERC-D.
- Comparar la formación de biopelícula en los aislamientos de *C. albicans* que colonizan o infectan la mucosa bucal de pacientes con ERC-D.
- Establecer la posible asociación entre la expresión del gen ALS3 con la filamentación y formación de biopelícula en los aislamientos de *C. albicans* que colonizan o infectan la mucosa bucal de pacientes con ERC-D.

5. Materiales y métodos

5.1 Diseño de estudio

Estudio transversal, observacional y comparativo realizado en colaboración entre la Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Xochimilco (UAM-X), la Clínica de Especialidades “Dr. Pedro Bárcenas Hiriart”, el Hospital General del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) y el Laboratorio de Microbiología y Patología Bucal de la Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP).

5.2 Universo, lugar y periodo de realización del estudio

El presente estudio forma parte de una línea de investigación sobre las manifestaciones bucales e infecciones fúngicas en pacientes con enfermedad renal crónica en diálisis, iniciada en 2013 y actualmente vigente. Se incluyeron 68 muestras de la mucosa bucal de pacientes con ERC, en un periodo comprendido de febrero de 2013 a diciembre de 2015 en el servicio de diálisis de la Clínica de Especialidades “Dr. Pedro Bárcenas Hiriart” y el Hospital General del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE), y fueron almacenadas a -20°C en el laboratorio de UASLP.

5.3 Muestra

~~Se incluyeron 68 aislamientos de *Candida albicans*, 41 formaron parte del grupo de colonizados y 27 fueron clasificados como infectados de acuerdo a la base de datos del laboratorio.~~

Criterios de inclusión

- Aislamientos de la mucosa bucal de pacientes adultos (> 18 años) de ambos sexos.
- Aislamientos de la mucosa bucal de pacientes colonizados o infectados por *Candida albicans*, identificados previamente por cultivo y pruebas bioquímicas.

Criterios de eliminación

- Aislamientos contaminados con otros microorganismos.
- Aislamientos cuyo ARN no pudo ser extraídos o se encontraba degradado

De acuerdo a los criterios de eliminación, anteriormente mencionados, se eliminaron dos aislamientos cuyos ARN no pudieron ser obtenidos; de tal modo que la muestra final del estudio quedó constituida por 66 aislamientos provenientes de 46 pacientes.

5.4 Procedimientos para la recolección de información

Toda la información se recolectó en una ficha de recolección de datos, cuyo formato se basó en las fichas previas utilizadas en la línea de investigación de la que se constituye el presente estudio (Anexo I). La misma se dividió en tres apartados:

- a) Clínicos: que incluyeron datos de identificación, demográficos, de antecedentes de la enfermedad renal crónica, hábitos de tabaco y valores de los exámenes de laboratorio, así como el examen bucal, diagnóstico de citología y antecedentes de tratamiento antibiótico y/o antifúngico.
- b) Microbiológicos: que abarcó los datos para la expresión del gen ALS3, filamentación y formación de biopelícula.
- c) Codificación: incluyó los códigos empleados para el llenado de la ficha.

De acuerdo a los objetivos planteados, los datos empleados en el presente estudio se centraron principalmente en el apartado microbiológico y algunos datos clínicos.

5.5 Procedimientos de laboratorio

De los aislamientos de *Candida* spp., almacenados en glicerol y a -20°C en el laboratorio de Microbiología y Patología Bucal de la Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP) se seleccionaron aquellos procedentes de la mucosa bucal de pacientes con ERC-D y que correspondían a la especie *Candida albicans*. Posteriormente, se confirmó la especie con técnicas de cultivo convencionales (Agar Dextrosa Sabouraud - ADS y CHROMA Agar®).

➤ Aislamientos de *Candida albicans*

Primeramente se limpió la zona de trabajo con rociado de alcohol (etanol) al 70%. Posteriormente se colocó un trozo de papel madera que cubría la mesa de trabajo y se encendió el fuego de un mechero, de tal manera a obtener un campo estéril de aproximadamente 20 a 30 cm de diámetro. Luego, se hizo vibrar el tubo que contenía la muestra almacenada de *Candida albicans* en un agitador tipo vórtex durante 10 segundos y se tomó con un asa estéril un inóculo del hongo, el cual se sembró en placas de Agar Dextrosa Sabouraud (ADS). Todas las placas utilizadas fueron previamente rotuladas e identificadas por códigos correspondientes a cada muestra. La técnica de siembra que se utilizó se denomina “en césped” la cual consiste en depositar el inóculo contenido en el asa realizando movimientos horizontales chocando suavemente con las paredes de la caja y ejerciendo una ligera presión recorriendo toda la superficie del medio. Una vez sembrados, se incubaron a 36°C durante 48 hs. Pasado el tiempo de incubación se evaluó el crecimiento

del microorganismo. Se consideró que hubo crecimiento cuando se observaron colonias en el medio de cultivo ADS. Todos los datos fueron registrados en la ficha de recolección.

➤ Identificación de especie *C. albicans*

Una vez evaluado el crecimiento, y si este fue positivo; con el mechero encendido y dentro del área de trabajo, se destapó la placa de ADS y con un asa estéril se tomó una o varias colonias crecidas que luego fueron sembradas “por agotamiento” en placas de CHROMAgar® *Candida* (CHROMAgar®, París, France). Para verificar la pureza y viabilidad del inóculo se fue descargando por sectores: primeramente se tomó la placa, se descargó gran parte del inóculo en una porción del cultivo con movimientos horizontales, luego se giró la caja $\frac{1}{4}$ de vuelta y se repitieron los movimientos horizontales para descargar el inóculo y por último se volvió a girar la caja $\frac{1}{4}$ de vuelta depositando el inóculo que quedaba también con los mismos movimientos horizontales; de esta manera el depósito del inóculo va decreciendo del primer depósito al tercero. Todas las cajas utilizadas fueron previamente rotuladas y etiquetadas con el código correspondiente a cada muestra. Se incubaron a 36°C por 48 hs y con este medio cromógeno se hizo la identificación de las especies de *Candida* de acuerdo a las características colorimétricas de cada especie dadas por el fabricante. Así se confirmó que las cepas correspondían a la especie *albicans*, las cuales se observaron de color verde. Posteriormente los aislamientos identificados fueron almacenados en refrigeración para la determinación de los factores de virulencia.

➤ Evaluación de la filamentación:

La capacidad de filamentación se evaluó de la siguiente manera:

Se trabajó bajo las mismas condiciones de esterilidad descritas en los procedimientos anteriores. Se utilizaron placas de agar harina de maíz – AHM (Difco®; Detroit, MI, USA) adicionado con polisorbato 80 (Sigma-Aldrich®; St. Louis, MO, USA) (concentración final de 0.02%) como medio de cultivo. Dichas placas fueron previamente identificadas con los códigos correspondientes a cada muestra. La siembra se realizó según la técnica de Dalmau, con un asa estéril se tomó un inóculo de los aislamientos ya preparados e identificados anteriormente, se posicionó el asa a un ángulo aproximado de 45° se depositó el inóculo en tres líneas paralelas separadas a 1 cm de distancia cada una. Se incubaron a 36 °C durante 48 hs y luego fueron examinadas utilizando un microscopio invertido (Zeiss, Oberkochen, Germany). Los datos obtenidos se registraron en la ficha.

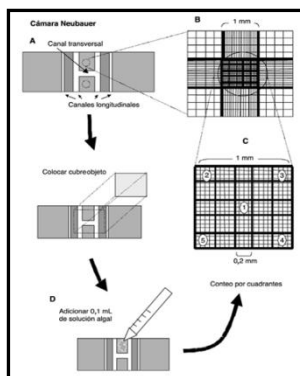
Después de la incubación por 48 hs. se tomó con un asa estéril una pequeña muestra de las placas de agar harina de maíz descritas en el paso anterior y se distribuyó en una laminilla que luego fue teñida con ácido periódico de Schiff (PAS). La presencia de filamentación se evaluó bajo el microscopio y los datos se anotaron en la ficha de recolección.

➤ Evaluación de la formación de biopelícula:

Para evaluar la formación de biopelícula fue utilizada la metodología descrita por Ramage y cols. (2001).

Primeramente se hizo una resiembra de los aislamientos a estudiar en tubos Falcon de 15ml estériles, los cuales fueron etiquetados previamente con los códigos correspondientes a cada muestra. Para el efecto, a todos los tubos se le agregaron 9ml de caldo levadura peptona dextrosa (YPD); luego se tomó con un asa estéril un inóculo de cada muestra y se colocó en

el tubo que le correspondía. Se incubó durante 24 hs a 36°C con agitación a 120 rpm. Una vez pasado el tiempo de incubación, se evaluó el crecimiento y cada uno de los aislamientos fueron traspasados a tubos eppendorf previamente etiquetados con los códigos de cada aislamiento con el fin de realizar lavados celulares con PBS, los cuales consisten en centrifugar cada muestra tres veces con solución PBS. Teniendo cada aislamiento suspendido en PBS, se tomaron 100µl y se resuspendieron en 900µl de PBS, de esta manera se obtuvo una dilución de 1:10. Seguido de esto, se hizo un ajuste de la densidad celular para cada aislamiento con ayuda de un hemocitómetro o cámara de Neubauer (Propper[®], USA). Para ello, de cada una de estas suspensiones realizadas se tomaron 10 µl y se colocaron en el hemocitómetro. Luego, bajo el microscopio se contaron las células presentes siguiendo la metodología que muestra la figura a continuación:



Hemocitómetro. (Manual de prácticas de laboratorio. Deschamps Lago Maria Esther. Veracruz, México.

Como se muestra en el cuadro B de la Figura 6, se seleccionó el centro para el conteo, se consideraron los cinco cuadros numerados en la porción C de la imagen; un cuadro central (1) y los cuatro restantes correspondientes a las esquinas (2.3.4.5). A su vez, cada uno de estos cuatro cuadros está compuesto de 16 cuadros más pequeños; de estos 16 cuadros pequeños, se volvieron a seleccionar cuatro cuadros (uno de cada esquina) y es en estos últimos en los que se contó la cantidad de células presentes. Se llevó un registro del número de células y al final el resultado que se obtuvo para cada muestra, fue la sumatoria de los

números obtenidos en los cinco cuadrantes. Estos resultados fueron utilizados en las siguientes fórmulas para conocer la concentración del inóculo testado.

$$1. \frac{n1+n2+n3+n4+n5}{20} = N$$

$$2. \frac{N}{4 \times 10^6} = N \times 10^6$$

$$3. N \times 10^6 \times \frac{1}{100} = N \times 10^6 \text{ cel/ml}$$

Una vez conocida la concentración del inóculo se aplicó la siguiente formula, para conocer cuántos ml de inóculo se debía utilizar para obtener una concentración final de 1.5×10^6 . Los ml obtenidos posteriormente se ajustaron a 1ml con RPMI-1640 (Sigma-Aldrich®, USA) utilizando la siguiente fórmula:

$$V_i \times N \times 10^6 \text{ cél/ml} = 1 \text{ ml} \times 1.5 \times 10^6$$

Una vez teniendo la concentración de 1.5×10^6 cél/ml en RPMI-1640, se llenaron las microplacas de titulación, poniendo 200µl de inóculo en cada pozo de la columna 2 a la 10, los pozos de la columna 1 se llenaron solo con 200µl de RPMI-1640 (control negativo). Una vez llenas las microplacas estas se llevaron a incubar durante 48 hs a 36 °C.

Posterior a la incubación; se le realizó, a cada pozo, 3 lavados con PBS, para posteriormente colocar en cada uno de ellos 100µl del reactivo XTT/Menadiona (Sigma-Aldrich®, USA) e incubarlas en completa oscuridad por un periodo de 60 min. Una vez pasado el tiempo de incubación las placas se leyeron por espectrofotometría en un lector de microplacas (Bio-Rad®, USA) a una longitud de onda de 490 nm.

Los datos fueron anotados en la ficha de recolección. Las medidas de esterilidad empleadas fueron las mismas ya descritas en pasos anteriores (limpieza del área de trabajo con etanol

70%, mesa de trabajo cubierta con papel madera, fuego del mechero y diámetro de campo de trabajo estéril de aproximadamente 20 a 30 cm).

➤ Extracción de ARN:

Para la extracción de ARN, se siguió el protocolo de extracción de ARN basado en el método descrito por Chomczynski y Sacchi (1987), el cual se basa en el aislamiento de este ácido nucleico empleando TRIZOL®, el cual se compone de: fenol, un compuesto volátil tóxico, hidroxiquinoleína que es un inhibidor de ARNasas, tiocianato de guanidina, tiocianato de amonio y glicerol.

Para el efecto, primero se etiquetaron 69 tubos Falcon de 15 ml estériles con los códigos correspondientes a las 68 muestras del estudio más la cepa de *Candida albicans* ATCC. En cada uno de ellos se depositó 5ml de caldo YPD y un inóculo de cada muestra tomado con un asa estéril; luego se incubaron por 48 hs a 36°C. Las medidas de esterilidad empleadas fueron las mismas ya descritas en pasos anteriores. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se centrifugaron las muestras a 1500 rpm/ durante 10 min. Se decantó la mayor parte del sobrenadante hasta obtener solamente el precipitado en el fondo del tubo, se tomó 1 ml de este precipitado y se colocó en tubos eppendorf, previamente etiquetados con los códigos correspondientes a cada aislamiento. Una vez que cada uno de los tubos eppendorf contenía 1 ml de la muestra, se agregó 1ml de TRIZOL® y se mezcló por pipeteo. A esta mezcla se agregó 100 µl de cloroformo y a partir de este momento todas se conservaron en refrigeración de 4°C, se vortexeó cada una de ellas tres veces durante 5-10 segundos por cada muestra hasta obtener una mezcla rosa homogénea de consistencia viscosa. Seguidamente éstas se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 min, siendo el resultado la presencia de tres fases: una acuosa, una intermedia y una más viscosa. Se extrajo todo el

sobrenadante (fase acuosa), cuidando de no extraer la fase intermedia y se colocó en los tubos eppendorf estériles, vacíos, etiquetados previamente. Una vez separada la fase acuosa, se agregó a cada tubo 500 µl de isopropanol y 1 µl de glucógeno, dejándose en refrigeración durante 12 hs. Luego de ese tiempo, se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm durante 15 min. Se decantó el isopropanol y se colocó 1 ml de etanol al 70% con el fin de realizar lavados del precipitado y nuevamente se metió a centrifugación de 14,000 rpm durante 10 min. Finalmente se decantó el etanol, cuidando de no eliminar el precipitado y se resuspendió en 10 a 100 µl de agua de pirocarbonato de dietilo o DEPC (libre de RNAsa). El volumen de agua DEPC se estableció en base al tamaño del precipitado.

➤ Cuantificación de ARN:

Se realizó una dilución 1:200 de cada muestra, tomando 2.5 µl del ARN resuspendido y agregando 500 µl de agua con DEPC para cada uno. Posteriormente, se tomó 1 µl de cada una de las diluciones preparadas y se utilizó el programa Thermo Scientific NanoDrop 2000 spectrophotometer® para la cuantificación de ARN. Con la razón Abs260/Abs280 se determinó la cantidad de ARN extraído (Anexo II):

- Abs260/Abs280 < 1.4 indicaba que había más proteína que ácidos nucleicos
- Abs260/Abs280 > 2.0 indicaba que el ARN estaba degradado
- Abs260/Abs280 de 1.4 a 2.0 indicaba que el ARN es de buena calidad.

Todas las diluciones salieron dentro del último rango (Anexo II).

➤ Obtención de ADNc:

Para la obtención de ADNc de cada muestra, se utilizó el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription® Applied Biosystems®, cuyo protocolo indicaba preparar una mezcla con un volumen total de 10 µl, distribuidos como sigue:

Cuadro 4. Volumen de reactivos utilizados para obtener ADNc

Reactivos	Volumen
<i>10X RT Buffer</i>	2.0 µl
<i>25X dNTP mix (100 mM)</i>	0.8 µl
<i>10X Random primers</i>	2.0 µl
<i>Transcriptasa reversa Multiscribe</i>	1.0 µl
<i>Inhibidor de RNasa</i>	1.0 µl
<i>Agua destilada NF</i>	3.2 µl

A fin de obtener una concentración de 1000 ng de ARN, se calculó el volumen para cada muestra con base a la concentración de ARN ng/µl obtenida en el proceso de cuantificación anterior. Seguidamente, se rotularon y codificaron 69 tubos con los códigos asignados a cada muestra y se colocó en cada uno el volumen de ARN calculado previamente más 10 µl de la mezcla preparada con el kit y se colocó en el termociclador marca Applied

Biosystems, bajo las condiciones que se muestran en el Cuadro 5:

Cuadro 5. Programación del termociclador para obtener el ADNc por PCR-TR

Etapas	Temperatura °C	Tiempo
<i>Paso 1</i>	25	10 min
<i>Paso 2</i>	37	120 min
<i>Paso 3</i>	85	5 min
<i>Paso 4</i>	4	∞

Basado en protocolo del kit High Capacity cDNA Reverse Transcription®

➤ Cuantificación de ADNc:

Una vez obtenido el ADNc se procedió a su cuantificación, para ello se realizó el mismo procedimiento que para la cuantificación del ARN. Se tomó 1 µl de cada una de las muestras y se utilizó el programa Thermo Scientific NanoDrop 2000 spectrophotometer® para la cuantificación de ADNc. Con la razón Abs260/Abs280 se determinó la cantidad de ADNc obtenido:

- Abs260/Abs280 < 1.4 indicaba que había más proteína que ácidos nucleicos
- Abs260/Abs280 > 2.0 indicaba que el ADNc estaba degradado
- Abs260/Abs280 de 1.4 a 2.0 indicaba que el ADNc es de buena calidad.

Todas las muestras arrojaron una cantidad entre 1000 y 2000 ng/µl, lo cual se consideró como cantidades suficientes de ADNc (Anexo III)

En un siguiente paso se ajustaron las concentraciones de ADNc a 100ng / 100 µl utilizando los valores de ADNc ng/ µl obtenido en la cuantificación. Estos valores se utilizaron en la siguiente fórmula:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Se obtuvieron así los volúmenes para cada muestra (Anexo III), los cuales fueron colocados en tubos previamente rotulados. Adicionalmente, a cada volumen se sumó la cantidad de agua DEPC faltante para completar 100 µl de solución.

➤ Detección del gen ALS3 por PCR en tiempo real:

Una vez obtenidas las diluciones de ADNc a una concentración de 100ng/µl. Se prepararon los oligos tanto de Actina como de ALS3, así como también las mezclas para cada uno de

estos genes, según indicaciones del protocolo del reactivo SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix utilizándose los siguientes componentes y sus concentraciones:

Cuadro 6. Volumen de reactivos utilizados para detección de ALS3 por PCR-TR

Reactivos	Volumen
<i>SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermix</i>	5 µl
<i>Primers:</i>	
- <i>Foward</i>	0.3 µl
- <i>Reverse</i>	0.3 µl
<i>Agua DEPC</i>	2.7 µl
<i>ADNc</i>	2.0 µl

Se realizó la corrida para las muestras de cada una de las cepas de estudio, teniendo como cepa control a *Candida albicans* ATCC y un control negativo de reactivos. A su vez, por cada muestra de ALS3 se utilizó una muestra control con el gen Actina, el cual es constitutivo. Las secuencias de los primers para ambos genes se muestran en el Cuadro 7:

Cuadro 7. Secuencia de los primers del gen ALS3 y Actina.

Gen	Foward	Reverse
ALS3	GTGGTCTACAACCTTGGGTTATTG	GAAACAGAAACCCAAGAACAAC
Actina	AGCTGTTTTCCCATCTCTTG	GGGCTTCATCACCAACATAAG

Para este paso se utilizó el termociclador marca BIO-RAD CFX96™ Real-Time System bajo las condiciones descritas en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Programación del termociclador para detección de ALS3 por PCR-TR.

Etapas	Temperatura °C	Tiempo	Número de ciclos
<i>Desnaturalización inicial</i>	95	3 min	1
<i>Desnaturalización</i>	95	15 s	40
<i>Alineamiento</i>	60	30 s	

Posteriormente a las lecturas de PCR en tiempo real de todas las muestras, se tomaron los valores Ct (valor umbral), tanto de ALS3 como de Actina, de cada una de las muestras, incluyendo la cepa *Candida albicans* ATCC y se calculó el valor de ΔCt para cada una de ellas utilizando la siguiente fórmula: $Ct_{ALS3} - Ct_{Actina} = \Delta Ct$

Los valores ΔCt resultantes en cada una de las muestras se denominaron ΔCt_1 , y el valor obtenido para la ATCC se denominó ΔCt_2 .

Luego se calculó el $\Delta\Delta Ct$ a partir de los valores ΔCt_1 y ΔCt_2 obtenidos, utilizando la siguiente fórmula: $\Delta Ct_1 - \Delta Ct_2 = \Delta\Delta Ct$

Finalmente el valor de $\Delta\Delta Ct$ calculado para cada muestra fue el que se utilizó para obtener la cuantificación relativa del gen ALS3 tanto en el grupo de colonizados e infectados, siendo la fórmula empleada la siguiente: $2^{(-\Delta\Delta Ct)} = CR$ (*cuantificación relativa*)

La CR de la ATCC fue la que se utilizó como valor de referencia para comparar las CR de cada muestra y así poder determinar el nivel de expresión del gen ALS3 (Anexo IV).

5.6 Variables

Independientes:

- Expresión del gen ALS3
- Filamentación
- Formación de biopelícula

Dependientes

- Colonización por *Candida albicans*
- Infección por *Candida albicans*

5.7 Definición operacional de variables

Colonización por *Candida albicans*: sin signos clínicos de candidosis bucal, cultivo de Agar Dextrosa Sabouraud positivo. (Gümri BT 2011, Gow y cols. 2013). Variable categórica/ dicotómica cuyos valores fueron Si=1, No=0.

Infección por *Candida albicans*: signos clínicos de candidosis bucal, confirmado con frotis citológico y cultivo de Agar Dextrosa Sabouraud positivo. (Niimi y cols. 2010, Gow y cols. 2013). Variable categórica/ dicotómica cuyos valores fueron Si=1, No=0.

Expresión del gen ALS3: se determinó por la cuantificación relativa del gen a partir del valor de Ct obtenida por PCR-TR. Es una variable cuantitativa continua, pero se dicotomizó en relación a un valor de referencia, el cual fue la cuantificación relativa de ALS3 de la cepa *C. albicans* ATCC, la cual fue 1. Entonces se estableció la expresión del gen como se muestra en el cuadro a continuación:

Cuadro 9. Valores dicotomizados para medir la expresión del gen ALS3 en base a la cuantificación relativa de la cepa control: *C. albicans* ATCC.

Expresión del gen ALS3	Código	Valor de referencia
<i>Si=1</i>	CR > 1	CR de <i>C. albicans</i> ATCC = 1
<i>No=0</i>	CR ≤ 1	

Filamentación: Formación de estructuras filamentosas o de tubos germinales a partir de levaduras de *Candida albicans* en Agar Harina de Maiz (AHM) y confirmado por frotis citológico con tinción de PAS. Se dicotomizó en Sí=1: crecimiento en AHM y frotis positivo, No=0: crecimiento en AHM negativo. (Sanchez-Vargas y cols 2013).

Formación de biopelícula: Estructura formada por red de hifas y pseudohifas junto con matriz extracelular y restos celulares, valorando su crecimiento mediante asimilación de enzima por sistema multiskan (Cassone y cols. 2012; Sánchez-Vargas y cols.2013; Hasan y cols. 2009). Variable categórica ordinal que se categorizó de la siguiente manera:

5.8 Análisis estadístico

Las variables continuas se expresaron mediante medidas de tendencia central (medias, medianas) y de dispersión (desviaciones estándar, intervalos intercuartilares). Las variables categóricas se expresaron en porcentajes. Para comparar estas variables se utilizaron

Cuadro 10. Clasificación de la formación de biopelícula por *Candida* spp., basada en ensayos de reducción colorimétrica con XTT.

Formación de biofilm	DO 490nm	UFC Log ₁₀ Cels/ml
<i>No produce = 0</i>	≤ 0.10	< 0.1 x 10 ⁸
<i>Ligeramente productora= 1</i>	0.11 - 0.40	0.1-0.75 x 10 ⁸
<i>Moderadamente productora=2</i>	0.41 - 0.74	0.76-2 x 10 ⁸
<i>Altamente productora=3</i>	≥ 0.75	>2 x 10 ⁸

Valores tomados del trabajo de Sánchez-Vargas y cols., 2013

pruebas de χ^2 con pruebas de máxima verosimilitud o pruebas exactas de Fisher en los casos necesarios, debido al tamaño de muestra.

En el análisis de la asociación entre la presencia de infección comparada con la colonización por *Candida albicans* y la expresión del gen ALS3 se generó un modelo de regresión logística múltiple, controlando por filamentación, formación de biopelícula y uso de prótesis dental. La regresión logística es una técnica estadística que trata de estimar la probabilidad de que ocurra un suceso en función de la dependencia de otras variables. Los coeficientes de regresión logística fueron exponenciados para estimar la razón de momios (RM) de cada variable independiente del modelo; por lo tanto, éste puede ser definido como el cociente entre la probabilidad de que ocurra el evento (infección) y la probabilidad de que no ocurra (colonización) teniendo en cuenta otros eventos (AGREGAR BIBLIOGRAFÍA)

Las pruebas de hipótesis se realizaron para $\alpha=0.05$ usando el programa estadístico JMP.V11, Statititcal Analisis System.

6. Resultados

En el presente estudio se incluyeron 66 aislamientos de *Candida albicans* provenientes de la mucosa bucal de 46 pacientes, 25 (37.9%) correspondieron al grupo de infectados y 41 (62.1%), a los colonizados.

6.1 Características demográficas y clínicas

Al describir las características de los pacientes de los que provienen los aislamientos estudiados; se observaron 24 hombres (52.2%) y 22 mujeres (47.8%) con una mediana de edad de 64 (Q₁-Q₃ 57-71) años. La nefropatía diabética (31/46, 67.4%) fue la causa de enfermedad renal crónica más frecuente y la mayoría de los pacientes (41/46, 89.1%), se encontraba bajo tratamiento de hemodiálisis al momento de la toma de muestra. Además se observó que un poco más de la mitad (25/46, 54.4%) eran portadores de prótesis dental (Cuadro 111). La candidosis bucal eritematosa fue el tipo de candidosis detectado en todos los pacientes infectados.

6.2 Características microbiológicas genotípicas y fenotípicas.

Como se muestra en el Cuadro 12, el gen ALS3 se expresó en el 88% de los aislamientos infectados (22/25) y solo en el 24.4% (10/41) de los colonizados con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$). El promedio de expresión relativa del gen ALS3 fue más alto (14.328) en los sujetos infectados en comparación con los colonizados (1.209), $p < 0.001$ (Figura 11).

Los aislamientos que expresaron el gen ALS3 presentaron más probabilidad de pertenecer a pacientes infectados que a colonizados (RM=32.7, $p < 0.001$). El mismo efecto se observó al

controlar por variables importantes como la filamentación (RM= 0.6), formación de biopelícula (RM=0.0) y uso de prótesis dental (RM=28.9).

Al analizar otras características patógenas del microorganismo, la formación de filamentos fue similar tanto en los aislamientos colonizados (60%) como en los infectados (68%); la formación de biopelícula fue alta en ambos grupos, resultando mayor en los sujetos colonizados (97.6%, $p=0.026$). Adicionalmente, se encontró que los sujetos portadores de prótesis dental mayor probabilidad de infección por *Candida* sp. (RM: 28.9, $p<0.001$).

6.3 Asociación del gen ALS3 con la filamentación y con la formación de biopelícula

En el análisis bivariado entre la expresión genética y los factores de virulencia no se observó asociación entre la expresión del gen ALS3 y la filamentación ($p=0.661$) (Cuadro 13); sin embargo, el 83% (5/6) de los microorganismos que no producen biopelícula presentaron expresión del gen ALS3 (RM 0.13 (IC:???, $p=0.041$)). Como se observa en el Cuadro 14, no se encontraron diferencias entre la filamentación y la expresión del gen, la formación de biopelícula o el uso de prótesis dental.

Cuadro 111. Características demográficas y clínicas de los pacientes con enfermedad renal crónica en diálisis.

<i>Características</i>	n=46	(%)
<i>Sexo</i>		
Masculino	24	(52.2)
Femenino	22	(47.8)
<i>Edad</i>		
Mediana de edad (Q ₁ - Q ₃) años	64	(57 - 71)
<i>Causa de Enfermedad Renal Crónica*</i>		
Nefropatía diabética	31	(67.4)
Hipertensión arterial	1	(2.2)
Glomerulonefritis crónica	2	(4.3)
Enfermedad renal poliquística	1	(2.2)
Enfermedad urológica	2	(4.3)
Otra causa conocida**	5	(10.9)
Causa desconocida	4	(8.7)
<i>Tipo de diálisis</i>		
Hemodiálisis	41	(89.1)
Diálisis peritoneal	5	(10.9)
<i>Uso de prótesis</i>		
Sí	25	(54.4)
No	21	(45.6)

*Clasificación ERC, USDRS

**malformaciones congénitas de las vías urinarias, nefropatía lúpica, nefropatía túbulo-intersticial, litiasis urinarias, causas vasculares inespecíficas y la uropatía obstructiva.

Cuadro 12. Expresión del gen ALS3, filamentación y formación de biopelícula en 66 aislamientos de *Candida albicans*

	<i>Infectados</i> (n=25)		<i>Colonizados</i> (n=41)		RM cruda	IC 95%	p	RM** ajustada
	n	(%)	n	(%)				
<i>Expresión del gen ALS3</i>								
Sí	22	(88.0)	10	(24.4)	22.73	(6.31 - 111.62)	< 0.001	32.75
No	3	(12.0)	31	(75.6)				
<i>Filamentación</i>								
Si	15	(60.0)	28	(68.3)	0.69	(0.25 - 1.98)	0.494	0.64
No	10	(40.0)	13	(31.7)				
<i>Formación de biopelícula</i>								
Productor	20	(80.0)	40	(97.6)	0.10	(0.01 - 0.67)	* 0.026	0.03
No productor	5	(20.0)	1	(2.4)				
<i>Uso de prótesis dental</i>								
Sí	19	(76.0)	10	(24,4)	9.82	(3.23 - 33.78)	< 0.001	28.91
No	6	(24.0)	31	(75.6)				

*Prueba exacta de Fisher. ** Ajustado por filamentación, formación de biopelícula y uso de prótesis.

Cuadro 13. Expresión del gen ALS3 y filamentación en 66 aislamientos de *Candida albicans*.

	<i>Filamentación</i>						<i>p</i>	RM* ajustada
	Sí	No	RM cruda	IC 95%				
	n (%)	n (%)						
<i>Expresión del gen ALS3</i>								
Sí	20 (46.5)	12 (52.2)	0.80	(0.29 – 2.20)			0.83	(0.29 – 2.20)
No	23 (53.5)	11 (47.8)			0.661			
<i>Formación de biopelícula</i>								
Productor	39 (90.7)	21 (91.3)	0.93	(0.12 - 5.98)			0.94	(0.12 - 5.98)
No productor	4 (9.3)	2 (8.7)			0.935			
<i>Uso de prótesis dental</i>								
Sí	17 (39.5)	12 (52.2)	0.60	(0.21 - 1.66)			0.62	(0.21 - 1.66)
No	26 (60.5)	11 (47.8)			0.325			

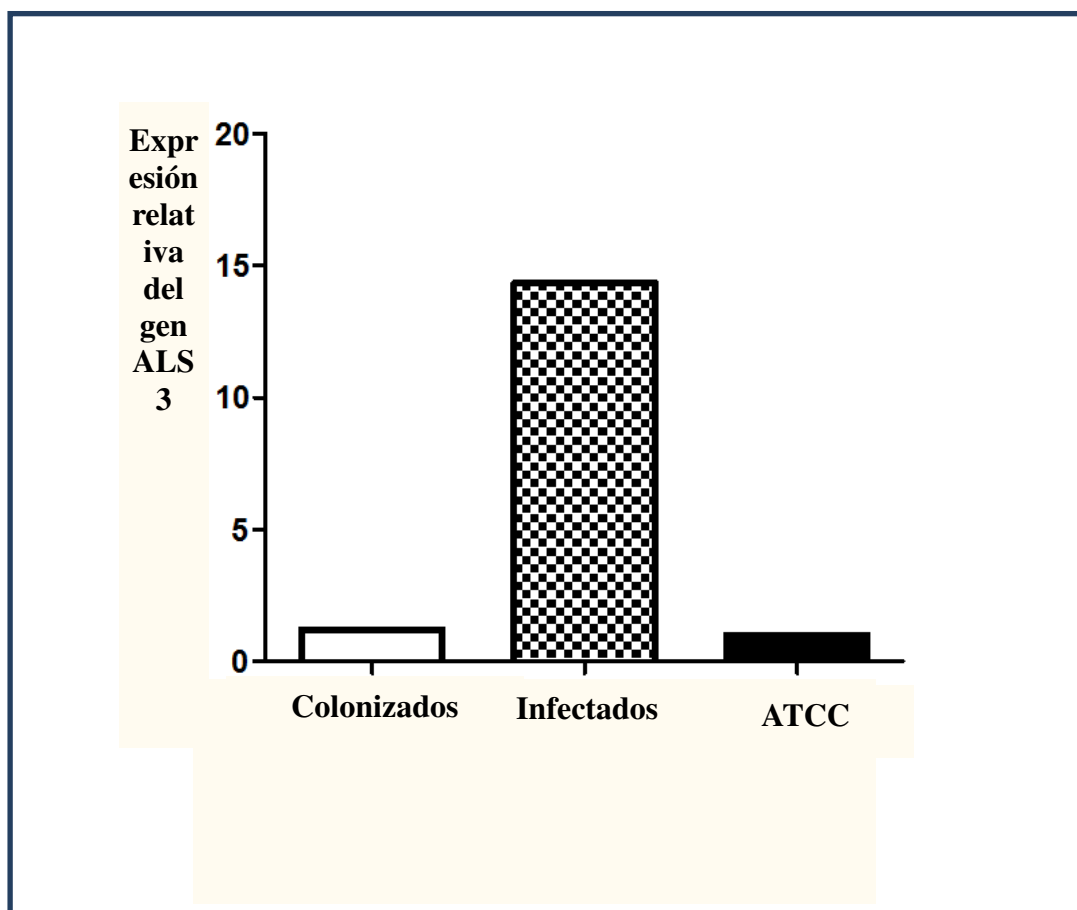
* Ajustado por expresión del gen ALS3, formación de biopelícula y uso de prótesis.

Cuadro 14. Expresión del gen ALS3 y formación de biopelícula en 66 aislamientos de *Candida albicans*.

	<i>Formación de biopelícula</i>							
	Productor		No productor		RM cruda	IC 95%	p	RM* ajustada
	n	(%)	n	(%)				
<i>Expresión del gen ALS3</i>								
Sí	27	(45.0)	5	(83.3)	0.16	(0.01 – 1.09)	0.073	0.13
No	33	(55.0)	1	(16.7)				
<i>Filamentación</i>								
Sí	39	(65.0)	4	(66.7)	0.93	(0.12 - 5.98)	0.935	0.97
No	21	(35.0)	2	(33.3)				
<i>Uso de prótesis dental</i>								
Sí	27	(45.0)	4	(66.7)	1.64	(0.29 -12.45)	0.579	2.55
No	33	(55.0)	2	(33.3)				

* Ajustado por expresión del gen ALS3, formación de biopelícula y uso de prótesis.

Figura 11. Expresión del gen ALS3 en 66 aislamientos clínicos de *C. albicans* en pacientes con enfermedad renal crónica en diálisis.



7. Discusión

El presente estudio es uno de los primeros en donde se compara la expresión del gen ALS3 en aislamientos de *Candida albicans* tomados de la mucosa bucal de pacientes colonizados o infectados por este microorganismo; para el efecto, se utilizó la técnica de PCR-TR. Al comparar ambos grupos, se encontró que la frecuencia de expresión del gen ALS3 fue mayor en las levaduras provenientes de pacientes infectados que las de colonizados; además, la RM mayor a 20 sugirió que aquellas que expresaron el gen tienen más probabilidad de producir infección que las que no lo expresaron.

Todos los aislamientos de *Candida albicans* estudiados se obtuvieron de la mucosa bucal de pacientes con enfermedad renal crónica en tratamiento de diálisis y según los objetivos trazados, se describió a estos sujetos. La mediana de edad observada fue de 64 años y predominó la nefropatía diabética (67.4%) como la causa más frecuente de ERC. Estos datos concuerdan con la literatura, la cual reporta que la ERC afecta principalmente a los adultos mayores, muchos aún en edad productiva, siendo entre los 65 y 75 años, el riesgo 10 veces mayor en relación a pacientes jóvenes (Bowling y Muntner 2012; Zhang y Rothenbacher, 2008; Meguid y Bello, 2005; Ceballos y cols., 2005) y que la Diabetes Mellitus es la principal responsable de la falla renal en estos individuos, no sólo en México (Ortiz y cols., 2014; García-García y cols. 2013; Jha y cols. 2013; Méndez-Durán y cols., 2010), sino también en varias partes del mundo; tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo (Atkins y Zimmet, 2010). Esto se debe a que con el paso de los años, la diabetes, por medio de varios mecanismos, lleva al daño de otros órganos, incluidos los riñones; aproximadamente 40% de los pacientes diabéticos presentan falla renal en algún momento de sus vidas (Shenghan 2016; Plantinga y cols. 2010).

Por otra parte, resultó que la mayoría de estos pacientes se encontraba bajo tratamiento de hemodiálisis. Según algunos autores, actualmente esta es la modalidad de terapia de reemplazo renal de preferencia que se indica para estos individuos, debido a la mejor sobrevida que ofrecen teniendo en cuenta su calidad de vida (Swapna y cols., 2013; Ortiz y cols. 2014; Noshad y cols. 2009; Bots y cols. 2006). En México, por el contrario, principalmente se recurre a la diálisis peritoneal como terapia de reemplazo renal, debido al mayor financiamiento de esta por parte del estado (Rojas-Campos y cols. 2013; Méndez-Durán y cols., 2010; Correa-Rotter, 2001; Su-Hernández y cols., 1996). Sin embargo, en las instituciones seleccionadas para obtener las muestras del estudio, existen más unidades de hemodiálisis que de diálisis peritoneal, lo cual podría explicar los resultados obtenidos.

Continuando con las características de estos pacientes y haciendo referencia a posibles factores locales que favorecen la colonización o infección por *Candida albicans*, se encontró que más de la mitad (54%) eran portadores de prótesis dental. Según algunas investigaciones, el 50 a 80% de los individuos con ERC usan prótesis dental (Pieralisi y cols., 2014; de la Rosa-García y cols., 2013). Esto puede estar relacionado con el hecho de que el grupo de individuos afectados por esta enfermedad presenta mayor pérdida de piezas dentarias; por lo tanto, requieren del uso de prótesis dentales (de la Rosa y cols, 2008). Estos aparatos, no solo ejercen presión sobre la mucosa bucal traumatizándola y volviéndola más susceptible al daño; sino que también, por la base de acrílico y porosidad que poseen constituyen un reservorio para este hongo y para la formación de biopelícula del mismo; al sumar a todo esto una higiene deficiente, el riesgo de colonización o infección por este microorganismo, aumenta (Bianchi y cols., 2016; Pieralisi y cols., 2014; Salerno y cols. 2011).

Para responder al principal objetivo del estudio, se incluyeron 41 aislamientos de *Candida albicans*, de los cuales 62% se agruparon dentro de los colonizados y 38% como infectados. Estos resultados difícilmente puedan ser contrastados con investigaciones previas, debido a que todos los trabajos realizados, en donde estudian la expresión del gen ALS3, consideraron únicamente muestras obtenidas de pacientes con candidosis bucal o vaginal (Roudbarmohammadi 2016; Monroy-Pérez y cols. 2012; Paniagua-Contreras, 2010; Cheng y cols. 2005) es más, varios estudios emplearon modelos de mucosa bucal infectada provenientes de murinos (Cleary y cols., 2011) o a partir de infección en reconstituciones epiteliales humanas (Green y cols. 2004; Zhao y cols. 2004); por lo tanto, el 100% de los aislamientos incluidos en dichos trabajos fueron infectados.

Sin embargo, existen datos previos que reportan una frecuencia de colonización por *Candida albicans* en pacientes con ERC que varía de 39% al 51.2% (Pirelisi y cols., 2014; de la Rosa y cols., 2013; Godoy y cols, 2013). Esta frecuencia es menor, al comparar con la observada en otros grupos de pacientes inmunocomprometidos como: diabéticos: 67.8% - 87.5% (Zomaradian y cols., 2016; Premkumar y col., 2014); pacientes al final del tratamiento de radioterapia por cáncer bucal: 69% (Mañas y cols., 2012), en individuos con infección por VIH/SIDA: 59.4 – 82.3% (Owotade y cols., 2014; Mulu y cols. 2013); en sujetos con neoplasias de cabeza y cuello: 56.8% (Schelenz y cols., 2011). Asimismo, la frecuencia de candidosis bucal en pacientes con ERC se ha descrito entre 5.7% y 32% (Thorman y cols., 2009; de la Rosa y cols., 2006). Cifras inferiores a lo reportado en diabéticos: 59.6% (Motta-Silva y cols., 2010) pacientes con cáncer: 71.4% (Jain y cols., 2016) e individuos infectados con VIH 71.3% (Anwar y cols., 2012). Esta diferencia en las cifras descritas puede deberse a que en cada grupo mencionado son distintos los factores

que intervienen para la colonización o infección por este hongo tales como una disminución severa del flujo salival en el caso de los pacientes sometidos a radioterapia, el uso de medicamentos inmunosupresores o antineoplásicos que producen xerostomía en los individuos con cáncer; o bien, el sistema inmune gravemente afectado en los pacientes infectados con VIH. En los pacientes con ERC, a pesar de que existe un deterioro sistémico, nutricional, hiposalivación, la edad avanzada y el uso de prótesis dentales que favorecen la colonización o infección por *Candida* spp., no se encuentran severamente inmunosuprimidos como los otros grupos mencionados anteriormente (Mañas y cols., 2012; Lim y cols., 2007; Haag-Weber y cols., 1992)

Lo más resaltante del presente trabajo fue la expresión del gen ALS3 en el 88% de los aislamientos infectados. Esta cifra se encuentra en el rango reportado en estudios previos realizados *in vitro*, en modelos murinos, en modelos de reconstitución epitelial humana, en mucosa vaginal y bucal que señalan la expresión de este gen en el 67% al 100% de los aislamientos infectados (Roudbarmohammadi y cols., 2016; Monroy-Pérez y cols., 2012; Cleary y cols., 2011; Paniagua-Contreras y cols. 2010; Cheng y cols., 2005). Además resultó que las levaduras que expresaron el gen ALS3 presentaron 22.7 veces más posibilidad de provocar infección que aquellas que no lo expresaron, lo cual sugiere que este gen, juega un papel importante durante la infección. A este respecto, cabe resaltar que dentro de los ocho miembros que forman parte de la familia de genes ALS, se ha descrito al gen ALS3 como uno de los más importantes, debido a que las proteínas Als3 son las que además de actuar como adhesinas, también son invasinas; es decir, que pueden unirse a las E-cadherinas e inducir la endocitosis por los queratinocitos, penetrar al espesor del epitelio y dañarlo. Incluso por su afinidad a las N-cadherinas presentes en las células endoteliales,

se las ha relacionado con la diseminación sistémica de este hongo (Cleary y cols., 2011; Liu y Filler, 2011; Hoyer y cols., 2008; Phan y cols., 2007). Sin embargo, se ha visto que Als1 y Als5 también pueden actuar como invasinas, pero su eficacia es menor comparada con Als3 (Sheppard y cols., 2004). Por lo tanto, todas estas propiedades, hacen que este gen sea un factor de virulencia muy útil para *Candida albicans* durante el proceso de infección, lo cual pudiera explicar el hecho de su mayor expresión en los aislamientos infectados que en los colonizados (Hoyer y Cota, 2016; Murciano y cols., 2012; Liu y Filler, 2011).

En este punto también cabe resaltar que con base a investigaciones previas, se ha reportado la adherencia deficiente e incluso la falta de adherencia del hongo al epitelio cuando se realizan delecciones o mutaciones del gen ALS3 (Liu y Filler, 2011; Zhao y cols., 2004). Esto sugiere que cuando el hongo expresa este gen hay una mejor interacción con el huésped, lo cual podría dar lugar a una infección si las condiciones lo favorecen.

Realizando todavía más el papel que tiene el gen ALS3 durante la infección, ya existen investigaciones *in vitro* y en murinos donde por medio de anticuerpos que se unen a la proteína Als3, bloquean la adhesión de *Candida albicans* al epitelio (Coleman y cols., 2009; Laforce-Nesbitt y cols., 2008; Spellberg B y cols., 2006); concluyendo que ésta puede ser un importante blanco terapéutico y que estos anticuerpos pueden ser utilizados como vacunas que protejan contra la infección, ya que al no haber adhesión, tampoco puede haber invasión y por lo tanto no se produciría enfermedad.

Por otra parte, en el presente trabajo se observó la expresión del gen ALS3 en el 24.4% de los aislamientos colonizados, lo cual no puede ser comparado con otros datos debido a que ninguno de los estudios realizados sobre este gen consideró aislamientos de *C. albicans*

provenientes de un estado de colonización, es más solo se describe su expresión en la infección (Roudbarmohammadi y cols., 2016; Monroy-Pérez y cols., 2012; Paniagua-Contreras y cols., 2010; Green y cols., 2004). El hecho de que los aislamientos de *C. albicans* que fueron tomados de pacientes sin signos de candidosis bucal, expresaran el gen ALS3, puede ser explicado por varias razones: en primer lugar, recordar que la infección es un proceso y por lo tanto, requiere tiempo para que se presenten las manifestaciones clínicas; el presente estudio fue transversal, por lo mismo, solo se vio al paciente una vez y en ese momento no presentaron signos de candidosis bucal; no fue el objetivo hacerles seguimiento, por lo cual no hubo un registro del desarrollo o no de la enfermedad un tiempo después. En segundo lugar, se debe tener en cuenta que las proteínas Als3 son adhesinas importantes para el hongo, entonces puede que hayan sido sintetizadas por el mismo solo para poder tener una mejor adherencia al epitelio. Por último; lo más importante, es tener en cuenta que la infección se da por la interacción entre factores del huésped, del microambiente y del microorganismo y en este estudio solo se están considerando factores de la levadura.

Con relación a la filamentación, se pudo observar que tanto las levaduras de los colonizados como de los infectados produjeron filamentos sin diferencias significativas entre ambos grupos. Si bien la filamentación es uno de los principales factores de virulencia del hongo, por sí sola, no es suficiente para producir infección, ya que en ocasiones las hifas son utilizadas por *C. albicans* solamente para una mejor adherencia al epitelio sin causar daño en el mismo (Gow y Hube 2012; Gow y cols., 2012; Hube 2004). Incluso, la formación de filamentos está influenciada por factores del ambiente como el pH o la temperatura que cuanto más elevados sean, mayor será la filamentación (Mayer y cols.,

2013; Naglik y cols., 2011). En este sentido, puede ser que tanto el pH como la temperatura de los medios de cultivo hayan influenciado en la formación de hifas de los aislamientos estudiados. Además, hay que considerar que para que el epitelio se dañe, las hifas deben penetrar profundamente y es aquí donde intervienen las células de defensa del huésped, principalmente los neutrófilos que son las que bloquean el paso e impiden la formación y penetración de hifas (Mayer y cols., 2013; Gow y cols., 2012; Haung, 2012; Naglik y cols., 2011). Cabe la posibilidad de que como los pacientes con ERC en su mayoría cursan con neutropenia (Kato y cols., 2008); el hecho de tener pocos neutrófilos haya conferido al hongo la capacidad de desarrollar hifas con mayor facilidad.

Siguiendo con los objetivos propuestos, en el presente estudio no se observó diferencias significativas entre colonizados e infectados en cuanto a la formación de biopelícula, ya que en la mayoría de los aislamientos estudiados resultó una ligera producción de la misma. Esto difiere de los estudios realizados en muestras aisladas de la mucosa bucal infectada de pacientes diabéticos, portadores de prótesis y con infección por VIH, en los que se describe una producción moderada y alta de biofilm (Sánchez- Vargas y cols., 2013; Alnuaimi y cols., 2013; Junqueira y cols., 2011; Dongari-Bagtzoglou y cols., 2009). En este sentido, cabe resaltar que la biopelícula es una forma que utiliza *C. albicans* para evadir a los neutrófilos y evitar ser fagocitadas por ellos (Johnosn y cols., 2016; Tournu y Van Dijck, 2012). Además, el biofilm en la mucosa bucal es bastante complejo, ya que está conformado no solo por células fúngicas, sino también por bacterias de la microbiota bucal y por células del hospedero como: queratinocitos descamados y polimorfonucleares (Ganguly y Mitchell, 2011; Dongari-Bagtzoglou y cols., 2009). Por lo tanto, como en estos pacientes con ERC, además de una marcada neutropenia, se ve alterada la función

fagocítica de los neutrófilos (Kato y cols., 2008), pudiera ser que *C. albicans* no haya tenido la necesidad de producir tanta biopelícula para generar infección. Por otra parte; en un estudio realizado por Bruder-Nascimento y cols. en el 2014, observaron que de todas las especies de *Candida*, la especie *albicans* es la menor productora de biofilm en comparación a las *no albicans*, lo cual también podría ayudar a explicar los hallazgos del presente estudio; ya que en su totalidad, los aislamientos estudiados fueron de *Candida albicans*.

Los resultados del presente estudio, no mostraron asociación del gen ALS3 con la filamentación, lo cual cae en contradicción con lo que se reporta en la literatura, donde mencionan que este gen participa en la formación de hifas (Thompson y cols., 2011; Naglik y cols., 2011; Liu y Filler, 2011). Sin embargo; otros estudios han demostrado que la producción de filamentos no está codificada únicamente por el gen ALS3, sino que hay otros genes, como el HGC1 y HWP1 que tienen mayor implicación en la formación de hifas (Fan y cols., 2013; Chauvel y cols., 2012; Thompson y cols., 2011), lo cual sugiere que probablemente en estos aislamientos la formación de hifas no esté regulada por ALS3, sino por otros genes.

Tampoco se observó asociación entre la expresión del gen ALS3 con la formación de biopelícula, lo cual coincide con Bruder-Nascimento y cols. en el 2011, quienes realizaron un estudio donde la producción de biofilm no se asoció a la expresión del gen ALS3. Aunque en la literatura se menciona que ALS3 favorece la formación de biopelícula en sus estadios iniciales, debido a que se requieren de numerosas adhesinas para empezar a formar el biofilm (Nailis y cols., 2010; Sellam y cols., 2009; Nobile y cols., 2008). Sin embargo, otros autores mencionan que la adhesina Als3 es importante para la formación de biofilm, pero de superficies inertes y no es imprescindible en la biopelícula de los tejidos vivos

como sí lo son el Bcr1 y el HWP1; además el microambiente, en este caso de la mucosa bucal, puede favorecer la expresión de cualquiera de los genes miembros de la familia ALS (Dwivedi y cols., 2011; Ganguly y Mitchell, 2011; Nobile y Mitchell, 2006). Entonces, entendiendo esto, se puede sugerir que la formación de biopelícula en la mucosa bucal está regulada principalmente por otros genes y que cualquier proteína Als puede estar involucrada en su formación, no únicamente Als3.

8. Fortalezas y debilidades

Dentro de las fortalezas del presente trabajo se puede mencionar la novedad que implica el haber incluido muestras de pacientes colonizados y no sólo de infectados, para evaluar la expresión del gen ALS3 y compararla en ambos grupos; así como también haber seleccionado a pacientes con ERC en quienes los estudios son poco frecuentes y no todos se han enfocado en conocer los mecanismos de patogenicidad que utiliza *C. albicans* en estos individuos. Finalmente, el haber utilizado la técnica de PCR-TR, en vez de la convencional, le confiere mayor fuerza a los resultados encontrados.

Entre las limitaciones, se encuentra el reducido número de aislamientos provenientes de pacientes infectados en relación a los colonizados, lo cual pudo haber influido en la falta de diferencias significativas en ambos grupos en cuanto a la filamentación y formación de biopelícula. Además, el diseño transversal del estudio limitó el poder observar si aquellos pacientes colonizados, en cuyos aislamientos sí hubo expresión del gen ALS3, presentaron en un futuro candidosis bucal. Probablemente el haber considerado solo los factores microbiológicos y no tener en cuentas las características clínicas de estos pacientes es una de las debilidades que se interpone a la hora de entender mejor el proceso de infección de

C. albicans en individuos con ERC. Asimismo, solo considerar al gen ALS3 y no a todos los de la familia ALS, pudo haber sido una limitante para explicar mejor los mecanismos de patogenicidad del hongo en la mucosa bucal de estos pacientes.

9. Contribuciones

Dentro de las aportaciones de este trabajo se encuentra la elevada frecuencia de expresión del gen ALS3 en aislamientos de *C. albicans* provenientes de pacientes infectados, lo cual sirve como dato para investigaciones futuras y fortalece la idea de que pudiera ser un posible blanco terapéutico muy útil a la hora de buscar alternativas de tratamiento.

10. Conclusiones

En conclusión, los resultados del presente estudio, sugieren que la expresión del gen ALS3 tiene una participación importante durante el proceso de infección en la mucosa bucal de los pacientes con ERC, ya que en estado de colonización casi no se observó expresión del mismo.

Asímismo, se puede concluir que todavía falta esclarecer el papel que juegan la filamentación y la formación de biopelícula en el paso de colonización a infección de *C. albicans* en estos individuos, aunque pudiera haber una relación con la neutropenia y la alteración fagocítica de los neutrófilos en estos pacientes, ya que estas células constituyen la principal línea de defensa contra este microorganismo. Sin embargo, como no se consideraron varios de los aspectos clínicos, esta es solo una hipótesis.

Finalmente, la falta de asociación entre el gen ALS3 con la filamentación y formación de biopelícula sugiere que este gen no es el principal regulador de estos factores de virulencia en la mucosa bucal, sino que son otros los responsables de la regulación de los mismos.

11. Perspectivas

Investigaciones futuras pueden considerar un estudio similar a este, pero en otros individuos inmunosuprimidos como pacientes diabéticos, infectados por VIH, con cáncer o trasplantados, incluso se podría incluir a individuos sanos colonizados por *C. albicans*. También puede tenerse en cuenta la posibilidad de un diseño longitudinal para evaluar si en los pacientes colonizados que expresan el gen ALS3 desarrollan candidosis bucal en un periodo considerable. Adicionalmente, tener en mente que muchos otros genes pudieran estar involucrados en la patogénesis de *C. albicans*; por lo tanto, todavía hay mucho por estudiar y conocer; sin olvidar correlacionar cualquier hallazgo con las características clínicas de los pacientes.

12. Referencias bibliográficas

- Albuquerque P y Casadevall A. Quorum sensing in fungi—a review. *Medical mycology* 2012; **50**: 337-345.
- Almeida RS, Brunke S, Albrecht A, Thewes S, Laue M, Edwards JE y cols. The hyphal-associated adhesin and invasin Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin. *PLoS Pathog* 2008; **4**: e1000217.
- Alnuaimi AD, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC y McCullough MJ. Clinical isolates and laboratory reference *Candida* species and strains have varying abilities to form biofilms. *FEMS Yeast Res* 2013; **13**: 689-699.
- Amato D, Álvarez-Aguilar C, Castañeda LR, Rodríguez E, Ávila-Díaz M, Arreola F y cols. Prevalence of chronic kidney disease in an urban Mexican population. *Kidney Int* 2005; **97**: S11-S17.
- Anderson MZ y Bennett RJ. Budding off: bringing functional genomics to *Candida albicans*. *Brief Funct Genomics* 2016; **15**: 85-94.
- Anwar KP, Malik A y Subhan KH. Profile of candidiasis in HIV infected patients. *Iran J Microbiol* 2012; **4**: 204–209.
- Atkins CR y Zimmet P. Diabetic kidney disease: act now or pay later. *Med J Aust.* 2010; **192**: 272-4.
- Bamford CV, Nobbs HA, Barbour ME, Lamont RJ y Jenkinson HF. Functional regions of *Candida albicans* hyphal cell wall protein Als3 that determine interaction with the oral bacterium *Streptococcus gordonii*. *Microbiology*. 2015; **161**: 18–29.
- Beaussart A, Alsteens D, El-Kirat-Chatel S, Lipke PN, Kuchari'kova' S, Van Dijck P y Dufrene YF. Single molecule imaging and functional analysis of Als adhesins and mannans during *Candida albicans* morphogenesis. *ACS Nano*. 2012; **6**: 10950–10964
- Bianchi CMPDC, Bianchi HA, Tadano T, Paula CRD, Hoffmann-Santos HD, Leite J y Hahn RC. Factors related to oral candidiasis in elderly users and non-users of removable dental prostheses. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 2016; **58**: 1-5.
- Bots CP, Poorterman JHG, Brand HS, Kalsbeek H, Van Amerongen BM, Veerman ECI y col. The oral health status of dentate patients with chronic renal failure undergoing dialysis therapy. *Oral Dis* 2006; **12**: 176-180.
- Bowling CB y Muntner P. Epidemiology of chronic kidney disease among older adults: a focus on the oldest old. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2012; **67**:1379-86.
- Brown PJA, Odds CF y Gow ANR. Infection-related gene expression in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* 2007; **10**: 307-313.
- Bruder-Nascimento A, Camargo CH, Mondelli AL, Sugizaki MF, Sadatsune T y Bagagli E. *Candida* species biofilm and *Candida albicans* ALS3 polymorphisms in clinical isolates. *Braz J Microbiol* 2014; **45**: 1371-1377.

- Butler G, Rasmussen MD, Lin FM, Santos MAS, Sakthikumar S, Munro CA y cols. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* 2009; **459**: 657-662.
- Bulacio L, Paz M, Ramadán S, Ramos L, Pairoba C, Sortino M y cols. Oral infections caused by yeasts in patients with head and neck cancer undergoing radiotherapy. Identification of the yeasts and evaluation of their antifungal susceptibility. *J Mycol Med* 2012; **22**:348-353.
- Candida Genome Database (CGD) <http://www.candidagenome.org/>
- Cannon RD y Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999; **10**: 359-383.
- Carlisle PL y Kadosh D. A genome – wide transcriptional analysis of morphology determination in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* 2013; **24**: 246-260.
- Cassone A y Cauda R. *Candida* and candidiasis in HIV-infected subjects: where commensalism, opportunistic behaviour and frank pathogenicity lose their borders. *AIDS*. 2012; **26**: 1457-1472.
- Cavalcanti YW, Morse DJ, da Silva WJ, Del-Bel-Cury AA, Wei X, Wilson M, Milward P y cols. Virulence and pathogenicity of *Candida albicans* is enhanced in biofilms containing oral bacteria. *Biofouling* 2015; **31**: 27-38.
- Ceballos M, López-Revuelta K, Saracho R, García LF, Castro P, Gutiérrez JA y cols. Dialysis and transplant patients registry of the Spanish Society of Nephrology. *Nefrologia* 2005; **25**: 121-129
- Chaffin WL, Lopez-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D y Martinez JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; **62**: 130–180.
- Chauvel M, Nesseir A, Cabral V, Znaidi S, Goyard S, Bachellier-Bassi S y cols. A Versatile Overexpression Strategy in the Pathogenic Yeast *Candida albicans*: Identification of Regulators of Morphogenesis and Fitness. *PLoS ONE* 2012; **7**: e45912.
- Cheng G, Wozniak K, Wallig MA, Fidel PL Jr., Trupin SR y Hoyer LL. Comparison between *Candida albicans* Agglutinin-Like Sequence Gene Expression Patterns in Human Clinical Specimens and Models of Vaginal Candidiasis. *Infect Immun* 2005; **73**:1656-1663.
- Chomczynski P y Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc*. 2006;1:581-5.
- Cleary IA, Reinhard SM, Miller CL, Murdoch C, Thornhill MH, Lazzell AL y cols. *Candida albicans* adhesin Als3p is dispensable for virulence in the mouse model of disseminated candidiasis. *Microbiology* 2011; **157**: 1806-1815.
- Cohen G y Hörl HW. Immune Dysfunction in Uremia-An Update. *Toxins* 2012; **4**: 962-990.
- Coleman DA, Oh SH, Zhao X, Zhao H, Hutchins JT, Vernachio JH y col. Monoclonal antibodies specific for *Candida albicans* Als3 that immunolabel fungal cells in vitro and

- in vivo and block adhesion to host surfaces. *Journal of Microbiological Methods* 2009; **78**: 71-78.
- Collins AJ, Kasiske B, Herzog C, Chavers B, Foley R, Gilbertson D y cols. Renal Data System 2006 Annual Data Report Abstract. *Am J Kidney Dis* 2007; **49**: vi-vii
 - Coronado L y Jiménez Y. Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis. *J Clin Exp Dent* 2013; **5**:279-286.
 - Correa-Rotter R. The cost barrier to renal replacement therapy and peritoneal dialysis in the developing world. *Perit Dial Int* 2001; **21**: S314-S317.
 - Correa-Rotter R y Cusumano AM. Present, Prevention and management of chronic kidney disease in latino america. *Blood Purif* 2008; **26**: 90-4.
 - De Backer MD, Magee PT, Pla J. Recent developments in molecular genetics of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* 2000; **54**: 463-498
 - De la Calle-Rodríguez N, Santa-Vélez C y Cardona-Castro N. Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *Candida albicans* y hongos dermatofitos. *CES Medicina* 2012; **26**: 43 – 55.
 - De la Rosa GE, Mondragón PA, Irigoyen CME y Bustamante RMA. Lesiones bucales en un grupo de pacientes con transplante renal. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005; **10**: 196-204.
 - De la Rosa García E, Mondragón Padilla A, Aranda Romo S y Bustamante Ramírez MA. Oral mucosa symptoms, signs and lesions, in end stage renal disease and non-end stage renal disease diabetic patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006; **11**: E467-73.
 - De la Rosa E, Cruz S y Mondragón A. Tooth loss in diabetic patients with and without chronic kidney disease and dialysis. *Nefrología*. 2008; **28**: 645-8.
 - De la Rosa GE, Miramontes M, Bustos J y Mondragón A. Especies de *Candida* en candidosis bucal en pacientes diabéticos con y sin insuficiencia renal crónica. *Revista ADM* 2013; **70**: 302-308.
 - De la Rosa E, Miramontes M, Sánchez LO y Mondragón A. Colonización e infección bucal por *Candida* sp. en pacientes diabéticos y no diabéticos con enfermedad renal crónica en diálisis. *Nefrología* 2013; **33**:764-70.
 - Desai VJ y Mitchell AP. *Candida albicans* biofilm development and its genetic control. *Microbiol Spectr* 2015; **3**: 1-19.
 - Dwivedi P, Thompson A, Xie Z, Kashleva H, Ganguly S, Mitchell AP y cols. Role of Bcr1-activated genes Hwp1 and Hyr1 in *Candida albicans* oral mucosal biofilms and neutrophil evasion. *PLoS One* 2011; **6**: e16218
 - Dongari-Bagtzoglou A, Kashleva H, Dwivedi P, Diaz P y Vasilakos J. Characterization of mucosal *Candida albicans* biofilms. *PLoS One* 2009; **4**: e7967.
 - Fan Y, He H, Dong Y y Pan H. Hyphae-specific genes HGC1, ALS3, HWP1, and ECE1 and relevant signaling pathways in *Candida albicans*. *Mycopathologia* 2013; **176**: 329-335.

- Farah SC, Ashman RB y Challacombe SJ. Oral Candidosis. Clin Dermatol 2000; **18**: 553-562.
- Feller L, Khammissa RAG, Chandran R, Altini M y Lemmer J. Oral candidosis in relation to oral immunity. J Oral Pathol Med 2014; **43**: 563-569.
- Ganguly S y Mitchell AP. Mucosal biofilms of *Candida albicans*. Curr Opin Microbiol. 2011; **14**: 380-5.
- Garcia C, Sarrion MG y Bagán JV. Current treatment of oral candidiasis: A literature review. J Clin Exp Dent: 2014; **6**:576-582.
- Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, Cui F, Sikaroodi M, Naqvi A y cols. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. PLoS Pathog 2010; **6**: e1000713
- Godoy JS, Souza Bonfim- Mendonça P, Nakamura SS, Yamada SS, Shinobu- Mesquita C, Pieralisi N y col. Colonization of the oral cavity by yeasts in patients with chronic renal failure undergoing hemodialysis. J Oral Pathol Med 2013; **42**: 229-234.
- Gow NA, van de Veerdonk FL, Brown AJ y Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. Nat Rev Microbiol 2012; **10**:112-122.
- Gow NA y Hube B. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. Curr Opin Microbiol 2012; **15**:406–412
- Green CB, Cheng G, Chandra J, Mukherjee P, Ghannoum MA y Hoyer LL. RT-PCR detection of *Candida albicans* ALS gene expression in the reconstituted human epithelium (RHE) model of oral candidiasis and in model biofilms. Microbiology 2004; **150**: 267-75.
- Haag-Weber M, Dumann H y Hörl WH. Effect of malnutrition and uremia on impaired cellular host defence. Miner Electrolyte Metab 1992; **18**:174-85.
- Hauser AB, Stinghen AE, Kato S, Bucharles S, Aita C, Yuzawa Y y col. Characteristics and causes of immune dysfunction related to uremia and dialysis. Peritoneal Dialysis International, 2008; **28**: S183-S187.
- Herwald SE y Kumamoto CA. *Candida albicans* Niche Specialization: Features that distinguish biofilm cells from commensal cells. Curr Fungal Infect Rep 2014; **8**:179-184.
- Hiller E, Zavrel M, Hauser N, Sohn K, Burger-Kentischer A, Lemuth K y col. Adaptation, adhesion and invasion during interaction of *Candida albicans* with the host-focus on the function of cell wall proteins. Int J Med Microbiol 2011; **301**:384-389.
- Hostetter MK. Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. with epithelial and endothelial surfaces. Clin Microbiol Rev 1994; **7**:29-42.
- Hoyer LL y Cota E. *Candida albicans* agglutinin-like sequence (Als) family vignettes: a review of Als protein structure and function. Front Microbiol 2016; **7**: 1-16.

- Hoyer LL, Green CB, Oh SH y Zhao X. Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family a sticky pursuit. *Med Mycol* 2008; **46**:1-15.
- Hoyer LL y Hecht JE. The ALS5 gene of *Candida albicans* and analysis of the Als5p N- terminal domain. *Yeast* 2001; **18**: 49-60.
- Hoyer LL, Payne TL, Bell M., Myers AM y Scherer, S. *Candida albicans* ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family. *Current genetics* 1998; **33**: 451-459.
- Huang G. Regulation of phenotypic transitions in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Virulence* 2012; **3**: 251–261.
- Hube B. From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* 2004; **7**:336-41.
- Jain M, Shah R, Chandolia B, Mathur A, Chauhan Y, Chawda J y cols. The oral carriage of *Candida* in oral cancer patients of Indian origin undergoing radiotherapy and/or chemotherapy. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2016; **10**: ZC17–ZC20.
- Jha V, García-García G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B y cols. Chronic kidney disease: global dimensión and perspective. *Lancet* 2013; **382**: 260-272.
- Johnson CJ, Cabezas-Olcoz J, Kernien JF, Wang SX, Beebe DJ, Huttenlocher A y cols. The extracellular matrix of *Candida albicans* biofilms impairs formation of neutrophil extracellular traps. *PLoS Pathog.* 2016; **12**: e1005884
- Junqueira JC, Fuchs BB, Muhammed M, Coleman JJ, Suleiman JM, Vilela SF y col. Oral *Candida albicans* isolates from HIV-positive individuals have similar in vitro biofilm-forming ability and pathogenicity as invasive *Candida* isolates. *BMC Mmicrobiol* 2011; **11**: 1-9.
- Kato S, Chmielewski M, Honda H, Pecois-Filho R, Matsuo S, Yuzawa Y y cols. Aspects of immune dysfunction in end-stage renal disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; **3**: 1526-33.
- K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Kidney Disease Outcome Quality Initiative. Am J Kidney Dis.* 2002; **39**:S1-246.
- Kim J y Sudbery P. *Candida albicans* a major fungal pathogen. *J Microbiol* 2011; **49**: 171-177.
- Kuashik A, Reddy S, Umesh L, Devi B, Santana N, y Rakesh N. Oral and salivary changes among renal patients undergoing hemodialysis: a cross-sectional study. *Indian J Nephrol*, 2013; **23**: 125-29
- Kurokawa K, Nangaku M, Saito A, Inagi R y Miyata T. Current issues and future perspectives of chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2002; **13**: S3–S6
- Laforce-Nesbitt SS, Sullivan MA, Hoyer LL y Bliss JM. Inhibition of *Candida albicans* adhesion by recombinant human antibody single-chain variable fragment specific for Als3p. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 2008; **54**: 195-202.

- Lalla RV, Patton LL y Dongari-Bagtzoglou A. Oral candidiasis: pathogenesis, clinical presentation, diagnosis and treatment strategies. *Calif Dent Assoc.* 2013; **41**:263-8
- Levey AS y Coresh J. Chronic kidney disease. *Lancet* 2012; **379**: 165-180.
- Levey AS, Coresh J, Balk E, Kausz TA, Levin A, Steffes MW y cols. National Kidney Foundation Practice Guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann Intern Med* 2003; **139**: 137-147.
- Lim WH, Kireta S, Leedham E, Russ GR, Coates PT. Uremia impairs monocyte and monocyte-derived dendritic cell function in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2007; **72**:1138-48.
- Lin J, Oh SH, Jones R, Garnett JA, Salgado PS, Rusnakova S y cols. The Peptide-binding Cavity Is Essential for Als3-mediated Adhesion of *Candida albicans* to Human Cells. *J Biol Chem.* 2014; **289**: 18401–18412.
- Liu H. Co-regulation of pathogenesis with dimorphism and phenotypic switching in *Candida albicans*, a commensal and a pathogen. *Int J Med Microbiol* 2002; **292**: 299-311.
- Liu Y y Filler SG. *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin. *Eukaryot Cell* 2011; **10**: 168-173.
- López-Giacoman S y Madero M. Biomarkers in chronic kidney disease, from kidney function to kidney damage. *World J Nephrol* 2015; **4**: 57-73
- Mañas A, Cerezo L, de la Torre A, García M, Albuquerque H, Ludeña B y cols. Epidemiology and prevalence of oropharyngeal candidiasis in Spanish patients with head and neck tumors undergoing radiotherapy treatment alone or in combination with chemotherapy. *Clin Transl Oncol* 2012; **14**:740–746
- Marín E, Parra-Giraldo CM, Hernández-Haro C, Hernández ML, Nombela C, Monteoliva L y col. *Candida albicans* shaving to profile human serum proteins on hyphal surface. *Front Microbiol* 2015; **6**:1343.
- Mayer LF, Wilson D y Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* 2013; **4**: 119–128.
- Meguid El Nahas A, Bello AK. Chronic kidney disease: the global challenge. *Lancet.* 2005; **365**: 331-40.
- Méndez-Durán A, Méndez-Bueno JF, Tapia-Yáñez T, Montes AM y Aguilar-Sánchez L. Epidemiología de la insuficiencia renal crónica en México. *Diálisis y trasplante* 2010; **31**: 7-11.
- Monroy-Pérez E, Sáinz-Espuñes T, Paniagua-Contreras G, Negrete-Abascal E, Rodríguez-Moctezuma JR y Vaca S. Frequency and expression of ALS and HWP1 genotypes in *Candida albicans* strains isolated from Mexican patients suffering from vaginal candidosis. *Mycoses* 2012; **55**: e151–e157.
- Motta-Silva AC, Aleva NA, Chavasco JK, Armond MC, França JP y Pereira LJ. Erythematous oral candidiasis in patients with controlled type II diabetes mellitus and complete dentures. *Mycopathologia.* 2010; **169**: 215-23.

- Moyes LD, Richardson JP y Naglik JR. *Candida albicans*-epithelial interactions and pathogenicity mechanisms: scratching the surface. *Virulence* 2015; **6**: 338-346.
- Mulu A, Kassu A, Anagaw B, Moges B, Gelaw A, Alemayehu M y cols. Frequent detection of “azole” resistant *Candida* species among late presenting AIDS patients in northwest Ethiopia. *BMC Infect Dis.* 2013; **12**: 82.
- Murali P, Narasimhan M, Periasamy S y Harikrishnan A. A comparison of oral and dental manifestations in diabetic and non diabetic uremic patients receiving hemodialysis. *J Oral Maxillofac Pathol* 2012; **16**: 374-79.
- Murciano C, Moyes DL, Runglall M, Tobouti P, Islam A, Hoyer LL y cols. Evaluation of the role of *Candida albicans* agglutinin-like sequence (Als) proteins in human oral epithelial cell interactions. *PLoS One* 2012; **7**: e33362.
- Naglik JR y Moyes D. Epithelial cell innate response to *Candida albicans*. *Adv Dent Res* 2011; **23**: 50-55.
- Naglik JR, Moyes DL, Wächtler B y Hube B. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes Infect* 2011; **13**: 963-976.
- Naglik JR, Richardson JP y Moyes DL. *Candida albicans* pathogenicity and epithelial immunity. *PLoS Pathog* 2014; **10**: e1004257.
- Nailis H, Kucharíková S, Rídicová M, Van Dijck P, Deforce D, Nelis H, y cols. Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and -independent gene expression. *BMC Microbiol* 2010; **10** 1-11.
- Nasution AI. Virulence factor and pathogenicity of *Candida albicans* in oral candidiasis. *World J Dent* 2013; **4**: 267-271.
- Negroni M, González MI, Levin B, Cuesta A y Iovanniti C. *Candida* carriage in the oral mucosa of a student population: adhesiveness of the strains and predisposing factors. *Rev Argent Microbiol.* 2002; 34:22-8.
- Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ y Gow NA. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol* 2008; **6**: 67-78.
- Nobile CJ, Schneider HA, Nett JE, Sheppard DC, Filler SG, Andes DR y col. Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. *Curr Biol.* 2008; **18**: 1017-24
- Nobile CJ y Mitchell AP. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cell Microbiol.* 2006; **8**: 1382-91.
- Noshad H, Argani H, Nezami N, Ghojazadeh M, Zomorodi A, Bohlouli A y cols. Arterial atherosclerosis in patients with chronic kidney disease and its relationship with serum and tissue endothelin-1. *Iran J Kidney Dis.* 2009; **3**: 203-9.
- Odds FC, Brown AJ y Gow NA. *Candida albicans* genome sequence: a platform for genomics in the absence of genetics. *Genome Biol* 2004; **5**: 230.

- Ortíz A, Covic A, Fliser D, Fouque D, Goldsmith D, Kanbay M y cols. Epidemiology, contributors to, and clinical trials of mortality risk in chronic kidney failure. *Lancet* 2014; **383**: 1831-1843.
- Owotade FJ y Patel M. Virulence of oral *Candida* isolated from HIV-positive women with oral candidiasis and asymptomatic carriers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2014; **118**: 455-460
- Oyetola EO, Owotade FJ, Agbelusi GA, Fatusi OA y Sanusi AA. Oral findings in chronic kidney disease: implications for management in developing countries. *BMC oral health* 2015; **15**: 1-8.
- Pallavan B, Ramesh V, Dhanasekaran BP, Oza N, Indu S y Govindarajan V. Comparison and correlation of candidal colonization in diabetic patients and normal individuals. *J Diabetes Metab Disord* 2014; **13**: 66.
- Paniagua-Contreras GL, Monroy-Pérez E, Pineda-Olvera J, Negrete-Abascal E y Vaca-Pacheco S. Caracterización genotípica de cepas de *Candida albicans* aisladas de la mucosa oral y vaginal de pacientes no inmunocomprometidos. *Rev Med Hosp Gen Mex* 2010; **73**: 94-101.
- Paniagua R, Ramos A, Fabian R, Lagunas J y Amato D. Chronic kidney disease and dialysis in Mexico. *Perit Dial Int.* 2007; **27**:405-9.
- Patil S, Rao RS, Majumdar B y Anil S. Clinical appearance of oral *Candida* Infection and therapeutic strategies. *Front Microbiol* 2015; **6**:1391.
- Pérez-Martínez J, Llamas-Fuentes F y Legido A. Insuficiencia renal crónica: revisión y tratamiento conservador. *Archivos de Medicina* 2005; **01**: 1-10.
- Pérez JC, Kumamoto CA y Johnson AD. *Candida albicans* commensalism and pathogenicity are intertwined traits directed by a tightly knit transcriptional regulatory circuit. *PLoS Biol* 2013; **11**: e1001510.
- Phan Q.T., Myers C.L., Fu Y., Sheppard D.C., Yeaman M.R., Welch W.H. y cols. Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLoS Biol* 2007; **5**: e64.
- Perialisi N, de Souza Bonfim-Mendonça P, Negri M, Jarros IC y Svidzinski, T. Tongue coating frequency and its colonization by yeasts in chronic kidney disease patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2016; **35**: 1455-1462
- Perialisi, N., Godoy, J., Yamada, S., Santana, R. y Svidzinski, T. Oral lesions and colonization by yeasts in hemodialysis patients. *J Oral Pathol Med* 2014; **44**: 585-590.
- Plantinga, LC, Crews DC, Coresh J, Miller III ER, Saran R, Yee, J y cols. Prevalence of chronic kidney disease in US adults with undiagnosed diabetes or prediabetes. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol* 2010; **5**: 673–682
- Premkumar J, Ramani P, Chandrasekar T, Natesan A y Premkumar P. Detection of species diversity in oral *Candida* colonization and anti-fungal susceptibility among non-oral habit adult diabetic patients. *J Nat Sci Biol Med* 2014; **5**:148-154.
- Poulain D y Jouault T. *Candida albicans* cell wall glycans, host receptors and responses: elements for a decisive crosstalk. *Curr Opin Microbiol* 2004; **7**:342-349.

- Ramage G, Vandewalle K, Wickes BL y López-Ribot JL. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. Rev Iberoam Micol. 2001;18:163-70.
- Ramage G, Rajendran R, Sherry L y Williams C. Fungal biofilm resistance. Int J Microbiol 2012; **12**: 1-14.
- Ramla S, Sharma V y Patel M. Influence of cancer treatment on the *Candida albicans* isolated from the oral cavities of cancer patients. Support Care Cancer 2015; **15**: 3035-3038.
- Rautemaa R. y Ramage G. Oral candidosis – Clinical challenges of a biofilm disease. Crit Rev Microbiol 2011; **37**: 328-336.
- Richardson JP y Moyes DL. Adaptive immune responses to *Candida albicans* infection. Virulence 2015; **6**: 327-337.
- Rojas-Campos E, Herrera-Llamas R, Montañez-Fernández JL, Martínez-Martínez P, Andrade-Sierra J, Ávila-Baray AA y col. Vascular calcification in Mexican hemodialysis patients. Arch Med Res 2013; **44**: 628-632.
- Roudbarmohammadi S, Roudbary M, Bakhshi B, Katirae F, Mohammadi R y Falahati M. ALS1 and ALS3 gene expression and biofilm formation in *Candida albicans* isolated from vulvovaginal candidiasis. Adv Biomed Res 2016; **5**, 1-6.
- Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L y cols. *Candida*-associated denture stomatitis. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2011; **16**: e139-43.
- Salvatori O, Puri S, Tati S y Edgerton M. Innate immunity and saliva in *Candida albicans*-mediated oral diseases. J Dent Res 2016; **95**: 365-371.
- Samaranayake L. Oral *Candida* in health and disease. Oral Oncology 2013; 49: S1–S3
- Sánchez-Vargas LO, Estrada-Barraza D, Pozos-Guillen AJ y Rivas-Caceres R. Biofilm formation by oral clinical isolates of *Candida* species. Arch Oral Biol 2013; **58**: 1318-1326.
- Sánchez-Vargas LO, Ortiz LNG, Villar M, Moragues MD, Aguirre JM, Cashat CM y cols. Point prevalence, microbiology and antifungal susceptibility patterns of oral *Candida* isolates colonizing or infecting Mexicans HIV/AIDS patients and healthy persons. Rev Iberoam Micol 2005; **22**: 83-92.
- Sandilands EA, Dhaun N, Dear JW y Webb DJ. Measurement of renal function in patients with chronic kidney disease. Br J Clin Pharmacol. 2013; **76**:504-15.
- Schelenz S, Abdallah S, Gray G, Stubbings H, Gow I, Baker P y col. Epidemiology of oral yeast colonization and infection in patients with hematological malignancies, head neck and solid tumors. J Oral Pathol Med. 2011; **40**: 83-9
- Selmecki A, Forche A y Berman J. Genomic plasticity of the human fungal pathogen *Candida albicans*. Eukaryot Cell 2010; **9**:991-1008.
- Sellam A, Al-Niemi T, McInnerney K, Brumfield S, Nantel A y Suci PA. A *Candida albicans* early stage biofilm detachment event in rich medium. BMC Microbiol. 2009; **9**: 25.

- Shenghan Lai. Chronic kidney disease and diabetes—a potential causal link. *E Bio Medicine* 2016; **6**: 10–11
- Shenoy MP, Puranik RS, Vanaki SS, Puranik SR, Shetty P y Shenoy R. A comparative study of oral candidal species carriage in patients with type1 and type2 diabetes mellitus. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2014; **18**:60-65.
- Sheppard DC, Yeaman MR, Welch WH, Phan QT, Fu Y, Ibrahim AS y cols. Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. *J Biol Chem.* 2004; **279**: 30840–30849.
- Singh A, Verma R, Murari A y Agrawal A. Oral candidiasis: an overview. *J Oral Maxillofac Pathol* 2014; **18**: 81-85.
- Slee AD. Exploring metabolic dysfunction in chronic kidney disease. *Nutrition & metabolism* 2012; **9**: 1-16.
- Soll DR. *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Acta Trop* 2002; **81**: 101-110.
- Spellberg BJ, Ibrahim AS, Avanesian V, Fu Y, Myers C, Phan QT y cols. Efficacy of the Anti-*Candida* rAls3p-N or rAls1p-N Vaccines against Disseminated and Mucosal Candidiasis. *J Infect Dis* 2006; **194**: 256-260.
- Sturtevant J y Calderone R. *Candida albicans* adhesins: biochemical aspects and virulence. *Rev Iberoam Micol* 1997; **14**:90-7.
- Su-Hernández L, Abascal-Macías A, Méndez-Bueno FJ, Paniagua R y Amato, D. Epidemiologic and demographic aspects of peritoneal dialysis in Mexico. *Perit Dial Int* 1996; **16**: 362-365.
- Suárez BL, Álvarez MI, de Bernal M y Collazos A. *Candida* species and other yeasts in the oral cavities of type 2 diabetic patients in Cali, Colombia. *Colomb Med* 2013; **44**:26-30.
- Sun, L, Liao, K y Wang, D. Effects of magnolol and honokiol on adhesion, yeast-hyphal transition, and formation of biofilm by *Candida albicans*. *PloS one* 2015; **10**: e0117695.
- Swako K, Chmielewski M, Honda H, Pecotis-Filho R, Matsuo S, Yuzawa Y y cols. Aspects of Immune Dysfunction in End-stage Renal Disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; **3**: 1526-1533.
- Swapna AL, Reddy SR, Ramesh T, Reddy LR, Vijayalaxmi N, Karmakar y col. *J Clin Diagn Res* 2013; **7**: 2047-2050.
- Tadakamadla J, Kumar S y Mamatha GP. Comparative evaluation of oral health status of chronic kidney disease (CKD) patients in various stages and healthy controls. *Spec Care Dentist* 2014; **34**: 122-126.
- The *Candida albicans* physical map website <https://cbs.umn.edu/candida-albicans/home>

- Theberge S, Semlali A, Alamri A, Leung KP y Rouabhia M. *C. albicans* growth, transition, biofilm formation, and gene expression modulation by antimicrobial decapeptide KSL-W. BMC Microbiol 2013; **13**: 1-14.
- Thompson DS, Carlisle PL y Kadosh D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. Eukaryot Cell 2011; **10**:1173-1182.
- Thorman R, Neovius M y Hylander B. Clinical findings in oral health during progression of chronic kidney disease to end-stage renal disease in a Swedish population. Scand J Urol Nephrol. 2009; **43**:154-9.
- Tooyama H, Matsumoto T, Hayashi K, Kurashina K, Kurita H, Uchida M y cols. *Candida* concentrations determined following concentrated oral rinse culture reflect clinical oral signs BMC Oral Health 2015; **15**: 1-8.
- Tournu H y Van Dijck P. *Candida* Biofilms and the host: models and new concepts for eradication. International Journal of Microbiology 2012; **2012**: 845352.
- Van het Hoog M, Rast TJ, Martchenko M, Grindle S, Dignard D, Hogues H y cols. Assembly of the *Candida albicans* genome into sixteen supercontigs aligned on the eight chromosomes. Genome Biol. 2007;8:R52.
- Wächtler B, Citiulo F, Jablonowski N, Förster S, Dalle F y cols. *Candida albicans*-epithelial interactions: dissecting the roles of active penetration, induced endocytosis and host factors on the infection process. PLoS ONE 2012; **7**: e36952.
- Wächtler B, Wilson D, Haedicke K, Dalle F y Hube B. From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. PLoS ONE 2011; **6**: e17046.
- Williams D y Lewis M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. J Oral Microbiol 2011; **3**: 1-11.
- Wilson D, Mayer FL, Miramón P, Citiulo F, Slesiona S, Jacobsen ID y col. Distinct roles of *Candida albicans*-specific genes in host-pathogen interactions. Eukaryot Cell 2014; **13**:977-989.
- Wilson D, Thewes S, Zakikhany K, Fradin C, Albrecht A, Almeida R y cols. Identifying infection-associated genes of *Candida albicans* in the postgenomic era. FEMS Yeast Res 2009; **9**: 688-700.
- Yang L, Chang S y Haoping L. Genomic plasticity of the human fungal pathogen *Candida albicans*. Trends Microbiol 2014; **22**: 707-714.
- Yang W, Yan L, Wu C, Zhao X y Tang J. Fungal invasión of epithelial cells. Microbiol Res 2014; **169**: 803-810.
- Zakikhany K, Naglik JR, Schmidt- Westhausen A, Holland G, Schaller M y Hube B. In vivo transcript profiling of *Candida albicans* identifies a gene essential for interepithelial dissemination. Cellular microbiology 2007; **9**: 2938-2954.
- Zhang QL y Rothenbacher D. Prevalence of chronic kidney disease in population-based studies: systematic review. BMC Public Health 2008; **8**: 117.

- Zhao X, Oh SH, Cheng G, Green CB, Nuessen JA, Yeater K y cols. ALS3 and ALS8 represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. *Microbiology* 2004; **150**: 2415–2428.
- Zomorodian K, Kavosi F, Pishdad G.R., Mehriar P, Ebrahimi H, Bandegani A, Pakshir K. Prevalence of oral *Candida* colonization in patients with diabetes mellitus. *J Mycol Med* 2016; **26**:103-110.

13. Anexos

ANEXO I. Ficha de recolección de datos

Comparación de la expresión del gen ALS3, filamentación y formación de biopelícula en aislamientos de *C. albicans* que colonizan o infectan la mucosa bucal de pacientes con enfermedad renal crónica en diálisis.

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

N° de expediente:		Fecha:	/ /	FOLIO:	
I) Datos de identificación:					
Nombre/s y Apellido/s:		Sexo:		Edad:	años
Fecha de nacimiento:	/ /	Peso:		Talla:	IMC:
II) Datos Demográficos:					
Estado civil:		Ocupación:		Escolaridad:	Años de estudio (total):
III) Antecedentes de la enfermedad renal crónica (ERC)					
Causa de la ERC: *Clasificación USRDS		*Diabetes Mellitus:	Tipo:	Tiempo de evolución:	
Tipo de diálisis:		Tiempo de diálisis:	meses		
IV) Hábitos					
Tabaco:		Cantidad:		Frecuencia:	
V) Datos de laboratorio:					
Fecha: / /	Glucosa:	Urea:	Creatinina:	Proteínas Totales:	
	Albúmina:	Hemoglobina:	Leucocitos Totales:		
	Linfocitos: %	Hematocrito:			
VI) Examen de la mucosa bucal:					
Portador de prótesis bucal:		Tipo:	Localización:		
Lesión sugestiva de candidosis bucal:		Tipo:	Localización:		
VII) Diagnóstico:					
Citología exfoliativa:		Registro N°:	Resultado:		
VIII) Antecedentes de tratamiento antibiótico y antimicótico:					
Recibió tratamiento antibiótico:		Tiempo de uso:			
Recibió tratamiento antimicótico:		Tiempo de uso:			

IX) Datos microbiológicos				
Fecha: / /	Registro N°		Crecimiento 24 hs:	Especie de <i>Candida</i> :
			Crecimiento 48 hs:	
X) Datos fenotípicos:				
Formación de biopelícula	DO 490nm	UFC Log ₁₀ Cels/ml	Código	
Capacidad de filamentación				
XI) Datos genotípicos:				
Expresión de ALS3				

	Variable	Codificación		
I	Sexo	Masculino=1 Femenino=2		
II	Estado civil	Soltero/a= 1 Casado/a=2 Separado/a= 3 Divorciado/a=4 Viudo/a= 5 Unión libre=6 No hay datos= 7		
II	Ocupación	Hogar =1 Estudiante=2 Oficio= 3 (campesino, albañil, carpintero, obrero, chofer, secretaria, plomero, dependiente de tienda, dependiente de oficina, jardinero) Profesor= 4 Profesionista=5 (licenciatura de cualquier carrera) Pensionado= 6 Desempleado=7		
II	Escolaridad	Analfabeto/a=1 Primaria (completa e incompleta)= 2 Secundaria (completa, incompleta e instrucción técnica)= 3 Bachillerato o Preparatoria= 4 Licenciatura=5		
III	Causa de la ERC	Nefropatía diabética=1 Hipertensión arterial=2 Glomerulonefritis crónica= 3 Enfermedad renal poliúística=4 Enfermedad urológica=5 Otra causa conocida= 6 Causa desconocida=7 Dato faltante= 8 *Clasificación USRDS		
III	Tipo de diálisis	Diálisis peritoneal=1 Hemodiálisis=2		
IV	Hábitos (Tabaco)	No=0 Fumador=1 Ex fumador=2		
VI	Portador de prótesis bucal	No= 0 Si= 1		
VI	Tipo de prótesis bucal	Total=1 Parcial=2		
VI	Localización de prótesis bucal	Superior=1 Inferior=2 Superior e inferior=3		
VI	Lesión sugestiva de candidosis bucal	No= 0 Si= 1		
VI	Tipo de candidosis bucal	Candidosis eritematosa= 1 Candidosis asociada a prótesis =2 Candidosis pseudomembranosa=3 Queilitis angular=4		
VI	Localización de candidosis bucal	Dorso de lengua= 1 Paladar=2 Comisuras bucales=3 Mucosa vestibular=4		
VII	Citología exfoliativa	No= 0 Si= 1		
VII	Recibió tratamiento ATB	No= 0 Si= 1		
VII	Recibió tratamiento antimicótico	No= 0 Si= 1		
X	Formación de biopelícula	DO 490nm	UFC Log ₁₀ Cels/ml	Código
	No produce	≤ 0.10	< 0.1 x 10 ⁸	0
	Ligeramente productora	0.11 - 0.40	0.1-0.75 x 10 ⁸	1
	Moderadamente productora	0.41 - 0.74	0.76-2 x 10 ⁸	2
	Altamente productora	≥ 0.75	>2 x 10 ⁸	3
X	Capacidad de filamentación	No= 0 Si= 1		
XI	Expresión de ALS3	No= 0 Si= 1		

ANEXO II. Cuantificación de ARNm Nanodrop® y cálculo de volumen para obtener ADNc de cada muestra.

Muestra		ARN óptimo			
#	ID	ARN	Unidades	260/280 (1.6-2.0)	Volumen/μl
01	MJ03	179,7	ng/μl	1,83	5,6
02	MJ04	181,6	ng/μl	1,92	5,5
03	MJ05	140,2	ng/μl	1,73	7,1
04	MJ07	116,7	ng/μl	1,94	8,6
05	MJ18	84,3	ng/μl	1,74	11,9
06	MJ36	195,4	ng/μl	1,86	5,1
07	MJ53	56,9	ng/μl	1,83	17,6
08	MJ59	195,9	ng/μl	1,86	5,1
09	MJ61	140,9	ng/μl	1,74	7,1
10	MJ67	23,3	ng/μl	1,74	42,9
11	MJ72	84,3	ng/μl	1,8	11,9
12	IRC07	86,1	ng/μl	1,89	11,6
13	IRC11	50	ng/μl	1,87	20,0
14	IRC12	107,9	ng/μl	1,89	9,3
15	IRC15	55,1	ng/μl	1,67	18,1
16	IRC20	196	ng/μl	1,62	5,1
17	IRC33	71,1	ng/μl	1,72	14,1
18	IRC36	-	ng/μl	-	-
19	IRC50	40,1	ng/μl	1,57	24,9
20	IRC58	165,4	ng/μl	1,91	6,0
21	IRC77	64,4	ng/μl	1,72	15,5
22	KDG11	30,8	ng/μl	1,72	32,5
23	KDG13	-	ng/μl	-	-
24	KDG16	123,1	ng/μl	1,76	8,1
25	ATCC	346,7	ng/μl	1,76	2,9
26	MJ02	196,3	ng/μl	1,85	5,1
27	MJ08	313,3	ng/μl	1,91	3,2

Muestra		ARN óptimo			
#	ID	ARN	Unidades	260/280 (1.6-2.0)	Volumen/ μ l
28	MJ12	189,3	ng/ μ l	1,86	5,3
29	MJ14	161,6	ng/ μ l	1,83	6,2
30	MJ15	82,9	ng/ μ l	1,8	12,1
31	MJ19	233,1	ng/ μ l	1,67	4,3
32	MJ20	246	ng/ μ l	1,84	4,1
33	MJ21	263,7	ng/ μ l	1,86	3,8
34	MJ22	172,4	ng/ μ l	1,79	5,8
35	MJ25	425	ng/ μ l	1,71	2,4
36	MJ38	119,4	ng/ μ l	1,84	8,4
37	MJ39	135,4	ng/ μ l	2,26	7,4
38	MJ41	144,4	ng/ μ l	1,76	6,9
39	MJ43	301,2	ng/ μ l	1,94	3,3
40	MJ44	151	ng/ μ l	1,7	6,6
41	MJ45	83,6	ng/ μ l	1,71	12,0
42	MJ46	293,3	ng/ μ l	1,88	3,4
43	MJ47	69,5	ng/ μ l	1,8	14,4
44	MJ48	58,3	ng/ μ l	1,78	17,2
45	MJ55	218,8	ng/ μ l	1,79	4,6
46	MJ62	40,6	ng/ μ l	1,67	24,6
47	IRC43	233,2	ng/ μ l	1,89	4,3
48	MJ63	310,9	ng/ μ l	1,84	3,2
49	MJ74	174,6	ng/ μ l	1,69	5,7
50	IRC05	439,2	ng/ μ l	1,81	2,3
51	IRC10	556,2	ng/ μ l	1,76	1,8
52	IRC16	170,5	ng/ μ l	1,85	5,9
53	IRC18	599,5	ng/ μ l	1,85	1,7
54	IRC21	299,2	ng/ μ l	1,91	3,3
55	IRC26	310,5	ng/ μ l	1,84	3,2
56	IRC28	132	ng/ μ l	1,79	7,6

Muestra		ARN óptimo			
#	ID	ARN	Unidades	260/280 (1.6-2.0)	Volumen/ μ l
57	IRC30	117,5	ng/ μ l	1,71	8,5
58	IRC32	71,3	ng/ μ l	1,73	14,0
59	IRC37	137,4	ng/ μ l	1,79	7,3
60	IRC40	81,1	ng/ μ l	1,75	12,3
61	IRC52	132,1	ng/ μ l	1,86	7,6
62	IRC62	219,4	ng/ μ l	1,87	4,6
63	IRC78	132,1	ng/ μ l	1,81	7,6
64	IRC80	95,1	ng/ μ l	1,74	10,5
65	IRC84	534,9	ng/ μ l	1,92	1,9
66	KDG05	93,7	ng/ μ l	1,63	10,7
67	KDG10	361,6	ng/ μ l	1,94	2,8
68	MJ56	98,1	ng/ μ l	1,76	10,2
69	MJ68	53	ng/ μ l	2,15	18,9

ANEXO III. Cuantificación de ADNc mediante Nanodrop® y cálculo de volumen para obtener concentración de 100 µl para cada muestra

#	Muestra ID	ADN	Unidades	ADNc óptimo 260/280 (1.6-2.0)	Volumen de ADNc	Volumen de H ₂ O DEPC
01	MJ03	1856,4	ng/µl	1,78	5,4	94,6
02	MJ04	1710,1	ng/µl	1,79	5,8	94,2
03	MJ05	1636,2	ng/µl	1,79	6,1	93,9
04	MJ07	1505,9	ng/µl	1,81	6,6	93,4
05	MJ18	1106,1	ng/µl	1,82	9,0	91,0
06	MJ36	1816	ng/µl	1,79	5,5	94,5
07	MJ53	1040,1	ng/µl	1,82	9,6	90,4
08	MJ59	1812,8	ng/µl	1,79	5,5	94,5
09	MJ61	1674,6	ng/µl	1,79	6,0	94,0
10	MJ67	2290,1	ng/µl	1,82	4,4	95,6
11	MJ72	1324,4	ng/µl	1,82	7,6	92,4
12	IRC07	1478,6	ng/µl	1,81	6,8	93,2
13	IRC11	645,8	ng/µl	1,84	15,5	84,5
14	IRC12	1428	ng/µl	1,81	7,0	93,0
15	IRC15	888,7	ng/µl	1,82	11,3	88,7
16	IRC20	1794,1	ng/µl	1,79	5,6	94,4
17	IRC33	1224,1	ng/µl	1,82	8,2	91,8
19	IRC50	847	ng/µl	1,79	11,8	88,2
20	IRC58	1743,5	ng/µl	1,79	5,7	94,3
21	IRC77	1069,5	ng/µl	1,81	9,4	90,6
22	KDG11	947,8	ng/µl	1,82	10,6	89,4
24	KDG16	1436,9	ng/µl	1,8	7,0	93,0
25	ATCC	1935,2	ng/µl	1,77	5,2	94,8
26	MJ02	1760,9	ng/µl	1,79	5,7	94,3
27	MJ08	2190,1	ng/µl	1,83	4,6	95,4
28	MJ12	1747,6	ng/µl	1,79	5,7	94,3
29	MJ14	1669,6	ng/µl	1,8	6,0	94,0

#	Muestra		Unidades	ADNc óptimo	Volumen	Volumen
	ID	ADN		260/280 (1.6-2.0)	de ADNc	de H ₂ O DEPC
30	MJ15	1359,7	ng/μl	1,81	7,4	92,6
31	MJ19	1853,4	ng/μl	1,78	5,4	94,6
32	MJ20	1900,3	ng/μl	1,76	5,3	94,7
33	MJ21	1846,3	ng/μl	1,77	5,4	94,6
34	MJ22	1655,2	ng/μl	1,79	6,0	94,0
35	MJ25	2315,8	ng/μl	1,82	4,3	95,7
36	MJ38	1509,8	ng/μl	1,8	6,6	93,4
37	MJ39	1535,9	ng/μl	1,81	6,5	93,5
38	MJ41	1580,2	ng/μl	1,79	6,3	93,7
39	MJ43	2115,5	ng/μl	1,84	4,7	95,3
40	MJ44	1603,9	ng/μl	1,8	6,2	93,8
41	MJ45	1216,3	ng/μl	1,81	8,2	91,8
42	MJ46	2116,3	ng/μl	1,82	4,7	95,3
43	MJ47	1097	ng/μl	1,82	9,1	90,9
44	MJ48	1040,8	ng/μl	1,82	9,6	90,4
45	MJ55	1831,6	ng/μl	1,78	5,5	94,5
46	MJ62	1341	ng/μl	1,81	7,5	92,5
47	IRC43	2194,1	ng/μl	1,82	4,6	95,4
48	MJ63	2099,2	ng/μl	1,82	4,8	95,2
49	MJ74	1621,8	ng/μl	1,8	6,2	93,8
50	IRC05	2296,8	ng/μl	1,81	4,4	95,6
51	IRC10	2412,5	ng/μl	1,82	4,1	95,9
52	IRC16	1658	ng/μl	1,81	6,0	94,0
53	IRC18	2462,9	ng/μl	1,82	4,1	95,9
54	IRC21	2191,3	ng/μl	1,82	4,6	95,4
55	IRC26	2191,2	ng/μl	1,81	4,6	95,4
56	IRC28	1513,3	ng/μl	1,81	6,6	93,4
57	IRC30	1327,4	ng/μl	1,8	7,5	92,5

#	Muestra		Unidades	ADNc óptimo	Volumen	Volumen
	ID	ADN		260/280 (1.6-2.0)	de ADNc	de H ₂ O DEPC
58	IRC32	1252,7	ng/μl	1,82	8,0	92,0
59	IRC37	1507,5	ng/μl	1,81	6,6	93,4
60	IRC40	1214,5	ng/μl	1,82	8,2	91,8
61	IRC52	1484,1	ng/μl	1,81	6,7	93,3
62	IRC62	1805,9	ng/μl	1,77	5,5	94,5
63	IRC78	1533,1	ng/μl	1,8	6,5	93,5
64	IRC80	1327,8	ng/μl	1,81	7,5	92,5
65	IRC84	2389,6	ng/μl	1,82	4,2	95,8
66	KDG05	1433,3	ng/μl	1,78	7,0	93,0
67	KDG10	2226,7	ng/μl	1,82	4,5	95,5
68	MJ56	1449,2	ng/μl	1,81	6,9	93,1
69	MJ68	981,8	ng/μl	1,83	10,2	89,8

ANEXO IV. Expresión relativa del gen ALS3 en 66 aislamientos de *C. albicans* en grupos infectados y colonizados.

Infectados (n=25)		Colonizados (n=41)	
Muestra	Cuantificación relativa	Muestra	Cuantificación relativa
<i>ATCC</i>	1,00	<i>ATCC</i>	1,00
<i>1</i>	3,549	<i>26</i>	0,703
<i>2</i>	4,095	<i>27</i>	5,369
<i>3</i>	13,612	<i>28</i>	0,785
<i>4</i>	45,474	<i>29</i>	0,349
<i>5</i>	172,125	<i>30</i>	0,177
<i>6</i>	32,137	<i>31</i>	0,140
<i>7</i>	4,241	<i>32</i>	0,085
<i>8</i>	10,081	<i>33</i>	0,062
<i>9</i>	5,615	<i>34</i>	0,069
<i>10</i>	2,099	<i>35</i>	0,050
<i>11</i>	0,428	<i>36</i>	0,314
<i>12</i>	11,962	<i>37</i>	0,269
<i>13</i>	3,309	<i>38</i>	0,201
<i>14</i>	2,624	<i>39</i>	0,370
<i>15</i>	2,238	<i>40</i>	0,237
		<i>41</i>	0,281
		<i>42</i>	0,472
		<i>43</i>	0,438
		<i>44</i>	0,622
		<i>45</i>	1,938
		<i>68</i>	11,480

Infectados		Colonizados	
(n=25)		(n=41)	
Muestras	Cuantificación relativa	Muestras	Cuantificación relativa
<i>ATCC</i>	1,00	<i>ATCC</i>	1,00
<i>16</i>	0,826	<i>46</i>	1,118
<i>17</i>	1,154	<i>48</i>	0,818
<i>19</i>	4,030	<i>49</i>	0,755
<i>20</i>	2,808	<i>50</i>	0,253
<i>21</i>	1,736	<i>51</i>	0,093
<i>22</i>	1,414	<i>52</i>	0,315
<i>44</i>	0,645	<i>53</i>	0,567
<i>47</i>	2,195	<i>54</i>	0,438
<i>67</i>	10,696	<i>55</i>	0,672
<i>69</i>	19,114	<i>56</i>	0,262
		<i>57</i>	0,144
		<i>58</i>	0,230
		<i>59</i>	1,920
		<i>60</i>	0,754
		<i>61</i>	1,150
		<i>62</i>	1,059
		<i>63</i>	1,743
		<i>64</i>	9,965
		<i>65</i>	0,715
		<i>66</i>	2,194