



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

## SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Expresión de genes *SAP*  
(codificantes  
de aspartil proteasas) de *Candida  
dubliniensis* en diferentes condiciones  
fisiológicas y durante la infección  
experimental de queratinocitos.

**T E S I S**

Que para obtener el grado de:  
Doctor en Ciencias Quimicobiológicas

Presenta:

**María Salomé Loaiza Loeza**

Directoras de Tesis:

Dra. Lourdes Villa Tanaca  
Dra. Berenice Illades Aguiar



Mexico D. F., diciembre de 2008

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética Microbiana y en el Laboratorio de Microbiología General del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN bajo la dirección de la Dra. Ma. Lourdes Villa Tanaca y de la Dra. Berenice Illades Aguiar.

Esta Tesis se llevó a cabo con el apoyo de CONACyT (14299 y 69984) y SIP-IPN (2007-0248 y 2008-2350)

La sustentante recibió becas del Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI-IPN) 2005 y de la Secretaría de Educación Pública, Subsecretaría de Educación Superior e investigación Científica, Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP UAGRO-156) 2006-2008

## CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ii
ABREVIATURAS.....	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
Generalidades de <i>Candida</i> y candidosis .....	1
Antecedentes.....	15
Justificación .....	23
Objetivos.....	24
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
III. RESULTADOS.....	37
IV. DISCUSIÓN.....	55
V. CONCLUSIONES.....	61
VI. PROSPECTIVAS.....	62
VII. REFERENCIAS .....	63
VI. ANEXOS.....	75

## CUADROS

Cuadro 1. Especies de *Candida* no *C. albicans* de importancia médica comúnmente encontradas.

Cuadro 2. Principales atributos de virulencia de *C. albicans*.

Cuadro 3. Comparación de algunas características genotípicas y fenotípicas de *C. albicans* y *C. dubliniensis*.

Cuadro 4. Comparación de la homología de las secuencias de aminoácidos de genes representativos de *C. albicans* y *C. dubliniensis*.

Cuadro 5. Resumen de casos de infecciones invasivas causadas por *C. dubliniensis* en un centro oncológico de Nueva York.

Cuadro 6. Oligonucleótidos iniciadores usados en las reacciones de PCR.

Cuadro 7. Comparación de genes *SAP* de *C. dubliniensis* y *C. albicans* y principales características de las proteínas deducidas.

## FIGURAS

Fig 1. Dendrograma de la familia de isoenzimas Sap de *C. albicans*, basado en la de secuencias de aminoácidos.

Fig. 2. Sitio catalítico y región circundante de pepsina porcina.

Fig 3 Estructura deducida de la proteinasa Sap1 con elementos y motivos establecidos en todas las Sap.

Fig. 4. Procesamiento y secreción de Sap's vía el mapa de secreción y sus rangos de pH óptimos.

Fig. 5. Árbol filogenético generado a partir del alineamiento de las secuencias de genes de rRNA pequeño de *C. dubliniensis* CD36 y otras especies de *Candida*.

Fig. 6. Alineamiento de secuencias deducidas de proteínas Sap de *Candida* spp.

Fig. 7. Relación filogenética de los genes *SAP* de *Candida* spp.

Fig. 8. Matriz de similitud e identidad de las proteínas deducidas de los genes *SAP* de *C. dubliniensis* y *C. albicans*.

Fig. 9. Expresión de genes *CdSAP1-4* de *C. dubliniensis* durante las diferentes fases de crecimiento.

Fig. 10. Expresión de los genes *CdSAP1-4* de *C. dubliniensis* en medio YNB con diferentes fuentes de nitrógeno y durante la formación de pseudomicelio.

Fig. 11. Efecto del pH en la expresión de los genes *CdSAP1-4* de *C. dubliniensis* en medio YCB-BSA a 37°C.

Fig. 12. Expresión de genes *CdSAP1-4* de *C. dubliniensis* durante el dimorfismo en medio de Lee-FCS a pH 6.7 y a 37°C y durante la infección de un cultivo de queratinocitos de la línea celular HaCaT con *C. dubliniensis*.

Fig. 13. Imágenes digitales del efecto de la pepstatina (un inhibidor de aspartil proteasas) en la infección de queratinocitos humanos de la línea celular HaCaT con *C. dubliniensis*.

**ABREVIATURAS**

DNAsa	Desoxiribonucleasa
ORF	Porción del genoma que puede codificar potencialmente en su secuencia de bases a una proteína
RT	Reacción de transcripción reversa
SAP	Gen codificante de aspartil proteinasa secretada
Sap	Aspartil proteinasa secretada
YPD	Medio extracto de levadura, dextrosa y peptona
YNB	Base nitrogenada para levaduras (Yeast nitrogen base)
YCB	Base carbonada para levaduras (Yeast carbon base)
PBS	Amortiguador de fosfatos y solución salina
DMEM	Medio de Dulbecco modificado
SFB	Suero fetal bovino
EDTA	Etilendiamino tetracetato de sodio
BSA	Albúmina sérica bovina
UFC	Unidades formadoras de colonias
ATCC	American Type Culture Collection
DMEM	Medio de Dulbecco modificado
CNCA	<i>Candida</i> no <i>Candida albicans</i>
IVET	In vivo expresión technology
RFLP	Fragmentos de restricción largos polimórficos
RAPD	DNA polimórfico amplificado al azar
MLEE	Electroforesis de multilocus enzimáticos

## RESUMEN

En este trabajo se reporta por primera vez la expresión de cuatro genes putativos codificantes de aspartil proteasas secretadas de *Candida dubliniensis* (*CdSAP1-4*). Se clonaron los genes *CdSAP1* y *CdSAP3* utilizando iniciadores degenerados y junto con los genes reportados en las bases de datos (*CdSAP2* y *CdSAP4*) se estudió la regulación de la expresión de estos cuatro genes a nivel transcripcional bajo diferentes condiciones *in vitro*. También fueron reconocidos en el genoma de *C. dubliniensis* los genes ortólogos de *C. albicans* *CdSAP7*, *CdSAP8*, *CdSAP9*, and *CdSAP10*.

La expresión de los genes *CdSAP1* y *CdSAP2* fue independiente del estado morfológico de *C. dubliniensis*, se expresaron a pH 4 y pH 7 y fueron inducidos con albúmina como fuente de nitrógeno. La expresión de *CdSAP3* fue regulada por el pH y se relacionó con el proceso de infección de queratinocitos. La expresión de *CdSAP4* predominó durante la fase micelial y el estado inicial de la infección de queratinocitos. Durante la infección con *C. dubliniensis* de la línea celular de queratinocitos HaCaT, solo se expresaron los genes *CdSAP3-4* y se afectó la forma y el número de los queratinocitos, sin embargo este efecto disminuyó en la presencia de pepstatina A (un inhibidor de aspartil proteasas).

Por lo anterior se sugiere que las Saps de *C. dubliniensis* pudieran ser consideradas al igual que las de *C. albicans* atributos de virulencia así como participar en el metabolismo nitrogenado de la levadura para la adquisición de nutrientes. Se observó una transición total de levadura a micelio en los medios YCB-BSA y medio de Lee-FCS

## ABSTRACT

The *in vitro*, and keratinocyte (HaCAT cells) cultures expression of four putative genes encoding for secreted aspartyl proteases of *Candida dubliniensis* (*CdSAP1-4*) is reported for the first time. The regulation of the expression of *CdSAP1* and *CdSAP3* genes cloned and sequenced in this work and *CdSAP2* and *CdSAP4* previously deposited in GeneBank database was studied. Also *CdSAP7*, *CdSAP8*, *CdSAP9*, and *CdSAP10*, orthologous genes of *Candida albicans*, were recognized in *C. dubliniensis* genome.

The *CdSAP1* and *CdSAP2* expressions were independent from the morphological stage of *C. dubliniensis*, they are expressed at both pH 4 and pH 7, and were induced with albumin as nitrogen source. *CdSAP3* expression was regulated by the pH, and was related with the infection process of keratinocytes. Expression of *CdSAP4* predominated during the mycelial phase and the initial stage of keratinocytes infection. During infection of the HaCaT cell line, only genes *CdSAP3-4* were expressed, keratinocytes were affected in their number and shape by the infection with *C. dubliniensis*, however, this effect decreased in the presence of pepstatin (aspartyl proteases inhibitor).

Based on the aforementioned, we suggest that the Saps from *C. dubliniensis* could be considered virulence factor just as those from *C. albicans*, and as participants in the nitrogen metabolism of the yeast for nutrient acquisition. A total Yeast-mycelium transition was observed in YCB-BSA and Lee-FCS media.

# I. INTRODUCCIÓN

## Generalidades

### Candida y Candidosis

La candidosis es la micosis oportunista más frecuente. Es una infección aguda o crónica de las mucosas, piel, uñas o tejidos profundos, causada por levaduras del género *Candida* (López-Martínez *et al.*, 1995).

Algunas de las especies del género *Candida* forman parte de la microbiota normal de las mucosas del tracto gastrointestinal y genitourinario del humano y de animales de sangre caliente (Arango y Castañeda, 1995). La adquisición de candidosis está determinada por la presencia de factores de oportunismo que predisponen a un individuo, por ejemplo: la diabetes, el SIDA, los carcinomas, la leucemia, la prematurez, las endocrinopatías, los trasplantes, las cirugías, las terapias inmunosupresoras, la administración de antimetabolitos, la antibioticoterapia, los anticonceptivos, la drogadicción y diversas inmunopatías como leucopenias o neutropenias (López-Martínez *et al.*, 1995).

### Frecuencia de Candidosis

Las especies de *Candida* son la cuarta causa de infección nosocomial del torrente circulatorio en los Estados Unidos y representan del 8 al 10 % de las infecciones del torrente circulatorio adquiridas durante la hospitalización. El número absoluto de casos de candidemia nosocomial se calcula entre 7,000 a 28,000 por año. Si la mortalidad cruda por candidemia nosocomial es 40% entonces pueden estar asociadas a candidemia nosocomial de 2,800 a 11,200 muertes cada año. Dado que aproximadamente dos tercios de todas las infecciones del torrente circulatorio producidas por *Candida* son nosocomiales, la carga anual de candidemia en estados Unidos es aproximadamente 10,500 a 42,000 infecciones (Pfaller y Diekema 2007). En México se ha reportado que el 13% de infecciones nosocomiales son debidas a *Candida* (Valenzuela-Flores *et al.*, 2004; Diaz-Ramos R. D., 1998-2003). En otro estudio mexicano se aisló *Candida* en 1.3% de 2,607 solicitudes

de cultivo en pacientes pediátricos. En esta serie de casos la mortalidad fue de 32.2% (Reyna-Figueroa *et al.*, 2007), mientras que un estudio español registró una mortalidad de 42% en pacientes con candidosis diseminada con diabetes y neoplasias como factores de riesgo asociados (Hernández-Sierra *et al.*, 2008). En la población en general aproximadamente el 70% de las mujeres experimentan infección vaginal causada por *Candida* spp. y 20% de ellas sufren de infección recurrente. *C. albicans* es la especie más comúnmente encontrada en los casos de candidosis (Yang, 2003; Calderone, 2002).

### **Morfología de *C. albicans***

*C. albicans* es una levadura imperfecta es decir no presenta reproducción sexual y puede crecer con una variedad de morfologías. Los términos levadura, pseudomicelio (o pseudohifas) y micelio verdadero son usadas para describir estas formas:

La forma de levadura consiste de células redondeadas cuyas células hijas producidas por gemación se encuentran físicamente separadas de la célula madre después de citocinesis. El inicio de la gemación es una evaginación que se desarrollará para formar la célula hija. Durante la gemación se forma un cuello entre célula madre y célula hija a través del cual se lleva a cabo la división nuclear.

El pseudomicelio se produce de una levadura o de una hifa por gemación pero la célula hija permanece unida a la célula madre y se alarga resultando en cadenas de células que muestran varios grados de elongación, presentan un cuello entre compartimientos celulares adyacentes y pueden tener la forma de un rosario o la apariencia de un filamento. En estas células el diámetro interior no es uniforme y mide alrededor de 2.6  $\mu\text{M}$ . En el proceso de formación del pseudomicelio, durante la mitosis el núcleo se divide a través del cuello entre la célula madre y la célula hija.

Las hifas verdaderas se forman a partir de una célula de levadura o como ramificaciones de una hifa ya formada. Son tubos largos con paredes paralelas con

un diámetro interior aproximadamente 2.2  $\mu\text{M}$  y sin cuello entre compartimientos celulares. Los tubos germinativos se inician como evaginaciones que se desarrollan en proyecciones filamentosas cuando *Candida albicans* pasa de la forma de levadura a crecimiento en forma de micelio. Durante el proceso de formación del tubo germinativo (que al desarrollarse en longitud dará origen al micelio), el núcleo migra de la célula basal hacia el tubo germinativo en formación, la mitosis se lleva a cabo a lo largo del tubo germinativo y un núcleo regresa a la célula basal. El micelio crece por extensión apical.

El punto de transición para el desarrollo de un tipo morfológico particular de hifas o pseudohifas en *C. albicans* se lleva a cabo muy temprano en el ciclo, antes de la evaginación y tras este punto el desarrollo no puede ser cambiado alterando las condiciones ambientales.

*Candida albicans* es capaz de formar también clamidoconidios en medios especiales como agar harina de maíz con tween 80, tanto a temperatura de 37°C como a temperatura ambiente. Los clamidoconidios se producen en los extremos o intercalados en hifas y pseudohifas. Son células de 8-12  $\mu\text{M}$  de diámetro redondas de superficie lisa con una doble pared refringente (Martin *et al.*, 2005).

Una población de células con frecuencia constituye una mezcla de las diferentes morfologías. El balance entre las diferentes formas afecta la morfología colonial y la proporción de las diferentes formas cambia durante el “switching” de las colonias. *In vivo* el “switching” entre las diferentes formas puede ser importante en el proceso infeccioso, porque las cepas que han sido genéticamente modificadas y que únicamente pueden crecer como formas de levadura son avirulentas. *In vitro* la morfología celular es afectada por las condiciones de crecimiento. Un gran número de medios han sido descritos para favorecer el crecimiento de una u otra forma. También la temperatura influye en la morfología. A temperatura de 25°C a 35°C en medio Sabouraud o YPD se observa comúnmente la forma de levadura. El crecimiento a 37°C a pH neutro favorece generalmente la formación de pseudohifas mientras que las hifas son inducidas por la presencia de suero. Otros constituyentes químicos como N-acetil glucosamina, también favorecen la formación de hifas y pseudohifas sobre la forma de levadura. Se ha observado que

la morfogénesis es extremadamente sensible a la temperatura mientras que el tubo germinativo y micelio se desarrolla a 37°C una diferencia de 2°C (a 35°C) produce una mezcla de micelio verdadero y pseudomicelio en medio de Lee y en medio YPD con suero. El cultivo en medio YPD a 35°C produce pseudomicelio (Sudbery, 2001; Calderone, 2002).

### ***Candida no Candida albicans (CNCA)***

El incremento en la incidencia de sida y el desarrollo reciente de nuevas estrategias de tratamiento para pacientes con enfermedades hematológicas y trasplantes de órganos, ha producido un aumento en el número de pacientes inmunocomprometidos con infecciones fúngicas, entre éstas las especies de *Candida* son el patógeno comúnmente más encontrado (Tamura *et al.*, 2001; Pfaller y Diekema, 2007). *C. albicans* es el principal patógeno humano, sin embargo otras especies de *Candida* han surgido en los últimos 15 años como causa significativa de la enfermedad. Las especies que se mencionan con más frecuencia como causa de una incidencia cada vez mayor de micosis son *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. dubliniensis* denominadas actualmente “*Candida no Candida albicans*” (CNCA) (cuadro 1). El incremento en la frecuencia de enfermedades causadas por algunas de esas especies se ha asociado con resistencia a drogas antifúngicas como fluconazol especialmente en *C. glabrata* y *C. krusei*. En los huéspedes inmunocomprometidos la selección por drogas antifúngicas puede ser en parte responsable del gran número de casos de candidosis causados por especies CNCA (Calderone, 2002; Moran *et al.*, 2002; Eiman *et al.*, 2007).

### **Factores de virulencia**

Las especies de *Candida* han desarrollado una batería de factores de virulencia efectivos y de estrategias específicas que las capacitan para la colonización de los tejidos del huésped, lo que les permite causar enfermedad y vencer las defensas del huésped (cuadro 2). Los factores requeridos o expresados por *C. albicans* en particular para causar infección varían dependiendo del tipo de

ésta, el sitio y estado de la infección y la naturaleza de la respuesta del huésped. Aparentemente, durante el proceso de infección están involucrados un conjunto de atributos de virulencia y la expresión de todos estos, puede no ser necesaria en un particular estado de la infección.

**Cuadro 1.** Especies de *Candida* no *C. albicans* de importancia médica comúnmente encontradas (Moran *et al.*, 2002)

Especies	Sitios infectados o afectados	Enfermedad subyacente/factor de riesgo <sup>a</sup>
<i>C. dubliniensis</i>	Mucosa oral, sangre	Infección por VIH, TMO
<i>C. glabrata</i>	Tracto urinario, mucosa, sangre, infección diseminada	Infección por VIH, tumores sólidos, leucemia, TMO
<i>C. krusei</i>	Mucosa oral, sangre, infección diseminada	Infección por VIH, TMO, Leucemia
<i>C. parapsilosis</i>	Sangre, endocarditis, infección de huesos/articulaciones	Nacimiento prematuro, nutrición parenteral, catéter intravenoso
<i>C. tropicalis</i>	Mucosa oral, sangre, infección diseminada, infección de huesos/articulaciones	Infección por VIH, tumores sólidos, TMO, leucemia

a. TMO, trasplante de médula ósea

Diversos factores han sido sugeridos como atributos de virulencia para *C. albicans*: formación de micelio, moléculas de reconocimiento superficiales, switching fenotípico y la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares. La producción de enzimas hidrolíticas tales como fosfolipasas, hialuronidasas, condroitín sulfatasa y proteinasas son factores de virulencia putativos que favorecen la invasión de tejidos en *C. albicans* (De Bernardis *et al.*, 2001; Naglik *et al.*, 2003; Schaller *et al.*, 2005; Albrecht *et al.*, 2006;). Las aspartil proteinasas secretadas

(Saps) codificadas por la familia de genes *SAP* parecen tener un papel principal en la virulencia de *C. albicans* y han sido ampliamente estudiadas como determinantes claves en la virulencia de *C. albicans* (Hube *et al.*, 1994; Monod y Borg-von Zepelin, 2002; Linares *et al.*, 2007).

**Cuadro 2.** Principales atributos de virulencia de *C. albicans* (Naglik *et al.*, 2003).

Atributo de virulencia	Papel en la virulencia
Adhesinas (ej familia Als, Hwp1, Int1) <sup>a</sup>	Adhesión y colonización
Producción de micelio	Adhesión, invasión y daño de tejido
Enzimas hidrolíticas extracelulares (ej. familias de Sap, Plb, y Lip) <sup>b</sup>	Adquisición de nutrientes, invasión, daño de tejido, evasión de la respuesta inmune.
Cambio fenotípico (switching)	Adhesión, evasión de la respuesta inmune

a, Als, secuencias parecidas a aglutininas; Hwp1, proteínas de la pared celular del micelio; Int1, proteínas parecidas a integrinas

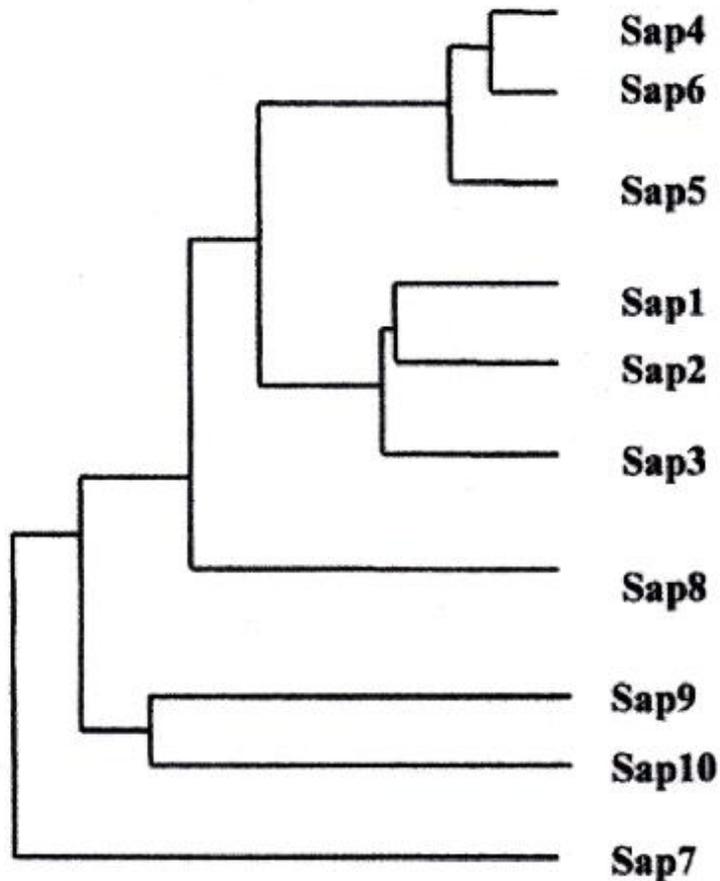
b, Sap, aspartil proteinasas secretadas 1 a 10; Plb, fosfolipasa B1 y B2; Lip, lipasas 1 a 10

### Aspartil proteinasas secretadas (Sap's)

#### Genes que codifican aspartil proteinasas secretadas (genes *SAP*)

El genoma de *C. albicans* contiene al menos diez genes distintos que codifican aspartil proteinasas secretadas (genes *SAP*) (Monod *et al.*, 1994; Hube *et al.*, 1994; Monod *et al.*, 1998). Los genes *SAP* de *C. albicans* forman una familia de multigenes (Stehr *et al.*, 2000) (fig. 1). Diversas investigaciones han demostrado que los miembros individuales de la familia de genes *SAP* poseen una amplia

especificidad de sustrato, se pueden expresar durante los diferentes estadios del proceso infeccioso y que las diferentes Sap's específicas pueden tener un papel especial en la infección (De Bernardis *et al.*, 1990; Tavanti *et al.*, 2004).

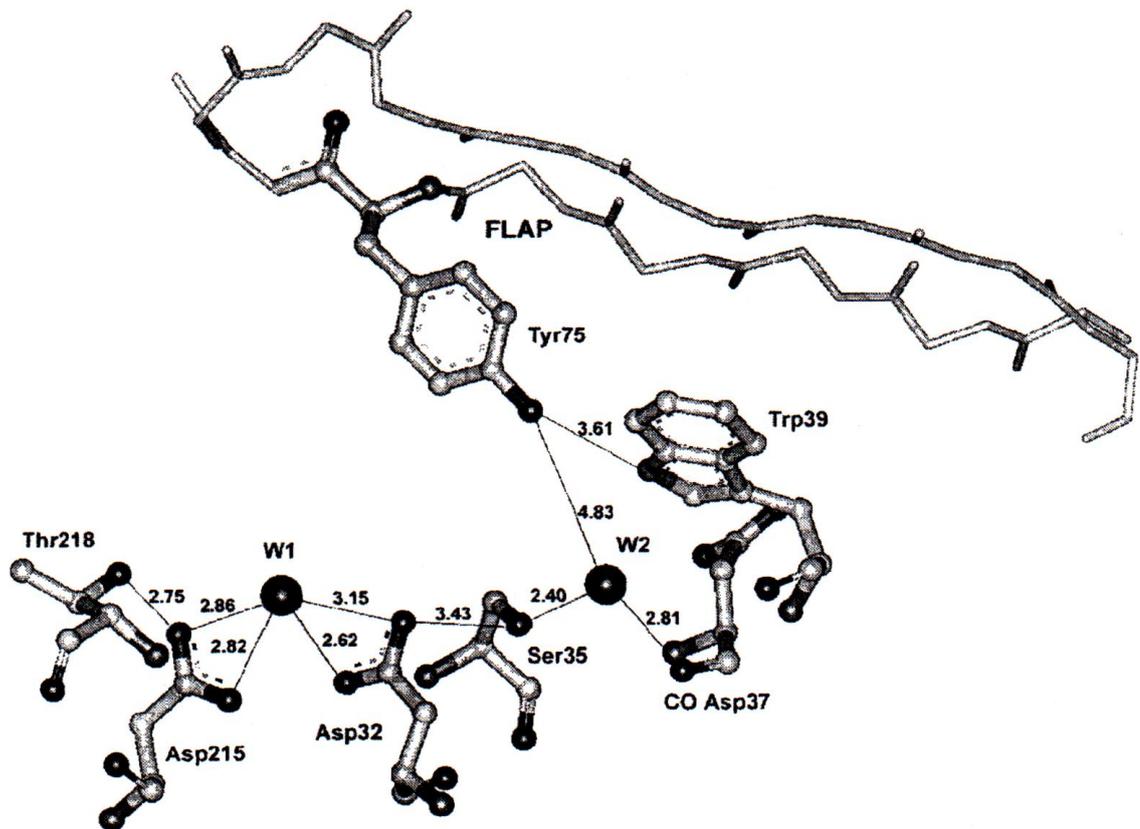


**Fig 1.** Dendrograma de la familia de isoenzimas Sap de *C. albicans*, basado en la de secuencias de aminoácidos. En esta familia hay tres grupos. Sap 1 a Sap 3 son 67 % idénticas, Sap4 a Sap6, son 89 % idénticas, mientras que Sap7 es sólo 20 a 27 % idéntica a otras proteínas Sap. Sap9 y Sap10 tienen secuencias consenso C-terminales típicas para proteínas GPI y constituyen un tercer grupo distinto (Stehr *et al.*, 2000).

### Características de las Sap's

Las aspartil proteinasas pertenecen a la familia A1 de las peptidasas. Esta familia comprende proteínas cuya molécula es una sola cadena que forma dos

dominios con diferentes secuencias de aminoácidos, pero básicamente con similar plegamiento. El sitio catalítico de estas enzimas está formado por la unión de los dominios y contiene 2 residuos de ácido aspártico, uno en cada dominio, Asp 32 y Asp 215. El dominio Asp 215 no está cargado mientras que Asp 32 es protonado (figura 2). Una propiedad importante de este centro catalítico es la adaptación para la acción en un amplio rango de pH, desde 1.0 a más de 7.0 (Andreeva y Rumsh, 2001).

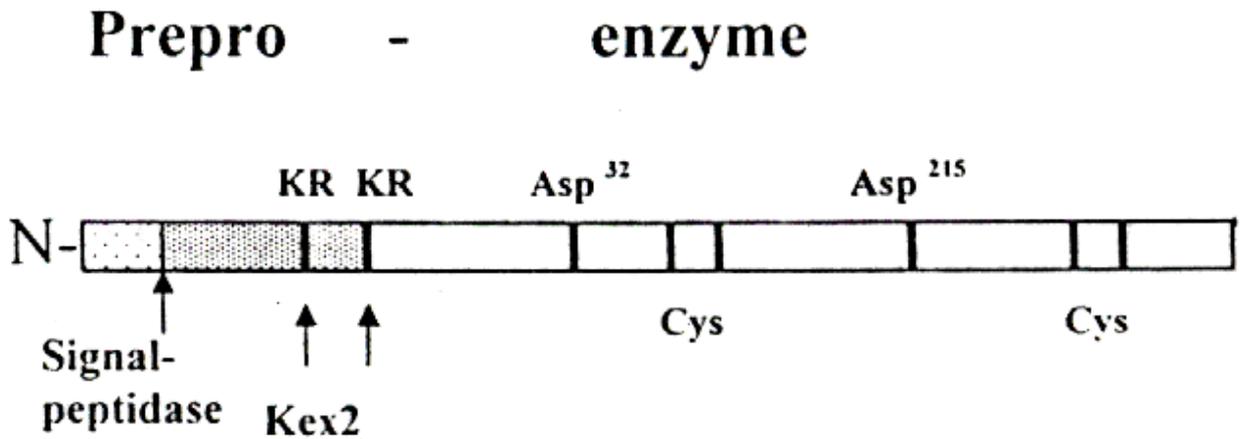


**Fig. 2.** Sitio catalítico y región circundante de pepsina porcina (aspartil proteinasas). El ala (FLAP) involucra un contacto intermolecular: el hidroxilo de la Tyr 75 forma enlaces de hidrógeno con el interior de la molécula, lo que ocasiona la formación de una cadena continua de los residuos Trp 39-Tyr 75-W2-Ser 35-Asp 32 enlazados al hidrógeno, extendiéndose desde el ala hasta al sitio activo. La misma cadena de enlaces de hidrógeno es una propiedad característica de todos los complejos de enzimas semejantes a pepsina. El grupo hidroxilo de Thr 218 localizado a un enlace de hidrógeno de distancia del carbonilo del Asp 215, protege a este carbonilo de la protonación en medio ácido (Andreeva y Rumsh, 2001).

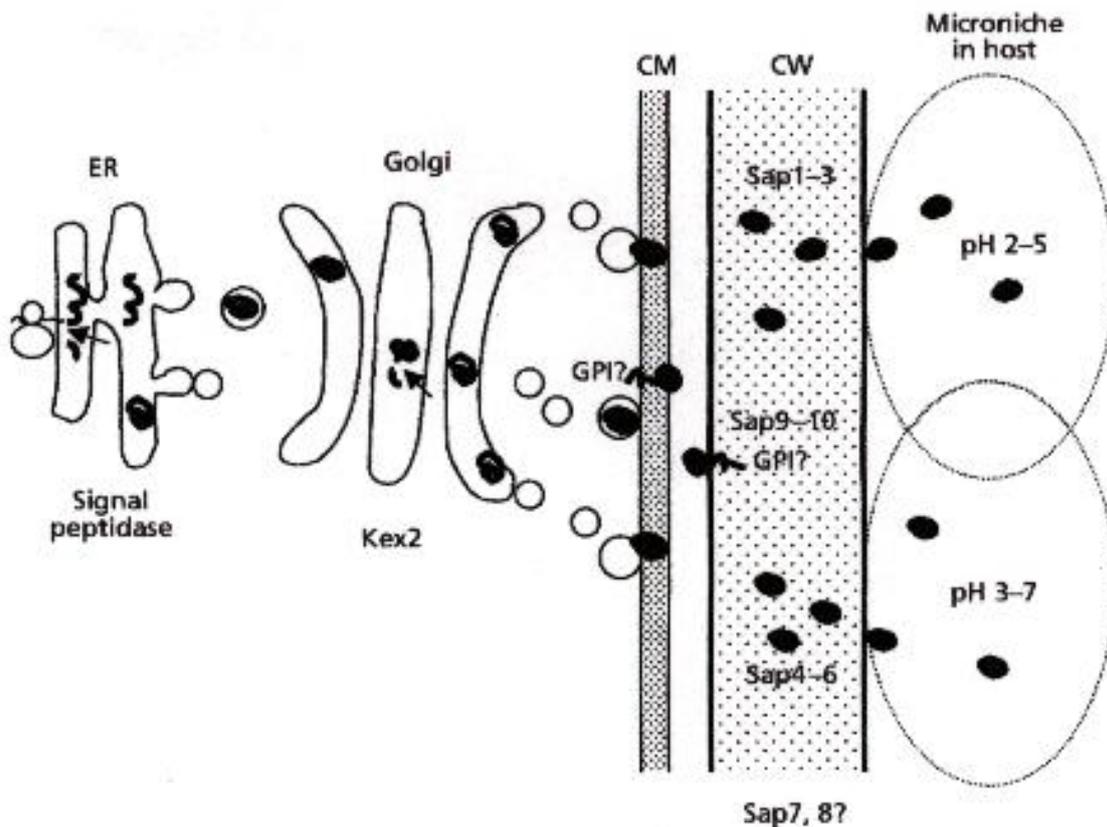
Los 10 genes *SAP* de *C. albicans* codifican preproenzimas de aproximadamente 60 aminoácidos más grandes que la enzima madura, las cuales son procesadas cuando son transportadas por la vía secretoria. Las enzimas maduras contienen secuencias motivo típicas de todas las Sap's, incluyendo los dos residuos de aspartato del sitio activo y residuos de cisteína conservados implicados en el mantenimiento de la estructura tridimensional.

### Vía de síntesis de las Sap's

La vía de la síntesis de proteinasas inicia en el núcleo, de ahí el nuevo mRNA sintetizado es transferido al citoplasma, traducido a la preproenzima y transferido como preproenzima al retículo endoplásmico rugoso donde el péptido señal N-terminal es removido por una peptidasa señal. El propéptido o péptido señal de 16 a 18 residuos de aa es necesario para entrar a la vía secretoria transportando a la proteína a través de la membrana del retículo endoplásmico (Pfeffer y Rothman, 1987). La proenzima es transferida al aparato de Golgi donde es adicionalmente procesada después de la secuencia Lys-Arg por una proteinasa Kex2. Hay evidencias de que en ausencia de una proteinasa Kex2 algunas proteínas Sap son autocatalíticas y se procesan a sí mismas transformándose en enzimas maduras (Koelsch *et al.*, 2000; Albrecht *et al.*, 2006). El propéptido antes de ser procesado por la enzima Kex2 desempeña una función importante en el plegamiento correcto de los dominios de la enzima, en el mantenimiento del zimógeno en forma inactiva y en la secreción (Dostal *et al.* 2005). Una vez empacada la enzima en vesículas secretorias es transportada a la membrana plasmática donde posteriormente puede ser incorporada a la pared celular o es liberada al espacio extracelular (figuras 3 y 4). Algunas proteínas Sap como Sap9 y Sap10 presentan sitios omega consenso para anclaje GPI en el extremo carboxilo terminal, las cuales son regiones ricas en serina/treonina (Albrecht *et al.*, 2006).



**Fig 3.** Estructura deducida de la proteinasa Sap1 con elementos y motivos establecidos en todas las Sap (Hube y Naglik., 2002).



**Fig. 4.** Procesamiento y secreción de Sap's vía el mapa de secreción y sus rangos de pH óptimos (Hube y Naglik, 2001).

## Regulación de la expresión de las Sap's

Puesto que la familia de genes *SAP*'s codifica preproenzimas, la regulación de la expresión de las proteinasas puede ser controlada a nivel del mRNA o de las proteínas. La comparación de los niveles de proteínas Sap's y los niveles de mRNA son idénticos en un tiempo determinado, los estudios de cinética de la secreción de proteinasas, sugieren que la síntesis de proteinasas y su secreción están fuertemente acopladas, y se ha sugerido que la regulación de la actividad de Sap's ocurre predominantemente al nivel de mRNA. Estudios en los que usan pepstatina A (inhibidor de aspartil proteinasas) demostraron que la expresión de *SAP2* en *C. albicans* también se regula a través de un mecanismo de retroalimentación positiva, puesto que los productos proteolíticos de Sap2 y péptidos de 8 residuos de aminoácidos o más inducen a este gen (Naglik *et al.*, 2003).

## Expresión de genes *SAP*'s en *C. albicans*

El papel de las aspartil proteinasas secretadas (Sap's) de *C. albicans* ha sido demostrado en candidosis experimental y en casos clínicos (Borg-von Zepellin *et al.*, 1998; Schaller *et al.*, 2000). Las Sap's degradan un número de substratos celulares incluyendo proteínas relativas a la defensa inmunológica y defensas estructurales tales como IgA secretora,  $\alpha_2$ -macroglobulina, proteína C3,  $\beta$ -lactoglobulina, lactoperoxidasa, colágena y fibronectina (Naglik *et al.*, 2003, Cutler, 1991; Kaminishi *et al.*, 1995).

Las aspartil proteinasas secretadas codificadas por la familia de genes *SAP* de *C. albicans* han sido ampliamente estudiadas en la década pasada. A partir de la secuenciación del primer gen *SAP* por Hube en 1991 (Hube *et al.*, 1991), rápidamente fueron descubiertos más genes que codifican aspartil proteinasas extracelulares en *C. albicans*. El segundo gen, *SAP2*, fue descrito por Wright en 1992 usando PCR basada en estrategias de clonación (Wright *et al.*, 1992). El tercero, el gen *SAP3*, fue reportado en 1993 (White *et al.*, 1993). El cuarto, *SAP4*, por Miyasaki en 1994 (Miyasaki *et al.*, 1994). En el mismo año fueron identificados los

genes, *SAP5-SAP7* usando *SAP1* como sonda (Monod *et al.*, 1994). En 1998 se identificaron otros dos genes adicionales *SAP8* y *SAP9* (Monod *et al.*, 1998). *SAP10* fue identificado por alineamiento Blast en bases de datos del genoma (*SAP10* número de acceso AF146440) (Hube y Naglik, 2001).

Han sido estudiados muchos aspectos de esta familia de genes, sus relaciones por homología de secuencias (fig. 1) (Stehr *et al.*, 2000), su localización ultraestructural en *C. albicans* (Stringaro *et al.*, 1997), su participación en la patogénesis, su regulación y expresión (Naglik *et al.*, 2003).

#### Relación de genes *SAP* con la infección natural y experimental.

En 1994 y 1995 quedó establecido que los genes *SAP* 1,2 y 3 se expresan predominantemente en las formas de levadura, mientras que la expresión de los genes *SAP* 4, 5 y 6 está confinada principalmente al micelio (Hube *et al.*, 1994; White *et al.*, 1995).

Las Sap's 1, 2 y 3 son importantes para la infección oral, y vaginal contribuyen al daño de tejido y se expresan en los primeros estadios del establecimiento de la infección. La expresión de *SAP2* puede aumentar con los tratamientos antifúngicos (Schaller *et al.*, 1998; Schaller *et al.*, 1999; Schaller y Korting, 1999; De Bernardis *et al.*, 1990; De Bernardis *et al.*, 1999; Naglik *et al.*, 1999; Schaller *et al.*, 2000; Copping *et al.* 2005).

La expresión de *SAP6* es necesaria para la formación de hifas se presenta en estadios tardíos de la infección natural y experimental, *SAP6* y 8 coinciden con la invasión profunda y formación de micelio, *SAP4* y 5 y 10 se expresan pero no parecen relacionarse con la invasión o daño de tejido., *SAP7* se detecta en ocasiones raras y podría no ser necesaria para el establecimiento de la infección o su mantenimiento, *SAP9* se detecta en etapas de crecimiento tardías. (Sanglard *et al.*, 1997; Borg-von Zepellin *et al.*, 1998; Monod *et al.*, 1998; Schaller *et al.*, 1998; Schaller *et al.*, 1999; Naglik *et al.*, 1999; Schaller *et al.*, 2000; Korting *et al.*, 2003; Schaller *et al.*, 2003; Fradin *et al.*, 2005).

La patogénesis de la candidosis experimental y clínica está asociada con la regulación diferencial y temporal de la expresión de los genes *SAP*. Existen evidencias de una regulación combinada de diferentes factores de virulencia como el dimorfismo y la expresión de genes *SAP* (Schaller *et al.*, 1998; Korting *et al.*, 2003; Tavanti *et al.*, 2004; Schaller *et al.*, 2005).

Se han empleado diversas técnicas en el estudio de la expresión de los genes *SAP* en *C. albicans* como, IVET (in vivo expresión technology) (Staib *et al.*, 2000; Kretschmar *et al.*, 2002), Northern blotting (De Bernardis *et al.*, 1995), y RT-PCR (Naglik *et al.*, 1999; Naglik, Rodgers *et al.*, 2003; Schaller *et al.*, 1998; Schaller *et al.*, 2003; Schaller *et al.*, 2000; Tavanti *et al.*, 2004) sin embargo la técnica más ampliamente utilizada ha sido RT-PCR cuyo costo, reproducibilidad y relativa sencillez la hacen idónea para este tipo de estudios.

Otras especies del género *Candida* como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. lusitanae* y *C. dubliniensis* presentan la capacidad de producir, secretar o expresar en su superficie enzimas hidrolíticas como las aspartil proteinasas secretadas (Pichová, *et al.*, 2001; Gilfillan *et al.*, 1998).

### **Papel biológico de las Sap's**

La función principal de las Sap's es proporcionar nutrientes a la levadura al hidrolizar componentes celulares del hospedero, además la producción de estas proteínas está asociada con la formación de hifas, la adhesión y los cambios fenotípicos y en el establecimiento de la infección (Chaffin *et al.*, 1998; Naglik *et al.*, 2003).

Además de la participación en el establecimiento de la enfermedad, en general la proteólisis es un proceso vital esencial que juega un papel importante en diferentes funciones fisiológicas como digestión de proteínas, maduración de hormonas, inflamación, respuesta inmune, coagulación, fertilización, germinación y otros procesos morfológicos (Holzer y Heinrich 1988). Algunas proteasas son importantes en la formación y germinación de esporas, en regulación

postraducciona l y en la patogénesis de varios microorganismos (Yuan y Cole, 1989; Vartiarian, 1992; White y Agabian, 1995; Monod *et al.*, 1998; Suarez-Rendueles *et al.*, 1991). La capacidad de las células para responder a ambientes extremos es vital para su sobrevivencia. La proteólisis juega un papel esencial en la respuesta a condiciones de estrés. Las condiciones de estrés celular pueden ser causadas por falta de nutrientes y por condiciones físicas y químicas tales como calor, valores extremos de pH y radiación ultravioleta. El estrés nutricional probablemente produce reorganización del metabolismo celular y por lo tanto reorganización de la composición de enzimas. Se ha reportado que algunas levaduras forman seudomicelio en respuesta a estrés nutricional por inanición de nitrógeno. Se ha sugerido que este crecimiento filamentos o en lugar del crecimiento unicelular las capacita para adquirir nutrientes (Hilt y Wolf 1992).

Por lo mencionado anteriormente, el estudio de la proteólisis en el género *Candida*, podría no sólo estar asociado con la virulencia ya que podrían abordarse aspectos fisiológicos de este fenómeno para relacionarlos con el ciclo de vida de este hongo.

## Antecedentes

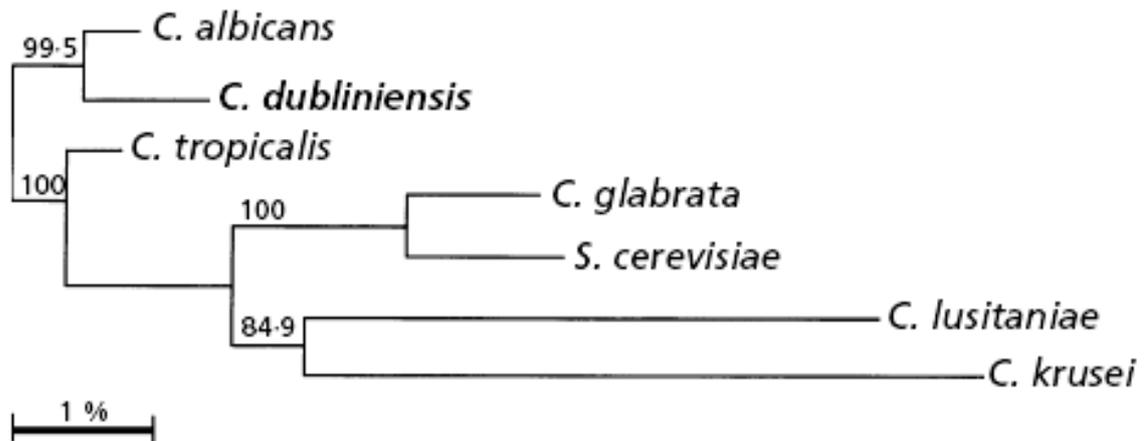
### ***C. dubliniensis***

*C. dubliniensis* se propuso como una nueva especie en 1995 (Sullivan *et al.*, 1995) y durante los últimos años ha cobrado interés como especie CNCA. Es un patógeno emergente capaz de causar infecciones orofaríngeas, vaginales, del torrente circulatorio y otras localizaciones. Morfológica y bioquímicamente es muy similar a *C. albicans*. Es una levadura que produce pseudomicelio, micelio y clamidoconidios al igual que *C. albicans* (Sullivan *et al.*, 2005).

Dentro de sus características fenotípicas particulares se encuentran el color verde oscuro de la colonia en el medio CHROMagar, la ausencia de expresión de  $\beta$ -glucosidasa y la incapacidad para crecer a 42°C a diferencia de *C. albicans* (cuadro 3). Dentro de sus características genotípicas es diploide al igual que *C. albicans* sin embargo ambas especies presentan diferentes patrones al utilizar RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), MLEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis Analysis), hibridación con DNA microsatélites, y secuencias de genes rDNA (Bautista *et al.*, 2003; Pujol *et al.*, 2004; Staib *et al.*, 2000; Sullivan y Coleman, 1998).

### **Filogenia de *C. dubliniensis***

Estudios filogenéticos basados en el análisis de las secuencias del gene de las subunidades pequeñas del rRNA demostraron que *C. albicans* y *C. dubliniensis* están muy cercanamente emparentadas y que es probable que la divergencia de estas especies haya ocurrido es relativamente recientemente en el tiempo evolutivo (Fig. 5) (Gilfillan *et al.*, 1998). En el dendrograma de la fig. 5 se puede observar que comparten un 99.5% de nucleótidos en este gen.



**Fig. 5.** Árbol filogenético generado por el método de neighbour-joining a partir del alineamiento de las secuencias de genes de las subunidades pequeñas de rRNA de *C. dubliniensis* CD36 y otras especies de *Candida*. La barra de escala indica 1% de diferencia en la secuencia de nucleótidos (Gilfillan *et al.*, 1998).

### Homología entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*

El parentesco cercano entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* coincide con sus aparentes similitudes fenotípicas (por ejem. la habilidad para producir hifas en suero) (Cuadro 3), las cuales son mucho más que simples semejanzas debidas al azar. En la mayoría de casos, la homología de los genes que se han comparado entre las dos especies es de aproximadamente 90% de identidad al nivel de nucleótidos con algunos genes altamente conservados como ACT1 el cual muestra 98% de identidad (Sullivan *et al.* 2005) (Cuadro 4). La disposición del genoma completo de *C. albicans* y la secuenciación del genoma casi terminado de *C. dubliniensis*, permitirá identificar los genes que pueden estar ausentes o ser divergentes en *C. dubliniensis*.

**Cuadro 3.** Comparación de algunas características genotípicas y fenotípicas de *C. albicans* y *C. dubliniensis* ( Sullivan *et al.*, 2005)

	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
Organización del genoma:		
Ploidía	Diploide	Diploide
Patrón del cariotipo	8 bandas	9-11 bandas
Hibridización a la sonda:		
Cd25	Ninguna	Fuerte
27A	Fuerte	Débil
Familias de genes:		
Genes <i>ALS</i>	8	3
Genes <i>SAP</i>	10	8
Formación de hifas:		
Suero	Si	Si
Agar de Pal	No	seudohifas
Agar tabaco	No	seudohifas
Condiciones de crecimiento:		
Crecimiento a 42-45°C	Si	No
Crecimiento en NaCl al 6.5%	Si	No
Crecimiento en trealosa	Si	escaso

**Cuadro 4.** Comparación de la homología de las secuencias de aminoácidos de genes representativos de *C. albicans* y *C. dubliniensis* (Sullivan *et al.*, 2005)

Gene	Homología en nucleótidos (%)	Homología en aminoácidos (%)
<i>ACT1</i> (ORF)	98	99
<i>ACT1</i> (intrón)	83	No aplicable
<i>URA3</i>	93	98
<i>CDR1</i>	92	97
<i>MDR1</i>	92	96
<i>ERG11</i>	92	96
<i>SAP2</i>	90	94
<i>ERG3</i>	91	93
<i>PHR1</i>	89	92
<i>HWP1</i>	45	49

En un estudio se hibridó DNA genómico de *C. dubliniensis* a un microarreglo de DNA genómico de *C. albicans*. El DNA de *C. dubliniensis* hibridó eficientemente al 95.6% de puntos en el microarreglo confirmando que las dos especies están emparentadas muy cercanamente. Sin embargo la ausencia o pobre hibridación de los 4.4% puntos restantes sugiere que hay un pequeño subset de secuencias (representando 247 genes putativos) que están presentes en genoma de *C. albicans* y ausentes o altamente divergentes en el genoma *C. dubliniensis*. También quedó de manifiesto que aunque comparten muchos genes la regulación de su expresión es diferente (Moran *et al.*, 2004)

## Epidemiología

*C. dubliniensis* está asociada particularmente a portadores orales e infecciones orofaríngeas con episodios recurrentes en pacientes infectados con VIH pero también se ha detectado en otros sitios anatómicos en pacientes no infectados con VIH (Cuadro 5).

Estudios epidemiológicos han demostrado que *C. dubliniensis* es prevalente en todo el mundo. Sin embargo a diferencia de *C. albicans*, *C. dubliniensis* es raramente encontrada en la microbiota normal de individuos sanos y es responsable de menos del 2% de casos de candidemia (comparada con aproximadamente 65% de *C. albicans*). En estudios de la frecuencia de *C. dubliniensis* en aislamientos de *Candida* tubo germinativo positivos se ha encontrado una prevalencia de 0.2% (Al-Sweih *et al.*, 2005)

## Virulencia de *C. dubliniensis*

Datos de modelos de infección reflejan los hallazgos de los estudios epidemiológicos y sugieren que *C. dubliniensis* es menos patógena que *C. albicans*. La razón de la reducida virulencia de *C. dubliniensis* no es clara. Se ha demostrado que las dos especies expresan un rango similar de factores de virulencia. Sin embargo puesto que *C. dubliniensis* produce hifas parece que las condiciones y dinámica de su inducción puede diferir de la de *C. albicans*. *C. dubliniensis* permanece en forma de levadura en los órganos infectados durante la infección por inyección intravenosa de la levadura en ratones mientras que *C. albicans* cambia a su forma micelial. *C. dubliniensis* es mas vulnerable a la actividad fungicida de los leucocitos y es mas susceptible al efecto tóxico del peróxido de hidrógeno que *C. albicans* además, *C. dubliniensis* es menos tolerante a factores de estrés ambiental tales como temperatura elevada, concentración de NaCl y de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sugiriendo que *C. albicans* puede tener una ventaja competitiva cuando coloniza y causa infección en el cuerpo humano (Vilela *et al.*, 2002; Sullivan *et al.*, 2006)

**Cuadro 5.** Resumen de casos de infecciones invasivas causadas por *C. dubliniensis* en un centro oncológico de Nueva York (Sebti *et al.*, 2001)

Pacientes edad y sexo	Fuente de la muestra	Enfermedad subyacente	Síntomas clínicos	Resultado
39/F	Sangre	Leucemia mielógena	Fiebre ascitis	Muerte ( 3 semanas)
5/M	Sangre	Rabdomiosarcoma	Fiebre diarrea	Muerte (1 año)
8/F	Sangre	Postrasplante de médula ósea	Sepsis, falla renal	Resolución
74/M	Sangre	Leucemia linfocítica	Falla múltiple de órganos	Muerte (1 día)
32/F	Sangre	Estadío final de enfermedad hepática	Ascitis	Muerte (24 días)
39/M	Sangre	Estadío final de enfermedad hepática	Falla renal, ascitis	Muerte 5 Días
37/F	Sangre	SIDA	Fiebre	Sin dato
1/F	Sangre	Neuroblastoma	Fiebre	Resolución
50/F	Líquido sinovial	Mieloma múltiple	Artritis de rodilla	Muerte (3 semanas)

*C. dubliniensis* es similar a *C. albicans* en varias características genotípicas y fenotípicas (Cuadro 3) pero diferente con respecto a su epidemiología, a ciertos factores de virulencia, como una mayor capacidad que *C. albicans* de adherirse a células epiteliales bucales y a la capacidad de desarrollar rápidamente resistencia a fluconazol. La mayoría de aislamientos identificados como *C. dubliniensis* son susceptibles a agentes antifúngicos comúnmente usados sin embargo se ha observado reducida susceptibilidad a antifúngicos azoles en aislamientos clínicos y esta susceptibilidad reducida puede ser inducida rápidamente *in vitro* (Vilela *et al.*, 2002).

Con los datos epidemiológicos y de modelos de infección se puede sugerir que *C. albicans* es más efectiva como patógena que *C. dubliniensis*. Por lo que a pesar de la relación filogenética tan cercana entre *C. albicans* y *C. dubliniensis* es interesante especular en donde está la dicotomía en su capacidad para colonizar y causar enfermedad en humano.

Una estrategia para contestar esta pregunta es comparar los genomas de las dos especies para determinar si hay alguna diferencia importante entre estas dos especies tan cercanamente emparentadas lo que podría ayudar a identificar los factores de virulencia responsables de la menor virulencia de *C. dubliniensis* y posiblemente identificar los factores que están implicados específicamente en infecciones candidiásicas superficiales o sistémicas (Sullivan *et al.*, 2006; Sullivan *et al.*, 2005; Gifillan *et al.*, 1998; Vilela, *et al.*, 2002).

La familia de genes *SAP* de *C. albicans* se han identificado como importantes factores de virulencia y constituyen un blanco potencial para agentes antifúngicos por lo que la búsqueda de genes *SAP* en *C. dubliniensis* y el estudio de las condiciones para su expresión podrían aportar elementos para dilucidar si la menor virulencia de *C. dubliniensis* es debida a sus diferencias genéticas o quizá a que existan diferencias en la regulación de la expresión de sus genes

### **Genes *SAP* en *C. dubliniensis***

En 2004 Moran *et al.* realizaron un estudio de hibridación comparativa genómica de *C. albicans* y *C. dubliniensis* con microarreglos de DNA de *C. albicans*, en el que incluyeron secuencias de los 10 genes que codifican Sap's de *C. albicans* (*SAP1-10*). En este estudio encontraron secuencias homólogas a todos los genes *SAP* a excepción de los genes *SAP4*, 5 y 6. Para buscar estos genes amplificaron por PCR (con iniciadores de regiones conservadas de los genes *SAP4-6*) y secuenciaron el ORF completo de un gen *SAP* al cual denominaron *CdSAP4* debido a que lo localizaron río arriba del homólogo de *SAP1* de manera similar a la localización de *SAP4* en el genoma de *C. albicans*. Usando como sonda este gen completo hicieron un análisis Southern blot y concluyeron que

probablemente *C. dubliniensis* no tiene *SAP5* ni *6* ya que hibridó significativamente en el genoma de *C. dubliniensis* en una sola banda. En este estudio también reportaron el hallazgo de un gen *SAP* con 83.6 % de homología con el gen *SAP2* de *C. albicans* y lo reportaron como *CdSAP2* (Moran *et al.*, 2004). Estos resultados coinciden con los reportados por nuestro grupo de investigación ya que al utilizar una sonda de genes *CaSAP4-6* hibridada contra el genoma de *C. dubliniensis*, sólo se encontró una banda de hibridación, a diferencia de la sonda *CaSAP1-3* en donde se encontraron 3 bandas de hibridación (Loaiza-Loeza *et al.*, 2007)

En nuestro grupo de trabajo se ha iniciado el estudio de genes *SAP* de diferentes especies de *Candida* y se han clonado y secuenciado 3 genes *SAP* de *C. dubliniensis* que corresponden a *CdSAP1*, *CdSAP2*, y *CdSAP3* (Parra-Ortega, comunicación personal). Cabe mencionar que al inicio de este estudio sólo se conocían las secuencias de los genes *CdSAP2*, y *CdSAP4*.

Se han hecho estudios sobre la epidemiología y filogenia de *C. dubliniensis* pero se conoce poco de factores putativos de virulencia tales como su actividad enzimática y la importancia de las proteínas Sap's en la virulencia de *C. dubliniensis* (Linares *et al.*, 2007) sin embargo puesto que posiblemente posee al menos 8 genes *SAP*, es altamente probable que la producción de proteinasas contribuya a su virulencia (Sullivan *et al.*, 1995; Moran *et al.*, 1997; Jabra-Rizk *et al.*, 2001; Ahmad *et al.*, 2004; Naglik *et al.*, 2003; Fotedar *et a.*, 2004; Moran *et al.*, 2004).

## Justificación

Las infecciones producidas por *Candida* son un problema creciente. Su incidencia se ha incrementado dramáticamente en las tres décadas pasadas y esa tendencia continuará inevitablemente en el presente siglo, paralela al aumento de los enfermos de sida, al empleo de fármacos inmunosupresores, a la sobrevida de pacientes con enfermedades como diabetes y a las neoplasias hematológicas entre otras predisposiciones. La candidosis es la micosis más común y constituye la cuarta causa de infección nosocomial. Los rangos de mortalidad de candidosis sistémica son elevados. La mayoría de pacientes con inmunosupresión severa infectados con virus VIH, sufren algunas formas de candidosis de las mucosas y es frecuente que presenten infecciones recurrentes. Además, casi tres cuartos de todas las mujeres sanas experimentan al menos un episodio de candidosis vaginal y cerca de 5% padecen ataques recurrentes de la infección.

La presencia de genes *SAP* en *C. albicans* son primordiales para su éxito como patógeno oportunista. Los estudios actuales sobre la expresión de genes *SAP* se han realizado principalmente con *C. albicans*, sin embargo especies de CNCA como *C. dubliniensis*, han sido poco estudiadas. En *C. dubliniensis* hay escasos estudios sobre la actividad Sap y nula información acerca de la expresión de los genes *SAP* correspondientes. Por estos motivos en este trabajo se pretende estudiar la regulación de la expresión de los genes *CdSAP1*, *CdSAP2*, *CdSAP3* y *CdSAP4* de *C. dubliniensis* en un modelo *in vitro* y en un cultivo de queratinocitos. Los resultados obtenidos permitirán discutir el papel que desempeñan las Sap's como factores de virulencia, durante el ciclo de vida del hongo, el metabolismo nitrogenado, el dimorfismo así como el papel de los queratinocitos (células hospederas) en la expresión de los genes *SAP*.

## Objetivos

### Objetivo general:

Estudiar la expresión de los genes *SAP* en *C. dubliniensis* en diversas condiciones de cultivo *in vitro* y durante la infección de un cultivo de queratinocitos

### Objetivos particulares:

- a) Diseñar un procedimiento basado en la RT-PCR para el estudio de la expresión de genes *SAP* 1- 4 en *C. dubliniensis*.
- b) Estudiar la expresión de los genes *SAP* en modelos *in vitro* durante las fases de crecimiento, polimorfismo y con diferentes fuentes de nitrógeno, pH y temperaturas
- c) Estudiar la expresión de los genes *SAP* en cultivo de queratinocitos en función del tiempo
- d) Buscar en el genoma de *C. dubliniensis* la presencia de genes *SAP* putativos y comparar las secuencias con los genes *SAP* de *Candida albicans*.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismos

En este trabajo se utilizaron *C. dubliniensis* CD36 (Sullivan y col., 1995), *Candida albicans* ATCC10231 (American Type Culture Collection, Rockville, Md.), y *Rhodotorula* sp. (aislada como comensal de piel). Las levaduras se almacenaron a -70°C en glicerol al 30%.

### Medios de cultivo

Los medios de cultivo empleados a lo largo de este trabajo para la conservación y purificación de las levaduras fueron los siguientes:

Medio de conservación: rutinariamente las levaduras fueron mantenidas a 25°C en placas agar dextrosa de Sabouraud: dextrosa 40 g/l, mezcla de peptonas 10 g/l, agar bacteriológico 15 g/l con un pH final de 5.6. Medio rico YPD: Extracto de levadura 1%, peptona de gelatina 2%, y dextrosa 2%, pH final de 6.7. Los medios se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Para purificación de las levaduras se usó agar BiGGY (BBL; Becton Dickinson and CO.). Las levaduras se sembraron en placas de agar BiGGY (BBL; Becton Dickinson and CO.). Se seleccionó una colonia aislada y se subcultivó en caldo YPD durante toda la noche a partir de este cultivo se sembraron los medios para las diferentes pruebas.

El medio de cultivo Yeast nitrogen base (YNB) con diferentes fuentes de nitrógeno (amonio, albúmina, prolina, suero, etc., así como el medio de Lee para el dimorfismo se prepararon como describe Bautista-Muñoz *et al.* (2005). El pH del medio Lee fue ajustado con citrato de sodio.

Medio Yeast carbon base (YCB) al 1.2% con albúmina al 0.2%, esterilizado por filtración. El pH 4 y 7 fue ajustado con citrato de sodio.

### **Determinación de las fases de crecimiento**

Para las fases de crecimiento y determinación de actividad Sap fueron inoculados los medios YPD, YCB con albúmina con  $2 \times 10^6$  células de levadura / ml cosechadas y lavadas procedentes de un cultivo en YPD de 18 h. Los medios inoculados se incubaron en agitación orbital a 37°C, se midió el crecimiento y el sobrenadante de los cultivos se utilizó para determinar actividad Sap. El crecimiento celular se determinó en muestras de los cultivos, cuantificando UFC / ml en placas de agar Sabouraud dextrosa.

### **Sincronización de cultivos**

La sincronización de cultivos de levadura se llevó a cabo para inducir la transición dimórfica de *C. dubliniensis*.

Un inóculo pequeño de células se hizo crecer durante toda la noche en medio YPD. Las células se cosecharon por centrifugación a 5,000 rpm durante 5 min a 4°C. El paquete celular se lavó dos veces con agua destilada estéril fría. Posteriormente, las células se colocaron en matraces de 1000 ml con 250 ml de agua destilada estéril y se agitaron durante 48 h a temperatura ambiente. A continuación, las células se colocaron en refrigeración durante 48-72 h después de ese tiempo, las células detienen su ciclo celular y se sincronizan en fase G1, en la cual las levaduras son redondas y sin yemas (Bautista-Muñoz *et al.*, 2005).

### **Cultivo de queratinocitos**

Los queratinocitos humanos de la línea celular Ha-CaT se cultivaron en medio de Dulbecco modificado (DMEM por sus siglas en inglés), adicionado con 5-

10% de suero fetal bovino (SFB) en una estufa con atmósfera húmeda con CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C (Pivarcsi *et al.*, 2003). A los cultivos con un 80% de confluencia se les reemplazó el medio por medio DMEM sin suero y sin antibióticos y se mantuvieron en estas condiciones 24 h antes de la inoculación o tratamiento.

### **Inóculo de levaduras para los cultivos de queratinocitos**

Se hicieron precultivos de *C. dubliniensis* y *Rhodotorula* sp. en medio YPD a 37°C por 24 h, se cosecharon las células de levadura por centrifugación, se lavaron, se resuspendieron en PBS y se usaron como inóculo para los cultivos de células Ha-CaT.

### **Determinación de actividad Sap**

Se midió la actividad bioquímica de las enzimas Sap en una alícuota de medio, utilizando como sustrato albúmina sérica bovina de acuerdo a Tavanti *et al.*, (2004). Los péptidos liberados se midieron con la técnica de Micro Lowry (Gary 1979).

Se utilizó *C. albicans* ATCC 10231 como cepa de referencia. Se colectaron alícuotas del cultivo, se centrifugaron a 2,000 X *g* por 10 min, y se colectó el sobrenadante. La mezcla de reacción para la determinación de actividad proteinasa fue la siguiente: 100 µl del sobrenadante como fuente de proteinasas, 400 µl de BSA al 1% en regulador de citratos 0.05 M (pH 3.2) como sustrato. Como testigos fueron preparadas mezclas de reacción sin el sobrenadante, el cual fue sustituido con agua destilada, o sin el sustrato el cual fue sustituido por regulador de citratos. Las mezclas de reacción fueron incubadas a 37°C, 120 min, y la reacción enzimática fue detenida adicionando 1000 µl de ácido tricloroacético al 10%. Las mezclas fueron centrifugadas a 12,000 X *g*. A 200 µl del sobrenadante se le adicionaron 200 µl de solución A (CuSO<sub>4</sub> al 1%, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 24%, NaOH 1M y Tartrato de sodio y potasio al 2.7%), se incubaron 10 min a temperatura ambiente y enseguida se le adicionó 100 µl de solución B (Folin Cicalteau 1:20), se incubaron

a 37°C 30 min y se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 660 nm. La actividad enzimática fue expresada en microgramos de tirosina liberada por minuto

### Diseño de iniciadores

Para el estudio de la expresión se diseñaron pares de iniciadores específicos para amplificar fragmentos de los genes *CdSAP1-4*.

Se hizo un alineamiento múltiple -con el programa CLUSTAL X versión 1.83 (Thompson et al., 1997)- con las secuencias de las clonas de *C. dubliniensis* obtenidas previamente en nuestro grupo de trabajo y depositadas en el GenBank: *CdSAP3* (EU604645, EU604646, EU604647), *CdSAP1* (EU604648) y *CdSAP2* (EU604649) y las secuencias de los genes disponibles en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>): *C. dubliniensis CdSAP2* (AJ634672), *CdSAP4* (AJ634382) y *C. albicans SAP1-10* (L12449, AF481101, L22358, L25388, Z30191, Z30192, Z30193, AF043330, AF043331, AF146440).

Se buscaron regiones específicas de cada gen para diseñar iniciadores de aproximadamente 22 pb, con ayuda del programa DNAMAN versión 3.0 (Lynnon Biosoft, 1994-97) (Anexo 1).

Se diseñaron iniciadores para amplificar por PCR un fragmento del gen *ACT1* para usar como testigo positivo de la expresión y para la normalización de los resultados. Se escogió este gen ya que además de ser constitutivo, presenta un intrón y la diferencia entre el tamaño de los amplificados nos indicó la presencia o no de contaminación con DNA en las preparaciones de RNA. Se diseñaron 3 iniciadores: ACT1i-F, ACT1e-F, y ACT1-R. La amplificación de dos fragmentos de 192 y 642 pb indicaron contaminación de DNA cromosómico en las preparaciones de RNA y la amplificación de un solo fragmento de 192 pb indicó que las preparaciones de RNA estaban libres de DNA (Anexo 2).

Las secuencias de los oligonucleótidos diseñados y usados en las RT-PCRs se describen en el cuadro 6.

**Cuadro 6.** Oligonucleótidos iniciadores usados en las reacciones de PCR

Genes y nombre de los iniciadores	Secuencias	Coordenadas de los nucleótidos*	Tamaño del producto de PCR (pb)
<i>CdSAP1</i> 1-F	5'-GGTAACCCATTCTATATTGG-3'	+379 a +398	505
1-R	5'-CCATCCAGTTTCAATTCAGC-3'	+865 a +884	
<i>CdSAP2</i> 2-F	5'-GATTGCCAAGTCACCTATAG-3'	+300 a +319	471
2-R	5'-CATCA ACTGATCCCAAAGT-3'	+752 a +771	
<i>CdSAP3</i> 3-F	5'-TTCATGTCAAACCTTCATATG-3'	+329 a +348	365
3-R	5'-TCCACTAGCTGATTGTCTTG-3'	+675 a +694	
<i>CdSAP4</i> 4-F	5'-AGTGGTCTGGACAAAAGGG-3'	+373 a +392	261
4-R	5'-TAGACTCAGTAGCTTCGTTTT-3'	+614 a +634	
<i>CdACT1</i> ACT1i-F	5'-GATTGATTGATTGATCTGTCTGG-3'	+292 a +311 Localizado en el intrón	642
ACT1e-F	5'-GGTAGACCAAGACATCAAGGTA-3'	+742 a +761 Localizado en el exón	192
ACT1-R	5'-CTTCTGGAGCAACTCTCAATTC-3'	+913 a +934 Localizado en el exón	

\* Las coordenadas de los nucleótidos están numeradas en la dirección 5' a 3' con la primera base del codón de inicio de la traducción en posición +1. *CdACT1* (accession no. AJ236897.1). Las secuencias de los genes *CdSAP*'s se localizan en el proyecto genoma de *C. dubliniensis* en el Trust Sanger Institute Pathogen Sequencing Unit (<http://www.sanger.ac.uk/>), en los "contigs" y coordenadas: *CdSAP1* CHR6.07011 (646689 – 647776), *CdSAP2* CHRR.070112 (1665258 – 1666452), *CdSAP3* CHR3.070111 (1198648 – 1199399), *CdSAP4* CHR6.07011 (643380 – 644536).

## Extracción de RNA

El RNA total se extrajo con el método para aislamiento de RNA de levaduras descrito por Farrell (Farrell, 1998) de la manera siguiente:

Se cultivaron las levaduras en un tubo con 15 ml de medio YEPD toda la noche a 30°C en agitación. Se obtuvo el paquete celular por centrifugación (2,000 x g durante 5 min). Se decantó y se suspendió el paquete celular en 400 µl de regulador AE frío pH 5.2 (acetato de sodio 50 mM, EDTA 10 mM, pH 5.2) y se transfirió a un microtubo de 1.5 ml con 0.5 g de perlas de vidrio (425-600 µm). Se adicionaron 40 µl de SDS al 10% y 500 µl de fenol: cloroformo: isoamílico 24:24:1 equilibrado con regulador AE y se agitó 4 min at 6.5 en un Fastprep para romper las células y se incubó a 65°C / 4 min, se transfirió rápidamente a -70°C / 10 min, después de lo cual se descongeló y se centrifugó a 12 000 x g / 5 min. Se recuperó la fase superior acuosa y se le agregó 500 µl de fenol:cloroformo:isoamílico pH 8, se mezcló por inversión y se centrifugó a 12000 g / 5 min. Se recuperó la fase acuosa y se le adicionaron 500 µl de cloroformo:isoamílico (24:1). Se centrifugó a 12 000 g / 5 min, y se recuperó la fase acuosa. Se le adicionaron 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol al 95 %, y se dejó a -20°C toda la noche para que precipitara el RNA. Se centrifugó nuevamente a 12,000 x g / 10 min, se desechó el sobrenadante y se adicionaron 500 µl de etanol al 70 %. Se mezcló suavemente y se centrifugó a 12 000 x g / 5 min. (Se repitió el lavado 2-3 veces). Se dejó secar, se suspendió en 30 µl de agua tratada con DEPC y se cuantificó.

La cuantificación y calidad de las muestras de RNA se realizó midiendo la absorbancia a 260 nm y 280 nm de longitud de onda.

Una muestra de RNA puro debe presentar una relación  $A_{260}/A_{280}$  de 2.0 como mínimo.

$A_{260} \times \text{Dilución de la muestra} \times 40 = \mu\text{g} / \text{ml de RNA}$  (Farrell 1998).

Del RNA obtenido se tomó una alícuota de 2 µg y se trató con DNasa I libre de RNasa (DNasa I, amplification grade, Invitrogen CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, para eliminar el DNA contaminante (Bautista-Muñoz, 2004).

### RT-PCR

La reacción RT para síntesis de cDNA se llevó a cabo con los iniciadores reversos (1-R, 2-R, 3-R, 4-R, and ACT1-R) usando el kit comercial SuperScript RT-PCR System (Invitrogen CA, USA)

La mezcla de reacción se llevó a un volumen final de 20 µl, conteniendo 2 µg of RNA, regulador para RT, dithiothreitol 10 mM, desoxynucleótidos triphosphato 10 µM, y 100 U de transcriptasa reversa Superscript II, a 42°C por 50 min.

Todas las reacciones de PCR para los genes *CdSAP* y *CdACT1* se llevaron a un volumen final de 25 µl, conteniendo Tris-HCl (pH 4) 20mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, deoxynucleótidos trifosfato a concentración de 200 µM cada uno, cada primer a concentración de 0.4 µM, 3 µl de cDNA, y 2 U de *Taq* polimerasa. La condiciones de amplificación incluyeron: desnaturalización por 5 min a 94°C, 35 ciclos de amplificación que consistieron en: 1 min a 94°C, 45 segundos a 52°C (*CdSAP1*, *CdSAP2*, *CdSAP3* y *CdSAP4*) o 1 min a 53°C (*ACT1*), 1 min a 72°C, y una extensión final por 5 min a 72°. La reacción de PCR para el gen *ACT1* se hizo con los 3 iniciadores (ACT1i-F derecho, ACT1e-F derecho y ACT1-R reverso). Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems).

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en agarosa al 2% (Gibco-BRL, USA), se tiñeron con solución de bromuro de etidio (0.5 µg/ml), y el DNA se visualizo bajo luz UV.

Las determinaciones se hicieron por duplicado. La expresión de los genes *SAP* se normalizó con los niveles del cDNA de *ACT1*. La intensidad de cada banda

amplificada fue medida con SigmaGel v.1 (Jandel Scientific Software USA) para obtener la relación *CdSAP/ACT1*. Para estimar la expresión de los genes *CdSAP*, se calculó el error estándar de la media.

Todas las polimerasas, enzimas y medio DMEM fueron suministradas por Invitrogen CA, USA.

### Estudio de la expresión de los genes *CdSAP*

Se estudió el efecto de diferentes condiciones y medios en la expresión de los genes *CdSAP1-4* de *C. dubliniensis*, incluyendo los siguientes:

**(a)** Durante las fases de crecimiento: logarítmica, estacionaria temprana y estacionaria tardía en los medios YPD y YCB con albúmina sérica bovina al 0.2% (YCB-BSA)

**(b)** En diferentes fuentes de nitrógeno: Para el estudio de la expresión con diferentes fuentes de nitrógeno se hizo un precultivo de *C. dubliniensis* en matraces con 30 ml de medio YPD y se incubaron 12 hs a 37°C en agitación orbital. Las células de cada matraz fueron cosechadas por centrifugación, lavadas con agua destilada y transferidas a igual número de matraces con 30 ml de medio mínimo YNB solo y con las diferentes fuentes de nitrógeno (amonio, prolina, peptona y albúmina) al 0.5%, así como un testigo sin fuente de nitrógeno. Una vez inoculados los medios fueron incubados durante 12 h a 37°C en agitación orbital, al cabo de las cuales se cosecharon células para obtención de RNA.

**(c)** Durante la formación de pseudomicelio en medio YPD a 35°C. Para inducir la formación de pseudomicelio se inoculó medio YPD con  $2 \times 10^6$  levaduras / ml de un cultivo sincronizado y se incubó a 35°C en cultivo estacionario. (Sudbery, 2001). Se cosecharon células a las 0, 2, 5 y 7 h para obtención de RNA.

**(d)** Durante la transición de levadura a tubo germinativo y micelio:

**(d1)** en medio de Lee (de acuerdo al protocolo de Lee *et al.*, 1975). Para la inducción de tubo germinativo y micelio se utilizó medio sintético de Lee precalentado a 39°C. Este medio se inoculó con  $2 \times 10^6$  levaduras / ml de un cultivo sincronizado y se incubó a 37°C en cultivo estacionario. Se cosecharon células durante las fases de formación de tubo germinativo y micelio a las 0, 1, 4, 8, 24, y 48 h para la obtención de RNA.

**(d2)** En medio de Lee adicionado con SFB al 5% (Lee-SFB) (pH 4.5 y pH 6.7) a 25°C y 37°C. Con el objeto de relacionar el efecto del pH, la temperatura y el dimorfismo con la expresión de los genes *SAP1-4* se inocularon 21 matraces con 30 ml de medio mineral de Lee con SFB al 5% pH 4.5 y se incubaron a 25°C durante 48 h en agitación orbital. En estas condiciones se obtuvieron células en fase de levadura 100 %. Las células de cada matraz fueron cosechadas por centrifugación, lavadas con agua destilada y transferidas a igual número de matraces con 30 ml de medio mineral de Lee con SFB al 5% pH 4.5 y 6.7 e incubados a 25 y 37°C. Las células se cosecharon por centrifugación a las 0, 3, 6, 12 y 24 h para la posterior obtención del RNA.

**(e)** En medio YCB-BSA a pH neutro y ácido a 37°C. Para estudiar el efecto del pH en la morfología de *C. dubliniensis* y en la expresión de los genes *SAP1-4*, se inocularon 12 matraces con 30 ml de medio YCB-BSA pH 7 y se incubaron 18 h a 37°C en agitación orbital. En estas condiciones las levaduras se transformaron a micelio 100 %. Las células de cada matraz fueron cosechadas por centrifugación, lavadas con agua destilada y transferidas a igual número de matraces con 30 ml de medio YCB-BSA a pH 4 y 7 e incubado en agitación orbital a 37°C. Se cosecharon las células a las 0, 3, 6, 12, 24 y 48 h para obtención de RNA.

**(f)** Durante la infección de queratinocitos humanos de la línea celular HaCaT con *C. dubliniensis*. Se hicieron cultivos de células HaCaT en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> y se inocularon con  $2.5 \times 10^6$  células de levadura por ml en 30 µl de PBS (Okeke *et al.*, 2000), se incluyeron testigos inoculados con PBS. Los cultivos inoculados se incubaron en una atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub> a 37°C por 0, 6, 12, y 24 h.

Todos los experimentos se hicieron por duplicado. Los experimentos de morfogénesis se monitorearon en fresco con un microscopio de contraste de fases (OlympusCH30; Olympus Optical CO., LTD. Japan) con objetivo de 40x.

### **Efecto de la pepstatina A durante la infección de queratinocitos (línea celular HaCaT) con *C. dubliniensis***

Se hicieron cultivos de células HaCaT sobre cubreobjetos de vidrio de 22 × 22 mm colocados en el fondo de cada uno de los 6 pozos de una placa para cultivo. Se inocularon con *C. dubliniensis* como se describió anteriormente. Se trataron cultivos similares con pepstatina A (ICN Biomedicals, Inc) 10 y 20  $\mu\text{M}$ .

Como testigos, se prepararon cultivos de células HaCaT sin inóculo de *C. dubliniensis*, cultivos iguales se trataron con pepstatina A 10  $\mu\text{M}$  y cultivos de células HaCaT inoculados con *Rhodotorula* sp. Después de 0, 6, 12, 18 y 24 h de incubación se recuperaron los cubreobjetos, se secaron al aire, se fijaron con methanol, se tiñeron con colorante Wright durante 12 minutos, se lavaron con agua y se examinaron bajo objetivo 40x usando un microscopio óptico. Se examinaron un total de 100 campos microscópicos para cuantificar las células HaCaT sobrevivientes.

Todos los experimentos se hicieron por duplicado. Todas las imágenes microscópicas fueron fotografiadas con una cámara digital. El significado estadístico de las diferencias entre los cultivos de células HaCaT testigo, los cultivos infectados, y cultivos infectados y tratados con pepstatina A, fue determinado con la prueba de distribución binomial de una cola y una  $P < 0.01$  fue considerada significativa.

## **Análisis bioinformático y filogenético**

Las secuencias de los genes *CdSAP* y *SAP1-10* de *C. albicans* (mencionados en la sección “Diseño de iniciadores”) fueron usadas para localizar los genes *CdSAP* completos y las secuencias corriente arriba y corriente abajo, mediante análisis BLAST en el proyecto genoma de *C. dubliniensis* disponible en disponible en la dirección electrónica <http://www.sanger.ac.uk/sequencing/Candida/dubliniensis/>.

Las secuencias de proteínas fueron deducidas de los genes usando el código genético alternativo para levaduras empleando el programa DNAMAN version 3 (Lynnon BioSoft 1994-97).

La identificación de motivos (secuencias de aminoácidos específicas dentro de una proteína) y la predicción de la localización subcelular de las proteínas deducidas fueron determinadas con las bases de datos de ScanProsite (Falquet *et al.*, 2002) y WoLFPSORT respectivamente disponibles en el servidor <http://www.expasy.org> que cuenta con bases de datos de secuencias de aminoácidos biológicamente significativas y patrones perfectamente formulados con los cuales se puede comparar e identificar a que familia de proteínas conocidas pertenece una proteína de función desconocida.

Las secuencias de proteínas Sap de *C. dubliniensis*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y yapsina de *Sacharomyces cerevisiae*, fueron alineadas con el programa CLUSTAL X version 1.83 (Thompson *et al.*, 1997).

El árbol filogenético se contruyó con el programa MEGA ( Molecular Evolutionary Genetics Analysis) MEGA version 4.01 (Tamura *et al.*, 2007), usando el criterio de evolución mínima incluyendo todos los sitios y 1000 muestreos al azar tipo “bootstrap” para evaluar las ramas internas del árbol (Hillis y Bull, 1993).

La similitud e identidad entre las secuencias fue calculada con el programa MatGAT 2.01 usando la matriz BLOSUM 62 (Campanella *et al.*, 2003).

La predicción de regiones promotoras fue realizado con el programa MatInspector versión 7.4.8.2, July 2007 (Cartharius *et al.*, 2005) y con la librería matriz de familias Version 6.3, 2007.

### III. RESULTADOS

#### Análisis bioinformático y filogenético

Las secuencias de las clonas de los genes *CdSAP1*, 2 y 3 obtenidas en nuestro grupo de trabajo así como las secuencias de los genes *CdSAP2*, *CdSAP4*, y *SAP1-10* de *C. albicans* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) permitieron realizar un análisis BLAST basado en el proyecto genoma de *C. dubliniensis* (<http://www.sanger.ac.uk/sequencing/Candida/dubliniensis/>). En este proyecto se está secuenciando el genoma de la cepa tipo de *Candida dubliniensis* CD36. Esta cepa es la más intensamente estudiada de esta especie. El proyecto de *C. dubliniensis* está en sus últimas fases de terminación y cuenta actualmente con 8 contigs cromosómicos de más de 100 Kb. Estos contigs representan la mayoría de un ensamblado haploide de 8 cromosomas homólogos a las de *C. albicans* que incluye los cromosomas CHR1, CHR2, CHR3, CHR4, CHR5, CHR6, CHR7 y CHRR cuyas secuencias se han liberado sin embargo los genes no están anotados aún. El análisis BLAST reveló la presencia de aparentemente 8 genes codificantes de Sap's todos ellos en sintenia con sus homólogos en *C. albicans* (Cuadro 7).

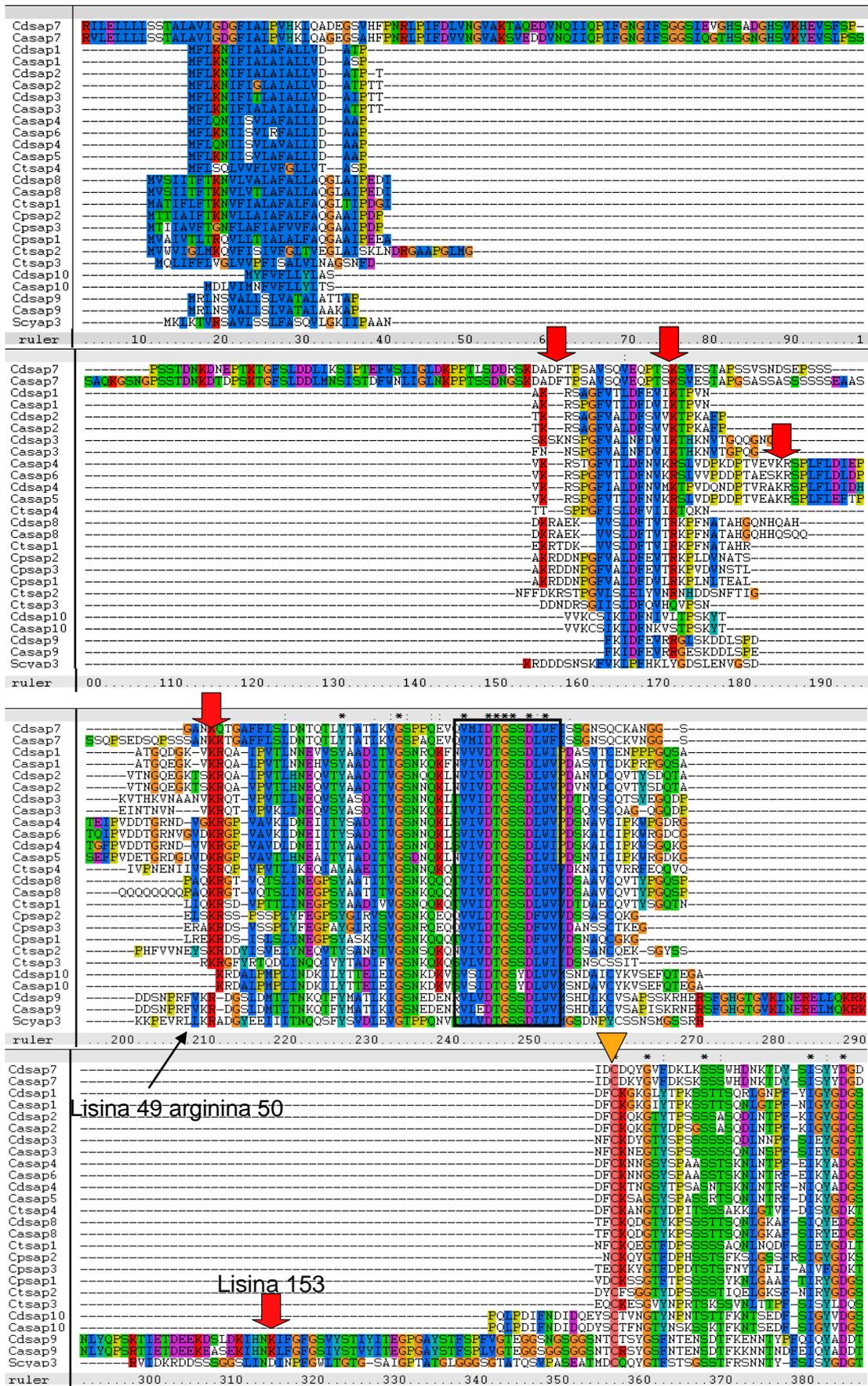
Al traducir a proteínas las secuencias y de los genes putativos de *CdSAP* se observó que son similares en tamaño a sus homólogas en *C. albicans* e igualmente con predicción de localización extracelular. Se identificaron las secuencias motivo típicas de aspartil proteasas, los motivos de cisteína conservados, así como los sitios putativos de procesamiento KK o KR y de anclaje GPI en las Sap 9 y 10. Se encontraron pequeñas diferencias en algunos aa de las secuencias motivo y en el número de sitios KK o KR en los genes *CdSAP4* y *CdSAP7*, en comparación a *C. albicans* (Cuadro 7 y Fig 6).

El árbol filogenético construido a partir de las secuencias deducidas de proteínas nos muestra que las *CdSap* 1, 2, 3, 7, 8, 9 y 10 se agrupan con sus homólogas en *C. albicans* mientras que se encontró una proteína Sap de *C. dubliniensis* que se agrupa con la subfamilia Sap4-6 de *C. albicans* (Fig. 7).

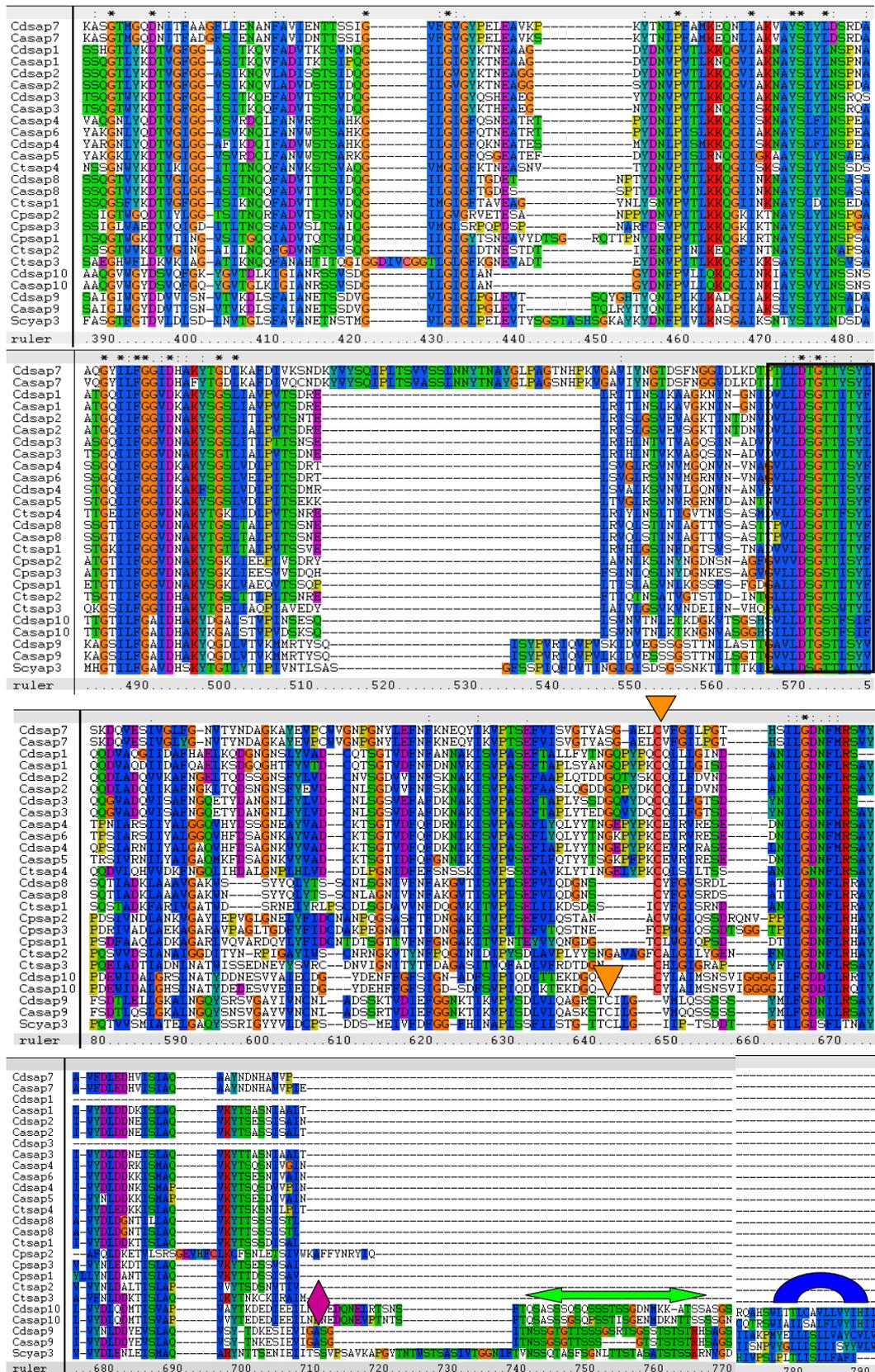
**Cuadro 7.** Comparación de genes *SAP* de *C. dubliniensis* y *C. albicans* y principales características de las proteínas deducidas.

Gen	Cromosoma	Contig y coordenadas <sup>a</sup>	ORF (pb) y aa <sup>b</sup>	Secuencias motif de aspartil proteasas y localización <sup>c</sup>	No. of sitios KR y KK <sup>d</sup>	Localización celular <sup>e</sup>
Cd/Ca	Cd <sup>a</sup> / Ca	Cd	Cd / Ca	Cd / Ca	Cd / Ca	Cd/Ca
<i>CdSAP1/SAP1</i>	6 / 6	CHR6.07011 646689 - 647776	1088 / 1173 362 / 390	VVVDTGSSDLWI 79-90 / 79-90  VLLDSGTTITYF 260-271 / 260-271	2 KR / 2 KR	E/E
<i>CdSAP2/SAP2</i>	R / R	CHRR.070112 1665258 - 1666452	1199 / 1194 397 / 397	VIVDTGSSDLWV 84-95 / 85-96  VLLDSGTTITYL 266-277 / 267-278	2 KR / 2 KR	E/E
<i>CdSAP3/SAP3</i>	3 / 3	CHR3.070111 1198648 - 1199399	1133 / 1194 377 / 397	VVIDTGSSDLWV 94-105 / 87-98  VLLDSGTTISYL 276-287 / 268-279	1 KR / 1 KR	E/E
<i>CdSAP4/SAP4</i>	6 / 6	CHR6.07011 643380 - 644536	1249 / 1254 417 / 417	VIVDTGSSDLWI 104-115 / 104-115  VLLDSGTTISYF 272-283 / 272-283	3 KR / 4 KR	E/E
<i>CdSAP7/SAP7</i>	1 / 1	CHR1.070111 1046844 - 1048406	1526 / 1764 561 / 587	VMIDTGSSDLWF 216-227 / 241-252 TLLDTGTTYSYL 434-445 / 459-570	- / 1 KK	E/E
<i>CdSAP8/SAP8</i>	3 / 3	CHR3.070111 585548 - 586738	1191 / 1215 396 / 405	VIVDTGSSDLWV 93-104 / 102-113  PVLDSGTTITYF 274-285 / 283-294	2 KR / 2KR	E/E
<i>CdSAP9/SAP9</i>	3 / 3	CHR3.070111 847432 - 849081	1659 / 1632 549 / 544	VLVDTGSSDLWV 76-87 / 76-87  AVLDTGSTLSYV 359-370 / 359-370	1 KR / 1 KR	E/E
<i>CdSAP10/SAP10</i>	4 / 4	CHR4.07111 997263 - 998416	1498 / 1326 447 / 441	VSIDTGSYDLWV 58-69 / 63-74  VLLDTGSTFSIF 250 - 261 / 255-266	1 KR / 1 KR	E/E

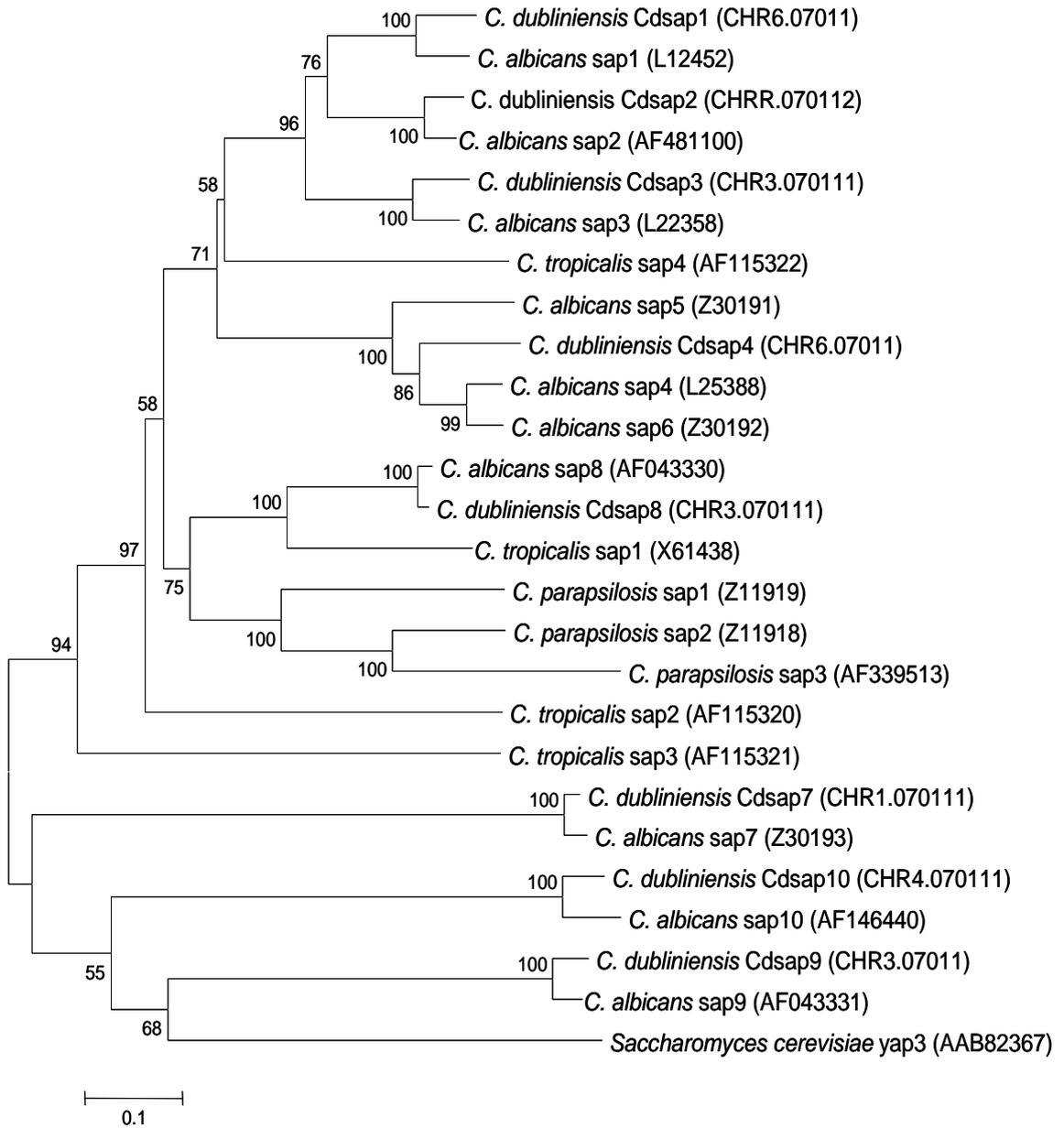
**Cd**, *C. dubliniensis*. **Ca**, *C. albicans*. **En negritas**, sustituciones en las secuencias motif de *C. albicans*. **a**, genes *CdSAP* localizados por BLAST con las secuencias de *C. albicans* en el Trust Sanger Institute Pathogen Sequencing Unit. **b**, las traducciones se hicieron usando el código alternativo para levaduras con el programa DNAMAN version v. 3. **c**, la predicción se hizo con las bases de datos de ScanProsite de ExPASy Proteomics tools. **d**, todas las proteínas Sap contienen sitios de procesamiento Lys-Arg (KR) o Lys-Lys (KK). **e**, la predicción se hizo con el programa WoLF SORT de ExPASy Proteomics tools. **E**, extracelular. -, ausente



**Fig 6.** Alineamiento de secuencias deducidas de proteínas Sap de *Candida* spp. Con cuadros negros se señalan las secuencias motivo de aspartil proteasas. Con flechas rojas, los sitios de procesamiento KK y KR. Con triángulos naranjas, motivos de cisteína conservados.



**Fig. 6.** Continuación. Alineamiento de secuencias deducidas de proteínas Sap de *Candida* Spp. Con cuadros negros se señalan las secuencias motivo de aspartil proteasas con triángulos naranja, motivos de cisteína conservados. Con rombo morado la secuencia consenso GASG de proteínas GPI ancladas. Con doble flecha verde, sitios omega consenso para anclaje GPI ricos en serina y treonina. Medio círculo azul, regiones hidrofóbicas.



**Fig.7.** Relación filogenética de los genes *SAP* de *Candida* spp. Las secuencias de las proteínas fueron deducidas de los genes de *Candida* spp. y se alinearon con el programa CLUSTAL X (Thompson et al., 1997). El árbol filogenético se construyó con el programa MEGA version 4.01 (Tamura et al., 2007), usando el criterio de evolución mínima incluyendo todos los sitios y 1000 muestreos al azar tipo “bootstrap” para evaluar las ramas internas del árbol (Hillis y Bull, 1993). Las proteínas *CdSAP* de *C. dubliniensis* fueron deducidas de los genes localizados en el proyecto genoma de *C. dubliniensis* (<http://www.sanger.ac.uk/sequencing/Candida/dubliniensis/>), en los contig y coordenadas sig: *CdSAP1* CHR6.07011 (646689 – 647776), *CdSAP2* CHRR.070112 (1665258 – 1666452), *CdSAP3* CHR3.070111 (1198648 – 1199399), *CdSAP4* CHR6.07011 (643380 – 644536), *CdSAP7* CHR1.070111 (1046844 – 1048406), *CdSAP8* CHR3.070111 (585548-586738), *CdSAP9* CHR3.070111 (847532-849081), *CdSAP10* CHR4.07111 (997263 - 998416).

	Cdsap1	Cdsap2	Cdsap3	Cdsap4	Cdsap7	Cdsap8	Cdsap9	Cdsap10	sap1	sap2	sap3	sap4	sap5	sap6	sap7	sap8	sap9	sap10
1. Cdsap1		67.5	64.7	51.8	23.2	49.0	21.3	28.4	82.1	67.1	61.9	50.8	51.0	51.4	21.8	47.2	22.2	26.6
2. Cdsap2	75.8		64.1	55.4	26.0	54.1	25.0	29.8	73.0	92.5	70.3	53.9	53.3	54.8	25.8	51.6	24.8	29.9
3. Cdsap3	75.9	76.1		48.5	25.1	47.2	22.1	27.8	59.9	64.4	80.5	47.7	45.7	46.7	24.2	47.5	22.0	27.3
4. Cdsap4	66.2	71.2	66.2		26.6	45.7	26.2	27.9	56.6	55.7	53.5	81.1	75.1	81.8	26.6	44.5	25.0	27.1
5. Cdsap7	34.9	38.5	37.1	40.5		26.3	23.9	18.1	26.1	26.5	27.2	27.7	27.2	28.1	86.4	26.5	24.6	18.9
6. Cdsap8	61.1	68.0	62.1	62.4	38.9		26.6	28.2	53.3	54.4	54.3	46.4	45.3	46.3	24.6	94.1	27.5	28.2
7. Cdsap9	34.6	39.9	36.8	40.3	44.4	38.3		31.3	24.0	26.9	24.9	27.9	26.9	27.5	23.1	26.9	89.3	30.5
8. Cdsap10	43.6	49.4	45.6	47.4	34.8	46.3	45.5		31.5	29.7	29.0	28.5	27.5	27.6	19.1	28.1	31.7	86.1
9. sap1Ca	86.4	81.9	73.4	72.9	38.1	65.7	36.1	45.4		72.9	68.9	56.4	55.0	56.2	24.5	51.2	25.1	31.5
10. sap2Ca	74.1	95.5	74.9	70.0	39.4	66.1	40.3	49.7	80.4		71.5	55.0	53.2	55.3	25.6	52.4	26.0	28.4
11. sap3Ca	72.6	82.7	86.9	71.7	38.7	67.8	40.6	48.5	81.2	81.7		53.5	49.5	53.1	24.8	53.6	24.6	28.7
12. sap4Ca	66.4	70.0	65.5	89.7	41.5	62.1	41.7	46.1	71.7	70.0	70.3		77.8	90.4	25.8	45.9	28.7	27.4
13. sap5Ca...	65.6	68.4	62.4	87.1	39.4	61.5	42.3	47.2	72.2	67.9	68.2	89.2		80.4	26.7	45.1	26.4	27.4
14. sap6Ca	65.3	69.9	64.4	90.2	41.5	62.0	41.2	45.6	71.3	69.1	69.6	95.9	89.7		27.1	45.8	27.7	26.2
15. sap7Ca	32.8	37.1	36.2	39.3	90.8	37.1	42.0	34.4	37.1	37.9	35.9	38.9	38.3	39.1		25.3	24.1	18.9
16. sap8Ca	59.5	66.7	61.7	63.1	39.6	96.5	42.1	46.8	64.7	66.4	67.4	63.3	62.0	62.7	38.4		26.4	28.1
17. sap9Ca	35.3	39.7	36.4	39.9	44.4	40.4	94.5	46.1	38.2	38.8	39.5	43.0	42.6	41.5	43.7	41.2		30.1
18. sap10Ca	41.5	48.3	43.9	45.7	35.3	45.0	45.2	91.6	45.9	46.8	46.8	45.0	46.6	44.4	33.8	45.5	45.6	

**Fig. 8.** Matriz de similitud e identidad de las proteínas deducidas de los genes *SAP* de *C. dubliniensis* y *C. albicans*. La similitud e identidad entre las secuencias fue calculada con el programa MatGAT 2.01 usando la matriz BLOSUM 62 (Campanella *et al.*, 2003). Similitud (rótulos horizontales) en azul. Identidad (rótulos verticales) en verde. Se marcan con óvalos los % de similitud e identidad de los genes homólogos.

La similitud e identidad de las secuencias de las proteínas deducidas con las proteínas Sap de *C. albicans* es mayor al 80% y en el caso de la proteína de *C. dubliniensis* que se agrupa con la subfamilia Sap4-6 de *C. albicans*, la similitud e identidad fue mayor con la Sap6 que con las Sap4 y 5 (Fig 8), sin embargo la sintenia corresponde al gen *SAP4* de *C. albicans* es decir en el cromosoma 6 y corriente arriba del gen *SAP1* (Cuadro7).

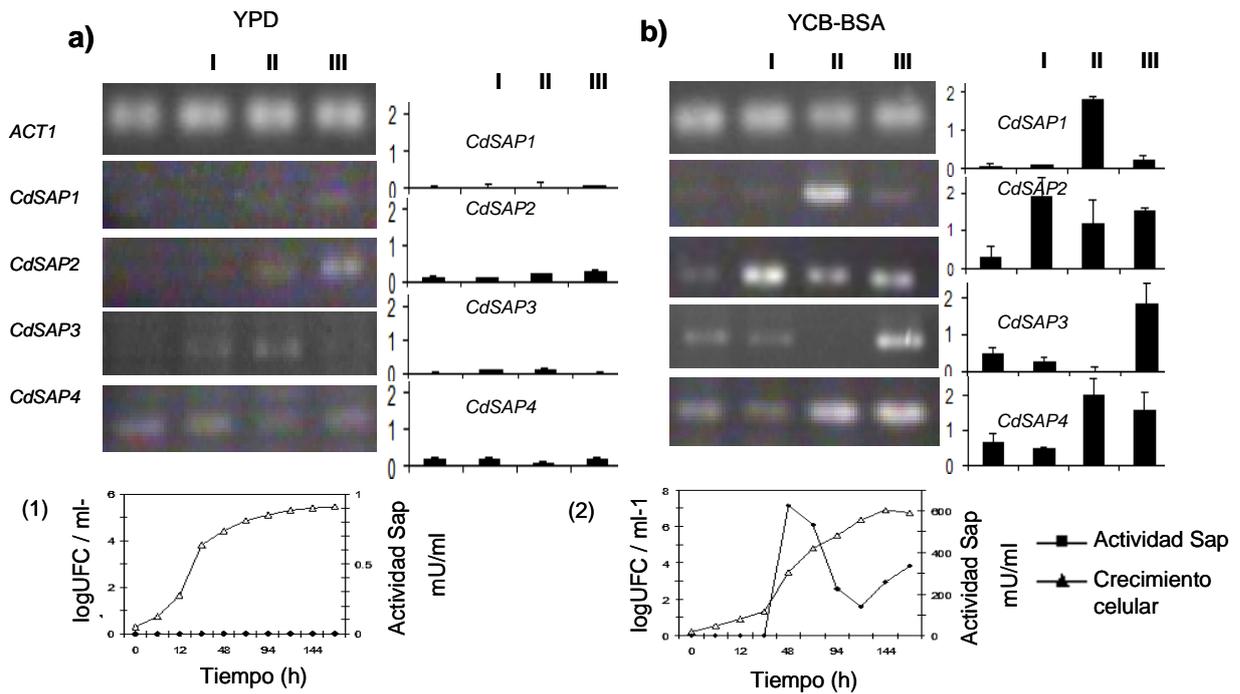
El objetivo de este trabajo consistió en estudiar la expresión de los genes *CdSAP1-4* ya que sus homólogos en *C. albicans* son considerados atributos de virulencia.

### **Expresión de genes *CdSAP* durante las diferentes fases de crecimiento.**

Se determinó el crecimiento cuantificando UFC/ml durante los tiempos correspondientes a las fases: logarítmica (I), estacionaria temprana (II) y estacionaria tardía (III) en medios YPD y YCB-BSA. El crecimiento de *C. dubliniensis* es más lento en el medio YCB-BSA que en YPD (Fig. 9-a y b). Los tiempos correspondientes a las fases descritas, fueron: 12, 24 y 48 h en medio YPD y 48, 72 y 120 h en medio YCB-BSA. *C. dubliniensis* no presentó actividad Sap en medio YPD sin embargo en medio YCB-BSA la actividad se aprecia a partir de las 48 h (fase logarítmica de crecimiento en este medio) (Fig. 9-a y b). Los mayores niveles de expresión de los genes *CdSAP1-4* se presentaron en el medio YCB-BSA (Fig. 9-a y b). En el medio YCB-BSA el gen *CdSAP1* se expresó durante la fase estacionaria temprana, el gen *CdSAP2* se expresó en las tres fases de crecimiento; el gen *CdSAP3* se expresó principalmente durante la fase de crecimiento estacionaria tardía mientras que el gen *CdSAP4* se expresó principalmente durante la fase estacionaria (temprana y tardía). La expresión del gen *CdSAP2* presentó una tendencia similar a la de la actividad Sap determinada en el sobrenadante, mayores niveles de expresión y mayores niveles de la actividad enzimática durante la fase logarítmica de crecimiento, por lo que esta actividad podría corresponder principalmente a la expresada por este gen.

### **Expresión de genes *CdSAP* en diferentes fuentes de nitrógeno.**

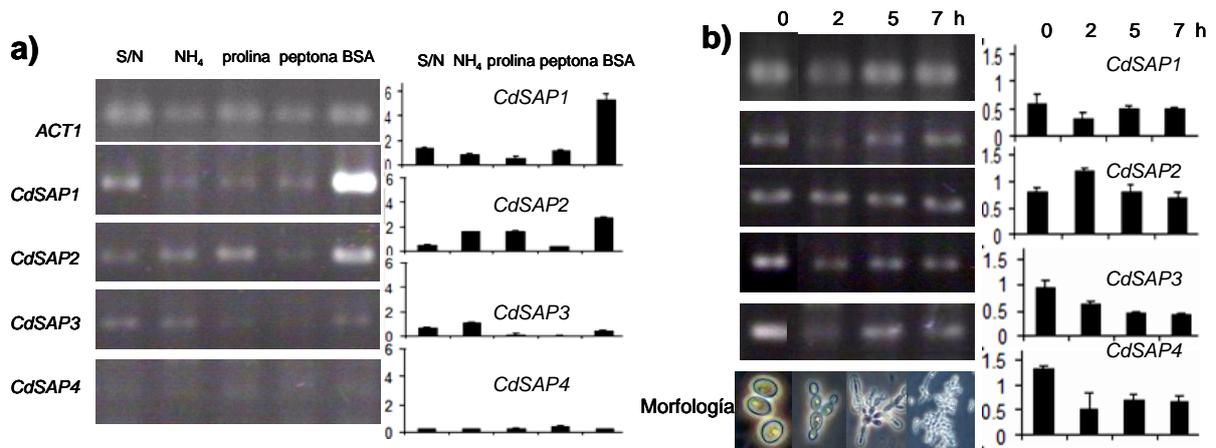
Cabe mencionar que este experimento es de transición y no de crecimiento ya que células provenientes de la fase estacionaria temprana cultivadas en YPD fueron lavadas y transferidas en el mismo volumen a los medios con diferentes fuentes de nitrógeno. Los cultivos no proliferantes se incubaron durante 12 h, utilizando como fuentes de nitrógeno: amonio, prolina, peptona y BSA al 0.5%, así como un testigo sin fuente de nitrógeno. Los genes *CdSAP1* y 2 se expresaron en los 5 medios probados, con un aumento de la expresión en el medio con BSA como fuente de nitrógeno. La expresión de los genes *CdSAP3* y 4 fue apenas perceptible en todas las condiciones de fuente de nitrógeno probadas (Fig. 10-a).



**Fig. 9.** Expresión de genes *CdSAP1-4* de *C. dubliniensis* durante las diferentes fases de crecimiento, a) en medio, YPD, b) en medio YCB-BSA, (a-I y b-I) fase logarítmica, (a-II and b-II) fase estacionaria temprana, (a-III b-III) estacionaria tardía, (1) curva de crecimiento en medio YPD, (2) curva de crecimiento en medio YCB-BSA. La expresión de los genes fue normalizada con la expresión del gen *ACT1*, y medida por RT-PCR semicuantitativa. Las gráficas de barras presentan el resultado de la media  $\pm$  SE de dos experimentos.

### Expresión de *CdSAP's* de *C. dubliniensis* en la formación de pseudomicelio.

La formación de pseudomicelio se pudo observar al 100% a las 7 h, tiempos mayores de incubación (hasta 48 h) no produjeron diferencia en la morfología del pseudomicelio obtenido a las 7 h. En este experimento se pudo observar que hay expresión de los cuatro genes (*CdSAP1-4*) durante las etapas de formación del pseudomicelio pero dicha expresión no es diferencial (Fig. 10-b). *C. albicans* produjo pseudomicelio más lentamente que *C. dubliniensis* bajo las mismas condiciones probadas, las ramificaciones de *C. albicans* fueron de mayor longitud ya que las ramificaciones de *C. dubliniensis* eran cortas.



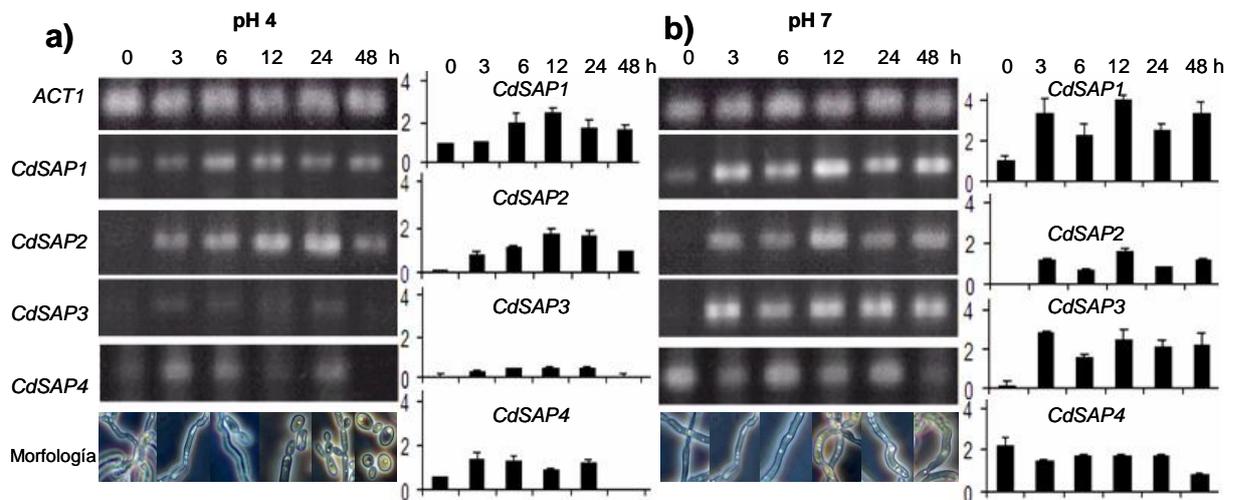
**Fig. 10.** Expresión de los genes *CdSAP1-4* de *C. dubliniensis*: **a)** en medio YNB con diferentes fuentes de nitrógeno, incubado durante 12 h; **b)** durante la formación de pseudomicelio (0-7 h) en medio YPD a a 35°C. La expresión de los genes fue normalizada con la expresión del gen *ACT1*, y medida por RT-PCR semicuantitativa. Las gráficas de barras presentan el resultado de la media ± SE de dos experimentos.

### Expresión de *CdSAP's* de *C. dubliniensis* durante la producción de tubo germinativo y micelio en medio Lee.

La formación de tubo germinativo inició en la primera hora de incubación, se hizo evidente a las 4 h y la formación de micelio se observó a partir de las 8 h, cabe mencionar que aunque se realizaron observaciones a las 24 y 48 h, la conversión a micelio no se llevó a cabo en su totalidad como llega a suceder con algunas cepas de *C. albicans*). En comparación con *C. albicans* ATCC 10231 la formación de micelio fue más lenta en *C. dubliniensis* ya que a las 4 h *C. albicans* presentó tubos germinativos de mayor longitud. Los niveles de expresión de los *CdSAPs* fueron bajos y no se observó una expresión diferencial durante la formación del tubo germinativo o micelio (datos no mostrados).

### Efecto del pH en la expresión de los genes *CdSAP1-4* en medio YCB-BSA a 37°C.

Los medios YCB-BSA pH 4 y pH 7 se inocularon con la fase micelial. En el medio YCB-BSA a pH 4 el micelio empezó a revertir a la fase de levadura a partir de las 6 h de incubación y a las 48 h se observaron levaduras mayoritariamente (Fig. 11-a). Por otro lado, en el medio YCB-BSA a pH 7 se mantuvo la fase de micelio en un 100% a diferencia de lo ocurrido en el medio de Lee, esta morfología se conservó hasta las 48 h (Fig. 11-b). Los genes *CdSAP1*, 2 y 4 se expresaron tanto a pH 7 como a pH 4. Los niveles de expresión del gen *CdSAP3* fueron considerablemente mayores a pH 7. Los genes *CdSAP3* y *CdSAP4* dejaron de expresarse cuando el cultivo revirtió a fase de levadura, en el medio a pH 4 a las 48 h.



**Fig. 11.** Efecto del pH en la expresión de los genes *CdSAP1-4* de *C. dubliniensis* en medio YCB-BSA a 37°C: **a)** durante la fase micelial (0-6 h) y durante la reversión a la fase de levadura (12 a 48 h) a pH 4; **b)** durante la fase micelial (0-48 h) a pH 7. La expresión de los genes fue normalizada con la expresión del gen *ACT1*, y medida por RT-PCR semicuantitativa. Las gráficas de barras presentan el resultado de la media  $\pm$  SE de dos experimentos.

### **Expresión de genes *CdSAP1-4* en medio de Lee-FCS a diferentes temperaturas y pH.**

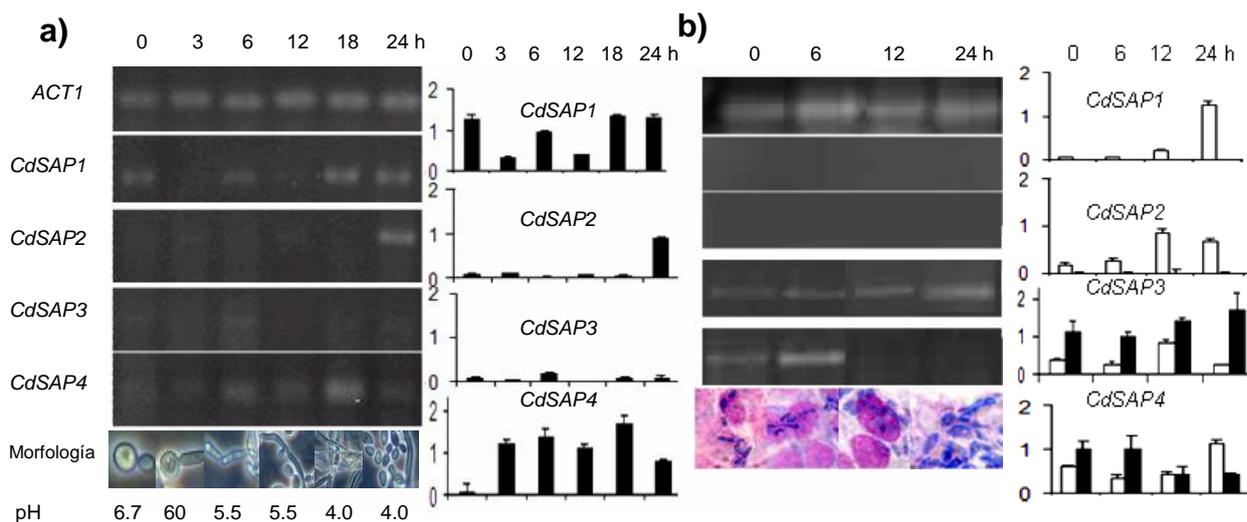
Con el objeto de relacionar el efecto del pH, la temperatura y el dimorfismo con la expresión de los genes *CdSAP1-4* se utilizó medio de Lee-FCS incubando a 25°C y a 37°C así como a pH 4.5 y 6.7. La formación total de micelio en *C. dubliniensis* se observó a pH 6.7, a 37°C a las 18 h de incubación (Fig. 12-a). El gen *CdSAP4* aumentó su expresión durante la formación de micelio hasta las 18 h de incubación, a las 24 h desapareció la expresión del gen, tiempo que coincidió con la reversión a fase de levadura (Fig. 12-a). La temperatura de 25°C y pH ácido impidió la formación de micelio de *C. dubliniensis*.

### **Expresión de genes *CdSAP1-4* durante la infección de un cultivo de queratinocitos y el efecto de un inhibidor de aspartil proteasas (pepstatina).**

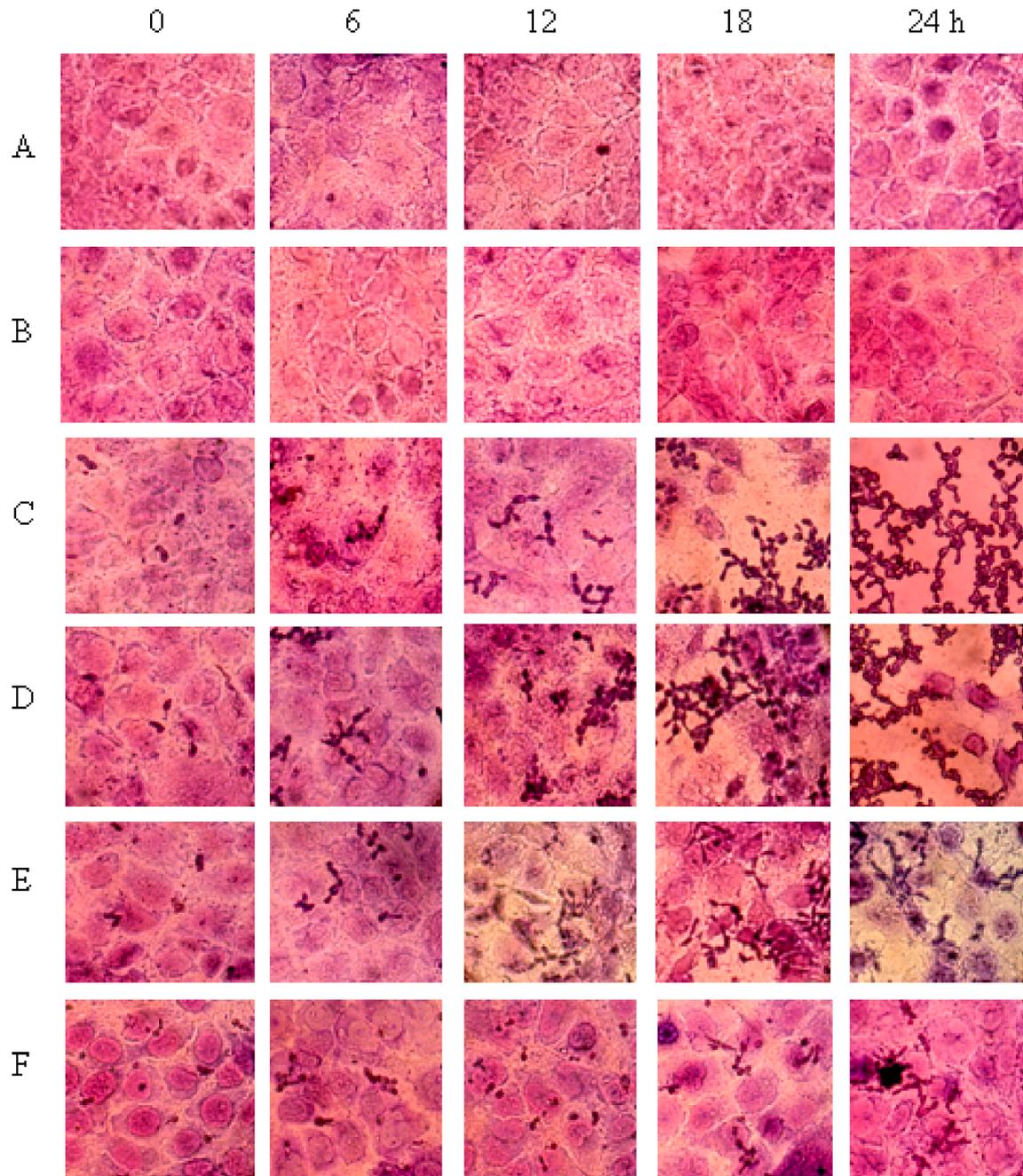
Con el fin de estudiar la expresión de los genes *CdSAP1-4* en presencia de células del hospedero se inocularon queratinocitos de la línea celular HaCaT con *C. dubliniensis*. En estas condiciones se expresaron únicamente los genes *CdSAP3* y *4*. El gen *CdSAP3* aumentó levemente su expresión hacia el final del experimento (24 h) y *CdSAP4* se expresó solo en la etapa inicial de la infección (Fig. 12-b barras negras), la expresión de ambos genes fue mayor que en los testigos. Utilizando este modelo, se observó que *C. dubliniensis* puede formar únicamente pseudomicelio desde las 6 hasta las 24 h (Fig. 12-b y Fig. 13-C, D y E). Los testigos de este experimento fueron cultivos de *C. dubliniensis* en medio DMEM mantenidos en las mismas condiciones que los cultivos con queratinocitos, la expresión en estos testigos es representada por barras blancas.

La infección del cultivo celular HaCaT con *C. dubliniensis* ocasionó una disminución del número de queratinocitos así como cambios en la granulocidad de los mismos, el mayor efecto se observó a las 18 y 24 h (Fig. 13-A, B y C). Con el fin de estudiar la relación de los cambios y la producción de Sap's se realizaron experimentos con dos concentraciones de pepstatina A (10 y 20 µM). Se determinó

el número de queratinocitos con y sin pepstatina, a las 18 h de incubación. Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) entre el porcentaje de células sobrevivientes de queratinocitos infectados y sin infectar así como los tratados con pepstatina A 10 y 20  $\mu\text{M}$ . Se observó un 35% de queratinocitos sobrevivientes en el cultivo inoculado con *C. dubliniensis* con respecto a los cultivos sin levaduras (Fig. 13-A, B, y C), con 10  $\mu\text{M}$  de pepstatina hubo un aumento de queratinocitos sobrevivientes a 63% (SE 0.07) (Fig. 13-D) y cuando se aumentó la concentración de pepstatina (20  $\mu\text{M}$ ) se observó 78% de queratinocitos sobrevivientes (SE 0.07) (Fig. 13-E). Se utilizó a *Rhodotorula sp.* como un testigo de levadura no patógena y se encontró un 100% de sobrevivencia de los queratinocitos (Fig. 13-F).



**Fig. 12.** Expresión de genes *CdSAP1-4* de *C. dubliniensis*: **a)** durante el dimorfismo en medio de Lee-FCS a pH 6.7 y a 37°C; 3h formación de tubo germinativo, 6-18 h formación de micelio, 24 h reversión a fase de levadura; **b)** durante la infección de un cultivo de queratinocitos de la línea celular HaCaT con *C. dubliniensis* (barras negras) y durante el crecimiento de las levaduras en medio DMEM solo (barras blancas). La expresión de los genes fue normalizada con la expresión del gen *ACT1*, y medida por RT-PCR semicuantitativa. Las gráficas de barras presentan el resultado de la media  $\pm$  SE de dos experimentos.



**Fig. 13.** Imágenes digitales del efecto de la pepstatina A (un inhibidor de aspartil proteasas) en la infección de queratinocitos humanos de la línea celular HaCaT con *C. dubliniensis*. **A**, cultivos de queratinocitos sin inocular con *C. dubliniensis* usados como testigos. **B**, cultivos de queratinocitos sin inocular con *C. dubliniensis* con pepstatina A 10 µM usados como testigos. **C**, cultivos de queratinocitos inoculados con *C. dubliniensis*. **D**, cultivos de queratinocitos inoculados con *C. dubliniensis* con pepstatina A 10 µM. **E**, cultivos de queratinocitos inoculados con *C. dubliniensis* con pepstatina A 20 µM. **F**, cultivos de queratinocitos inoculados con *Rhodotorula* sp. usados como testigos. Tinción de Wright, 40 X.

### Posibles sitios de unión a factores de transcripción

Se analizó la secuencia de aproximadamente 2100 pb corriente arriba del codón de inicio (ATG) de los genes *SAP*. La búsqueda de sitios de unión a factores de transcripción se realizó con el programa MatInspector versión 7.4.8.2, julio 2007 (Cartharius *et al.*, 2005). Este programa usa una librería de descripciones de matrices predefinidas para sitios de unión a proteínas reguladoras. La búsqueda se realizó comparando las secuencias con la librería matriz de familias Version 6.3, 2007, previamente conocidas en hongos aplicando un “core de similitud” de 0.95.

Cabe mencionar que el “core de similitud” es de 1.0 y es alcanzado cuando las bases más conservadas de una matriz se complementan de manera exacta con la secuencia problema. El “core de secuencia” de una matriz es definido como las posiciones consecutivas (usualmente cuatro) más conservadas de la matriz. La “matriz de similitud” considera todas las bases sobre la longitud entera de la matriz. Una similitud perfecta entre las secuencias problema y matriz, obtiene un “score” de 1.00 (lo que significa que cada posición de la secuencia corresponde al nucleótido más altamente conservado en dicha posición en la matriz).

El alineamiento gráfico de las secuencias mostró sitios putativos de unión a factores de transcripción. En *CdSAP1* se encontraron 77. Los más frecuentes fueron: 26 sitios NIT2 el cual activa genes regulados por nitrógeno, ocho sitios MATA1 proteína homeodominio del factor alfa 2, cuatro sitios ADR1 regulador del gen de la alcohol deshidrogenasa 1, Tres sitios MAT1MC, proteína HMG-Box que activa genes M específicos en las células M de *S. pombe*, se une a sitios M-Box y actúa cooperativamente con *STE11* HMG-Box unida a sitios TR-box, Un sitio STRE MSN2y MSN4 son proteínas de dedos de zinc que activan genes regulados por STRE (elemento de respuesta a estrés en *S. cerevisiae*, tres elementos MATA1 proteína homeodominio del factor sexual a1 de *S. cerevisiae* (Fig.14-A, anexo 3).

En *CdSAP2* se encontraron 74 sitios putativos de unión a factores de transcripción. Los más frecuentes fueron: 11 sitios NIT2 activador genes regulados por nitrógeno, tres sitios GATA de unión a una proteína de dedos de zinc que

activa la expresión de genes activados por metabolitos de nitrógeno, tres sitios GCR1 activador de transcripción de enzimas glicolíticas e interactúa con RAP1, dos sitios MATA1 proteína homeodominio del factor sexual a1 de *S. cerevisiae*, 2 sitios MAT1MC, proteína HMG-Box que activa genes M específicos en las células M de *S. pombe*, se une a sitios M-Box y actúa cooperativamente con *STE11* HMG-Box unida a sitios TR-box (Fig.14-B, anexo 4).

En *CdSAP3* se encontraron 56 sitios putativos de unión a factores de transcripción. Los más frecuentes fueron: 12 sitios NIT2 activador genes regulados por nitrógeno, siete sitios MATA1 proteína homeodominio del factor sexual alfa2, dos sitios MATA1 proteína homeodominio del factor sexual a1 de *S. cerevisiae*, cuatro sitios ADR1 regulador del gen de la alcohol deshidrogenasa 1, Un sitio STRE elemento de respuesta a estrés (Fig.14-C, anexo 5).

En *CdSAP4* se encontraron 69 sitios putativos de unión a factores de transcripción. Los más frecuentes fueron: ocho sitios ADR1 regulador del gen de la alcohol deshidrogenasa 1, nueve sitios NIT2 el cual activa genes regulados por nitrógeno, tres sitios MATA1 proteína homeodominio del factor sexual alfa2, dos sitios STREMSN2 y MSN4 son proteínas de dedos de zinc que activan genes regulados por STRE (elemento de respuesta a estrés en respuesta a estrés en *S. cerevisiae*, dos sitios MAT1MC, proteína HMG-Box que activa genes M específicos en las células M de *S. pombe*, dos sitios HAP234 factores de unión a CCAAT de levaduras (Fig.14-D, anexo 6).

En *CdSAP7* se encontraron 54 sitios putativos de unión a factores de transcripción. Los más frecuentes fueron: 18 sitios NIT2 activador genes regulados por nitrógeno, nueve sitios ADR1 regulador del gen de la alcohol deshidrogenasa 1, cinco sitios MATA1 proteína homeodominio del factor sexual alfa2, cinco sitios MATA1 proteína homeodominio del factor sexual a1 de *S. cerevisiae*, cuatro sitios HAP234 factores de unión a CCAAT de levaduras, tres sitios GATA de unión a una proteína de dedos de zinc que activa la expresión de genes activados por metabolitos de nitrógeno, dos sitios MAT1MC proteína HMG-Box que activa genes M específicos en las células M de *S. pombe* (Fig.14-E, anexo 7).

En *CdSAP8* se encontraron 58 sitios putativos de unión a factores de transcripción. Los más frecuentes fueron: cuatro sitios NIT2 activador genes regulados por nitrógeno, tres sitios GATA de unión a una proteína de dedos de zinc que activa la expresión de genes activados por metabolitos de nitrógeno, un sitio MMAT M-box interacting with Mat1-Mc, dos sitios YSTR elemento de respuesta a estrés de levaduras, dos sitios YMIG proteína GC-Box de levaduras, dos sitios YMAT factor de apareamiento de levaduras, 2 sitios MADS factor MADS-Box de levaduras (Fig.14-F, anexo 8).

En *CdSAP9* se encontraron 38 sitios putativos de unión a factores de transcripción. Los más frecuentes fueron: seis sitios NIT2 activador genes regulados por nitrógeno, dos sitios ABAA regulador del desarrollo de esporas de *Aspergillus*, tres sitios ABF1 proteína de unión a ARS, tres sitios GCN4 proteína cremallera de leucina, dos sitios MCM1 regulador del ciclo celular y metabólico, tres sitios HAP234 factores de unión a CCAAT de levaduras, dos sitios GCR1 activador de genes glicolíticos y dos sitios MATA1 Factor sexual a1 de *S. cerevisiae* (Fig.14-G, anexo 9).

En *CdSAP10* se encontraron 54 sitios putativos de unión a factores de transcripción. Los más frecuentes fueron: diez sitios ADR1.01 regulador del gen de la alcohol deshidrogenasa 1, nueve sitios NIT2 activador genes regulados por nitrógeno, cuatro sitios MATALPHA2 proteína homeodominio del factor sexual alfa2, tres sitios MAT1MC.01 proteína HMG-Box que activa genes M específicos en las células M de *S. pombe*, dos sitios GATA de unión a una proteína de dedos de zinc que activa la expresión de genes activados por metabolitos de nitrógeno (Fig.14-H, anexo 10).

Comparando el análisis de los sitios putativos de unión a factores de transcripción de los genes *CdSAP* con sus homólogos en *C. albicans* observamos muy pocas coincidencias podría decirse que son diferentes. Lo que si coincide es la presencia de numerosos sitios putativos de unión a factores de transcripción NIT2 (activador genes regulados por nitrógeno) en todas las regiones reguladoras putativas de los genes *CdSAP* y *SAP* aunque en diferentes localizaciones.

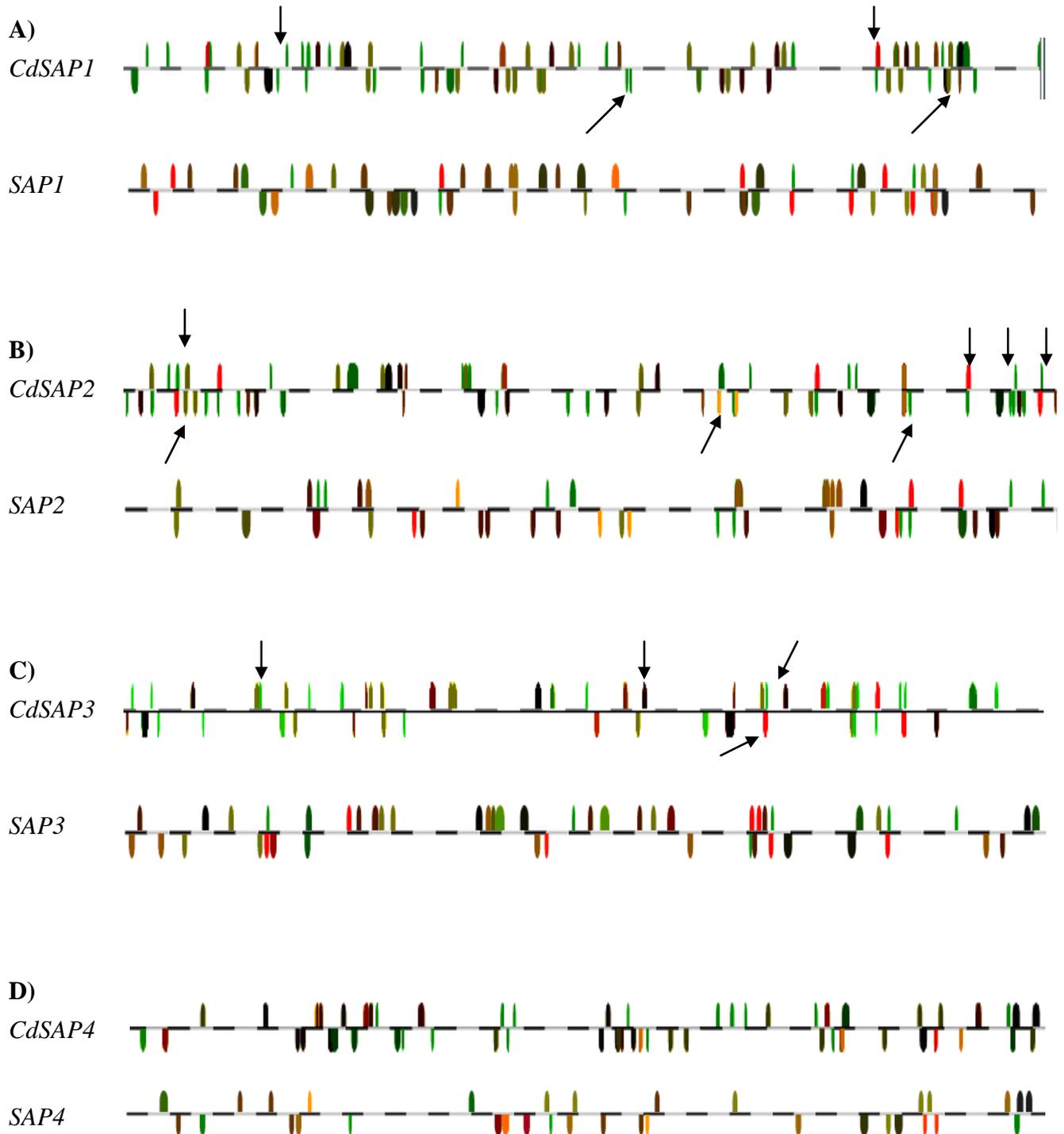


Fig 14. Representación esquemática de los posibles sitios de unión a factores de transcripción de los genes *SAP* de *C. dubliniensis* y *C. albicans*. Se analizaron 2100 pb corriente arriba del codón de inicio (ATG). Arriba de la línea se esquematizan los de la cadena positiva y debajo de la línea los de la cadena negativa. Se señalan con flechas los sitios que coinciden en ambas especies. Abajo se presentan los códigos de color de los principales sitios.

<input checked="" type="checkbox"/> F\$ABAA	<input checked="" type="checkbox"/> F\$ACPF	<input checked="" type="checkbox"/> F\$GATA	<input checked="" type="checkbox"/> F\$MADS	<input checked="" type="checkbox"/> F\$MMAT	<input checked="" type="checkbox"/> F\$MREF	<input checked="" type="checkbox"/> F\$TRBI	<input checked="" type="checkbox"/> F\$YADR	<input checked="" type="checkbox"/> F\$YCAT	<input checked="" type="checkbox"/> F\$YGCR
<input checked="" type="checkbox"/> F\$VHSF	<input checked="" type="checkbox"/> F\$YMAT	<input checked="" type="checkbox"/> F\$YMCB	<input checked="" type="checkbox"/> F\$YMCM	<input checked="" type="checkbox"/> F\$YMIG	<input checked="" type="checkbox"/> F\$VNIT				

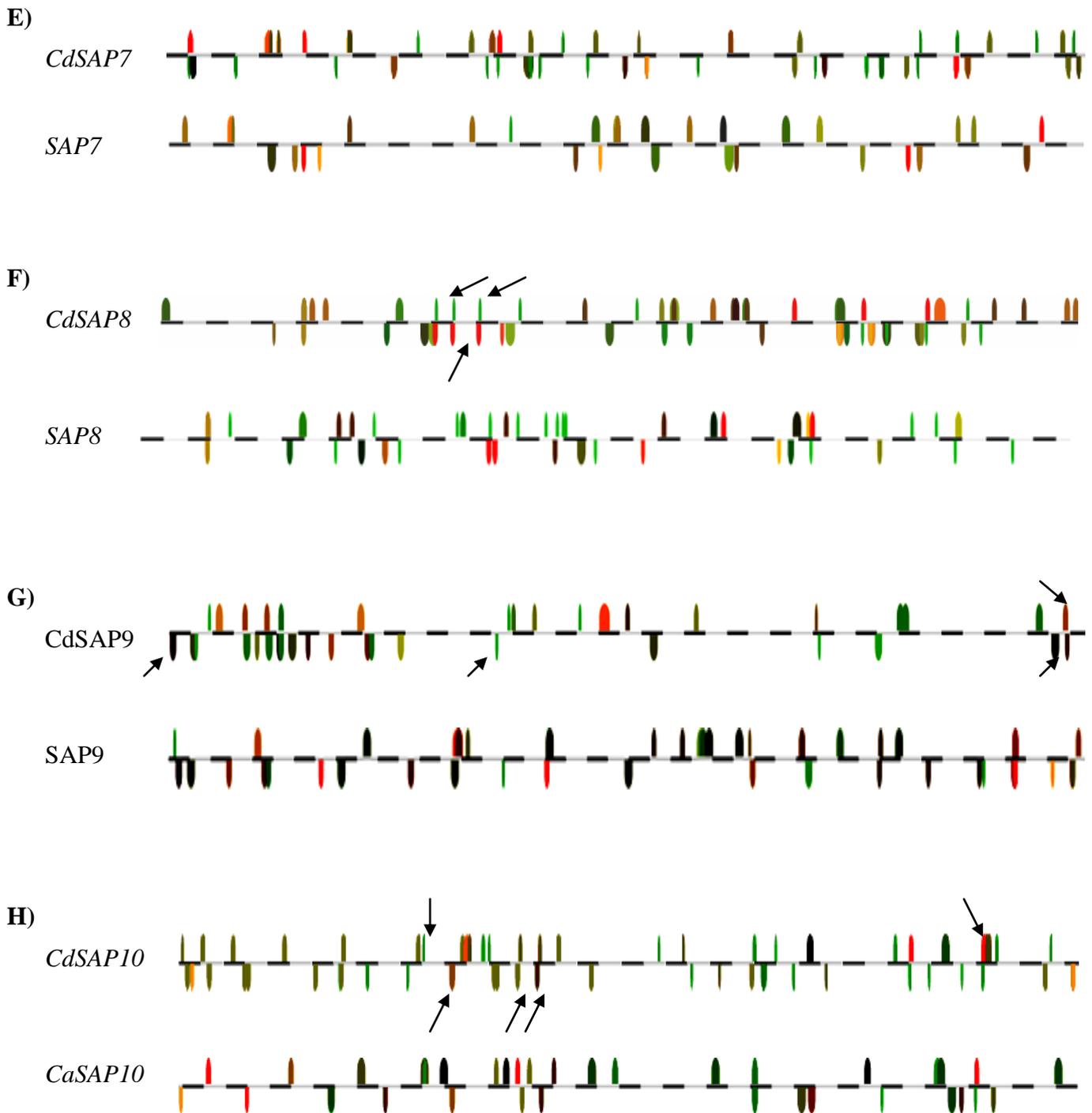


Fig 14. Continuación. Representación esquemática de los posibles sitios de unión a factores de transcripción de los genes *SAP* de *C. dubliniensis* y *C. albicans*. Se analizaron 2000 pb corriente arriba del codón de inicio (ATG). Arriba de la línea se esquematizan los de la cadena positiva y debajo de la línea los de la cadena negativa. Se señalan con flechas los sitios que coinciden en ambas especies. Abajo se presentan los códigos de color de los principales sitios.

<input checked="" type="checkbox"/> F\$ABAA	<input checked="" type="checkbox"/> F\$ACPF	<input checked="" type="checkbox"/> F\$GATA	<input checked="" type="checkbox"/> F\$MADS	<input checked="" type="checkbox"/> F\$MMAT	<input checked="" type="checkbox"/> F\$MREF	<input checked="" type="checkbox"/> F\$TRBI	<input checked="" type="checkbox"/> F\$YADR	<input checked="" type="checkbox"/> F\$VCAT	<input checked="" type="checkbox"/> F\$VGCR
<input checked="" type="checkbox"/> F\$YHSF	<input checked="" type="checkbox"/> F\$VMAT	<input checked="" type="checkbox"/> F\$VMCB	<input checked="" type="checkbox"/> F\$VMCM	<input checked="" type="checkbox"/> F\$VMIG	<input checked="" type="checkbox"/> F\$YNIT				

## IV. DISCUSIÓN

Aunque *C. dubliniensis* está relacionada filogenéticamente con *C. albicans* se ha sugerido que la regulación de la expresión de sus genes pudiera ser diferente (Moran *et al.*, 2004). *C. albicans* presenta en su genoma 10 genes codificantes de Sap's, los genes SAP1-6 han sido considerados atributos de virulencia (Naglik *et al.*, 2003) y por la alta homología que presentan entre ellos han sido descritos como las subfamilias SAP1-3 y SAP4-6. En 2004 Moran y col. (Morán *et al.*, 2004) describieron la ausencia de los genes SAP5 y SAP6 en *C. dubliniensis*. El análisis BLAST realizado sugiere la presencia en el genoma de *C. dubliniensis* de 8 genes codificantes de Sap's: *CdSAP1*, *CdSAP2*, *CdSAP3*, *CdSAP4*, *CdSAP7*, *CdSAP8*, *CdSAP9* y *CdSAP10*. El árbol filogenético construido con las secuencias de aa deducidas de las secuencias nucleotídicas y comparadas con las Sap de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* reveló que las secuencias de aa de las Sap de *C. dubliniensis* presentan mayor identidad y similitud con las de *C. albicans*: CdSap1 y Sap1 presentaron una identidad y similitud de 82.1 y 86.4%, CdSap2 y Sap2 92.5 y 95.5% y CdSap3 y Sap3 80.5 y 86.9% respectivamente. Aunque CdSap4 presentó mayor identidad y similitud con Sap6 (81.8, 90.2%) que con la misma Sap4 de *C. albicans* (81.1, 89.7%), la sintenia sugiere que se trata del gen *CdSAP4*, al igual que lo había descrito Moran en 2004 (Morán *et al.*, 2004). CdSap7, CdSap8, CdSap9 y CdSap10 se agruparon en otras ramas del árbol, junto con las correspondientes a Sap7, Sap8, Sap9 y Sap10 de *C. albicans*. La posible función de Sap7 en *C. albicans* se desconoce aún y en el caso de Sap9 y 10 se ha sugerido un papel parecido al de las yapsinas de *S. cerevisiae*. Experimentos de eliminación de los genes SAP9 y SAP10 de *C. albicans*, sugieren que las proteínas correspondientes pudieran participaren la interacción con células epiteliales. La presencia en CdSap9 de los sitios de procesamiento lisina 49 y 153 igual que en CaSap9 y en Scyap1 sugieren que también podría ser procesada para generar dos subunidades. (Cawley *et al.*, 2003; Schaller *et al.*, 2005; Albrecht. *et al.*, 2006).

Los 8 genes analizados presentan sintenia ya que además de estar en el mismo cromosoma el % de identidad de la secuencia analizada (4000 pb corriente arriba y 4000 pb corriente abajo) varió para cada gen desde 67% hasta 92%. Las

proteínas deducidas de los genes *CdSAP1-4* presentan pesos moleculares parecidos a sus homólogos en *C. albicans*, así como dos sitios activos prácticamente en la misma localización para cada proteína. A diferencia, las proteínas Sap7 y Sap10 tanto de *C. dubliniensis* como de *C. albicans* sólo presentan un sitio activo y en general el PM de las proteínas correspondientes es ligeramente mayor que el PM de las proteínas de la subfamilia Sap1-4. Los sitios putativos de procesamiento por la enzima Kex2 (KR y KK) presentes en todas las proteínas sugieren que todas ellas podrían compartir la misma ruta de secreción (Hube & Naglik, 2001).

Si comparamos el análisis de las secuencias corriente arriba de los genes *CdSAP* (1100 pb) con sus homólogos en *C. albicans* observamos poca coincidencia en sitios potenciales de unión a factores de transcripción sobre todo entre *CdSAP4* con *SAP4* y *CdSAP7* con *SAP7* en los que no aparece ninguna coincidencia, esto coincide con estudios que muestran que si bien los genes en ambas especies están muy conservados su regulación es diferente. Esta podría ser una de las razones de esta diferencia.

La actividad Sap de *C. dubliniensis* determinada en el sobrenadante podría corresponder principalmente a la expresada por el gen *CdSAP2* (mayores niveles de expresión), de manera similar a lo que sucede en *C. albicans*, ya que en esta especie se ha reportado que Sap2 presenta la actividad mayoritaria en sobrenadantes (White *et al.*, 1993). Estudios realizados en *C. albicans* en diferentes medios para la expresión y producción de Sap, han determinado que el medio YCB-BSA es un medio inductor para la producción de estas enzimas, los resultados obtenidos en *C. dubliniensis* concuerdan con lo reportado en *C. albicans* ya que no se detectó la actividad Sap en medio YPD y si la hubo en medio YCB-BSA (Chen *et al.*, 2002).

Se ha visto en diferentes organismos que la fuente de nitrógeno juega un papel importante en la regulación de la expresión de genes codificantes de proteasas, en *C. albicans* se ha estudiado la expresión de genes *SAP* así como de los genes codificantes de otras proteasas como el gen *STE13* (codificante de una dipeptidil aminopeptidasa) bajo diferentes condiciones de fuente de nitrógeno

(Bautista-Muñoz *et al.*, 2005). Los genes *CdSAP1* y *2*, se expresaron en todas las condiciones de nitrógeno probadas, sin embargo los niveles de expresión de ambos genes aumentaron cuando la fuente de nitrógeno era BSA. En *C. albicans* se ha propuesto que las enzimas Sap pudieran participar en la degradación de proteínas para proporcionar una fuente de nitrógeno a la levadura (aminoácidos o péptidos en este caso) (Naglik *et al.*, 2003), esta podría ser una de las funciones que desempeñaran *CdSap1* y *CdSap2*. En *C. albicans* se ha demostrado que la estimulación con suero aumenta la expresión de *SAP2* y por otro lado es bien sabido que bajo condiciones *in vitro* con BSA como única fuente de nitrógeno, *C. albicans* secreta como aspartil proteasa dominante *Sap2* (White *et al.*, 1993). La prolina ha sido descrita como una fuente de nitrógeno de difícil asimilación (Magasanik & Kaiser, 2002) sin embargo ninguno de los genes *CdSAP* estudiados aumentó su expresión con esta fuente de nitrógeno o en ausencia de la misma por lo que se puede sugerir que la expresión de estos genes no se induce en condiciones de estrés por fuente de nitrógeno como sucede con el gen *STE13* codificante de la proteasa *CaDAP* en *C. albicans* (Bautista-Muñoz *et al.*, 2005). En relación a la expresión de *CdSAP1-4* durante la formación de pseudomicelio no encontramos expresión diferencial entre los genes estudiados.

Los resultados obtenidos en medio mineral de Lee para inducir la producción de micelio de *C. dubliniensis*, coinciden con diversos autores que demuestran que esta especie es poco eficiente en la formación de micelio bajo estas condiciones (Gilfillan *et al.*, 1998; Stokes *et al.*, 2007). Diversos estudios concluyen que *C. dubliniensis* presenta menores niveles de filamentación lo que contribuye a una menor virulencia en comparación con *C. albicans* (Stokes *et al.*, 2007). Se han realizado estudios de inducción para la formación de hifas de *C. dubliniensis*, utilizando diferentes medios se encontró que el medio Lee promueve únicamente la formación del 9% de hifas en comparación con el 100% que presenta *C. albicans*; en general, con todos los medios utilizados se encuentra menor filamentación y únicamente con medio de inducción agua-suero se alcanza un 73% de filamentación para *C. dubliniensis* (Stokes *et al.*, 2007). En este trabajo se comprobó que el medio YCB-BSA a pH 7 y a 37°C de incubación, resultó un buen inductor de la formación de micelio en *C. dubliniensis* ya que se obtuvo un 100% de transformación. Los genes *CdSAP1-4* de *C. dubliniensis* pueden expresarse tanto a

pH 7 como a pH 4 en medio YCB-BSA sin embargo se puede generalizar que los niveles de expresión son mayores a pH 7 (en donde se favorece la formación de micelio) que a pH 4 (donde se favorece la formación de levaduras), a excepción del gen *CdSAP2* en donde no se observó diferencia en los niveles de expresión en ambos pHs. Se ha descrito en *C. albicans* que los genes *SAP4-6* en medio Lee-BSA presentan mayores niveles de expresión a pHs cercanos a la neutralidad que a pHs ácidos (Chen *et al.*, 2002). Los resultados obtenidos podrían explicarnos porqué *CdSap2* pudiera ser también la proteína mayoritaria ya que el gen *CdSAP2* al no estar regulado por el pH se puede expresar en diferentes condiciones. Por otro lado, la expresión de los genes *CdSAP3* y *CdSAP4* coincide con las fases miceliales de *C. dubliniensis* ya que cuando el hongo revierte a la fase de levadura, estos genes dejan de expresarse. En *C. albicans* se encuentra muy bien documentada la relación entre la fase micelial y la expresión de los genes de la subfamilia *SAP4-6* así como la presencia de las proteínas correspondientes y por lo tanto su posible papel en infecciones invasivas (Chen *et al.*, 2002; Borg-von-Zepellin *et al.*, 1998; Felk *et al.*, 2002).

Se ha descrito que la regulación de la formación de micelio y pseudomicelio en *C. dubliniensis* es diferente a lo que se presenta en *C. albicans* (Stokes *et al.*, 2007 24). *C. albicans* es capaz de formar pseudomicelio en medio Lee-FCS a pH 4.5 (Chen *et al.*, 2002), sin embargo nosotros encontramos que a pH ácido *C. dubliniensis* se presenta siempre en fase de levadura. A pesar de que Stokes en 2007 (Stokes *et al.*, 2007) reportó varios medios que favorecen la filamentación de *C. dubliniensis*, con ninguno obtuvo un 100% de filamentación y en este trabajo reportamos dos medios que permiten este fenómeno, el medio YCBA-BSA y medio Lee-FCS, siempre y cuando se incuba a la levadura a un pH cercano al neutro y a una temperatura de 37°C. En *C. albicans* se ha descrito que los genes de la subfamilia *SAP4-6* se expresan a pH neutro durante la transición de levadura a hifa (Hube *et al.*, 1994), nuestros resultados demuestran que el gen *CdSAP4* pudiera presentar un comportamiento similar ya que en medio Lee-FCS durante la formación de micelio los niveles de expresión del gen a nivel de transcripción aumentaban mientras se formaba el micelio y cuando éste revirtió a levadura, los niveles del transcrito disminuyeron. Estos resultados podrían sugerir la participación *CdSap4* para el establecimiento de la infección e invasión en tejidos por *C. dubliniensis*. Cabe

mencionar que el medio Lee-FCS no regula el pH y éste se acidificó hasta pH 4 lo cual podría explicar la represión de la expresión del gen *CdSAP4*, así como la reversión a fase levaduriforme. Chen y col. (Chen *et al.*, 2002) demostraron la presencia de proteínas Sap4-6 a pH cercano al neutro y disminución de las mismas a pH ácido.

Para determinar si la expresión de los genes *CdSAP1-4* son regulados por las células del huésped, se estudió un cultivo de queratinocitos inoculado con *C. dubliniensis*. En estas condiciones sólo se observó expresión de los genes *CdSAP3* y *CdSAP4*. *CdSAP3* pudiera estar relacionado con el proceso infeccioso de queratinocitos y *CdSAP4* pudiera estar relacionado únicamente durante la fase inicial de infección. Se ha descrito en *C. albicans* que los genes *SAP1-3* genes contribuyen a la infección experimental de mucosa oral y epidermis cutánea (Schaller *et al.*, 2005) y los genes *SAP4-6* se expresan durante la formación de hifas y podrían contribuir a las infecciones invasivas (Naglik *et al.*, 2003) Al respecto, aunque al parecer *C. dubliniensis* no posee genes *SAP5-6*, el gen *CdSAP4* podría participar en los procesos de infecciones invasivas ya que como se observó en los experimentos de expresión *in vitro* durante la morfogénesis, la expresión de *CdSAP4* al parecer está asociada a la formación de hifas y no al estadio de levadura. Se ha descrito que las proteasas de *C. albicans* presentan actividad epidermolítica y contribuyen a la adherencia de las células de levadura a los queratinocitos (el-Magrhabi *et al.*, 1990). En el modelo de línea celular HaCaT infectado con *C. dubliniensis* se observó una disminución significativa en el número de queratinocitos (35%) en comparación con el cultivo celular sin inocular. Para comprobar si esta disminución era debida a la actividad Sap de *C. dubliniensis* se utilizó pepstatina, un inhibidor específico de aspartil proteasas y se encontró que el porcentaje de sobrevivencia fue significativamente mayor, 65% con 10  $\mu$ M y 78% con 20  $\mu$ M del inhibidor. No se obtuvo un 100% de sobrevivencia después de adicionar la pepstatina debido muy probablemente a la presencia de otros atributos de virulencia presentes en *C. dubliniensis* (Sullivan *et al.*, 2005) que pudieran estar afectando el número y/o viabilidad de los queratinocitos, sin embargo fue evidente que las Sap de esta levadura afectan el número de queratinocitos en el cultivo celular. No se descarta la posibilidad de desprendimiento celular o apoptosis, por lo

que se tendrán que realizar otros experimentos que proporcionen evidencia del efecto de *C. dubliniensis* sobre el cultivo celular HaCaT.

En este trabajo se ha demostrado la expresión diferencial de *CdSAP1-4* durante diferentes condiciones fisiológicas y durante la infección de queratinocitos. Con los resultados obtenidos hasta ahora podemos sugerir que posiblemente *SAP1-2* participan en el metabolismo nitrogenado de la levadura, probablemente en la obtención de nutrientes a partir de proteínas y *SAP3-4* podrían participar durante los eventos de infecciones superficiales sin embargo, el papel de las Saps de *C. dubliniensis* podrá ser dilucidado con la ayuda de otros modelos como la infección de epitelio humano reconstituído, infecciones en animales, con el estudio comparativo de casos de candidosis superficiales y sistémicas, y en aislamientos de diferentes orígenes así como futuros experimentos de detección de las proteínas, caracterización de mutantes, etc.

## V. CONCLUSIONES

1. El genoma de *C. dubliniensis* presenta 8 genes codificantes de aspartil proteasas secretadas: *CdSAP1*, *CdSAP2*, *CdSAP3*, *CdSAP4*, *CdSAP7*, *CdSAP8*, *CdSAP9*, *CdSAP10*. La ausencia de *CdSAP5* y *CdSAP6* podría explicar la aparente menor virulencia reportada en *C. dubliniensis* cuando se compara con *C. albicans*.
2. Los 8 genes *CdSAP* presentaron homología y sintenia con sus correspondientes en *C. albicans*, sin embargo la comparación de las secuencias promotoras sugiere que la regulación de la expresión de los mismos pudiera ser diferente.
3. La expresión de los genes *CdSAP1* y *CdSAP2* fue independiente del estado morfológico de *C. dubliniensis*, se expresaron a pH 4 y pH 7 y fueron inducidos con albúmina como fuente de nitrógeno.
4. La expresión de *CdSAP3* fue regulada por el pH y se relacionó con el proceso de infección de queratinocitos.
5. La expresión de *CdSAP4* predominó durante la fase micelial y el estado inicial de la infección de queratinocitos.
6. La actividad proteolítica de las CdSap's muy probablemente participa en el daño a queratinocitos, el inhibidor de estas proteasas, peptatina A revierte parcialmente este efecto.

## VI. PROSPECTIVAS

1. Realizar estudios comparativos de expresión entre los genes CaSAP's y CdSAP's por RT-PCR en tiempo real.
2. Obtener y caracterizar mutantes nulas de actividad CdSap.
3. Estudiar otros modelos: ratón, epitelios humanos reconstituídos orales (RHE).
4. Estudiar la expresión y el papel de los genes CdSAP7-10, por ejemplo su papel en la fisiología de la pared, procesamiento de otras proteínas, interacción con células del hospedero, etc.
5. Estudiar la presencia de genes CdSap's en aislados clínicos de *C. dubliniensis*.

## VII. REFERENCIAS

**Ahmad S.**, Khan Z., Mokaddas E., Khan Z.U. (2004) Isolation and molecular identification of *Candida dubliniensis* from non-human immunodeficiency virus-infected patients in Kuwait. *J. Med. Microbiol.* 53(7):633-7.

**Albrecht A.**, Felk A., Pichova I., Naglik J. R., Schaller M., de Groot P., MacCallum D., Odds F. C., Schafer W., Klis F., Monod M., Hube B. (2006) Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. *J. Biol. Chem.* 281:688–694.

**Andreeva N.S.** y Rumsh L.D. (2001) Analysis of crystal structures of aspartic proteinases: on the role of amino acid residues adjacent to the catalytic site of pepsin-like enzymes. *Protein. Sci.* 10:2439-50

**Al-Sweih N.**, Ahmad S., Khan Z.U., Khan S., Chandy R. (2005) Prevalence of *Candida dubliniensis* among germ tube-positive *Candida* isolates in a maternity hospital in Kuwait. *Mycoses.* 48:347-351.

**Bautista-Muñoz C.**, Boldo-León X., Villa-Tanaca L., Hernández- Rodríguez C. (2003) Identification of *Candida* spp. By randomly amplified polymorphic DNA and differentiation between *C. albicans* and *C. dubliniensis* by direct PCR methods. *J. Clin. Microbiol.* 41(1):414-420.

**Bautista-Muñoz C.**, Hernández-Rodríguez C., Villa-Tanaca L. (2005) Analysis and expresion of *STE13* gene encoding a putative X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from *Candida albicans*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 45(3):459-69.

**Bautista-Muñoz C.** (2004) Bioquímica y biología molecular de la dipeptidil aminopeptidasa (*ycaDAP*) de *Candida albicans*. Tesis doctoral. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. México D. F.

- Borg-von Zepellin M.**, Beggah S., Boggian K., Sanglard D., Monod M. (1998) The expression of the secreted aspartyl proteinases Sap4 to Sap 6 from *Candida albicans* in murine macrophages. *Mol. Microbiol.* 28:543-54.
- Cartharius K.**, Frech K., Grote K., Klocke B., Haltmeier M., Klingenhoff A., Frisch M., Bayerlein M., Werner T. (2005) MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 21:2933-42
- Calderone R.A.** (2002) Taxonomy and biology of *Candida*. En Calderone R.A. *Candida and candidiasis*. Ed ASM Press. EUA. Pp 15.
- Campanella J. J.**, Bitincka L., Smalley J. (2003) MatGAT: an application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences. *BMC Bioinformatics* 4:29
- Cawley N. X.**, Chino M., Maldonado A., Rodriguez Y. M., Loh P., Ellman J. A. (2003) Synthesis and Characterization of the First Potent Inhibitor of Yapsin. *J. Biol. Chem.* 278:5523–30
- Chaffin W. L.**, Lopez-Ribot J. L., Casanova M., Gozalbo D., Martinez J. P. (1998) Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:130–80.
- Chen Y.C.**, Wu C.C., Chung W.L., Lee F.J. (2002) Differential secretion of Sap4-6 proteins in *Candida albicans* during hyphae formation. *Microbiology* 148:3743-3754.
- Copping V.M.**, Barelle C.J., Hube B., *et al.* (2005) Exposure of *Candida albicans* to antifungal agents affects expression of SAP2 y Sap9 secreted proteinase genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 55: 645-54.
- Cutler E.** (1991) Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu. Rev. Microbiol.* 45:187-218.

- De Bernardis F.**, Cassone A., Sturtevant J., Calderone R. (1995) Expression of *Candida albicans* *SAP1* and *SAP2* in experimental vaginitis. *Infect. Immun.* 63:1887-92.
- De Bernardis F.**, Mondello F., Scaravelli G., Pachi A., Girolamo A., Agatensi L., Cassone A. (1999) High aspartyl proteinase production and vaginitis in human immunodeficiency virus-infected women. *J. Clin. Microbiol.* 37(5):1376-80.
- De Bernardis F.**, Agatensi L., Ross I.K., Emerson G.W., Lorenzini R., Sullivan P.A., Cassone A. (1990) Evidence for a role for secreted aspartate proteinase of *Candida albicans* in vulvovaginal candidiasis. *J. Infect. Dis.* 161:1276-83.
- De Bernardis F.**, Sullivan P.A., Cassone A. (2001) Aspartyl proteinases of *Candida albicans* and their role in pathogenicity. *Med. Mycol.* 39: 303-313.
- Díaz-Ramos R. D.** (1998-2003) Las actividades del epidemiólogo en el comité de infecciones nosocomiales. Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) 1998-2003 [www.respyn.uanl.mx/especiales/ee-6-2003/08.pdf](http://www.respyn.uanl.mx/especiales/ee-6-2003/08.pdf). 2 de diciembre de 2008.
- Dostal J.**, Dlouha H., Malon P., Pichova I., Hruskova-Heidingsfeldova O. (2005) The precursor of secreted aspartic proteinase Sapp1p from *Candida parapsilosis* can be activated both autocatalytically and by a membrane-bound processing proteinase. *Biol. Chem.* 386:791–799.
- Eiman M.M.**, Noura A.A., Zia U.K. (2007) Species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* bloodstream isolates in Kuwait: a 10-year study. *J. Med. Microbiol.* 56:255-259.
- el-Maghrabi E.A.**, Dixon D.M., Burnett J.W. (1990) Characterization of *Candida albicans* epidermolytic proteases and their role in yeast-cell adherence to keratinocytes. *Clin. Exp. Dermatol.* 15:183-191.

**Falquet, L.**, M. Pagni, P. Bucher, N. Hulo, C. J. Sigrist, K. Hofmann and A. Bairoch. (2002) The PROSITE database. *Nucleic Acids Res.* 30: 235-238.

**Farrell R.E.** (1998). RNA methodologies. A laboratory guide for isolation and characterization. 2a ed. Ed. Academic Press. USA.

**Felk A.**, Kretschmar M., Albrecht A., Schaller M., Beinhauer S., Nichterlein T., Sanglard D., Korting H.C., Schafer W., Hube B. (2002). *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. *Infect. Immun.* 70:3689-3700.

**Fotedar R.** y Ai Hedaithy S.S. (2004) Prevalence of *Candida dubliniensis* among germ tube-positive yeasts recovered from respiratory specimens in HIV-negative patients. *Mycoses* 47(3-4):150-5.

**Fradin C.**, De Groot P., MacCallum D., Schaller M., Klis F., Odds F.C. Hube B. (2005) Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol. Microbiol.* 56:397-415.

**Gary L.** (1979) Review of the folin fenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal. Biochem.* 100:201-20.

**Gilfillan G.**, Sullivan D.J., Haynes K., Parkinson T., Coleman D.C., Gow N. (1998) *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. *Microbiology.* 144:829-38.

**Hernández-Sierra B.**, Prieto-Palomino M. A., Muñoz-Bono J., Curiel-Balsera E., Mora-Ordóñez J., Arias-Verdú L. (2008) Clinical, Epidemiological and Taxonomic Aspects of Systemic Candidiasis in an Intensive Care Unit. *Medicrit.* 5:1-12

**Hillis, D.M. y Bull J.J.** 1993 An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* 42:182-192.

**Hilt W.** y Wolf D.H. (1992) Stress-induced proteolysis in yeast. *Mol. Microbiol.* 6:2437-42.

**Hube B.**, Monod M., Schofield D.A., Brown J.P., Gow N.A.R. (1994) Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 14:87-99

**Hube, B.**, Turver C.J , Odds F C , Eiffert H , Boulnois G.J., Kochel H., Ruchel R. (1991) Sequence of the *Candida albicans* gene encoding the secretory aspartate proteinase. *J. Med. Vet. Mycol.* 29(2):129-32.

**Hube B.** y Naglik J. (2001) *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology.* 147:1997-2005.

**Hube B.** y Naglik J. (2002) Extracellular hidrolases: *Candida* and candidiasis. Calderone RA. Ed ASM Press. EUA. pp.37.

**Holzer H.** y Heinrich P.C. (1988) Control of proteolysis. *Annu. Rev. Bioche.* 49:63–91.

**Jabra-Rizk M.A.**, Falkler-Jr W.A., Merz W.G., Baqui A.A., Kelley J.I., Meiller T.F. (2001) Cell surface hydrophobicity-associated adherence of *Candida dubliniensis* to human buccal epithelial cells. *Rev. Iberoam. Micol.* 18:17-22

**Kaminishi H.**, Miyaguchi H., Tamaki T., Suenega N., Hisamatsu M., Mihashi I., Matsumoto H., Maeda H., Hagihara Y. (1995) Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* proteinase. *Infect. Immun.* 63:984-88.

**Koelsch G.**, Tang J, Loy J.A., Monod M., Jackson K., Foundling S.I., Lin X. (2000) Enzymic characteristics of secreted aspartic proteases of *Candida albicans*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1480:117-31

**Korting H.C.**, Hube B., Oberbauer S., Januschke E., Hamm G., Albrecht A., Borelli C., Schaller M. (2003) Reduced expression of the hiphal-independent *Candida*

*albicans* proteinase genes *SAP1* and *SAP3* in the *efg1* mutant is associated with attenuated virulence during infection of oral epithelium. *J Med Microbiol*, 52:623-32.

**Linares B.C.E.**, Loreto E.S, Silveira C.P., Pozzatti P., Scheid L.A., Santurio J.M., Alves S.H. (2007) Enzymatic and Hemolytic Activities of *Candida dubliniensis* strains. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*. 49:203-206.

**Loaiza-Loeza S.**, Parra-Ortega B., Bautista-Muñoz C., Casiano-Rosas C., Hernández-Rodríguez C.H., Villa-Tanaca L. (2007) The proteolytic system of *Candida dubliniensis*. *Am. J. Infect. Dis.* 3:76-83.

**López-Martínez R.**, Méndez-Tovar L.J., Hernández-Hernández F., Castañón – Olivares R. (1995) *Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio.* Ed Trillas. México. pp99

**Magasanik B.**, Kaiser C.A. (2002) Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 290:1-18.

**Martin S.W.**, Douglas L. M., Konopka J. B. (2005) Cell cycle dynamics and quorum sensing in *Candida albicans* chlamydo spores are distinct from budding and hyphal growth. *Eukaryot. Cell*, 4:1191–1202.

**Miyasaki S.H.**, White T.C., Agabian N. (1994) A fourth secreted aspartic proteinase gene (*SAP4*) and a *CARE2* repetitive element are located upstream of the *SAP1* gene in *Candida albicans*. *J. Bacterio.* 176:1702-10.

**Monod M.**, Togni G., Hube B., Sanglard D. (1994) Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. *Mol. Microbiol.* 13(2):357-68.

**Monod M.**, Hube B., Hess D., Sanglard D. (1998) Differential regulation of *SAP8* and *SAP9*, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*. *Microbol.* 144:2731-37.

**Monod M.** y Borg-von Zepelin M. (2002). Secreted aspartic proteinases as virulence factors of *Candida* Species. *Biol. Chem.* 383:1087-1093

**Moran G.P.**, Sullivan D.J., Coleman D. (2002) Emergence of Non-*Candida albicans* *Candida* species as pathogen: *Candida* and candidiasis. Calderone RA. Ed ASM Press. EUA. pp.37.

**Moran G.P.**, Sullivan D.J., Henman M.C. McCreary C.E., Harrington B.J., Shanley D.B., Coleman D. (1997) Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives in vitro. Antimicrob. Agents. Chemother. 41(3):617-623.

**Moran G.P.**, Stokes C., Thewes S., Hube B., Coleman D.C., Sullivan D. (2004) Comparative genomics using *Candida albicans* DNA microarrays reveals absence and divergence of virulence-associated genes in *Candida dubliniensis*. Microbiology. 150:3363-82

**Naglik J.R.**, Newport G., White T.C., Fernández-Naglik L.L., Greenspan D., Sweet S.P., Challacombe S.J., Agabian N. (1999) In vivo analysis of secreted aspartyl proteinase expression in human oral candidiasis. Infect. Immun. 67:2482-90.

**Naglik J.R.**, Challacombe S.J., Hube B. (2003) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67(3):400-28.

**Naglik J.R.**, Rodgers C.A., Shirlaw P.J., Dobbie J.L., Fernández-Naglik L.L., Greenspan D., Agabian N., Challacombe S.J. (2003) Differential expresión of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral y vaginal infections. J. Infect. Dis. 188:465-75.

**Okeke C.N.**, Tsuboi R., Kawai M., Yamazaki M., Reangchainam S., Ogawa H. (2000) Reverse transcription-3' rapid amplification of cDNA end-nested PCR of ACT1 and SAP2 mRNA as a mean of detecting viable *Candida albicans* in an *in vitro* cutaneous candidiasis model. J. Invest. Dermatol. 114(1):95-100.

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

**Pfeffer, S.R.** y Rothman, J. E. (1987) Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. *Annu. Rev. Biochem.* 56:829-852.

**Pichová I.**, Pavlíckova L., Dostál J., Dolejší E., Hrusková-Heidingsfeldová O., Weber J., Ruml T., Soucek M. (2001) Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. Inhibition with peptidomimetic inhibitors. *Eur. J. Biochem.* 268:2669-2677.

**Pivarcsi A.**, Bodai L., Réthi B., Kenderessy-Szabó A., Koreck A., Szell M., Beer Z., Bata-Csorgo Z., Magócsi M., Rajnavolgyi E., Dobozy A., Kemény L. (2003) Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *Int. Immunol.* 15: 721-30.

**Pujol, C.**, Daniels K. J., Lockhart S. R., Srikantha T., Radke J. B., Geiger J., Soll D. R. (2004) The closely Related Species *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* Can Mate. *Eukaryotic Cell.* 3:1015-1027.

**Reyna-Figueroa J.**, Fragoso-Diaz A., Ortiz-Ibarra F. J., Soriano-Becerril D., Bermúdez G., Plazola-Camacho N. (2007) Epidemiología hospitalaria de candidiasis neonatal en el Instituto Nacional de Perinatología en un período de 5 años. *Enf. Inf. Microbiol.* 27:110-113.

**Sanglard D.**, Hube B., Monod M., Odds F.C., Grow N.A.R. (1997) A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes SAP, SAP5 y SAP6 of *Candida albicans* attenuated virulence. *Infect. Immun.* 65:3539-46.

**Schaller M.**, Borelli C., Korting H.C., Hube B. (2005) Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* 48:365-77.

**Schaller M.**, Hube B., Ollert M.W., Schäfer W., Borg-von Zepellin M., Thoma-Greber E., Korting H.C. (1999) In vivo expression and localization of *Candida*

*albicans* secreted aspartyl proteinases during oral candidiasis in HIV-infected patients. J. Invest. Dermatol. 112:383-6.

**Schaller M.**, Schäfer W., Korting H.C., Hube B. (1998) Diferencial expression of secreted aspartyl proteinases in a model of human oral candidosis and in patient samples from the oral cavity. Mol. Microbiol. 29(2):605-15.

**Schaller M.**, Korting H.C., Schäfer W., Bastert J., Chen W., Hube B. (1999) Secreted aspartic proteinase (*SAP*) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. Mol. Microbiol. 34(1):169-180

**Schaller M.**, Bein M., Korting H.C., Baur S., Hamm G., Monod M., Beinhauer S., Hube B. (2003) The secreted aspartyl proteinases *Sap1* y *Sap2* cause tissue damage in an *in vitro* model of vaginal candidiasis based on reconstituted human vaginal epithelium. Infect. Immun. 71(6):3227-34.

**Schaller M.**, Schackert C., Korting H.C., Januschke E., Hube B. (2000) Invasion of *Candida albicans* correlates with expression of secreted aspartic proteinases during experimental infection of human epidermis. J. Invest. Dermatol. 114(4):712-7.

**Sebti A.**, Kiehn T.E., Perlin D., Chaturvedi V., Wong M., Doney A., Park S., Sepkowitz K. (2001) *Candida dubliniensis* at a cancer center. CID. 32:1034-38.

**Staib P.**, Kretschmar M., Nichterlein T., Hof H., Morschhauser. (2000) Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97:6102-07.

**Stehr F.**, Felk A., Kretschmar M., Scaller M., Schafer W., Hube B. (2000) Extracellular hydrolytic enzymes and their relevance during *Candida albicans* infections. Mycoses. 43:17-21.

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

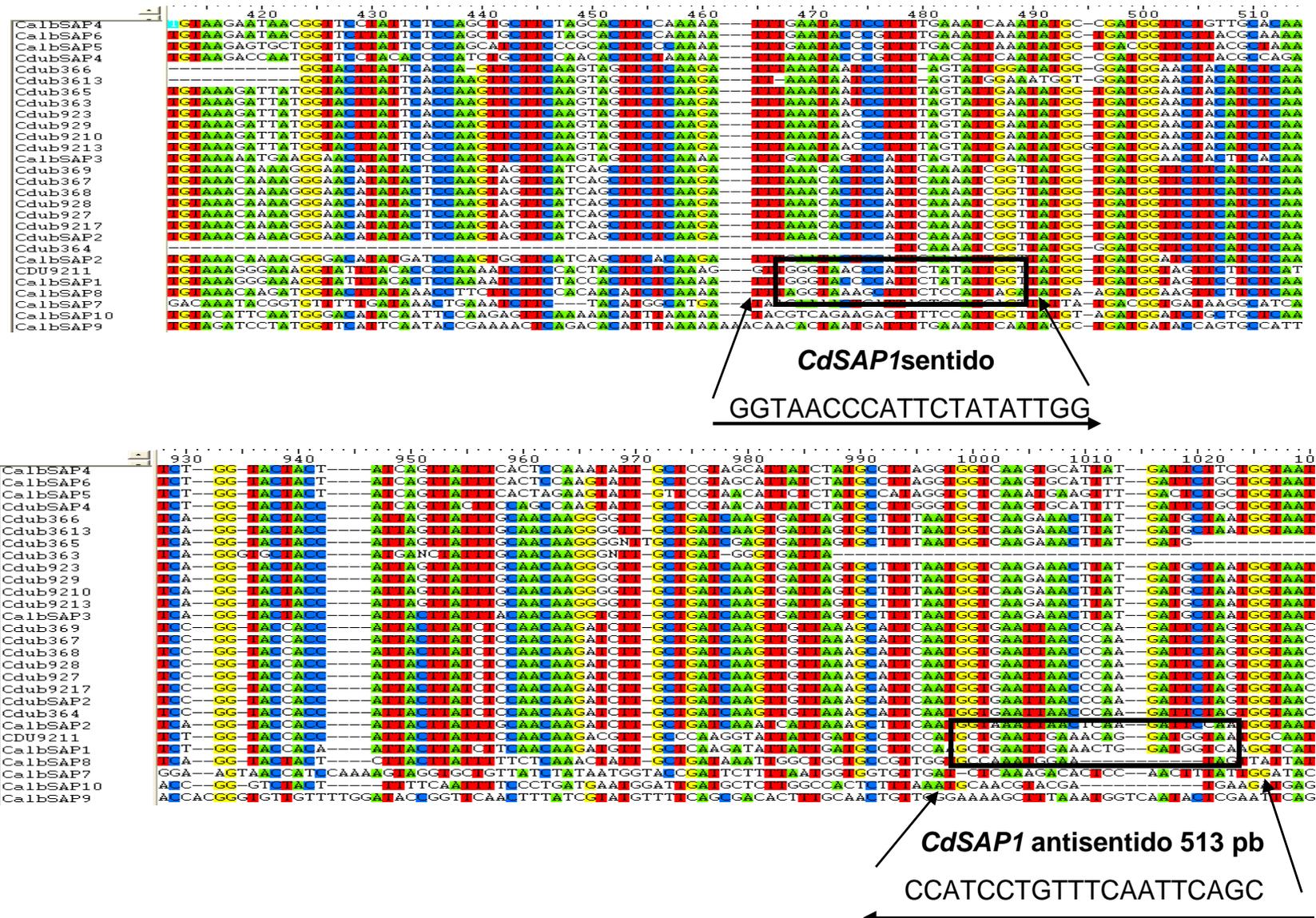
- Stringaro A.**, Crateri P., Pellegrini G., Arancia G., Cassone A., De Bernardis F. (1997) Ultrastructural localization of the secretory aspartil proteinase in *Candida albicans* cell wall *in vitro* and in experimentally infected rat vagina. *Mycopathologia* 137:95-105.
- Suárez-Rendueles P.**, Villa L., Arbesu M.J., Escudero B. (1991) The proteolytic system of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiol. Lett.* 81:215-20.
- Sudbery P. E.** (2001) The germ tubes of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae show different patterns of septin ring localization. *Mol. Microbiol.* 41:19-31.
- Sullivan D. J.**, Coleman D. (1998) *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *J. Clin. Microbiol.* 36:329-334.
- Sullivan D.J.**, Moran G. P., Pinjon E., Al-Mosaid A., Stokes C., Vaughan C., **Coleman D.C.** (2006) Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Fems Yeast Research.* 4:369-376.
- Sullivan D. J.**, Moran G.P., Coleman D.C. (2005) *Candida dubliniensis*: ten years on. *FEMS Microbiol. Lett.* 253:9-17.
- Sullivan D.J.**, Westerneng T.J., Haynes K.A., Bennett D.E., Coleman D.C. (1995) *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology* 141:1507-21.
- Tamura, K.**, Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596-1599.

- Tamura M.**, Watanabe K., Mikami Y., Yazawa K., Nishimura K. (2001) Molecular characterization of a new clinical isolates of *Candida albicans* y *C dubliniensis* in Japan: analysis reveals a new genotype of *C albicans* with group I intron. J. Clin. Microbiol. 39(12):4309-15.
- Tavanti A.**, Pardini G., Campa D., Davini P., Lupetti A., (2004) Differential expression of secretory aspartyl proteinase genes (*SAP1-10*) in oral *Candida albicans* isolates with distinct kariotypes. J. Clin. Microbiol. 42:4726-34.
- Thompson J. D.**, Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D. G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 24:4876-4882.
- Valenzuela-Flores A.A.**, SigfridoRangel-Frausto M., Gutiérrez-García N., Valenzuela-Flores A. G., Tabal-Galán N. (2004) Vigilancia de infecciones nosocomiales: experiencia de un hospital de cardiología en México. Cir. Ciruj. 72: 41-46
- Vartivarian S.F.** (1992) Virulence properties and nonimmune pathogenic mechanism. Clin Infect. Dis. 14:30-6.
- Vilela M. M.**, Kamei K., Sano A., Tanaka R., Uno J., Takahashi I., Ito J., Yarita K., Miyaji M. (2002) Pathogenicity and virulence of *Candida dubliniensis*: comparison with *C. albicans*. Med. Micol. 40:249-257.
- White, T.C.**, Agabian N. (1995) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors. J. Bacteriol. 177:5215-21.
- White T.C.**, Miyasaki S.H., Agabian N. (1993) Three distinct secreted aspartic proteinases in *Candida albicans*. J. Bacteriol. 175:6126-33
- Wright R.J.**, Carne A., Hieber A.D., Lamont I.L., Emerson G.W., Sullivan P.A. (1992) A second gene for secreted aspartate proteinase in *Candida albicans*. J. Bacteriol. 174:7848-53.

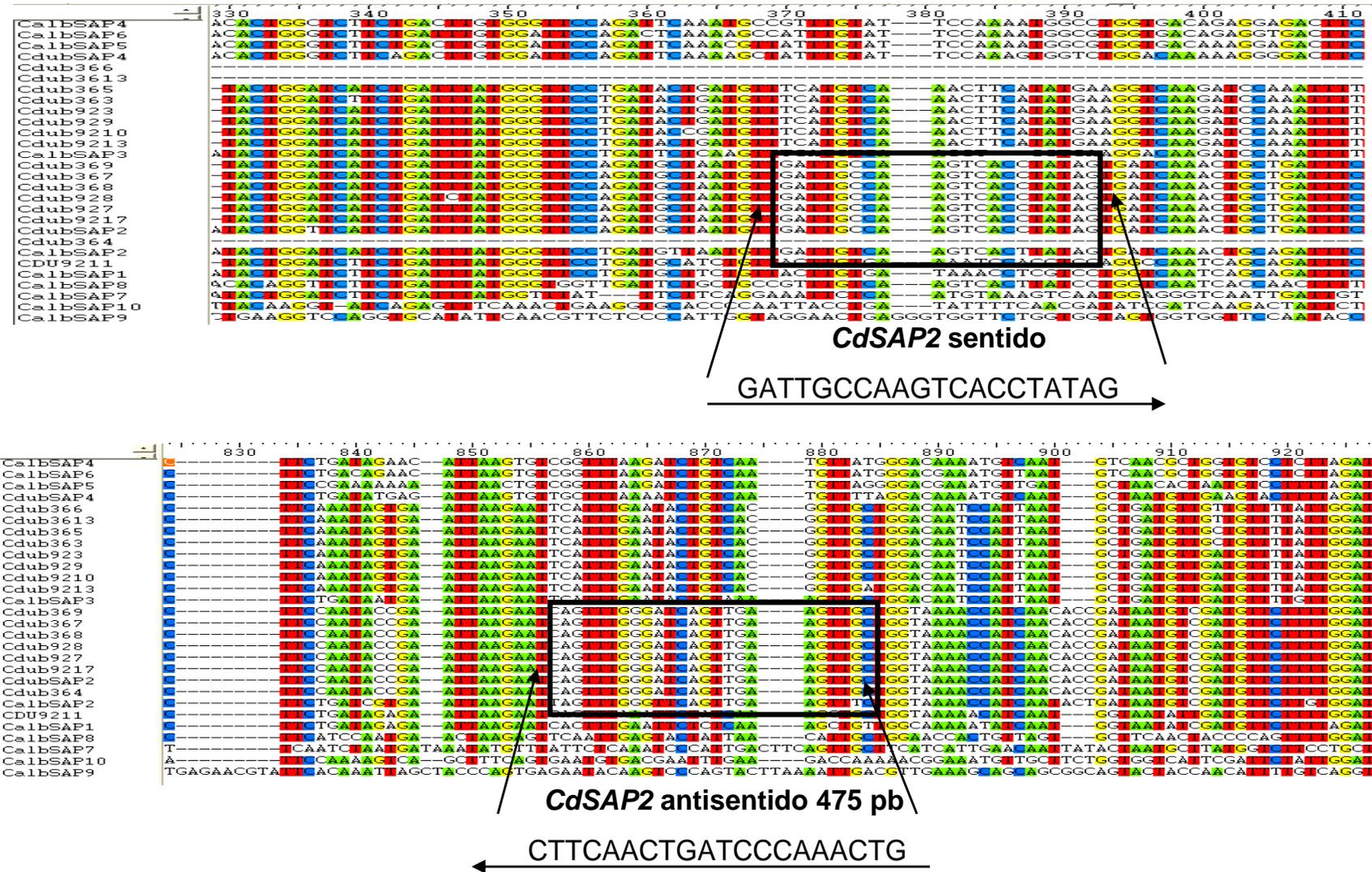
**Yang Y.L.** (2003) Virulence factors of *Candida* species. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 36:223-228.

**Yuan L.**, y Cole G.T. (1989) Characterization of proteinase inhibitors isolated from fungal pathogen *Coccidioides immitis*. *J. Biochem.* 257:729-36.

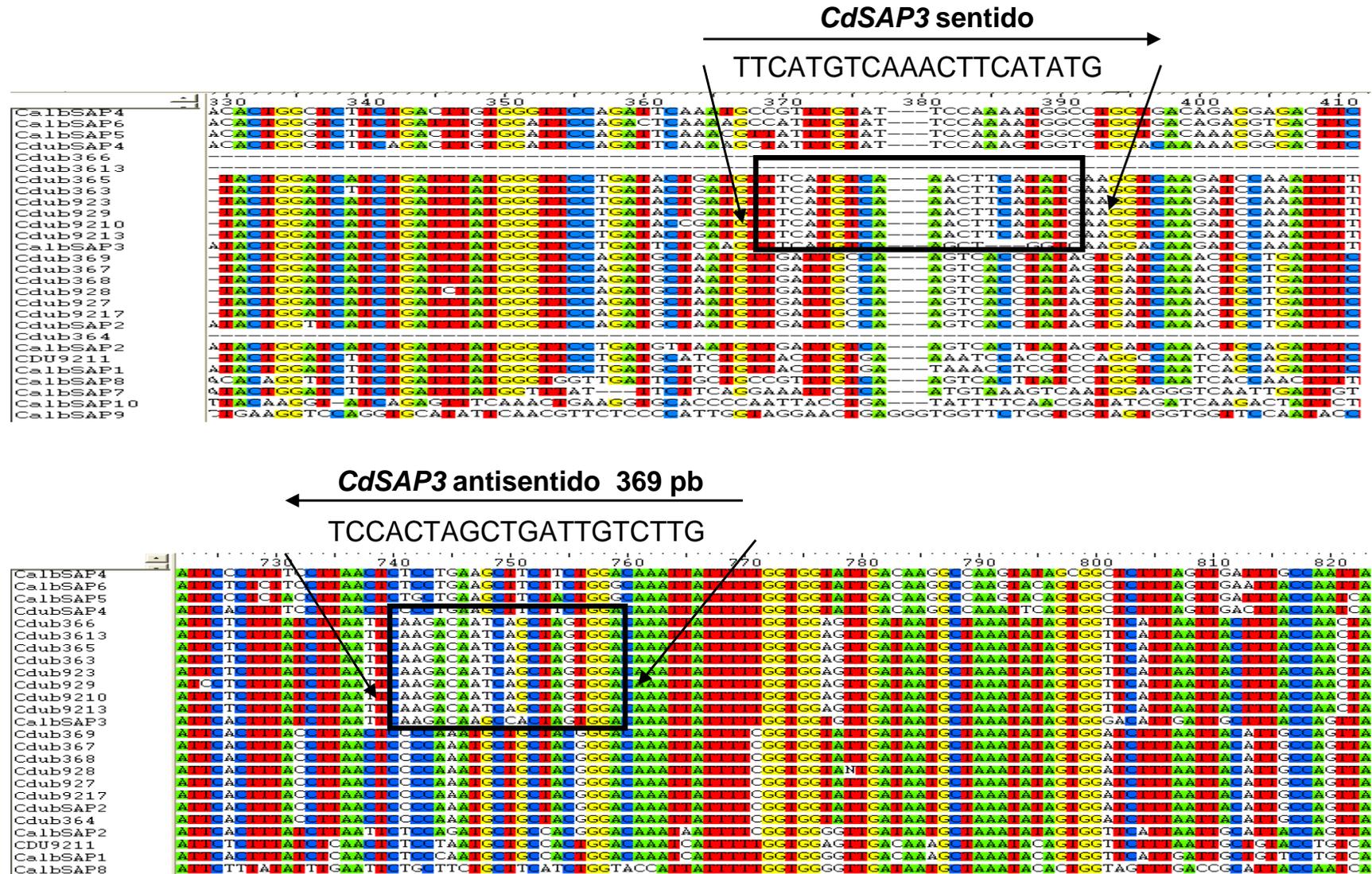
### Anexo 1



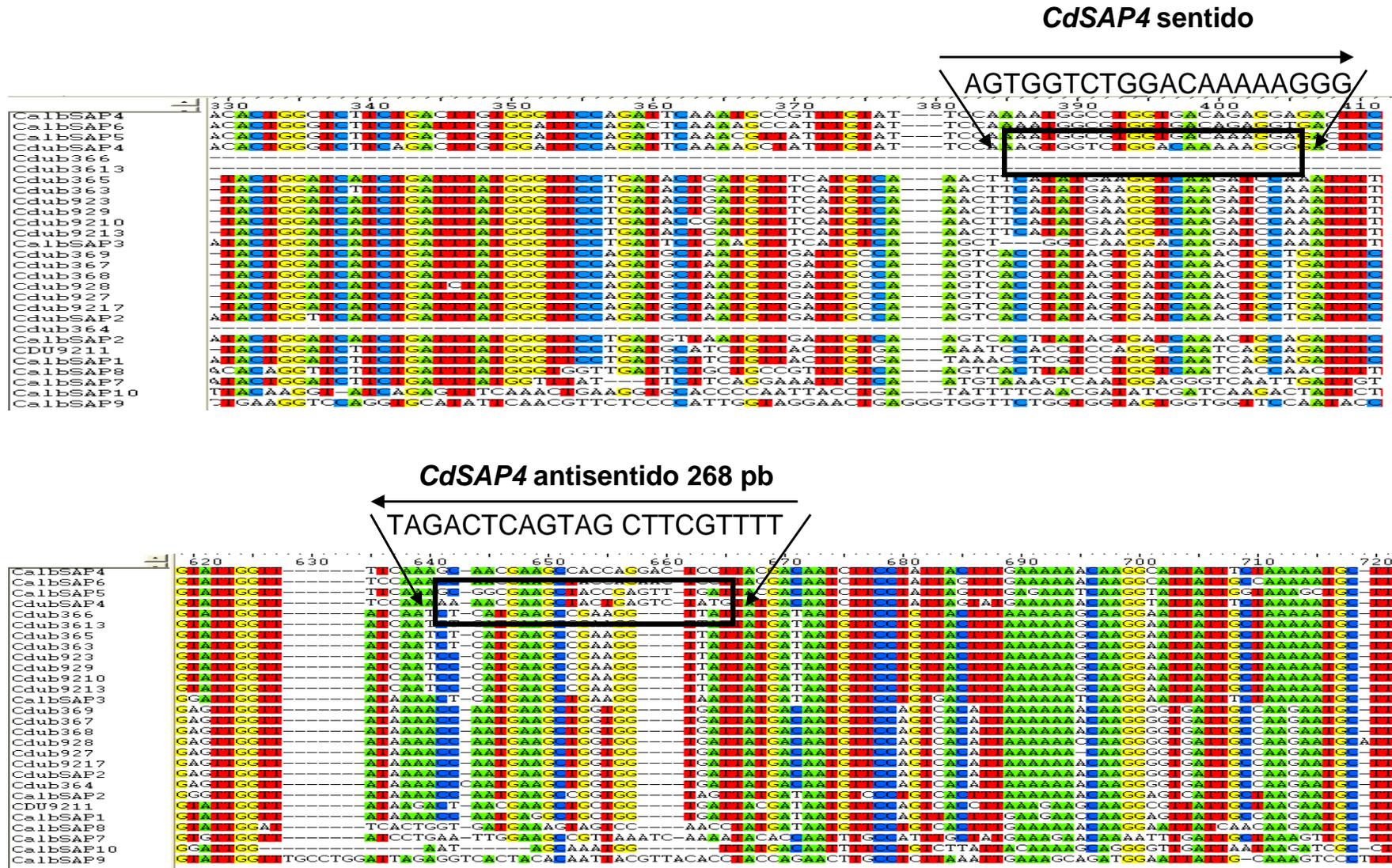
Alineamiento de los genes *SAP1-10* de *C. albicans*, *CdSAP2* y *4* de *C. dubliniensis* y clonas obtenidas por Parra-Ortega B. Con recuadros negros se muestran las secuencias seleccionadas para el diseño de los iniciadores del gen *CdSAP1* y con flecha se indica el sentido y el tamaño del producto esperado



Alineamiento de los genes *SAP1-10* de *C. albicans*, *CdSAP2* y *4* de *C. dubliniensis* y clonas obtenidas por Parra-Ortega B. Con recuadros negros se muestran las secuencias seleccionadas para el diseño de los iniciadores del gen *CdSAP2* y con flecha se indica el sentido y el tamaño del producto esperado

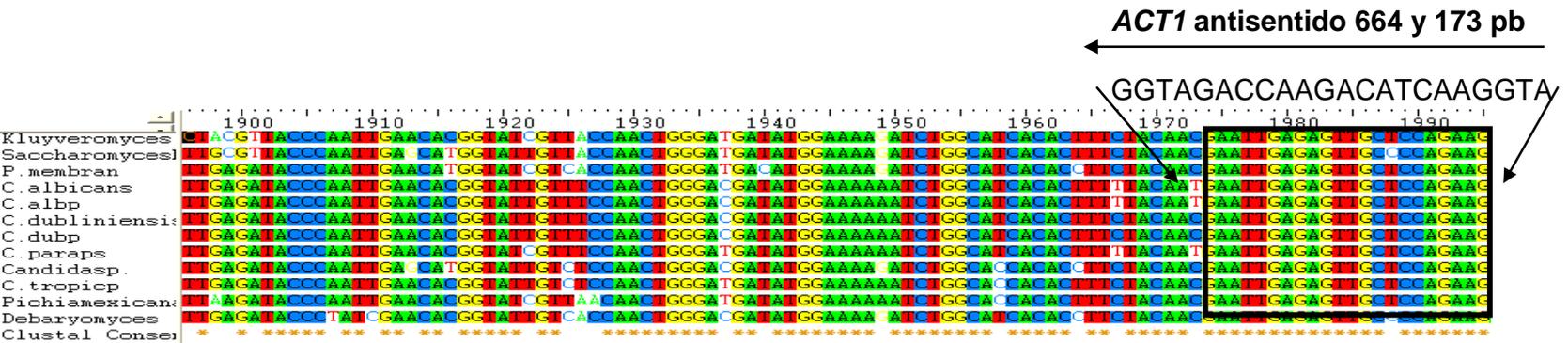
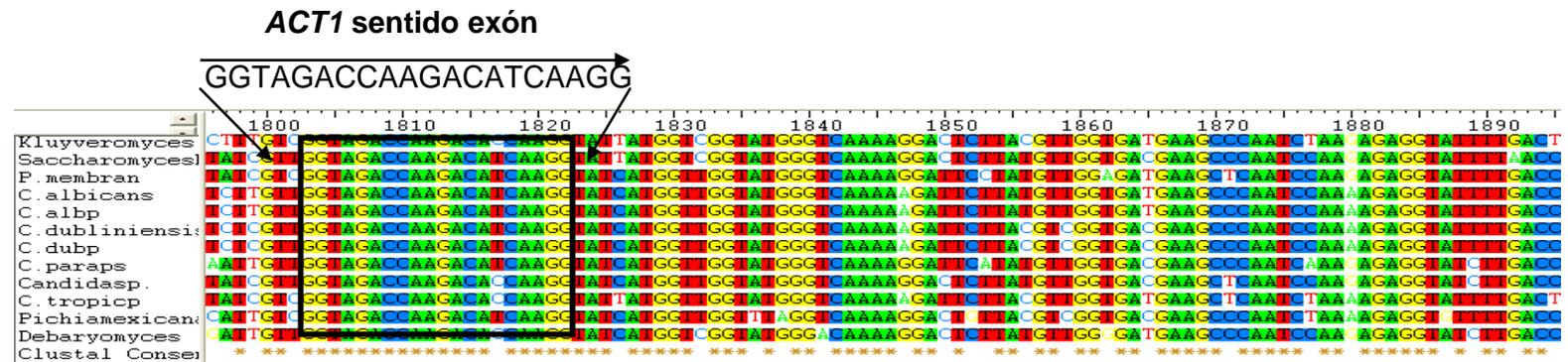
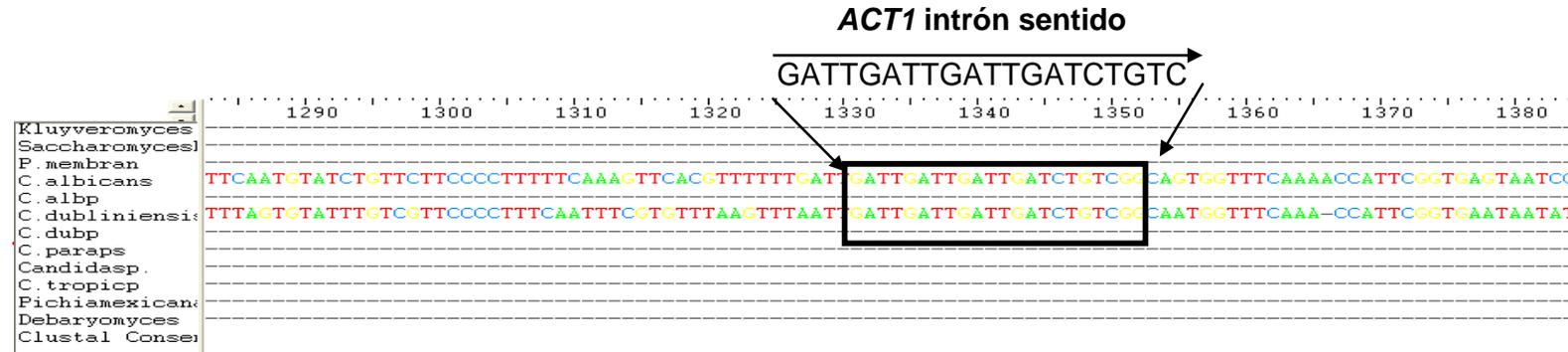


Alineamiento de los genes *SAP1-10* de *C. albicans*, *CdSAP2* y *4* de *C. dubliniensis* y clonas obtenidas por Parra-Ortega B. Con recuadros negros se muestran las secuencias seleccionadas para el diseño de los iniciadores del gen *CdSAP3* y con flecha se indica el sentido y el tamaño del producto esperado

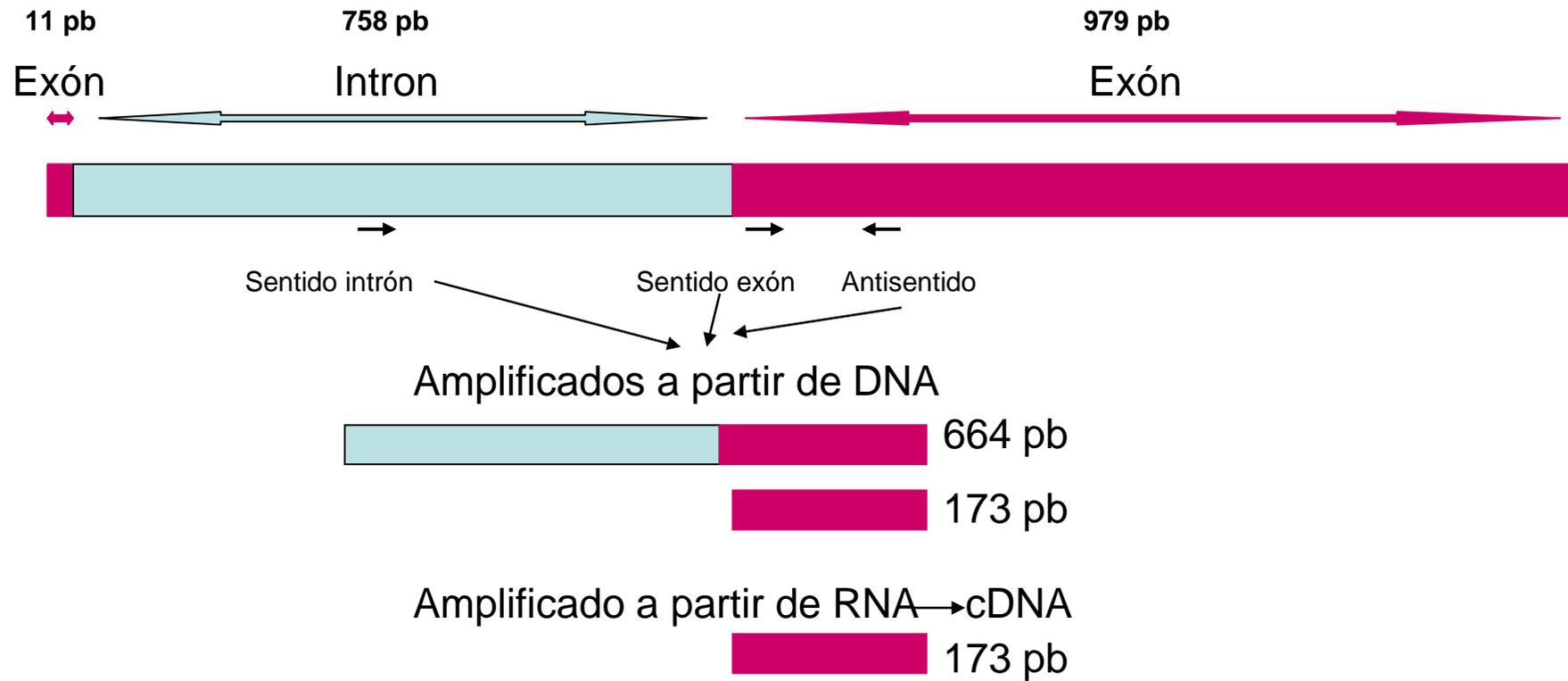


Alineamiento de los genes *SAP1-10* de *C. albicans*, *CdSAP2* y *4* de *C. dubliniensis* y clonas obtenidas por Parra-Ortega B. Con recuadros negros se muestran las secuencias seleccionadas para el diseño de los iniciadores del gen *CdSAP4* y con flecha se indica el sentido y tamaño del producto esperado

### Anexo 2



Alineamiento del gen ACT1 de especies de levaduras. Se señalan en recuadros negros las secuencias seleccionadas para el diseño de los iniciadores y con flechas el sentido y el tamaño del producto esperado



Esquema del gen *ACT1*, localización de los iniciadores diseñados y productos esperados.

### Anexo 3

Sitios potenciales de unión a factores de transcripción localizados en la secuencia corriente arriba de *CdSAP1* (2108 pb).

Factor de transcripción	Descripción	Opt.	Posición	Ca	Sim. core	Sim. matriz	Secuencia En mayúsculas: secuencia core
MATALPHA2	Proteína homeodominio de mating factor alfa 2	0.95	22 - 32	(+)	1.000	0.911	ttATGTattgc
GCR1	Activador de transcripción de enzimas glicolíticas	0.92	37 - 53	(-)	1.000	0.901	caCTTCccatattcaca
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	70 - 76	(+)	1.000	0.987	TATCttg
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	117 - 123	(+)	1.000	0.954	TATCctt
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	206 - 212	(-)	1.000	0.980	TATCata
GATA	Factor de unión a GATA de levaduras	0.89	207 - 217	(+)	1.000	0.903	atGATAaatc
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	214 - 220	(+)	1.000	0.961	TATCcct
MATALPHA2	Proteína homeodominio de mating factor alfa2	0.95	277 - 287	(+)	1.000	0.902	aaATGTagttg
MATALPHA2	Proteína homeodominio de mating factor alfa2	0.95	296 - 306	(-)	1.000	0.944	ttATGTaattc
STRE	Elemento de respuesta a estrés	0.98	318 - 326	(+)	1.000	0.977	tgAGGGggtt
ADR1	Regulador del gene de la alcohol deshidrogenada	1.00	320 - 326	(+)	1.000	0.993	aGGGGtt
RLM1.	Regula genes implicados en la biogénesis de la pared y se activa ante estrés inducido de la pared celular	0.78	340 - 358	(-)	1.000	0.936	atatTCTAaatatagttctt
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	367 - 373	(-)	1.000	0.954	TATCctt
NIT2	Activator of nitrogen-regulated genes	0.99	388 - 394	(+)	1.000	0.993	TATCaag

NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	423 - 429	(+)	1.000	0.993	TATCtct
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	432 - 438	(-)	1.000	0.980	TATCatt
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	437 - 443	(+)	1.000	1.000	TATCtat
MAT1MC	Proteína HMG-Box que activa genes M específicos se une a sitios M-Box y actúa cooperativamente con <i>STE11</i> HMG-Box	0.87	457 - 467	(+)	1.000	0.945	tcaATTGtaga
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	485 - 491	(+)	1.000	0.993	TATCaat
MATALPHA2	Proteína homeodominio de mating factor alfa 2	0.95	513 - 523	(+)	1.000	0.923	ttATGTggtt
ABAA	Regulador del desarrollo de las esporas de <i>Aspergillus</i> .	0.93	523 - 537	(+)	1.000	0.908	tcgtaaCATTcttta
MATALPHA2	Proteína homeodominio de mating factor alfa 2	0.95	571 - 581	(-)	1.000	0.950	acATGTtata
MATALPHA2	Proteína homeodominio de mating factor alfa2	0.95	576 - 586	(+)	1.000	0.941	acATGTgatt
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	587 - 593	(-)	1.000	0.987	TATCttt
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	694 - 700	(+)	1.000	0.967	TATCcag
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	697 - 703	(-)	1.000	0.967	TATCtgg
ADR1	Regulador del gene de la alcohol deshidrogenada	1.00	729 - 735	(-)	0.931	0.948	gGGAGtt
GCR1	Activador de transcripción de enzimas glicolíticas	0.92	755 - 771	(-)	1.000	0.902	ctCTTCctcagacaata
MATA1	Factor de mating a1	0.92	775 - 785	(-)	1.000	0.926	tGATGttccgg
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	788 - 794	(+)	1.000	0.980	TATCatt
MAT1MC	Proteína HMG-Box que activa genes M específicos se une a sitios M-Box y actúa cooperativamente con <i>STE11</i> HMG-Box	0.87	863 - 873	(-)	1.000	0.930	gcgATTGtttt

HAP234	Factor HAP2/3/5, homólogo NF-Y/CP1/CBF de vertebrados	0.86	876 - 888	(+)	1.000	0.938	tcaatCCAAtcac
MATALPHA2	Proteína homeodominio de mating factor alfa 2	0.95	889 - 899	(-)	1.000	0.906	aaATGTaaatg
MATALPHA2	Proteína homeodominio de mating factor alfa 2	0.95	904 - 914	(-)	1.000	0.923	ttATGTtagtaa
MATALPHA2	Proteína homeodominio de mating factor alfa 2	0.95	934 - 944	(+)	1.000	0.916	taATGTtgca
MATALPHA2	Proteína homeodominio de mating factor alfa 2	0.95	961 - 971	(-)	1.000	0.976	tcATGTtctaa
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	967 - 973	(-)	1.000	0.980	TATCatg
MATA1	Factor de mating a1	0.92	970 - 980	(-)	1.000	0.989	tGATGtatatc
MAT1MC	Proteína HMG-Box que activa genes M específicos se une a sitios M-Box y actúa cooperativamente con <i>STE11</i> HMG-Box	0.87	988 - 998	(+)	1.000	0.985	tctATTGtttt
MATA1	Factor de mating a1	0.92	1033 - 1043	(+)	1.000	0.952	tGATGtgaatt
NIT2.	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1053 - 1059	(+)	1.000	0.961	TATCcca
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1116 - 1122	(+)	1.000	0.954	TATCctt
ADR1	Regulador del gene de la alcohol deshidrogenada	1.00	1143 - 1149	(+)	1.000	0.927	tGGGgag
ADR1	Regulador del gene de la alcohol deshidrogenada	1.00	1145 - 1151	(+)	0.931	0.948	gGGAGtg
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1162 - 1168	(-)	1.000	0.987	TATCttt
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1171 - 1177	(-)	1.000	0.993	TATCaaa
MATA1	Factor factor a1 de mating	0.92	1302 - 1312	(+)	1.000	0.992	tGATGtagttg
HSF	Factor de choque térmico	0.85	1324 - 1334	(-)	1.000	0.903	tTCTtgaag
MAT1MC	Proteína HMG-Box que activa genes M específicos se une a sitios	0.87	1377 -	(-)	1.000	0.904	gctATTGtctt

	M-Box y actúa cooperativamente con <i>STE11</i> HMG-Box		1387				
MATALPHA2	Proteína homeodominio de mating factor alfa 2	0.95	1390 - 1400	(-)	1.000	0.926	taATGTacatc
MAT1MC	Proteína HMG-Box que activa genes M específicos se une a sitios M-Box y actúa cooperativamente con <i>STE11</i> HMG-Box	0.87	1422 - 1432	(-)	1.000	0.911	tttATTGttgg
MATA1	Factor de mating a1	0.92	1446 - 1456	(+)	1.000	0.919	tGATGaagaaa
STUAP	Proteína de <i>Aspergillus</i> que regula la complejidad multicelular durante la reproducción	0.95	1482 - 1492	(-)	1.000	0.910	atgCGCGcaaa
MAT1MC	Proteína HMG-Box que activa genes M específicos se une a sitios M-Box y actúa cooperativamente con <i>STE11</i> HMG-Box	0.87	1501 - 1511	(+)	1.000	0.936	ttgATTGttta
MATALPHA2	Proteína homeodominio de mating factor alfa 2	0.95	1518 - 1528	(+)	1.000	0.935	tcATGTtgcaa
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1540 - 1546	(+)	1.000	0.993	TATCtct
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1730 - 1736	(-)	1.000	0.961	TATCagt
GATA	Factor de unión a GATA de levaduras	0.89	1731 - 1741	(+)	1.000	0.900	ctGATAaaaag
MATA1	Factor de mating a1	0.92	1756 - 1766	(-)	1.000	0.923	tGATGcagttt
HAP234	Factores de unión a CCAAT de levaduras	0.86	1772 - 1784	(+)	1.000	0.919	aatatCCAAtaat
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1774 - 1780	(+)	1.000	0.967	TATCcaa
MATA1	Factor de mating a1	0.92	1783 - 1793	(-)	1.000	0.952	tGATGtgaaat
MAT1MC	Proteína HMG-Box que activa genes M específicos se une a sitios M-Box y actúa cooperativamente con <i>STE11</i> HMG-Box	0.87	1796 - 1806	(+)	1.000	0.913	accATTGtcaa
MATALPHA2	Proteína homeodominio del factor alfa 2	0.95	1820 - 1830	(+)	1.000	0.957	ccATGTtattt
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1851 - 1857	(-)	1.000	0.974	TATCgtg
STRE	Elemento de respuesta a estrés	0.98	1864 - 1872	(+)	1.000	0.962	agAGGGgag

ADR1	Regulador metabólico	1.00	1866 - 1872	(+)	1.000	0.920	aGGGGag
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1881 - 1887	(+)	1.000	0.987	TATCttt
ABAA	Regulador del desarrollo de las esporas de <i>Aspergillus</i> .	0.93	1887 - 1901	(-)	1.000	0.961	catgtgCATTcccaa
MATALPHA2	Proteína homeodominio de mating factor alfa 2	0.95	1892 - 1902	(-)	1.000	0.924	acATGTgcatt
MATALPHA2	Proteína homeodominio de mating factor alfa 2	0.95	1897 - 1907	(+)	1.000	0.901	acATGTgtctc
GCN4	GCN4, dimeriza proteínas con zipper de leucina	0.90	1915 - 1927	(+)	1.000	0.936	aaaTGACtcatt
ABAA	Regulador del desarrollo de las esporas de <i>Aspergillus</i> .	0.93	1918 - 1932	(+)	1.000	0.907	tgactcCATTctgct
ADR1	Regulador del gene de la alcohol deshidrogenada	1.00	1919 - 1925	(-)	0.931	0.960	tGGAGtc
GCR1	Activador de transcripción de enzimas glicolíticas	0.92	1929 - 1945	(+)	1.000	0.935	tgCTTCctcccaatagc
NIT2.01	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1954 - 1960	(-)	1.000	0.993	TATCaac
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	2100 - 2106	(+)	1.000	0.993	TATCaaa

Opt, Umbral de matriz optimizado, es el valor considerado como el número mínimo de coincidencias en secuencias no regulatorias.

Ca, Cadena de DNA, positiva o negativa.

Core sim., Core de similitud, es el valor de complementación obtenido al comparar las secuencias.

Sim. Matriz, Matriz de similitud, se obtiene al comparar todas las bases de una secuencia sobre la longitud entera de la matriz.

## Anexo 4

Sitios potenciales de unión a factores de transcripción localizados en la secuencia corriente arriba de *CdSAP2* (2177 pb).

<b>Factor de transcripción</b>	<b>Descripción</b>	<b>Opt.</b>	<b>Posición</b>	<b>Ca</b>	<b>Sim. core</b>	<b>Sim. matriz</b>	<b>Secuencia</b> En mayúsculas: secuencia core
MATA1	Factor de mating a1	0.92	84 - 94	(+)	1.000	0.947	tGATGtgata
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	126 - 132	(+)	1.000	0.993	TATCaat
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	146 - 152	(+)	1.000	1.000	TATCtaa
MATALPHA2	Proteína homeodominio de mating factor alfa 2	0.95	167 - 177	(+)	1.000	0.950	acATGTataat
GATA	Factor de unión a GATA de levaduras	0.89	240 - 250	(+)	1.000	0.943	aaGATAagtcg
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	358 - 364	(+)	1.000	0.993	TATCaat
MATALPHA2	Proteína homeodominio de mating factor alfa 2	0.95	510 - 520	(+)	1.000	0.904	atATGTctttg
GCR1	Activador de transcripción de enzimas glicolíticas	0.92	536 - 552	(+)	1.000	0.954	atCTTCcttccttcctt
GCR1	Activador de transcripción de enzimas glicolíticas	0.92	540 - 556	(+)	1.000	0.961	tcCTTCcttcctttcat
GCR1	Activador de transcripción de enzimas glicolíticas	0.92	544 - 560	(+)	1.000	0.973	tcCTTCctttcatTTTT
MATA1	Factor de mating a1	0.92	612 - 622	(+)	1.000	0.913	tGATGaataca
ABAA	Regulador del desarrollo de las esporas de <i>Aspergillus</i> .	0.93	623 - 637	(+)	1.000	0.917	aatttgCATTcgatt
MAT1MC	Proteína HMG-Box que activa genes M específicos se une a sitios	0.87	651 - 661	(+)	1.000	0.931	accATTGtttc

	M-Box y actúa cooperativamente con <i>STE11</i> HMG-Box						
ADR1	Regulador del gene de la alcohol deshidrogenada	1.00	667 - 673	(+)	0.931	0.953	aGGAGtc
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	796 - 802	(+)	1.000	1.000	TATCtaa
MATALPHA2	Proteína homeodominio de mating factor alfa 2	0.95	802 - 812	(+)	1.000	0.906	aaATGTaaatt
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	812 - 818	(+)	1.000	0.993	TATCaat
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	887 - 893	(+)	1.000	0.993	TATCtcc
HAP234	Factores de unión a CCAAT de levaduras	0.86	888 - 900	(+)	1.000	0.950	atctcCCAAtgac
MATALPHA2	Proteína homeodominio de mating factor alfa 2	0.95	1201 - 1211	(+)	1.000	0.964	acATGTattg
MAT1MC	Proteína HMG-Box que activa genes M específicos se une a sitios M-Box y actúa cooperativamente con <i>STE11</i> HMG-Box	0.87	1240 - 1250	(+)	1.000	0.976	tccATTGttca
GCN4	GCN4, dimeriza proteínas con zipper de leucina	0.90	1385 - 1397	(+)	1.000	0.902	cctTGACtttga
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1452 - 1458	(+)	1.000	0.967	TATCcaa
GATA	Factor de unión a GATA de levaduras	0.89	1604 - 1614	(+)	1.000	0.907	atGATAatggt
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1678 - 1684	(+)	1.000	0.935	TATCcgga
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1695 - 1701	(+)	1.000	0.954	TATCgga
STUAP	Proteína que regula en <i>Aspergillus</i> la complejidad multicelular durante la reproducción asexual	0.95	1802 - 1812	(+)	1.000	0.909	tcaCGCGtgta
MCB	Caja Mlu I del ciclo celular, activa transcripción específica G1/S en levaduras	0.84	1802 - 1812	(+)	1.000	0.939	tcaCGCGtgta
GATA	Factor de unión a GATA de levaduras	0.89	1950 - 1960	(+)	1.000	0.946	cgGATAagttg
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	2058 - 2064	(+)	1.000	0.993	TATCaaa

NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	2117 - 2123	(+)	1.000	0.993	TATCaat
------	--	------	-------------	-----	-------	-------	---------

### Anexo 5

Opt, Umbral de matriz optimizado, es el valor considerado como el número mínimo de coincidencias en secuencias no regulatorias.

Core sim., Core de similitud, es el valor de complementación obtenido al comparar las secuencias.

Sim. Matriz, Matriz de similitud, se obtiene al comparar todas las bases de una secuencia sobre la longitud entera de la matriz.

Factor de transcripción	Descripción	Opt	Posicion	Ca	Sim. core	Sim. matriz	Secuencia En mayúsculas: secuencia core
MATALPHA2	Proteína homeodominio de mating factor alfa 2	0.95	29 - 39	(+)	1.000	0.940	ccATGTcctaa
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	140 - 146	(+)	1.000	0.993	TATCaag
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	183 - 189	(+)	1.000	0.987	TATCgaa
MAT1MC	Proteína HMG-Box que activa genes M específicos se une a sitios M-Box y actúa cooperativamente con <i>STE11</i> HMG-Box	0.87	272 - 282	(+)	1.000	0.928	accATTGttca
MATALPHA2	proteína homeodominio del factor alfa 2	0.95	414 - 424	(+)	1.000	0.983	tcATGTtcttt
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	424 - 430	(+)	1.000	0.961	TATCcca
MATA1	Factor de mating a1	0.92	478 - 488	(+)	1.000	0.928	tGATGtttatg
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	532 - 538	(+)	1.000	0.980	TATCgct
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	605 - 611	(+)	1.000	0.954	TATCctt
ADR1	Regulador del gene de la alcohol deshidrogenada	1.00	658 - 664	(+)	1.000	1.000	tGGGGtt
MATA1	Factor de mating a1	0.92	666 - 676	(+)	1.000	0.947	tGATGtggatg
MATALPHA2	Proteína homeodominio de mating factor alfa 2	0.95	691 - 701	(+)	1.000	0.916	ttATGTtaca
<b>CUSE</b>	Elemento de señalización de cobre, secuencia de reconocimiento AMT1/ACE1	0.88	801 - 815	(+)	1.000	0.942	gtgtttaGCTGgtc

MATALPHA2	Proteína homeodominio de mating factor alfa 2	0.95	843 - 853	(+)	1.000	0.953	tcATGTacaga
MATALPHA2	Proteína homeodominio de mating factor alfa 2	0.95	851 - 861	(+)	1.000	0.908	agATGTaatcc
ABAA	Regulador del desarrollo de las esporas de <i>Aspergillus</i> .	0.93	1035 - 1049	(+)	1.000	0.934	cttggtCATTctgtc
HSF	Factor de choque térmico	0.85	1069 - 1079	(+)	1.000	0.903	tTTCtTgaaat
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1147 - 1153	(+)	1.000	0.980	TATCatt
STRE	Elemento de respuesta a estrés	0.97	1230 - 1238	(+)	1.000	0.989	ttAGGGggg
ADR1	Regulador del gene de la alcohol deshidrogenada	1.00	1232 - 1238	(+)	1.000	0.935	aGGGGgg
ADR1	Regulador del gene de la alcohol deshidrogenada	1.00	1234 - 1240	(+)	1.000	0.988	gGGGGtt
MAT1MC	Proteína HMG-Box que activa genes M específicos se une a sitios M-Box y actúa cooperativamente con <i>STE11</i> HMG-Box	0.87	1273 - 1283	(+)	1.000	0.925	actATTGttgt
ADR1	Regulador del gene de la alcohol deshidrogenada	1.00	1474 - 1480	(+)	1.000	0.927	tGGGGat
MATALPHA2	Proteína homeodominio de mating factor alfa 2	0.95	1533 - 1543	(+)	1.000	0.913	ccATGTcacag
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1546 - 1552	(+)	1.000	0.993	TATCaaa
MAT1MC	Proteína HMG-Box que activa genes M específicos se une a sitios M-Box y actúa cooperativamente con <i>STE11</i> HMG-Box	0.87	1586 - 1596	(+)	1.000	0.905	tttATTGttct
HAP234	Factores de unión a CCAAT de levaduras	0.86	1670 - 1682	(+)	1.000	0.908	aattaCCAAttat
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1682 - 1688	(+)	1.000	1.000	TATCtac
MATALPHA2	Proteína homeodominio de mating factor alfa 2	0.95	1738 - 1748	(+)	1.000	0.935	acATGTgatat
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1748 - 1754	(+)	1.000	0.967	TATCcat
GATA	Factor de unión a GATA de levaduras	0.89	1790 -	(+)	1.000	0.979	ccGATAagaga

			1800				
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1842 - 1848	(+)	1.000	0.980	TATCata
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1854 - 1860	(+)	1.000	0.993	TATCaac
GCR1	Activador de transcripción de enzimas glicolíticas	0.92	1998 - 2014	(+)	1.000	0.943	tgCTTCctcgtcttatt
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	2055 - 2061	(+)	1.000	0.993	TATCaaa

Opt, Umbral de matriz optimizado, es el valor considerado como el número mínimo de coincidencias en secuencias no regulatorias.

Ca, Cadena de DNA, positiva o negativa.

Core sim., Core de similitud, es el valor de complementación obtenido al comparar las secuencias.

Sim. Matriz, Matriz de similitud, se obtiene al comparar todas las bases de una secuencia sobre la longitud entera de la matriz.

## Anexo 6

Sitios potenciales de unión a factores de transcripción localizados en la secuencia corriente arriba de *CdSAP4* ((2182 pb).

<b>Factor de transcripción</b>	<b>Descripción</b>	<b>Opt.</b>	<b>Posición</b>	<b>Ca</b>	<b>Sim. core</b>	<b>Sim. matriz</b>	<b>Secuencia</b> En mayúsculas: secuencia core
MATALPHA2	Proteína homeodominio de mating factor alfa 2	0.95	275 - 285	(+)	1.000	0.916	ttATGTaatga
MAT1MC	Proteína HMG-Box que activa genes M específicos se une a sitios M-Box y actúa cooperativamente con <i>STE11</i> HMG-Box	0.87	416 - 426	(+)	1.000	0.928	ttcATTGtttt
STRE	Elemento de respuesta a estrés	0.98	533 - 541	(+)	1.000	0.980	aaAGGGgaa
ADR1	Regulador del gene de la alcohol deshidrogenada	1.00	535 - 541	(+)	1.000	0.920	aGGGGaa
STRE	Elemento de respuesta a estrés	0.98	541 - 549	(+)	1.000	0.974	aaAGGGgtg
ADR1	Regulador del gene de la alcohol deshidrogenada	1.00	543 - 549	(+)	1.000	0.993	aGGGGtg
MAT1MC	Proteína HMG-Box que activa genes M específicos se une a sitios M-Box y actúa cooperativamente con <i>STE11</i> HMG-Box	0.87	592 - 602	(+)	1.000	0.905	tgtATTGtttt
HAP234	Factores de unión a CCAAT de levaduras	0.86	643 - 655	(+)	1.000	0.945	ttacaCCAAttat
ADR1	Regulador del gene de la alcohol deshidrogenada	1.00	655 - 661	(+)	1.000	0.942	tGGGGgg
ADR1	Regulador del gene de la alcohol deshidrogenada	1.00	657 - 663	(+)	1.000	0.930	gGGGGga
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	670 - 676	(+)	1.000	0.980	TATCgcc
CUSE	Elemento de señalización de cobre, secuencia de reconocimiento AMT1/ACE1	0.88	766 - 780	(+)	1.000	0.936	aatatGCTGaat

NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	952 - 958	(+)	1.000	1.000	TATCtat
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	979 - 985	(+)	1.000	0.954	TATCcta
MAT1MC	Proteína HMG-Box que activa genes M específicos se une a sitios M-Box y actúa cooperativamente con <i>STE11</i> HMG-Box	0.87	1189 - 1199	(+)	1.000	0.914	tacATTGttaa
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1236 - 1242	(+)	1.000	0.954	TATCcta
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1438 - 1444	(+)	1.000	0.993	TATCaaa
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1470 - 1476	(+)	1.000	0.974	TATCgtg
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1500 - 1506	(+)	1.000	0.993	TATCaac
MATA1	Factor de mating a1	0.92	1550 - 1560	(+)	1.000	0.931	tGATGttgcaa
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1659 - 1665	(+)	1.000	0.987	TATCttt
HAP234	Factores de unión a CCAAT de levaduras	0.86	1682 - 1694	(+)	1.000	0.936	gtaagCCAAtaaa
GCR1	Activador de transcripción de enzimas glicolíticas	0.92	1721 - 1737	(+)	1.000	0.939	ccCTTCcttttttaggt
MATALPHA2	Proteína homeodominio de mating factor alfa 2	0.95	1891 - 1901	(+)	1.000	0.925	ttATGTtttat
MATALPHA2	Proteína homeodominio de mating factor alfa 2	0.95	1938 - 1948	(+)	1.000	0.919	ccATGTcctgc
ADR1	Regulador del gene de la alcohol deshidrogenada	1.00	2023 - 2029	(+)	1.000	0.942	tGGGGgg
ADR1	Regulador del gene de la alcohol deshidrogenada	1.00	2025 - 2031	(+)	1.000	0.930	gGGGGgg
ADR1	Regulador del gene de la alcohol deshidrogenada	1.00	2027 - 2033	(+)	1.000	0.930	gGGGGgg
ADR1	Regulador del gene de la alcohol deshidrogenada	1.00	2029 - 2035	(+)	1.000	0.988	gGGGGtt
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	2093 - 2099	(+)	1.000	0.967	TATCcaa

ABAA	Regulador del desarrollo de las esporas de <i>Aspergillus</i> .	0.93	2106 - 2120	(+)	1.000	0.954	gtcattCATTcctt
ABAA	Regulador del desarrollo de las esporas de <i>Aspergillus</i> .	0.93	2151 - 2165	(+)	1.000	0.957	catcatCATTccaga

Opt, Umbral de matriz optimizado, es el valor considerado como el número mínimo de coincidencias en secuencias no regulatorias.

Ca, Cadena de DNA, positiva o negativa.

Core sim., Core de similitud, es el valor de complementación obtenido al comparar las secuencias.

Sim. Matriz, Matriz de similitud, se obtiene al comparar todas las bases de una secuencia sobre la longitud entera de la matriz.

## Anexo 7

Sitios potenciales de unión a factores de transcripción localizados en la secuencia corriente arriba de *CdSAP7* (2071 pb).

<b>Factor de transcripción</b>	<b>Descripción</b>	<b>Opt.</b>	<b>Posición</b>	<b>Ca</b>	<b>Sim. core</b>	<b>Sim. matriz</b>	<b>Secuencia</b> En mayúsculas: secuencia core
ADR1	Regulador del gene de la alcohol deshidrogenada	1.00	32 - 38	(+)	0.931	0.960	tGGAGtt
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	150 - 156	(-)	1.000	0.974	TATCgtc
GATA	Factor de unión a GATA de levaduras	0.89	151 - 161	(+)	1.000	0.967	acGATAagaat
ABAA	Regulador del desarrollo de las esporas de <i>Aspergillus</i> .	0.93	154 - 168	(-)	1.000	0.923	cgtcatCATTcttat
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	249 - 255	(-)	1.000	0.987	TATCttt
STRE	Elemento de respuesta a estrés	0.98	339 - 347	(+)	1.000	0.976	acAGGGggtt
ADR1	Regulador del gene de la alcohol deshidrogenada	1.00	341 - 347	(+)	1.000	0.993	aGGGGtt
REB1	REB1, de <i>S. cerevisiae</i>	0.86	395 - 403	(+)	1.000	0.920	ataACCCga
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	464 - 470	(-)	1.000	0.980	TATCatt
STRE	Elemento de respuesta a estrés	0.97	489 - 497	(+)	1.000	0.997	taAGGGggg
ADR1	Regulador del gene de la alcohol deshidrogenada	1.00	491 - 497	(+)	1.000	0.935	aGGGGgg
ADR1	Regulador del gene de la alcohol deshidrogenada	1.00	493 - 499	(+)	1.000	0.930	gGGGGgg

ADR1	Regulador del gene de la alcohol deshidrogenada	1.00	495 - 501	(+)	1.000	0.988	gGGGGtg
HAP234	Factores de unión a CCAAT de levaduras	0.86	584 - 596	(-)	1.000	0.974	ctcgtCCAAtaaa
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	639 - 645	(+)	1.000	0.987	TATCttc
MATALPHA2	Proteína homeodominio de mating factor alfa 2	0.95	752 - 762	(+)	1.000	0.925	ttATGTtttaa
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	787 - 793	(-)	1.000	0.993	TATCtct
HAP234	Factores de unión a CCAAT de levaduras	0.86	795 - 807	(+)	1.000	0.935	aaagaCCAAtcag
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	810 - 816	(-)	1.000	0.961	TATCagt
GATA	Factor de unión a GATA de levaduras	0.89	811 - 821	(+)	1.000	0.903	ctGATAatctt
ABF1	ABF1, union a secuencias ARS	0.84	869 - 887	(-)	1.000	0.968	gtatcacattagACG Aaaa
MATALPHA2	Proteína homeodominio de mating factor alfa 2	0.95	877 - 887	(+)	1.000	0.908	taATGTgatac
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	880 - 886	(-)	1.000	0.987	TATCaca
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	899 - 905	(-)	1.000	0.987	TATCacc
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	949 - 955	(+)	1.000	1.000	TATCtac
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1002 - 1008	(-)	1.000	0.980	TATCgct
MATALPHA2	Proteína homeodominio de mating factor alfa 2	0.95	1017 - 1027	(+)	1.000	0.901	ctATGTaatat
MAT1MC	Proteína HMG-Box que activa genes M específicos se une a sitios M-Box y actúa cooperativamente con <i>STE11</i> HMG-Box	0.87	1079 - 1089	(-)	1.000	0.945	gccATTGttaa
ADR1	Regulador del gene de la alcohol deshidrogenada	1.00	1111 - 1117	(+)	0.931	0.953	aGGAGtt
ADR1	Regulador del gene de la alcohol deshidrogenada	1.00	1128 - 1134	(-)	1.000	0.920	aGGGGaa

STRE	Elemento de respuesta a estrés	0.98	1128 - 1136	(-)	1.000	0.980	caAGGGgaa
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1238 - 1244	(-)	1.000	1.000	TATCtac
HAP234	Factores de unión a CCAAT de levaduras	0.86	1305 - 1317	(+)	1.000	0.941	tgcaaCCAAtgac
MATA1	Factor de mating a1	0.92	1442 - 1452	(-)	1.000	0.911	tGATGaattaa
MATALPHA2	Proteína homeodominio de mating factor alfa 2	0.95	1453 - 1463	(+)	1.000	0.952	ccATGTcttta
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1488 - 1494	(-)	1.000	0.967	TATCtgc
MAT1MC	Proteína HMG-Box que activa genes M específicos se une a sitios M-Box y actúa cooperativamente con <i>STE11</i> HMG-Box	0.87	1506 - 1516	(-)	1.000	0.905	tatATTGtttt
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1598 - 1604	(-)	1.000	0.954	TATCctt
GCN4	GCN4, dimeriza proteínas con zipper de leucina	0.90	1627 - 1639	(-)	1.000	0.902	gaaTGACtagaag
MATA1	Factor de mating a1	0.92	1681 - 1691	(-)	1.000	0.921	tGATGaaactt
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1708 - 1714	(-)	1.000	0.987	TATCttt
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1713 - 1719	(+)	1.000	0.987	TATCttc
GATA	Factor de unión a GATA de levaduras	0.89	1787 - 1797	(-)	1.000	0.903	atGATAaaagt
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1792 - 1798	(+)	1.000	0.980	TATCatc
HAP234	Factores de unión a CCAAT de levaduras	0.86	1812 - 1824	(-)	1.000	0.917	catcaCCAAtaac
MATA1	Factor de mating a1	0.92	1859 - 1869	(+)	1.000	0.908	tGATGaaggca

NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1961 - 1967	(+)	1.000	0.987	TATCttt
MATA1	Factor de mating a1	0.92	2015 - 2025	(+)	1.000	0.906	tGATGgacaca
MATALPHA2	Proteína homeodominio de mating factor alfa 2	0.95	2028 - 2038	(-)	1.000	0.981	tcATGTtttac
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	2041 - 2047	(+)	1.000	0.980	TATCatt
MATA1	Factor de mating a1	0.92	2050 - 2060	(-)	1.000	0.900	tGATGgaggag
ADR1	Regulador del gene de la alcohol deshidrogenada	1.00	2051 - 2057	(-)	0.931	0.902	tGGAGga

Opt, Umbral de matriz optimizado, es el valor considerado como el número mínimo de coincidencias en secuencias no regulatorias.

Ca, Cadena de DNA, positiva o negativa.

Core sim., Core de similitud, es el valor de complementación obtenido al comparar las secuencias.

Sim. Matriz, Matriz de similitud, se obtiene al comparar todas las bases de una secuencia sobre la longitud entera de la matriz.

## Anexo 8

Sitios potenciales de unión a factores de transcripción localizados en la secuencia corriente arriba de *CdSAP8* (2042 pb).

Factor de transcripción	Descripción	Opt.	Posición	Ca	Sim. core	Sim. matriz	Secuencia En mayúsculas: secuencia core
YADR	Regulador metabólico	1.00	250 - 256	(-)	1.000	1.000	tGGGGtg
YMCB	Mlu I caja del ciclo celular	0.84	314 - 324	(-)	1.000	0.922	tgtCGCGttag
SXBP	Sitio de unión de la proteína I XhoI de <i>S.cerevisiae</i> .	0.88	498 - 510	(-)	1.000	0.914	accTCGAagtccc
MADS	Factor de la caja MADS de levaduras	0.78	579 - 597	(-)	1.000	0.824	ctttCTAttactatat
YQA1	<i>Neurospora crassa</i> QA1 gene activator	0.75	597 - 617	(-)	1.000	0.778	attgataaccatTTATatagc
GATA	Factor de unión a GATA de levaduras	0.89	606 - 616	(-)	1.000	0.908	ttGATAaccat
GATA	Factor de unión a GATA de levaduras	0.89	645 - 655	(-)	1.000	0.905	ttGATAataaa
GATA	Factor de unión a GATA de levaduras	0.89	703 - 713	(-)	1.000	0.906	ttGATAaaagt
RDNA	Factor de unión a RDNA	0.86	756 - 764	(-)	1.000	0.869	cttACCCtc
YQA1	Activador del gene QA1 de <i>Neurospora crassa</i>	0.75	768 - 788	(-)	1.000	0.796	atggaataaaatTTATacgat
TRBI	Interacción con la caja TR	0.82	990 - 1008	(-)	1.000	0.820	aagcctCTTTtttttaaa
YGCN	GCN4, dimeriza proteínas con zipper de leucina	0.90	1115 - 1127	(-)	1.000	0.929	cttTGACtaatta
YGCN	GCN4, dimeriza proteínas con zipper de leucina	0.90	1171 - 1183	(-)	1.000	0.908	tttTGACTgctag
MMAT	Proteína HMG-Box que activa genes M específicos se une a	0.87	1333 -	(-)	1.000	0.922	tttATTGttat

	sitios M-Box y actúa cooperativamente con <i>STE11</i> HMG-Box		1343				
YMIG	Proteínas de la caja GC de levaduras	0.84	1503 - 1519	(-)	1.000	0.857	aaaaacaaggGGGaa
YSTR	Elemento de respuesta a estrés	0.97	1505 - 1513	(-)	1.000	0.972	aaAGGGggg
SXBP	Sitio de union de la proteina I XhoI de <i>S.cerevisiae</i> .	0.88	1520 - 1532	(-)	1.000	0.908	ggcTCGAaaaaat
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1558 - 1564	(-)	1.000	1.000	TATCtaa
YMIG	Proteínas de la caja GC de levaduras	0.84	1573 - 1589	(-)	1.000	0.912	aaaaaaaaaggGGGaa
YSTR	Elemento de respuesta a estrés	0.97	1575 - 1583	(-)	1.000	0.972	aaAGGGggg
MADS	Factor de la caja MADS	0.78	1606 - 1624	(-)	1.000	0.809	ttgtTCTAtctatcggtat
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1612 - 1618	(-)	1.000	1.000	TATCtat
YABF	Factor ABF de levaduras	0.79	1678 - 1696	(-)	0.975	0.823	atgtaattgaagACGTagt
YMAT	Proteína homeodominio de mating factor alfa 2	0.95	1688 - 1698	(-)	1.000	0.971	acATGTaattg
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1700 - 1706	(-)	1.000	0.993	TATCtct
YMAT	Proteína homeodominio de mating factor alfa 2	0.92	1781 - 1791	(-)	1.000	0.924	tGATGaaaaag
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1821 - 1827	(-)	1.000	0.993	TATCaac

Opt, Umbral de matriz optimizado, es el valor considerado como el número mínimo de coincidencias en secuencias no regulatorias.

Ca, Cadena de DNA, positiva o negativa.

Core sim., Core de similitud, es el valor de complementación obtenido al comparar las secuencias.

Sim. Matriz, Matriz de similitud, se obtiene al comparar todas las bases de una secuencia sobre la longitud entera de la matriz.

## Anexo 9

Sitios potenciales de unión a factores de transcripción localizados en la secuencia corriente arriba de *CdSAP9* (2139 pb).

Factor de transcripción	Descripción	Opt.	Posicion	Ca	Sim. core	Sim. matriz	Secuencia En mayúsculas: secuencia core
ABAA	Regulador del desarrollo de las esporas de <i>Aspergillus</i> .	0.93	3 - 17	(-)	1.000	0.939	gtctcaCATTctttc
ABF1	Factor ABF de levaduras	0.84	50 - 68	(-)	1.000	0.935	ttatctctgaagACGActt
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	61 - 67	(-)	1.000	0.993	TATCtct
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	92 - 98	(+)	1.000	0.993	TATCaat
MCM1	Regulador metabólico y del ciclo celular	0.83	110 - 126	(+)	1.000	0.918	atcCCTAaacaggcaac
HAP234	Factores de unión a CCAAT de levaduras	0.86	172 - 184	(+)	1.000	0.909	gaaaaCCAAtgag
GCR1	Activador de transcripción de enzimas glicolíticas	0.92	174 - 190	(-)	1.000	0.931	tgCTTCctcattggttt
MATA1	Factor de mating a1	0.92	201 - 211	(-)	1.000	0.992	tGATGtagccg
HAP234	Factores de unión a CCAAT de levaduras	0.86	223 - 235	(+)	1.000	0.906	tggtCCAAtaag
GCR1	Activador de transcripción de enzimas glicolíticas , interactúa con RAP1	0.92	226 - 242	(-)	1.000	0.925	tgCTTCccttattggta
ABAA	Regulador del desarrollo de las esporas de <i>Aspergillus</i> .	0.93	252 - 266	(-)	1.000	0.942	gtgactCATTccttt
GCN4	GCN4, dimeriza proteínas con zipper de leucina	0.91	256 - 268	(+)	1.000	0.978	gaatgaGTCAcat
GCN4	GCN4, dimeriza proteínas con zipper de leucina	0.90	256 - 268	(-)	1.000	0.953	atgTGACtcattc

ABF1	Factor ABF de levaduras	0.84	279 - 297	(-)	1.000	0.866	ttctcaatccctACGTcca
STUAP	Proteína que regula en <i>Aspergillus</i> la complejidad multicelular durante la reproducción asexual	0.95	320 - 330	(-)	1.000	0.979	gatCGCGaata
HAP234	Factores de unión a CCAAT de levaduras	0.86	373 - 385	(-)	1.000	0.861	tctgaCCAACAag
MCM1	Regulador metabólico y del ciclo celular	0.83	440 - 456	(+)	1.000	0.835	ccaCCTAaccaagtcac
CUSE	Elemento regulador de elementos metálicos	0.88	457 - 471	(-)	1.000	0.912	actgttcGCTGtct
GCN4	GCN4, dimeriza proteínas con zipper de leucina	0.90	467 - 479	(-)	1.000	0.900	atcTGACtactgt
RAP1	Activador de genes glicolíticos, de reproducción y de mating tipo I.	0.83	534 - 548	(-)	1.000	0.898	caaACCCattcaaaa
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	762 - 768	(-)	1.000	1.000	TATCtat
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	790 - 796	(+)	1.000	1.000	TATCtac
HSF	Factor de choque térmico	0.85	799 - 809	(+)	1.000	0.858	aTTCTggaaat
MATALPHA2	Proteína homeodominio del factor alfa 2	0.95	848 - 858	(+)	1.000	0.953	tcATGTacagg
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	956 - 962	(+)	1.000	0.993	TATCaaa
GAL4	Factor GAL4 de levaduras	0.75	1004 - 1028	(+)	1.000	0.765	agacggttggtcgtgCCGA attg
MAT1MC	Proteína HMG-Box que activa genes M específicos se une a sitios M-Box y actúa cooperativamente con <i>STE11</i> HMG-Box	0.87	1065 - 1075	(+)	1.000	0.872	cacATTGttct
ABF1	Factor ABF de levaduras	0.84	1122 - 1140	(-)	1.000	0.862	aactcccaacatACGAagg
MATA1	Factor de mating a1	0.92	1225 - 1235	(+)	1.000	0.926	tGATGtttttc
ADR1	Regulador del gene de la alcohol deshidrogenada	1.00	1507 - 1513	(+)	1.000	1.000	tGGGGtt

NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1514 - 1520	(-)	1.000	0.993	TATCaat
PACC	Activador de genes alcalinos de levaduras	0.90	1647 - 1663	(-)	1.000	0.901	tgctGCCAagaataaca
GCR1	Activador de transcripción de enzimas glicolíticas	0.92	1698 - 1714	(+)	1.000	0.931	tgCTTCctccctcctt
GCR1	Activador de transcripción de enzimas glicolíticas	0.92	1710 - 1726	(+)	1.000	0.936	ccCTTCcattatattcc
GCR1	Activador de transcripción de enzimas glicolíticas	0.92	2022 - 2038	(+)	1.000	0.942	ccCTTCcagctttttt
RLM1	Factor de la caja MADS	0.78	2058 - 2076	(-)	1.000	0.781	aagcTCTAagaaaagaagc
HAP234	Factores de unión a CCAAT de levaduras	0.86	2085 - 2097	(+)	1.000	0.863	cttcaCCAcaat
MAT1MC	Proteína HMG-Box que activa genes M específicos se une a sitios M-Box y actúa cooperativamente con <i>STE11</i> HMG-Box	0.87	2090 - 2100	(-)	1.000	0.916	gcaATTGttgg

Opt, Umbral de matriz optimizado, es el valor considerado como el número mínimo de coincidencias en secuencias no regulatorias.

Ca, Cadena de DNA, positiva o negativa.

Core sim., Core de similitud, es el valor de complementación obtenido al comparar las secuencias.

Sim. Matriz, Matriz de similitud, se obtiene al comparar todas las bases de una secuencia sobre la longitud entera de la matriz.

## Anexo 10

Sitios potenciales de unión a factores de transcripción localizados en la secuencia corriente arriba de *CdSAP10* (2040 pb).

<b>Factor de transcripción</b>	<b>Descripción</b>	<b>Opt.</b>	<b>Posición</b>	<b>Ca</b>	<b>Sim. core</b>	<b>Sim. matriz</b>	<b>Secuencia</b> En mayúsculas: secuencia core
ADR1	Regulador del gene de la alcohol deshidrogenada	1.00	6 - 12	(+)	1.000	1.000	tGGGGta
MATA1	Factor de mating a1	0.92	51 - 61	(+)	1.000	0.923	tGATGcagtag
MATALPHA2	Proteína homeodominio del factor alfa 2	0.95	119 - 129	(+)	1.000	0.901	ctATGTtattt
MATA1	Factor de mating a1	0.92	235 - 245	(+)	1.000	0.926	tGATGttttat
MATALPHA2	Proteína homeodominio del factor alfa 2	0.95	368 - 378	(+)	1.000	0.971	acATGTaatta
MATALPHA2	Proteína homeodominio del factor alfa 2	0.95	538 - 548	(+)	1.000	0.907	agATGTactta
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	552 - 558	(+)	1.000	0.993	TATCaaa
MATA1	Factor de mating a1	0.92	637 - 647	(+)	1.000	0.916	tGATGgaaaat
MIG1	MIG1, proteína de dedos de zinc que media represión de glucosa	0.84	645 - 661	(+)	1.000	0.902	aatagaaaaccGGGGaa
ADR1	Regulador del gene de la alcohol deshidrogenada	1.00	655 - 661	(+)	1.000	0.925	cGGGGaa
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	686 - 692	(+)	1.000	0.993	TATCaat

NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	700 - 706	(+)	1.000	0.935	TATCcgga
ADR1	Regulador del gene de la alcohol deshidrogenada	1.00	770 - 776	(+)	1.000	1.000	tGGGGtc
ADR1	Regulador del gene de la alcohol deshidrogenada	1.00	814 - 820	(+)	0.931	0.900	cGGAGgt
MATALPHA2	Proteína homeodominio del factor alfa 2	0.95	854 - 864	(+)	1.000	0.928	ttATGTaaact
NIT2	Activator of nitrogen-regulated genes	0.99	1083 - 1089	(+)	1.000	0.987	TATCact
ADR1	Regulador del gene de la alcohol deshidrogenada	1.00	1138 - 1144	(+)	0.931	0.902	tGGAGga
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1299 - 1305	(+)	1.000	0.980	TATCatt
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1347 - 1353	(+)	1.000	0.987	TATCttg
ABAA	Regulador del desarrollo de las esporas de <i>Aspergillus</i> .	0.93	1420 - 1434	(+)	1.000	0.936	tactaaCATTccctt
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1617 - 1623	(+)	1.000	0.993	TATCtct
GATA	Factor de unión a GATA de levaduras	0.89	1651 - 1661	(+)	1.000	0.902	caGATAacaag
STE11	Caja TR interactúa con el factor STE11	0.89	1725 - 1743	(+)	1.000	0.946	acgcttCTTTgtttgttct
GATA	Factor de unión a GATA de levaduras	0.89	1816 - 1826	(+)	1.000	0.900	atGATAaacgg
ADR1	Regulador del gene de la alcohol deshidrogenada	1.00	1824 - 1830	(+)	1.000	0.939	cGGGGggg
ADR1	Regulador del gene de la alcohol deshidrogenada	1.00	1826 - 1832	(+)	1.000	0.930	gGGGGggg
ADR1	Regulador del gene de la alcohol deshidrogenada	1.00	1828 - 1834	(+)	1.000	0.930	gGGGGggg
ADR1	Regulador del gene de la alcohol deshidrogenada	1.00	1830 - 1836	(+)	1.000	0.930	gGGGGggg
ADR1	Regulador del gene de la alcohol deshidrogenada	1.00	1832 -	(+)	1.000	0.988	gGGGGgtg

			1838				
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1847 - 1853	(+)	1.000	1.000	TATCtat
NIT2	Activador de genes regulados por nitrógeno	0.99	1969 - 1975	(+)	1.000	0.967	TATCtga

Opt, Umbral de matriz optimizado, es el valor considerado como el número mínimo de coincidencias en secuencias no regulatorias.

Ca, Cadena de DNA, positiva o negativa.

Core sim., Core de similitud, es el valor de complementación obtenido al comparar las secuencias.

Sim. Matriz, Matriz de similitud, se obtiene al comparar todas las bases de una secuencia sobre la longitud entera de la matriz.