

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Odontología
Escuela Profesional de Odontología



**Análisis del nivel de expresión proteómico del sobrenadante de cultivos de
Candida albicans tratadas con fluconazol en aislados de bolsas periodontales
UCSM. Arequipa, 2025.**

Tesis presentada por el Bachiller:

Núñez Talavera, Gabriel Alejandro

ORCID: 0009-0006-4902-0856

para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista

Asesor (a):

Dr. Obando Pereda, Gustavo Alberto

ORCID: 0000-0001-6044-1551

Arequipa – Perú

2025

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

ODONTOLOGIA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 19 de Mayo del 2025

Dictamen: 014885-C-EPO-2025

Visto el borrador del expediente 014885, presentado por:

2020203841 - NUÑEZ TALAVERA GABRIEL ALEJANDRO

Titulado:

**ANÁLISIS DEL NIVEL DE EXPRESIÓN PROTEÓMICO DEL SOBRENADANTE DE CULTIVOS DE
CANDIDA ALBICANS TRATADAS CON FLUCONAZOL EN AISLADOS DE BOLSAS PERIODONTALES
UCSM. AREQUIPA, 2025.**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Título Profesional/Título de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

CIRUJANO DENTISTA

**06292199 - DE LOS RIOS FERNANDEZ ENRIQUE MANUEL
DICTAMINADOR**



**29547819 - ALVAREZ MONGE RUTH
DICTAMINADOR**



**29546298 - PONCE SOTO LUIS ALBERTO
DICTAMINADOR**



Análisis del nivel de expresión proteómico del sobrenadante de cultivos de Candida albicans tratadas con fluconazol en aislados de bolsas periodontales UCSM. Arequipa, 2025.

INFORME DE ORIGINALIDAD

19%	16%	5%	11%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Católica de Santa María	8%
	Trabajo del estudiante	
2	repositorio.ucsm.edu.pe	3%
	Fuente de Internet	
3	pubmed.ncbi.nlm.nih.gov	2%
	Fuente de Internet	
4	tesis.ucsm.edu.pe	<1 %
	Fuente de Internet	
5	www.coursehero.com	<1 %
	Fuente de Internet	
6	www-08.nist.gov	<1 %
	Fuente de Internet	
7	www.elsevier.es	<1 %
	Fuente de Internet	
8	www.dspace.uce.edu.ec	<1 %
	Fuente de Internet	

DEDICATORIA

A **Dios**, por ser quien me guía y brinda apoyo para seguir adelante sin importar el camino u obstáculo.

A mi madre **Juana Luz Talavera Arenas**, por todo el esfuerzo y paciencia que me tuvo durante todo este proceso de formación, por estar conmigo en todo momento y ayudarme siempre con sus enseñanzas y valores, para poder ser así una persona de bien, pero sobre todo por el gran amor que me brinda.

A mi padre **José Alejandro Nuñez Chiri**, quien es un gran ejemplo como persona y sin él no sería quien soy hoy en día, por siempre apoyarme a pesar de las circunstancias y por ser mi guía en la vida y cuidar de mis errores, gracias por todo papá.

A mi hermano **José Mauricio Nuñez Talavera**, por ser una gran persona y siempre querer sacar lo mejor de mí sin importar la forma, y ser mi ejemplo desde la infancia hasta hoy en día, gracias por todo.

A mi tía **Eliana Marilu Díaz Arenas**, por ayudarme desde pequeño con mis estudios, cuidarme y ser parte importante durante mi crecimiento profesional.

A mis abuelos, **Ernesto Núñez Portilla, Hipólita Chiri de Nuñez, Leonidas Maximiana Arenas Gonzales**, por su apoyo incondicional y buenos momentos durante mi infancia y ser un pilar para mi educación.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Católica de Santa María** y sobre todo a la Facultad de Odontología, por darme los mejores años que pude haber tenido y también por la oportunidad de ser parte de un maravilloso grupo de personas dedicadas y centradas en ser mejores.

Agradezco a mis **Dictaminadores**, por el tiempo empleado y dedicación que brindaron para apoyarme en mi formación como profesional y como persona.

Debo de agradecer a mis **Amigos**, que siempre me apoyaron y estuvieron ahí a pesar de las circunstancias, tanto buenas como malas, y también por ser parte en mi formación profesional, sobre todo, quiero dar valor y motivo al maravilloso apoyo que recibí en las últimas etapas de mi formación universitaria. En el camino, encontré apoyo que cuya presencia marcó la diferencia, creando un antes y un después, haciendo que los desafíos fueran más llevaderos y las metas más alcanzables. Sin ese apoyo, muchos logros no habrían sido posibles, y por ello, mi gratitud y deuda es infinita.

Y, finalmente, el más agradecimiento más grande y profundo va hacia mi **familia**, que sin ellos no hubiese podido lograr obtener estos años tan maravillosos durante la formación de mi etapa profesional.

A mis padres, **Juana y José**, por su gran ejemplo de perseverancia, inteligencia y honestidad; a mi hermano **Mauricio**, por su ejemplo de constancia y disciplina para lograr sus objetivos, a mis **Abuelos**, que me dejaron sus memorias y recuerdos para ser mejor persona y siempre sonreír ante cualquier circunstancia.

EPÍGRAFE

“La suerte es la esperanza de los incapaces”

Ka Hing

RESUMEN

Candida albicans es un hongo con morfología levaduriforme que habitualmente forma parte de la microbiota de la cavidad oral. No obstante, bajo determinadas condiciones puede comportarse como un patógeno oportunista. Una de las áreas donde suele encontrarse con mayor frecuencia es en las bolsas periodontales, espacios que presentan un ambiente con baja oxigenación y nutrientes disponibles, lo cual favorece su proliferación.

El estudio de la expresión proteómica resulta clave para identificar las proteínas que sintetiza *C. albicans* y analizar cómo varía su producción cuando se expone a ciertos factores, como en el caso del antifúngico fluconazol. Este tipo de análisis permite profundizar en los posibles mecanismos de adaptación y resistencia que adopta el hongo en contextos específicos como el ambiente oral.

El propósito central de esta investigación fue analizar la expresión proteica en el sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* extraídos de bolsas periodontales, sometidos a tratamiento con fluconazol.

Los hallazgos obtenidos reflejaron la presencia de 31 “spots” en cultivos que no fueron expuestos al antifúngico, mientras que en aquellos sometidos a fluconazol se observaron 7 “spots”. A partir de este análisis, se identificaron siete proteínas específicas, denominadas Ca_1 a Ca_7, correspondientes a: cdr2p, hsp90, upc2p, sterol 14-demethylase, mrr1p, tac1p y C5,6 desaturase (parcial). Según su función, Ca_1 participa como bomba de eflujo; Ca_2 funciona como chaperona molecular; Ca_3, Ca_5 y Ca_6 como factores de transcripción; y Ca_4 junto con Ca_7 intervienen en la ruta biosintética del ergosterol.

En conclusión, el análisis permitió identificar siete proteínas exclusivas en muestras tratadas con fluconazol, las cuales no se hallaron en cultivos sin exposición al fármaco. De acuerdo con su función y perfil proteico, se infiere que estas proteínas podrían estar vinculadas con mecanismos implicados en la resistencia al tratamiento antifúngico.

Palabras claves: *Candida albicans*, proteínas, fluconazol.

ABSTRACT

Candida albicans is a yeast-like fungus that is normally part of the oral cavity microbiota. However, under certain conditions, it can behave as an opportunistic pathogen. One of the areas where it is most frequently found is in periodontal pockets, environments characterized by low oxygen levels and available nutrients, which favor its proliferation.

The study of proteomic expression is key to identifying the proteins synthesized by *C. albicans* and analyzing how its production varies when exposed to certain factors, such as the antifungal fluconazole. This type of analysis allows for a deeper understanding of the possible adaptation and resistance mechanisms that the fungus adopts in specific contexts like the oral environment.

The main objective of this research was to analyze the protein expression in the supernatant of *Candida albicans* cultures isolated from periodontal pockets and treated with fluconazole.

The results obtained showed the presence of 31 spots in cultures not exposed to the antifungal, whereas 7 spots were observed in those subjected to fluconazole. Through this analysis, seven specific proteins were identified, named Ca_1 to Ca_7, corresponding to: cdr2p, hsp90, upc2p, sterol 14-demethylase, mrr1p, tac1p, and C5,6 desaturase (partial). According to their function, Ca_1 acts as an efflux pump; Ca_2 serves as a molecular chaperone; Ca_3, Ca_5, and Ca_6 as transcription factors; and both Ca_4 and Ca_7 are involved in the ergosterol biosynthesis pathway.

In conclusion, the analysis identified seven proteins exclusively present in samples treated with fluconazole, which were not found in untreated cultures. Based on their function and proteomic profile, these proteins are inferred to be potentially associated with mechanisms involved in resistance to antifungal treatment.

Keywords: *Candida albicans*, proteins, fluconazole.

ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

EPÍGRAFE

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN 1

CAPÍTULO I..... 2

PLANTEAMIENTO TEÓRICO 2

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN 3

1.1 Determinación del problema 3

1.2 Enunciado del problema 5

1.3 Descripción del problema 6

1.3.1 Áreas del conocimiento 6

1.3.2 Operacionalización de Variables 6

1.3.3 Interrogantes Básicas 7

1.3.4 Taxonomía de la investigación 7

1.4 Justificación del Problema 7

1.4.1 Originalidad 7

1.4.2 Relevancia 8

1.4.3 Actualidad 8

1.4.4 Factibilidad 8

1.4.5 Interés Personal 9

2. OBJETIVOS 9

2.1 Objetivo General 9

2.2 Objetivos Específicos 9

3. MARCO CONCEPTUAL 10

3.1 Conceptos Básicos 10

3.1.1 Bolsas periodontales 10

3.1.2 Candidiasis Oral 11

3.1.3 *Candida albicans* 11

3.1.4 Periodontitis 12

3.1.5 Fluconazol 12

3.1.4 Relación de la *Candida albicans* con periodontitis 12

3.1.5	Relación de <i>Candida albicans</i> con el microbioma bacteriano oral en la salud y la enfermedad	13
3.1.6	Tolerancia al Fluconazol	13
3.1.7	Proteínas de superficie	13
3.2	Antecedentes investigativos	14
3.2.1	Antecedentes Internacionales	14
3.2.2	Antecedentes Nacionales	19
3.2.3	Antecedentes Locales	19
4.	HIPOTESIS	21
	CAPÍTULO II	22
	PLANTEAMIENTO OPERACIONAL	22
1.	TÉCNICAS, INSTRUMENTOS Y MATERIALES DE VERIFICACIÓN	23
1.1	Técnicas	23
1.1.1	Electroforesis bidimensional (2-DE/2D-PAGE)	24
1.1.2	Espectrometría de masas (ESI-QTOF)	24
1.2	Instrumentos:	25
1.2.1	Instrumentos documentales	25
1.2.2	Instrumentos mecánicos	25
1.3	Materiales de verificación	25
2.	CAMPO DE VERIFICACIÓN	26
2.1	Ubicación Espacial	26
2.1.1	Ámbito General	26
2.1.2	Ámbito Específico	26
2.2	Ubicación Temporal	26
2.3	Unidades de Estudio Alternativa de Manejo	26
3.	ESTRATEGIA DE RECOLECCIÓN DE DATOS	27
3.1	Organización de la información	27
3.2	Recursos	27
3.3	Validación del instrumento y Pruebas piloto	27
4.	ESTRATEGIA PARA MANEJAR LOS RESULTADOS	27
4.1	Plan de procesamiento	28
4.1.1	Tipo de procesamiento	28
4.1.2	Operaciones del procesamiento	28
4.2	Plan de análisis de los datos	28

CAPÍTULO III	29
RESULTADOS	29
1. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	30
1.1. Estudio de Homología Secuencial	52
2. DISCUSIÓN	63
CONCLUSIONES	68
RECOMENDACIONES	69
REFERENCIAS	70
ANEXOS	75
Anexo 1 Solicitud para el uso del Laboratorio de Química y Proteínas de la UCSM .	76
Anexo 2 Declaración Jurada de Autorización	77
Anexo 3 Fotografías debidas del procedimiento de laboratorio	78
Anexo 4 Ficha de Recolección de Datos	91
Anexo 5 Preparación de Muestras	94
Anexo 6 Dictamen Comité de Ética de Investigación	95
Anexo 7 Correlación de proteínas (FASTA)	96
Anexo 8 Tabla comparativa de los niveles de expresión en cultivo de Cándida albicans en ausencia (control) y presencia de fluconazol (tratamiento)	99
Anexo 9 Protocolo de Electroforesis Bidimensional (2D) Bio Rad	100

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Referencia de spots en relación entre el pI y Mm para la identificación del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de <i>Candida albicans</i> sin tratamiento en aislados de bolsas periodontales (día 1).....	31
Tabla 2	Referencia de spots en relación entre el pI y Mm para la identificación del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de <i>Candida albicans</i> sin tratamiento en aislados de bolsas periodontales (día 7).....	34
Tabla 3	Referencia de spots en relación entre el pI y Mm para la identificación del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de <i>Candida albicans</i> sin tratamiento en aislados de bolsas periodontales (día 14).....	37
Tabla 4	Referencia de spots en relación entre el pI y Mm para la identificación del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de <i>Candida albicans</i> tratadas con fluconazol en aislados de bolsas periodontales (día 1).....	41
Tabla 5	Referencia de spots en relación entre el pI y Mm para la identificación del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de <i>Candida albicans</i> tratadas con fluconazol en aislados de bolsas periodontales (día 7).....	44
Tabla 6	Referencia de spots en relación entre el pI y Mm para la identificación del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de <i>Candida albicans</i> tratadas con fluconazol en aislados de bolsas periodontales (día 14).....	47
Tabla 7	Referencia de spots con el código de acceso de cada proteína seguida de su secuencia del péptido con sus respectivos pI y Mm para el análisis del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de <i>Candida albicans</i> tratadas con fluconazol en aislados de bolsas a los días de control (1, 7 y 14) que no se encontraron en la muestra sin tratamiento.	50
Tabla 8	Referencia de spots con el código de acceso asociada al nombre de cada molécula con sus respectivos organismos a los cuales pertenece para el análisis del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de <i>Candida albicans</i> tratadas con fluconazol en aislados de bolsas a los días de control (1, 7 y 14) que no se encontraron en la muestra sin tratamiento.	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Electroforesis bidimensional (2D) del extracto proteico para la identificación del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de <i>Candida albicans</i> sin tratamiento en aislados de bolsas periodontales, donde no se evidencian spots en el padrón de referencia (día 1).....	32
Figura 2	Representación tridimensional del gel de electroforesis bidimensional correspondiente al mapa de referencia proteico para la identificación del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de <i>Candida albicans</i> sin tratamiento en aislados de bolsas periodontales, generado mediante el software PD Quest Basic versión 8.0.1 (Bio-Rad, CA, USA) y teñido con Coomassie Blue. (día 1).	33
Figura 3	Electroforesis bidimensional (2D) del extracto proteico para la identificación del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de <i>Candida albicans</i> sin tratamiento en aislados de bolsas periodontales, donde no se evidencian spots en el padrón de referencia (día 7).....	35
Figura 4	Representación tridimensional del gel de electroforesis bidimensional correspondiente al mapa de referencia proteico para la identificación del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de <i>Candida albicans</i> sin tratamiento en aislados de bolsas periodontales, generado mediante el software PD Quest Basic versión 8.0.1 (Bio-Rad, CA, USA) y teñido con Coomassie Blue. (día 7).	36
Figura 5	Electroforesis bidimensional (2D) del extracto proteico para la identificación del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de <i>Candida albicans</i> sin tratamiento en aislados de bolsas periodontales, donde se evidencian 31 spots visibles en el padrón de referencia resaltados de color amarillo (día 14).	38
Figura 6	Representación tridimensional del gel de electroforesis bidimensional correspondiente al mapa de referencia proteico para la identificación del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de <i>Candida albicans</i> sin tratamiento en aislados de bolsas periodontales, generado mediante el software PD Quest Basic versión 8.0.1 (Bio-Rad, CA, USA) y teñido con Coomassie Blue (día 14).	39
Figura 7	Electroforesis bidimensional (2D) del extracto proteico para la identificación del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de <i>Candida albicans</i>	

- tratadas con fluconazol en aislados de bolsas periodontales, donde no se evidencian spots en el padrón de referencia (día 1). 42
- Figura 8 Representación tridimensional del gel de electroforesis bidimensional correspondiente al mapa de referencia proteico para la identificación del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas periodontales, generado mediante el software PD Quest Basic versión 8.0.1 (Bio-Rad, CA, USA) y teñido con Coomassie Blue (día 1). 43
- Figura 9 Electroforesis bidimensional (2D) del extracto proteico para la identificación del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas periodontales, donde no se evidencian spots en el padrón de referencia (día 7). 45
- Figura 10 Representación tridimensional del gel de electroforesis bidimensional correspondiente al mapa de referencia proteico para la identificación del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas periodontales, generado mediante el software PD Quest Basic versión 8.0.1 (Bio-Rad, CA, USA) y teñido con Coomassie Blue (día 7). 46
- Figura 11 Electroforesis bidimensional (2D) del extracto proteico para la identificación del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas periodontales, donde se evidencian 7 spots en el padrón de referencia que estuvieron en el rango de 5.0 a 9.0 de pI y masas en torno de 14 a 30kDa, resaltando estos spots de color rojo además de los que ya se encontraban sin tratamiento de color amarillo (día 14). 48
- Figura 12 Representación tridimensional del gel de electroforesis bidimensional correspondiente al mapa de referencia proteico para la identificación del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas periodontales, generado mediante el software PD Quest Basic versión 8.0.1 (Bio-Rad, CA, USA) y teñido con Coomassie Blue (día 14). 49
- Figura 13 Representación de los alineamientos de las secuencias de aminoácidos obtenida por digestión trípica del spot Ca_1 a Ca_7 relacionadas sus familias de proteínas para el análisis del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos

- de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas a los días de control (1, 7 y 14) que no se encontraron en la muestra sin tratamiento. 54
- Figura 14 Representación tridimensional del spot Ca-01 (Cdr2p) efectuado para facilitar la visualización de la estructura espacial de la proteína completa, cuya secuencia fue deducida de novo, destacando de color rojo la región conservada con el propósito de examinar posibles dominios estructurales compartidos con otras proteínas pertenecientes a la misma familia para el análisis del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas a los días de control (1, 7 y 14) que no se encontraron en la muestra sin tratamiento. 56
- Figura 15 Representación tridimensional del spot Ca-02 (Hsp90) efectuado para facilitar la visualización de la estructura espacial de la proteína completa, cuya secuencia fue deducida de novo, destacando de color rojo la región conservada con el propósito de examinar posibles dominios estructurales compartidos con otras proteínas pertenecientes a la misma familia para el análisis del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas a los días de control (1, 7 y 14) que no se encontraron en la muestra sin tratamiento. 57
- Figura 16 Representación tridimensional del spot Ca-03 (Upc2p) efectuado para facilitar la visualización de la estructura espacial de la proteína completa, cuya secuencia fue deducida de novo, destacando de color rojo la región conservada con el propósito de examinar posibles dominios estructurales compartidos con otras proteínas pertenecientes a la misma familia para el análisis del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas a los días de control (1, 7 y 14) que no se encontraron en la muestra sin tratamiento. 58
- Figura 17 Representación tridimensional del spot Ca-04 (sterol 14-demethylase) efectuado para facilitar la visualización de la estructura espacial de la proteína completa, cuya secuencia fue deducida de novo, destacando de color rojo la región conservada con el propósito de examinar posibles dominios estructurales compartidos con otras proteínas pertenecientes a la misma familia para el análisis del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas a los días de control (1, 7 y 14) que no se encontraron en la muestra sin tratamiento. 59

Figura 18 Representación tridimensional del spot Ca-05 (Mrr1p) efectuado para facilitar la visualización de la estructura espacial de la proteína completa, cuya secuencia fue deducida de novo, destacando de color rojo la región conservada con el propósito de examinar posibles dominios estructurales compartidos con otras proteínas pertenecientes a la misma familia para el análisis del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de <i>Candida albicans</i> tratadas con fluconazol en aislados de bolsas a los días de control (1, 7 y 14) que no se encontraron en la muestra sin tratamiento.	60
Figura 19 Representación tridimensional del spot Ca-06 (Tac1p) efectuado para facilitar la visualización de la estructura espacial de la proteína completa, cuya secuencia fue deducida de novo, destacando de color rojo la región conservada con el propósito de examinar posibles dominios estructurales compartidos con otras proteínas pertenecientes a la misma familia para el análisis del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de <i>Candida albicans</i> tratadas con fluconazol en aislados de bolsas a los días de control (1, 7 y 14) que no se encontraron en la muestra sin tratamiento.	61
Figura 20 Representación tridimensional del spot Ca-07 (C5 6 desaturase, partial) efectuado para facilitar la visualización de la estructura espacial de la proteína completa, cuya secuencia fue deducida de novo, destacando de color rojo la región conservada con el propósito de examinar posibles dominios estructurales compartidos con otras proteínas pertenecientes a la misma familia para el análisis del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de <i>Candida albicans</i> tratadas con fluconazol en aislados de bolsas a los días de control (1, 7 y 14) que no se encontraron en la muestra sin tratamiento.	62
Figura 21. Desinfección de cámara eflujo.....	78
Figura 22. Rotulación de sobrenadantes día 01.....	79
Figura 23. Rotulación de sobrenadantes día 07.....	80
Figura 24. Rotulación de sobrenadantes día 14.....	81
Figura 25. Preparación del agar para días 1, 7 y 14 en presencia y ausencia de fluconazol	82
Figura 26. Preparación del cultivo de <i>Candida albicans</i>	83
Figura 27. Colocación de fluconazol en sobrenadante.....	84
Figura 28. Colocación de muestras en estufa.....	85
Figura 29. Colocación el tubo de ensayo con agua destilada, preparando la solución	86
Figura 30. Sobrenadante de <i>Candida albicans</i> con fluconazol.....	87

Figura 31. Sobrenadante de <i>Candida albicans</i> sin fluconazol	88
Figura 32. Colocación de tubo de ensaño con tapa en vortex para la preparación de sobrenadante.....	89
Figura 33. Preparación de sobrenadante	90



INTRODUCCIÓN

Candida albicans es un hongo con morfología de levadura que forma parte de la microbiota de la cavidad oral humana. No obstante, cuando se presentan desequilibrios en el ecosistema microbiano o alteraciones del sistema inmunológico, esta levadura actúa como un patógeno oportunista. Comúnmente se haya en espacios interdentes, la lengua y las mucosas bucales, aunque también puede proliferar en ambientes favorables como dentro de las bolsas periodontales. Estas bolsas, que surgen como progreso del avance de una enfermedad periodontal, se desarrollan generalmente a partir de una infección bacteriana, principalmente por *Porphyromonas gingivalis*, y generan un entorno con baja oxigenación, alta humedad y abundantes nutrientes, condiciones ideales para el crecimiento de *C. albicans* (35).

Las características microambientales de las bolsas periodontales proporcionan un entorno propicio para la colonización de *C. albicans*, el cual puede adherirse a estas superficies y formar biopelículas. Esta capacidad incrementa la inflamación y complica su erradicación terapéutica. La presencia del hongo en estos nichos ha sido relacionada con dificultades clínicas adicionales, incluyendo una mayor resistencia a tratamientos antimicrobianos convencionales, ya que *C. albicans* puede activar diversos mecanismos de defensa frente a dichos agentes (2).

Uno de los antifúngicos más empleados en el tratamiento contra *C. albicans* es el fluconazol, que actúa inhibiendo una enzima esencial en la ruta biosintética del ergosterol, un componente clave de la membrana celular fúngica. Sin embargo, se ha documentado ampliamente la aparición de resistencia a este fármaco en distintas cepas del hongo, lo que resalta la necesidad de comprender los procesos de adaptación y supervivencia que desarrolla frente al tratamiento. En este contexto, el estudio del nivel de expresión proteómica se presenta como una herramienta fundamental para explorar las respuestas moleculares del hongo, permitiendo identificar las proteínas que se expresan en condiciones específicas, como la exposición al fluconazol (3).

El análisis del perfil proteómico no solo permite identificar qué proteínas están presentes, sino también medir su nivel de expresión y evaluar los cambios inducidos por factores como los antifúngicos. En esta investigación, se analizó el patrón de expresión proteica de *C. albicans* aislado de bolsas periodontales, tanto en condiciones con y sin fluconazol, con el propósito de identificar proteínas que puedan estar relacionadas con mecanismos de resistencia. Este enfoque resulta esencial para ampliar el conocimiento sobre las estrategias adaptativas del hongo, y representa un paso importante hacia el desarrollo de terapias más eficaces para tratar infecciones fúngicas tanto orales como periodontales (5,10).



CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO TEÓRICO

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Determinación del problema

La *Candida albicans* es reconocida a nivel global como una de las principales causantes de infecciones micóticas, particularmente en individuos con sistemas inmunológicos debilitados o que padecen enfermedades crónicas. Este hongo es especialmente prevalente en infecciones de origen periodontal, en las que su tratamiento se ve complicado por el aumento en la resistencia a agentes antifúngicos como el fluconazol, uno de los medicamentos de primera elección. Investigaciones recientes han demostrado que *Candida albicans* puede modificar su perfil proteico para activar mecanismos de resistencia y aumentar su capacidad de persistencia frente a tratamientos antifúngicos tradicionales (1). Asimismo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha señalado la resistencia a antifúngicos como una amenaza creciente para la salud pública, atribuyendo esta problemática al uso indiscriminado de estos medicamentos (2). Teniendo esto en cuenta, se vuelve esencial estudiar los mecanismos moleculares, como la modulación de proteínas implicadas en la supervivencia del hongo, al estar en contacto con fluconazol, con el fin de encontrar tratamientos más eficaces (2).

En el contexto nacional, la prevalencia de infecciones por *Candida albicans* en pacientes con enfermedad periodontal es alta, particularmente en aquellos con múltiples condiciones clínicas o que reciben terapias antifúngicas prolongadas. Estudios realizados en universidades y centros clínicos del país muestran una tendencia ascendente en la resistencia a fluconazol, comprometiendo así la efectividad terapéutica (3). Ante esta situación, el Ministerio de Salud ha emitido advertencias sobre la necesidad de monitorear el uso de antifúngicos y ha recomendado investigar los mecanismos que promueven dicha resistencia. Sin embargo, todavía son escasos los estudios que analicen cómo este hongo modifica su expresión proteica en presencia de fluconazol dentro de ambientes periodontales, lo que representa un vacío importante en el conocimiento actual (4).

A nivel local, se ha identificado que la resistencia de *Candida albicans* en bolsas periodontales representa un reto importante para el tratamiento odontológico. Informes de clínicas y hospitales han mostrado que un número considerable de pacientes no responden adecuadamente al fluconazol, debido a la habilidad del hongo para alterar su

perfil proteico y activar rutas de supervivencia frente al tratamiento. Investigaciones de laboratorio recientes han revelado que los sobrenadantes de cultivos de *Candida albicans* contienen proteínas clave para su resistencia, lo que subraya la necesidad de realizar análisis más profundos sobre estos mecanismos y así desarrollar terapias más efectivas y contextualizadas a las necesidades de los pacientes locales (5).

Las enfermedades infecciosas siguen siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, afectando a millones de personas anualmente. Factores como el aumento de la movilidad global, el envejecimiento poblacional y la resistencia a tratamientos antimicrobianos han intensificado esta problemática. El abordaje terapéutico de estas patologías se basa en un diagnóstico inicial seguido por la administración específica de medicamentos (6).

Estas enfermedades resultan de complejas interacciones entre numerosos factores del hospedador y del agente infeccioso. Para lograr una comprensión más integral de los procesos infecciosos, es fundamental adoptar enfoques multidisciplinarios y colaborativos entre diversas áreas de investigación y atención clínica (6).

Hasta ahora, los análisis más detallados para identificar biomarcadores y posibles blancos terapéuticos han provenido de estudios genómicos y transcriptómicos. En las últimas décadas, ha habido un incremento notable de investigaciones proteómicas orientadas a enfermedades infecciosas, que han enriquecido el desarrollo de nuevos tratamientos y vacunas (7).

La secuenciación de genomas microbianos ha revolucionado el estudio de patógenos, proporcionando avances en el diagnóstico, la epidemiología, la fisiopatología y la terapéutica. Esta herramienta ha permitido también el acceso al estudio de los proteomas. El primer genoma secuenciado fue el del virus Epstein-Barr en 1984, y posteriormente, en 1995, se completó la secuenciación de *Haemophilus influenzae*, una bacteria gramnegativa (7).

Muchas investigaciones se centraban en el análisis de genes activos en diferentes contextos biológicos, basándose principalmente en el ARN mensajero (ARNm). Sin embargo, frecuentemente no existía una correlación directa entre los niveles de ARNm y la cantidad de proteína expresada. Esto se debe a que la cantidad de proteínas producidas no depende únicamente del ARNm, sino también del estado funcional de la

célula. Un ejemplo ilustrativo es el estudio de Franco et al.⁵, en el cual se compararon dos cepas de *Helicobacter pylori*, una de ellas cancerígena. Mientras que a nivel transcriptómico no se observaron diferencias, en el análisis proteómico sí fue posible distinguirlas claramente (7).

La proteómica representa la siguiente etapa en la investigación biológica tras la genómica y transcriptómica. A diferencia del genoma, que es constante, el proteoma varía entre tipos celulares y condiciones. El término “proteoma”, acuñado por Marc Wilkins en 1994, hace referencia al conjunto de proteínas expresadas por una célula u organismo en un momento y condiciones específicas. Esta variabilidad se ve incrementada por modificaciones estructurales y postraduccionales que las proteínas pueden experimentar, las cuales influyen en su función, actividad o localización celular. También existe el fenómeno del “moonlighting”, en el que una sola proteína puede desempeñar múltiples funciones (7).

El desarrollo de la proteómica ha sido impulsado por la integración de tecnologías avanzadas como la espectrometría de masas, técnicas de separación proteica de alta resolución y herramientas bioinformáticas, lo que ha permitido el análisis detallado de grandes volúmenes de datos. Gracias a ello, no solo se identifican proteínas, sino que también se pueden clasificar según su función e interacciones (7).

El campo proteómico se divide en tres grandes áreas: (a) la proteómica de expresión, orientada a identificar proteínas, su abundancia, modificaciones y localización subcelular; (b) la proteómica estructural, que estudia la configuración tridimensional de las proteínas; y (c) la proteómica funcional, que investiga el rol biológico de las proteínas y sus redes de interacción (7).

1.2 Enunciado del problema

Análisis del nivel de expresión proteómico del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas periodontales UCSM. Arequipa, 2025.

1.3 Descripción del problema

1.3.1 Áreas del conocimiento

- **Área general:** Ciencias de la Salud
- **Área específica:** Odontología
- **Especialidad:** Periodoncia
- **Línea o Tópico:** Proteómica

1.3.2 Operacionalización de Variables

Variables	Indicadores	Sub-Indicadores
Independiente: Expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de <i>Candida albicans</i> en aislados de bolsas periodontales del trabajo de investigación “Influencia de la aerobiosis facultativa en la producción de biofilm, viabilidad y morfología de Candida Albicans en la Universidad Católica de Santa María (UCSM) - Arequipa 2024.” (27) sin tratamiento.	Aminoácidos y Proteínas expresadas del sobrenadante de cultivos de <i>Candida albicans</i> .	Número de spots según la densidad de coloración.
Dependiente: Expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de <i>Candida albicans</i> en aislados de bolsas periodontales del trabajo de investigación “Influencia de la aerobiosis facultativa en la producción de biofilm, viabilidad y morfología de Candida Albicans en la Universidad Católica de Santa María (UCSM) - Arequipa 2024.” (27) en presencia de fluconazol.	Aminoácidos y Proteínas expresadas del sobrenadante de cultivos de <i>Candida albicans</i> .	Número de spots según la densidad de coloración.

1.3.3 Interrogantes Básicas

- ¿Cuál es el nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* en aislados de bolsas periodontales?
- ¿Cuál es el nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas periodontales?
- ¿Cuál es el análisis de la expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas periodontales que no se encontraron en las muestras sin tratamiento?

1.3.4 Taxonomía de la investigación

ABORDAJE	TIPO DE ESTUDIO					DISEÑO	NIVEL
	1. Por la técnica de recolección	2. Por el tipo de dato que se planifica recoger	3. Por el número de mediciones de la variable	4. Por el número de muestras o población	5. Por el ámbito de recolección		
Cualitativo	Experimental	Prospectivo	Transversal	Comparativo	De laboratorio	Experimental	Explicativa

1.4 Justificación del Problema

1.4.1 Originalidad

La investigación es de carácter original. El estudio del análisis del nivel de expresión proteómico del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas periodontales, no ha sido investigada en su exactitud ampliamente. Alrededor del mundo existen distintos estudios que comentan de la interacción de la *Candida albicans* con su relación a las bolsas periodontales, mas no existen muchos estudios que comparen su relación proteómica en presencia de fluconazol.

1.4.2 Relevancia

La *Candida albicans* es un hongo el cual es profundamente vinculado a la enfermedad periodontal, agravando la actividad inflamatoria de pacientes con enfermedad periodontal, cabe aclarar que puede llegar a alterar el microbioma bucal. La importancia de esta investigación radica en comprender la manera en que esta levadura responde ante la acción de tratamientos antifúngicos. Analizar la expresión de proteínas permitiría identificar posibles mecanismos de resistencia al fluconazol, lo cual resulta valioso dentro de un enfoque preventivo y terapéutico.

1.4.3 Actualidad

En la actualidad, resulta imprescindible analizar los datos y circunstancias que dan paso a la resistencia de *Candida albicans*, sobre todo en pacientes que padezcan enfermedad periodontal, debido al alto índice de aparición de este hongo en dichos casos. *C. albicans* posee una notable capacidad para colonizar y mantenerse en el entorno bucal, sobre todo en las bolsas periodontales, donde el ambiente favorece su proliferación.

Es por eso por lo que estudiar el efecto del fluconazol (uno de los antifúngicos de uso más extendido) es sumamente importante para comprender los mecanismos moleculares que se involucran en la resistencia a este antifúngico, lo cual permite identificar las proteínas y elementos implicados en la persistencia de la infección.

1.4.4 Factibilidad

El proyecto es de carácter factible debido a que el ámbito de recolección de las cepas de *Candida* a analizar fueron aisladas de pacientes con enfermedad periodontal en una clínica local (27). La investigación se llevó en el Laboratorio de Química y Proteínas F-401, la secuenciación del modelo se realizó con el acompañamiento del Dr. Gustavo Obando y la colaboración del Dr. Luis Alberto Ponce Soto, especialista en proteómica, en la Universidad Católica de Santa María. El análisis bioinformático correspondiente fue efectuado en el Laboratorio de Química y Proteínas de dicha casa de estudios, utilizando como

herramienta de referencia la base de datos Mascot para la identificación de proteínas.

1.4.5 Interés Personal

Mi interés es conocer mucho más alrededor del tema y ser participe en relación con la investigación en torno a la resistencia de *Candida albicans* al fluconazol y sus circunstancias de supervivencia que podría ayudar a combatir infecciones orales y prevenir complicaciones en un futuro, y además profundizar en los mecanismos moleculares de la *Candida albicans*. Todo esto está relacionado a mi interés del conocimiento, investigación y además para obtener mi título profesional de cirujano dentista.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Identificar la expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas periodontales.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar el nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* sin tratamiento en aislados de bolsas periodontales de los días de control (1,7 y 14), a través de electroforesis bidimensional 2D y espectrometría de masas ESI-qTOF MS/MS.
- Identificar el nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas periodontales de los días de control (1,7 y 14), a través de electroforesis bidimensional 2D y espectrometría de masas ESI-qTOF MS/MS.
- Analizar el nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas a los días de control (1, 7 y 14) que no se encontraron en la muestra sin tratamiento.

3. MARCO CONCEPTUAL

3.1 Conceptos Básicos

3.1.1 Bolsas periodontales

Las enfermedades de ámbito periodontal (gingivitis y periodontitis), son infecciones orales que se producen en mayor frecuencia en la población hoy en día, estas enfermedades afectan las estructuras que soportan todos los dientes. Las enfermedades periodontales, empiezan en su mayoría con gingivitis, que se llega a definir como inflamación de las encías, cambio de color en la encía y usualmente sangrado acompañado de dolor en estas, ocasionado generalmente por la acumulación de bacterias en la cavidad oral. Si esta enfermedad progresa, se produce la periodontitis, que también es un tipo de infección que también produce dolor, sangrado, inflamación, cambio de coloración, pero en un estado mucho más grave que la gingivitis, llegando a poder perder dientes, tejido óseo, entre otras (8).

Cuando se produce la periodontitis y no se trata, por lo general aparecen las bolsas periodontales, que son espacios entre el diente y la encía, los cuales van creciendo por la falta de tratamientos, estas bolsas son provocados por la gran cantidad de bacterias que hay en estas zonas de la cavidad oral eliminando casi por completo los tejidos que sostienen los dientes. Estas bolsas periodontales, se encuentran distintos tipos de organismos como lo puede ser el *Candida albicans* o el *Streptococcus mutans*, que estas son algunos de los que provocan gran cantidad de las lesiones de la cavidad oral (8).

A nivel mundial, las enfermedades periodontales van en aumento por la gran cantidad de desinformación que existe sobre el cuidado de la cavidad oral hoy en día, aumentando la cantidad de personas que padecen estas enfermedades y como consecuencia perdiendo distintas funciones orales, como el habla, la masticación, entre otras (8).

Las bolsas periodontales son una de las principales muestras de que un paciente tiene periodontitis, con una mayor tasa de índice en pacientes mayores; las bolsas periodontales suelen ser un entorno ideal para el crecimiento de biopelículas

bacterianas, las cuales contribuyen a la presencia de una gran variedad de microorganismos en la encía. (9).

3.1.2 Candidiasis Oral

La candidiasis oral es un tipo de infección que se da en la cavidad oral, específicamente en la mucosa oral, esta infección es causada por hongos de tipo *Candida* sobre todo el tipo de hongo *Candida albicans* (10).

La *Candida* usualmente se presenta a causa de una inmunosupresión, como lo pueden ser enfermedades como el sida, o incluso el uso de corticoides que aumentan la susceptibilidad de la candidiasis, ya que, al bajar las defensas, las posibilidades del incremento de hongos en la cavidad aumentan, como por ejemplo con el uso de inhaladores (11).

Por lo general, el diagnóstico de esta infección por hongos es forma clínica; el tratamiento en la mayoría de los casos se da con antifúngicos, pero cuando este no se da de forma efectiva se opta por hacer cultivos e investigar el problema a fondo (11).

Clínicamente se llega a ver la candidiasis oral como una especie de manchas blancas y zonas de mucosa enrojecidas, por lo general este tipo de afecciones no son dolorosas, pero cuando lo son, el paciente por lo general siente ardor en las zonas afectadas o incluso sangrado, estas pueden aparecer en lengua y en la mayoría de las zonas orales como lo pueden ser el paladar, encías, entre otras (11).

3.1.3 *Candida albicans*

Candida albicans es un hongo levaduriforme que usualmente se encuentra en la mucosa oral, aunque también puede estar presente en otras partes del cuerpo (12).

La colonización oral por *Candida albicans* ocurre principalmente en pacientes inmunodeprimidos, lo que puede dar lugar a la candidiasis oral. Este hongo es el principal agente causante de la candidiasis, debido a su capacidad para formar hifas y biopelículas, lo que contribuye a su persistencia (13).

3.1.4 Periodontitis

La periodontitis es una patología que afecta las encías, derivada de una gingivitis no tratada, la cual es una inflamación de las encías causada por un exceso de placa bacteriana debido a diversos factores, como la mala higiene oral. La periodontitis causa daños severos en los tejidos que rodean los dientes, y si no se trata adecuadamente, puede llevar a la pérdida ósea y de los tejidos que mantienen los dientes, lo que resulta en pérdida dental, sangrado, inflamación, sensibilidad, entre otros síntomas (14).

3.1.5 Fluconazol

El fluconazol es un medicamento de índole antifúngica, que se utiliza para combatir e incluso prevenir infecciones ocasionadas por hongos, sus cualidades hacen que este medicamento sea usado en el tratamiento por infección de *Candida albicans* (15).

3.1.4 Relación de la *Candida albicans* con periodontitis

Entre las distintas especies que existen de *Candida*, la *Candida albicans* es el tipo de levadura más común en la cavidad oral que tiene una relación directa con las condiciones tanto favorables como desfavorables bajo distintas disposiciones; la periodontitis es un tipo de enfermedad oral con un gran alcance alrededor del mundo con un origen complejo, con factores como el desequilibrio de la microbiota oral y la respuesta que tiene el sistema inmunitario hacia esta enfermedad, pueden ser importantes para que se facilite la periodontitis, lo cual involucra inflamación, pérdida ósea, bolsas periodontales, entre otras (16).

En los recientes años se han realizado diversos análisis de las posibles relaciones que tienen las levaduras como *Candida albicans*, en el proceso de la formación de la periodontitis, ya que mientras más avanzada este la enfermedad, pueden darse la formación de bolsas periodontales, que son un gran almacén de microorganismos como lo puede ser el *Candida albicans* (16).

3.1.5 Relación de *Candida albicans* con el microbioma bacteriano oral en la salud y la enfermedad

La *Candida albicans* es un tipo de hongo de la cavidad oral muy común, puesto que puede llegar a ser inofensivo, los distintos factores del microbiota oral ayudan a que este llegue a un sobrecrecimiento y causar distintas afecciones (17).

Este hongo se le considera un hongo oportunista, ya que puede colonizar distintas zonas de la mucosa como la gastrointestinal o la orofaríngea. Los pacientes que sean inmunocomprometidos tienen mayor susceptibilidad a tener candidiasis debido al sobrecrecimiento de este hongo (17).

3.1.6 Tolerancia al Fluconazol

Los distintos tipos de *Candida* han ido desarrollando con el tiempo una resistencia inherente o adquirida a una gran cantidad de medicamentos de carácter antifúngico (18).

El fluconazol es un medicamento antifúngico, que se usa ampliamente para tratar distintas infecciones como lo pueden ser la candidiasis o la candidemia, debido a su tasa de éxito, más aún con la especie de *Candida albicans*, sin embargo la tolerancia de esta al fluconazol, es importante ya que podría complicar la respuesta de este medicamento contra la infección, como por ejemplo con la candidemia, que tiene una alto índice de mortalidad, que es provocada por la *Candida*; incluso la proliferación de esta dentro de un entorno relacionado al fluconazol de algunas de las distintas especies provoca la rapidez de la resistencia al fluconazol (19).

3.1.7 Proteínas de superficie

La relación que existe entre la aceptación o adhesión de célula a célula es uno de los motivos por lo que regulan las relaciones entre *Candida albicans* y las distintas bacterias del microbiota oral, esto apoyando a la proliferación de ambas (20).

Dentro de las estructuras de los hongos como la *Candida*, la zona de las paredes celulares está dispuestas de distintos polisacáridos (20).

Este hongo contiene múltiples proteínas de adhesión y receptores en su pared celular. La *Candida albicans* establece interacciones físicas con microorganismos orales mediante estos componentes, lo que permite la formación de una estructura definida (20).

3.2 Antecedentes investigativos

3.2.1 Antecedentes Internacionales

- **Título:** Marcada virulencia y resistencia a los azoles en *Candida albicans* aislada de pacientes con enfermedad periodontal.

Autores: Eric Monroy-Pérez, Rosa María Rodríguez-Bedolla, Javier Garzón, Felipe Vaca Paniagua, Ernesto Arturo Rojas Jiménez, Gloria Luz Paniagua-Contreras

Resumen: *Candida albicans* es un hongo oportunista frecuentemente asociado con enfermedades periodontales. El objetivo de este estudio fue determinar los patrones de expresión de genes de virulencia asociados con aquellos de resistencia a azoles entre las cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes con enfermedad periodontal. Aislamos 80 cepas de *Candida albicans* de pacientes con enfermedad periodontal reclutados de dos clínicas dentales y sus susceptibilidades antifúngicas se evaluaron utilizando el método de difusión en disco. *Candida albicans* y sus genes de virulencia se identificaron mediante PCR. Las expresiones de los genes de virulencia de *Candida albicans* se analizaron mediante PCR en tiempo real post infección in vitro de la línea celular A549. El fenotipo de resistencia contra azoles como ketoconazol y fluconazol se observó en todas las cepas analizadas (n = 80), lo que coincidió con la alta frecuencia de aparición de los genes CDR1 y MDR1 asociados con resistencia. Se encontró que las frecuencias de detección y expresión de los genes HWP1 (47/15), ALS1 (80/66), ALS3 (70/30), LIP1 (78/44), LIP4 (77/65), LIP5 (79/58), LIP6 (79/58), PLB1 (79/65) y PLB2 (80/66) eran más altas en las cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes con periodontitis moderada y se identificaron diferentes patrones de expresión asociados con aquellos para la resistencia a los azoles. Se pudo dilucidar que la alta expresión de marcadores de virulencia

asociados con la resistencia a los azoles en *Candida albicans* podría estar contribuyendo a la cronicidad de las infecciones periodontales (23).

Fuente: 10.1016/j.micpath.2020.104436

Link: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32781099/>

- **Título:** El transportador de casete de unión a ATP (ABC) Cdr2p de *Candida albicans* confiere resistencia a la caspofungina
- **Autores:** Manuela Schuetzer-Muehlbauer 1, Birgit Willinger , Gerd Krapf , Sabine Enzinger , Elisabeth Presterl , Karl Kuchler

Resumen: La resistencia a múltiples fármacos puede representar un serio problema para la terapia antifúngica. El Cdr2p de *Candida albicans* es uno de los dos transportadores del casete de unión a ATP (ABC) que median la resistencia a los antifúngicos in vivo mediante un mayor eflujo del fármaco. Las equinocandinas, como la caspofungina, representan la clase más reciente de antifúngicos que actúan sobre la síntesis de la pared celular. En este estudio, mediante ensayos de resistencia en placa de agar, demostramos que los aislados clínicos de *C. albicans* con resistencia cruzada presentan altas concentraciones inhibitorias mínimas (CMI) para caspofungina en comparación con una cepa de referencia ATCC sensible. El análisis Northern y la inmunotransferencia indican que estos aislados también muestran altos niveles de expresión de CDR1 y CDR2. Para determinar una posible contribución de Cdr1p o Cdr2p a la resistencia a caspofungina, hemos expresado funcionalmente Cdr1p y Cdr2p en cepas receptoras apropiadas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Las células de levadura que expresan Cdr1p o Cdr2p presentan resistencia cruzada a fármacos antifúngicos establecidos, como los azoles y la terbinafina. Sin embargo, Cdr2p y, en mucha menor medida, Cdr1p confieren hiperresistencia a caspofungina cuando se expresan en levadura. Asimismo, Cdr2p confiere resistencia a caspofungina cuando se sobreexpresa constitutivamente en una cepa de *C. albicans* sensible a fármacos. Por lo tanto, proponemos que Cdr2p podría contribuir a la resistencia clínica a la candida. Finalmente, nuestros datos sugieren que los fenotipos de resistencia cruzada de los aislados clínicos son

consecuencia de distintos mecanismos que pueden operar simultáneamente (24).

Fuente: 10.1046/j.1365-2958.2003.03430.x

Link: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12657057/>

Título: Roles of Hsp90 in *Candida albicans* morphogenesis and virulence

Autores: Nicole Robbins 1, Leah E Cowen

Resumen: Hsp90 is a conserved molecular chaperone that facilitates the folding and function of hundreds of client proteins, many of which serve as core hubs of signal transduction networks. Hsp90 has a critical role in virulence of the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*, which exists as a natural commensal of the human microbiota and is a leading cause of invasive fungal infections, particularly in immunocompromised individuals. The ability of *C. albicans* to cause disease is tightly coupled to its capacity to undergo a morphogenetic transition between yeast and filamentous forms. Here, we describe the complex mechanisms by which Hsp90 regulates *C. albicans* morphogenesis and virulence, and explore the potential of targeting fungal Hsp90 as a therapeutic strategy to combat fungal infections. (25).

Fuente: 10.1016/j.mib.2023.102351

Link: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37399670/>

- **Título:** Las mutaciones en el factor de transcripción Mrr2p contribuyen a la resistencia al fluconazol en aislamientos clínicos de *Candida albicans*

Autores: Ying Wang 1, Jin-Yan Liu 2, Ce Shi 1, Wen Jing Li 1, Yue Zhao 1, Lan Yan 3, Ming Jie Xiang 4

Resumen: Las proteínas del grupo zinc de *Candida albicans* son una familia de factores de transcripción (FT) que desempeñan un papel esencial en el desarrollo de la resistencia a los antifúngicos. Las mutaciones de ganancia de función en varios FT, como Tac1p, Mrr1p y Upc2p, se han documentado previamente en aislados clínicos de *C. albicans* resistentes a azoles. Mrr2p (regulador de resistencia a múltiples fármacos 2) es un nuevo FT que controla la expresión del gen transportador ABC CDR1 y media la resistencia al fluconazol. En este estudio, se investigó la relación entre las

mutaciones naturales en MRR2 y la resistencia al fluconazol en aislados clínicos de *C. albicans*. Entre un grupo de 20 *C. albicans* clínicas resistentes al fluconazol y 10 *C. albicans* sensibles al fluconazol, 12 aislados resistentes al fluconazol sobreexpresaron CDR1 al menos dos veces en comparación con los aislados sensibles al fluconazol. De estos 12 aislados resistentes, tres (C7, C9, C15) contenían 11 mutaciones de sentido erróneo idénticas, 6 de las cuales ocurrieron solo en los aislados resistentes a los azoles. La contribución de estas mutaciones a la sobreexpresión de CDR1 y, por lo tanto, a la resistencia al fluconazol se verificó aún más generando cepas recombinantes que contenían el gen MRR2 mutado. Los alelos MRR2 mutados del aislado C9 contribuyeron a un aumento de casi seis veces en la expresión de CDR1 y un aumento de ocho veces en la resistencia al fluconazol; las mutaciones de sentido erróneo S466L y T470N resultaron en un aumento de más del doble en la expresión de CDR1 y un aumento de cuatro veces en la resistencia al fluconazol. Por el contrario, las otras cuatro mutaciones de sentido erróneo confirieron solo aumentos de dos a cuatro veces en la resistencia al fluconazol, sin un aumento significativo en la expresión de CDR1. Estos hallazgos proporcionan alguna información sobre el mecanismo por el cual MRR2 regula la resistencia a múltiples fármacos de *C. albicans*. (26).

Fuente: 10.1016/j.ijantimicag.2015.08.001

Link: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26404130/>

- **Título:** Objetivos de *Candida albicans* que potencialmente actúan en sinergia con el fluconazol

Autores: Hui Lu, Manjari Shrivastava, Malcolm Whiteway, Yuanying Jiang

Resumen: El fluconazol tiene características que lo hacen ampliamente utilizado en el tratamiento clínico de las infecciones por *C. albicans*. Sin embargo, el fluconazol solo tiene una actividad fungistática en *C. albicans*, por lo tanto, en el tratamiento a largo plazo de la infección por *C. albicans* con fluconazol, *C. albicans* tiene el potencial de adquirir resistencia al fluconazol. Un enfoque prometedor para aumentar la eficacia del fluconazol es identificar posibles dianas de fármacos que puedan potenciar el efecto antifúngico del fluconazol, o incluso hacer que el fármaco sea fungicida. En

esta revisión, proporcionamos sistemáticamente una visión general global de las posibles dianas de los fármacos sinérgicos con fluconazol en *C. albicans*, identificamos nuevas vías para la investigación sobre la potenciación del fluconazol y destacamos la promesa de las estrategias combinatorias con fluconazol para combatir las infecciones por *C. albicans* (36).

Fuente: 10.1080/1040841X.2021.1884641

Link: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33587857/>

- **Título:** Modelado matemático de la resistencia al fluconazol en la vía del ergosterol de *Candida albicans*

Autores: Paul K. Yu, Llewelyn S Moron-Espiritu, Angelyn R Lao

Resumen:

Se informa que la candidiasis es la infección micótica más común en el ámbito de los cuidados críticos. El agente causal de esta infección es un patógeno comensal perteneciente al género *Candida*, cuya especie más común es *Candida albicans*. La vía del ergosterol en la levadura es un objetivo común de muchos agentes antimicóticos, ya que el ergosterol es un componente esencial de la membrana celular. El agente antimicótico de elección actual para el tratamiento de la candidiasis es el fluconazol, que se clasifica dentro de los antimicóticos azólicos. En los últimos años, el aumento significativo de *C. albicans* resistente al fluconazol en muestras clínicas ha revelado la necesidad de buscar otros posibles objetivos farmacológicos. En este estudio, construimos un modelo matemático de la vía del ergosterol de *C. albicans* utilizando ecuaciones diferenciales ordinarias con cinética de acción de masas. A partir de las simulaciones del modelo, encontramos los siguientes resultados: (i) una inhibición parcial de la enzima esterol-metiltransferasa produce una cantidad considerable de resistencia al fluconazol; (ii) la sobreexpresión del gen *ERG6*, que conduce a un aumento de la enzima esterol-metiltransferasa, es un buen objetivo de los antifúngicos como complemento del fluconazol; (iii) una inhibición parcial del lanosterol produce una cantidad considerable de resistencia al fluconazol; (iv) la enzima C5-desaturasa no es un buen objetivo de los antifúngicos como complemento del fluconazol; (v) se confirma que la

enzima C14 α -desmetilasa es un buen objetivo del fluconazol; y (vi) se confirma el efecto dependiente de la dosis del fluconazol. Este estudio espera ayudar a los experimentadores a limitar los posibles objetivos farmacológicos antes de realizar experimentos costosos y que requieren mucho tiempo, y servir como una herramienta de validación cruzada para los datos experimentales. **IMPORTANCIA** Se informa que la candidiasis es la infección fúngica más común en el entorno de cuidados críticos y es causada por un patógeno comensal que pertenece al género *Candida*, cuya especie más común es *Candida albicans*. El agente antifúngico de elección actual para el tratamiento de la candidiasis es el fluconazol, que se clasifica dentro de los antifúngicos azólicos. En los últimos años, se ha observado un aumento significativo de *C. albicans* resistentes al fluconazol, lo que ha puesto de manifiesto la necesidad de buscar otras posibles dianas farmacológicas. Construimos un modelo matemático de la vía del ergosterol en *C. albicans* mediante ecuaciones diferenciales ordinarias con cinética de acción de masas. En nuestras simulaciones, observamos que al aumentar la cantidad de la enzima esterol-metiltransferasa, *C. albicans* se vuelve más susceptible al fluconazol. Este estudio espera ayudar a los investigadores a delimitar las posibles dianas farmacológicas antes de realizar experimentos costosos y laboriosos, y servir como herramienta de validación cruzada para los datos experimentales. (37).

Fuente: 10.1128/msystems.00691-22

Link: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36383015/>

3.2.2 Antecedentes Nacionales

No se registra antecedente alguno

3.2.3 Antecedentes Locales

- **Título:** Influencia de la aerobiosis facultativa en la producción de biofilm, viabilidad y morfología de *Candida Albicans* en la Universidad Católica de Santa María (UCSM) - Arequipa 2024.
- **Resumen:** En la literatura se ha descrito la presencia de *Candida albicans* (*C. albicans*) en bolsas periodontales profundas lo que nos llevó a pensar que

la *C.albicans* puede crecer y desarrollarse en condiciones de aerobiosis facultativa. El presente trabajo de investigación tiene como objetivo evaluar la influencia de la aerobiosis facultativa en la producción de biofilm, en la viabilidad y en la morfología de *Candida albicans*. Se trabajó con una cepa de *C. albicans* ATCC y cuatro cepas aisladas de bolsas periodontales profundas, las cuales fueron distinguidas usando CHROMagar. Acto seguido se colocaron en caldo Saburaud y se llevó a una incubadora a 37°C por 72 horas en condiciones de aerobiosis facultativa. Después de este tiempo, se midió la producción de biofilm por peso seco, su viabilidad por unidades formadoras de colonia y se observó en microscopio su morfología. Finalmente los datos se procesaron utilizando ANOVA de una vía con la prueba estadística Tukey y el valor de $P < 0.0001$ se consideró estadísticamente significativo. Los resultados demostraron como influye la aerobiosis facultativa en las cepas de *C.albicans* aisladas de bolsas periodontales, debido a que en estas condiciones se logró un mayor crecimiento de Unidades Formadoras de Colonia en las cuatro cepas aisladas de bolsas periodontales (BP1, BP2, BP3 y BP4) respecto a la cepa de *C.albicans* ATCC, que presentó un menor crecimiento de UFC. Así mismo los resultados muestran que la aerobiosis facultativa influye en la producción de biofilm, de manera que, se mostró mayor peso seco de biofilm en la BP1, BP2 Y BP3 respecto a la ATCC y a la BP4. A nivel de microscopia, los resultados obtenidos fueron que en su morfología la mayoría tuvo predominación de hifas más que levaduras. Podemos inferir, considerando los resultados de estos 3 factores, que las cepas de *C. albicans* aisladas de bolsas periodontales tienen un mayor factor de virulencia en estas condiciones de aerobiosis facultativa Finalmente podemos concluir, teniendo en cuenta todos los aspectos analizados en la presente investigación, que, si existe una influencia de la aerobiosis facultativa en la producción de biofilm, en su virulencia y en la morfología de *C.albicans* (27).

Autor: Pampa Chuquicaña, Milagros

Link: <https://repositorio.ucsm.edu.pe/items/03189061-d004-412e-87b8-5703c7a3c519>

4. HIPOTESIS

Ho - La expresión de proteínas del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* no está relacionada significativamente con su resistencia al fluconazol en bolsas periodontales.

H1- La expresión de proteínas del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* está relacionada significativamente con su resistencia al fluconazol en bolsas periodontales.





CAPÍTULO II

PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

1. TÉCNICAS, INSTRUMENTOS Y MATERIALES DE VERIFICACIÓN

1.1 Técnicas

En esta investigación se analizó el nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* en aislados de bolsas periodontales del trabajo de investigación “Influencia de la aerobiosis facultativa en la producción de biofilm, viabilidad y morfología de *Candida Albicans* en la Universidad Católica de Santa María (UCSM) - Arequipa 2024.” (27), teniendo como controles los días 1, 7 y 14 tanto en presencia como en ausencia fluconazol. Se aplicó un enfoque de tipo observacional y de medición mediante electroforesis bidimensional (2-DE o 2D-PAGE), complementado con el análisis de homología de secuencias proteicas utilizando espectrometría de masas.

Este estudio se realizó de la siguiente forma:

Microbiológica: Cepas de *C. albicans* aisladas previamente de bolsas periodontales y conservadas a -70°C, fueron reactivadas usando caldo Sabouraud a 37°C por 48 horas. Seguidamente, estas cepas fueron nuevamente replicadas por 24 horas a 37°C en condiciones de aerobiosis. Las cepas en cuestión fueron cultivadas con y sin la presencia de fluconazol a una concentración de 150 mg en un tiempo de observación de 24 horas, 7 días y 14 días, siendo que se les agregaba 1 mL de caldo Sabouraud cada 48 horas. El sobrenadante de dicho cultivo fue aislado para su posterior procesamiento proteómico.

Proteómica: Protocolo de tratamiento de muestras de electroforesis bidimensional para análisis de secuencia vía espectrometría de MASAS ESI-Q-TOF-MS/MS y para el análisis por espectrometría de masas ESI-Q-TOFMS/MS (**Anexo 5, 9**).

Cabe aclarar que en esta investigación no se basó en el control del crecimiento del microorganismo (fase latencia, exponencial y estacionaria) sino en su participación a través del tiempo en la formación del biofilm.

Cuadro de Técnicas e Instrumentos		
Variables	Técnica	Instrumento
Nivel de expresión proteómico del sobrenadante de <i>Candida albicans</i> en aislados de bolsas periodontales del trabajo de investigación “Influencia de la aerobiosis facultativa en la producción de biofilm, viabilidad y morfología de <i>Candida Albicans</i> en la Universidad Católica de Santa María (UCSM) - Arequipa 2024.” (27), en presencia y en ausencia de fluconazol, teniendo como controles a los 1, 7 y 14 días.	Observación y Medición.	1. Electroforesis bidimensional (2-DE o 2D-PAGE). 2. Análisis de secuencias de proteínas por espectrometría de masas (ESI-QTOF).

1.1.1 Electroforesis bidimensional (2-DE/2D-PAGE)

La técnica de electroforesis bidimensional permite la separación de proteínas en dos dimensiones independientes, facilitando su análisis detallado. Combinada con herramientas propias de la proteómica, esta metodología posibilita la visualización y estudio de las proteínas en geles 2D-PAGE, lo cual proporciona información valiosa sobre su expresión y características moleculares (21).

1.1.2 Espectrometría de masas (ESI-QTOF)

Este es un tipo de proceso por el cual se brinda datos tanto cualitativos como cuantitativos, en relación con el estudio molecular seguido de su transformación en iones (22).

Las moléculas que sean objeto de estudio son las que se colocan antes que las demás en la fuente de ionización de este equipo, donde el proceso de ionización arroja una carga positiva o negativa. Seguido a esto, los iones se mueven por el analizador de masa y arriban a distintas zonas del detector esto en cuanto a su interacción de masa y carga (m/z) (22).

Seguido a que los iones se toquen contra el detector, este provoca marcas que son guardadas por un software. El programa enseña estas señales mediante

gráficos en forma de espectros de masas, donde se puede visualizar la intensidad relativa de cada señal en relación con su proporción masa y carga (m/z). La espectrometría de masas o abreviado como EM, es un proceso usado con el objetivo de observar y secuenciar proteínas con la meta de obtener la homología de estas (22).

1.2 Instrumentos:

1.2.1 Instrumentos documentales

- Se requirió de una hoja de recopilación de datos. (**Anexo 4**)

1.2.2 Instrumentos mecánicos

- Muestra de sobrenadante de cultivo de *Candida albicans* en aislados de bolsas periodontales (Control día 1, 7 y 14).
- Implementos de protección – bioseguridad, como guantes, lentes de protección, mascarilla, bata, entre otras.
- Electroforesis bidimensional (2-DE o 2D-PAGE).
- Espectrometría de masas (ESI-QTOF).
- Vórtex
- Estufa
- Cámara eflujo
- Balanza
- Autoclave
- Mechero
- Placas de cultura celular de seis pozos
- Pinzas
- Caldo Sabouraud
- Fluconazol
- Tubos Falcon de 15 ml

1.3 Materiales de verificación

- Laptop.
- Instrumento para capturar imágenes.

- Almacenes digitales de información, como Pubmed, Science Direct, Scopus.
- Dna Star, Pymol, UniProtKB/Swiss-Prot y BLAST.
- Material de escritorio.

2. CAMPO DE VERIFICACIÓN

2.1 Ubicación Espacial

2.1.1 Ámbito General

La investigación se realizó en Arequipa, Perú.

2.1.2 Ámbito Específico

Laboratorio de Química de Proteínas, VRI de la Universidad Católica de Santa María.

2.2 Ubicación Temporal

Esta investigación se realizó entre el mes de marzo a abril del 2025.

2.3 Unidades de Estudio Alternativa de Manejo

a) Población cualitativa

- **Criterios de inclusión:**
 - Sobrenadante libre de contaminaciones.
 - Muestras libres de contaminaciones.
- **Criterios de exclusión:**
 - Penetración multimicrobiana en la colección.

b) Población/muestra

En la realizada investigación se estudió 1 muestra de sobrenadante de *Candida albicans* en aislados de bolsas periodontales en el 1er día, 7mo día y 14vo día como controles en presencia de fluconazol, y como grupo basal (control) sin presencia de fluconazol.

3. ESTRATEGIA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

3.1 Organización de la información

Antes de comenzar la investigación se requirió:

- Aprobación del coordinador principal del Laboratorio de Química y Proteínas de la UCSM. (**Anexo 2**).
- Solicitud para el uso del Laboratorio de Química y Proteínas de la UCSM (**Anexo 1**).
- Gestión con los supervisores del laboratorio correspondiente.
- Se requirió de verificación de la Autorización del Comité de Ética de investigación de la UCSM del trabajo previo de la obtención de las muestras (**Anexo 6**).

3.2 Recursos

- **Físicos:** Condiciones del espacio del Laboratorio de Química y Proteínas de la UCSM.
- **Humanos:** El equipo de investigación se compone de:
Estudiante: Nuñez Talavera, Gabriel Alejandro.
Asesor: Dr. Gustavo Alberto Obando Pereda.
- **Económicos:** Los fondos de carácter económico del mismo investigador.

3.3 Validación del instrumento y Pruebas piloto

Dadas las dimensiones tanto de la población como de la muestra seleccionada, no será factible llevar a cabo una prueba piloto.

4. ESTRATEGIA PARA MANEJAR LOS RESULTADOS

Llevado ya a cabo el análisis proteómico de las muestras.

4.1 Plan de procesamiento

4.1.1 Tipo de procesamiento

Se llevó a cabo un procesamiento digital con programas como Mascot y Pattern lab como bases de datos para el análisis de secuencias.

4.1.2 Operaciones del procesamiento

- **Clasificación:** Los datos obtenidos de los instrumentos usados en la investigación, fueron organizados en una matriz de sistematización.
- **Codificación:** Para el procesamiento digital computacional, se necesitó de utilizar de una hoja de tabulación Word.
- **Tabulación:** Se realizó tablas de doble entrada.
- **Conteo:** Se manejó con matrices de recuento.
- **Graficación:** Gráficos y tablas.

4.2 Plan de análisis de los datos

Variable Investigativa	Tipo de variable	Escala por escala de medición	Estadística Descriptiva (Medidas de tendencia central y de dispersión)	Estadística
Nivel de expresión proteómico del sobrenadante de <i>Candida albicans</i> en aislados de bolsas periodontales del trabajo de investigación “Influencia de la aerobiosis facultativa en la producción de biofilm, viabilidad y morfología de <i>Candida Albicans</i> en la Universidad Católica de Santa María (UCSM) - Arequipa 2024.” (27), en presencia y en ausencia de fluconazol, teniendo como controles a los 1, 7 y 14 días.	Cualitativo	De razón	Ninguna	Ninguna



CAPÍTULO III

RESULTADOS

1. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Electroforesis bidimensional (2D) realizada a muestras de *Candida albicans* sin tratamiento en aislados de bolsas periodontales del día 1, 7 y 14 del grupo control.

El gel bidimensional (2D) de electroforesis en poliacrilamida (SDS-PAGE) representó el perfil proteico obtenido en sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* sin tratamiento en aislados de bolsas periodontales. Las proteínas fueron separadas según su punto isoeléctrico y peso molecular, y posteriormente visualizadas mediante coloración con Coomassie Blue, utilizando para el análisis en el software PD Quest Basic versión 8.0.1 (Bio-Rad, CA, USA).

Durante el análisis de las muestras correspondientes a los días 1 y 7 del grupo control, no se logró detectar la presencia de señales proteicas (spots) en los mapas de referencia obtenidos mediante electroforesis bidimensional, lo cual sugiere una baja o nula expresión proteica detectable bajo las condiciones experimentales aplicadas. No obstante, en la evaluación correspondiente al día 14 de control, tras la superposición de los geles bidimensionales mediante el software especializado, se logró evidenciar una señal clara correspondiente a la presencia de 31 proteínas, representadas visualmente como spots numerados del 1 al 31. Estas proteínas fueron registradas y mapeadas dentro del patrón de referencia generado, aunque no se realizó la identificación específica de cada una de ellas. Esta decisión se debió a que dichas muestras formaban parte del grupo de control, y la caracterización individual de estas proteínas no fue establecida como un objetivo dentro del diseño experimental de la investigación.

Tabla 1

Referencia de spots en relación entre el pI y Mm para la identificación del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* sin tratamiento en aislados de bolsas periodontales (día 1).

<i>Spot MR</i>	<i>pI</i>	<i>Mm</i>	<i>Spot MR</i>	<i>pI</i>	<i>Mm</i>
0	5.0	0	0	0	97
0	6.0	0	0	0	66
0	7.0	0	0	0	45
0	8.0	0	0	0	30
0	9.0	0	0	0	20
			0	0	14

Se dispone de la representación del punto isoeléctrico y de la masa molecular del primer día de control de los spots, no se encontró respuesta en ambas partes debido a la ausencia de spots dentro de la muestra de sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* sin tratamiento en aislados de bolsas periodontales con el objetivo la reacción proteica, no se evidencio la expresión de proteínas.

Figura 1

Electroforesis bidimensional (2D) del extracto proteico para la identificación del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* sin tratamiento en aislados de bolsas periodontales, donde no se evidencian spots en el padrón de referencia (día 1).

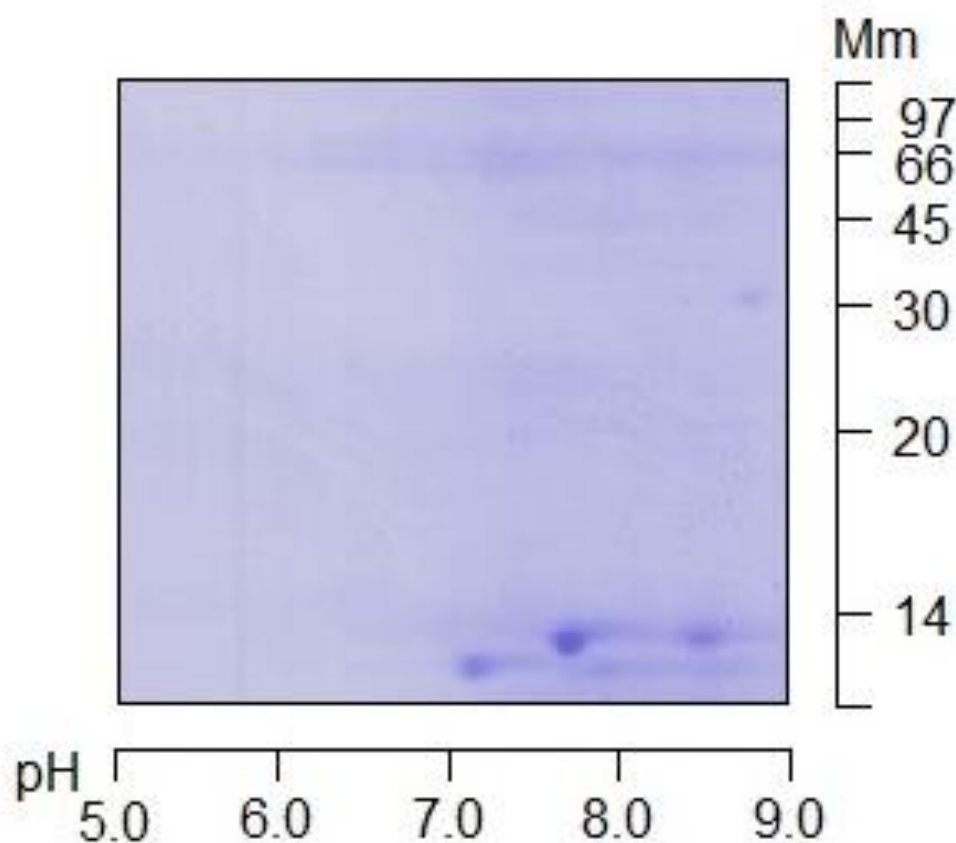


Figura 2

Representación tridimensional del gel de electroforesis bidimensional correspondiente al mapa de referencia proteico para la identificación del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* sin tratamiento en aislados de bolsas periodontales, generado mediante el software PD Quest Basic versión 8.0.1 (Bio-Rad, CA, USA) y teñido con Coomassie Blue. (día 1).

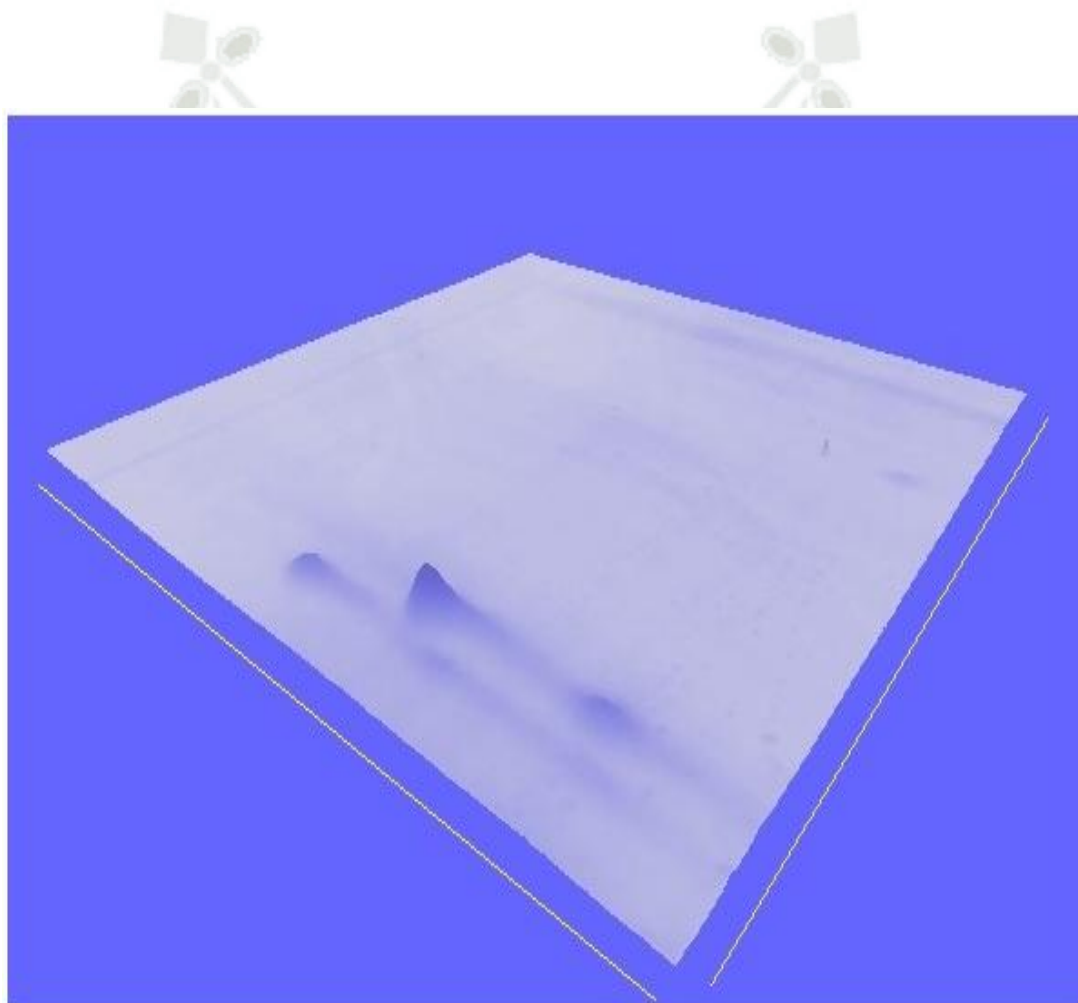


Tabla 2

Referencia de spots en relación entre el pI y Mm para la identificación del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* sin tratamiento en aislados de bolsas periodontales (día 7).

<i>Spot MR</i>	<i>pI</i>	<i>Mm</i>	<i>Spot MR</i>	<i>pI</i>	<i>Mm</i>
0	5.0	0	0	0	97
0	6.0	0	0	0	66
0	7.0	0	0	0	45
0	8.0	0	0	0	30
0	9.0	0	0	0	20
			0	0	14

Se dispone de la representación del punto isoeléctrico y de la masa molecular del séptimo día de control de los spots, no se encontró respuesta en ambas partes debido a la ausencia de spots dentro de la muestra de sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* sin tratamiento en aislados de bolsas periodontales con el objetivo de evidenciar su reacción proteica, no se evidencio la expresión de proteínas.

Figura 3

Electroforesis bidimensional (2D) del extracto proteico para la identificación del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* sin tratamiento en aislados de bolsas periodontales, donde no se evidencian spots en el padrón de referencia (día 7).

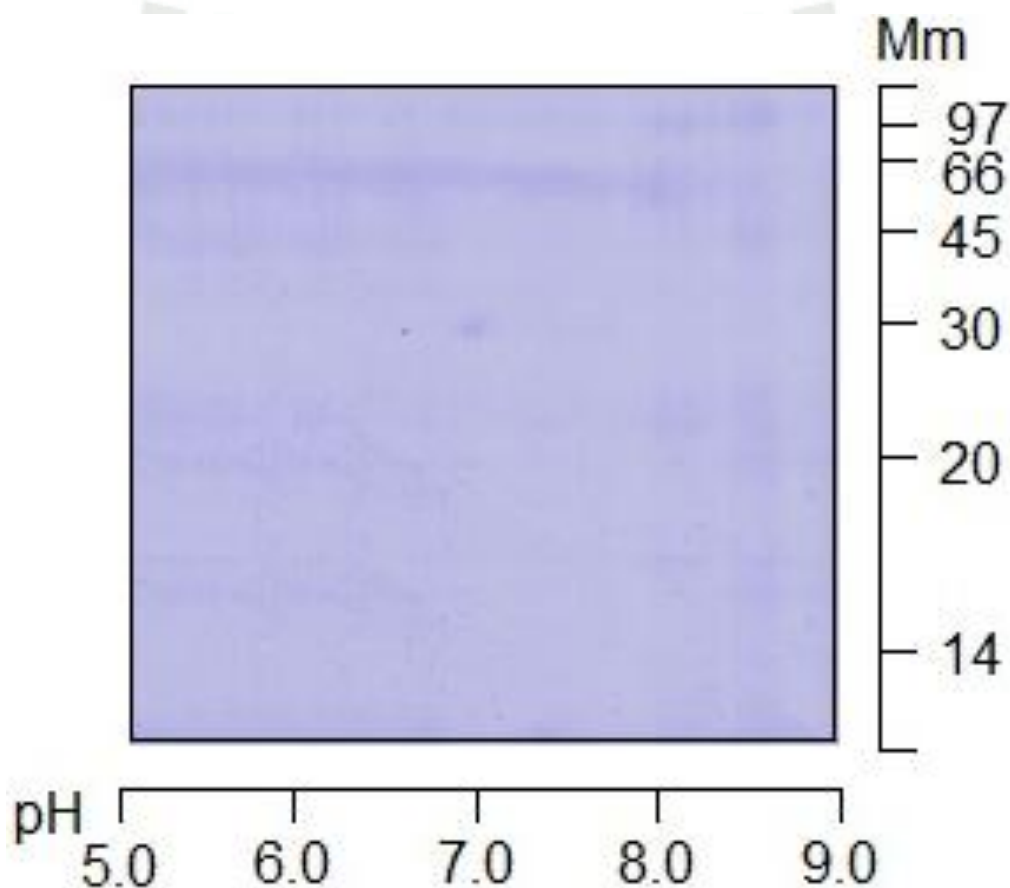


Figura 4

Representación tridimensional del gel de electroforesis bidimensional correspondiente al mapa de referencia proteico para la identificación del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* sin tratamiento en aislados de bolsas periodontales, generado mediante el software PD Quest Basic versión 8.0.1 (Bio-Rad, CA, USA) y teñido con Coomassie Blue. (día 7).

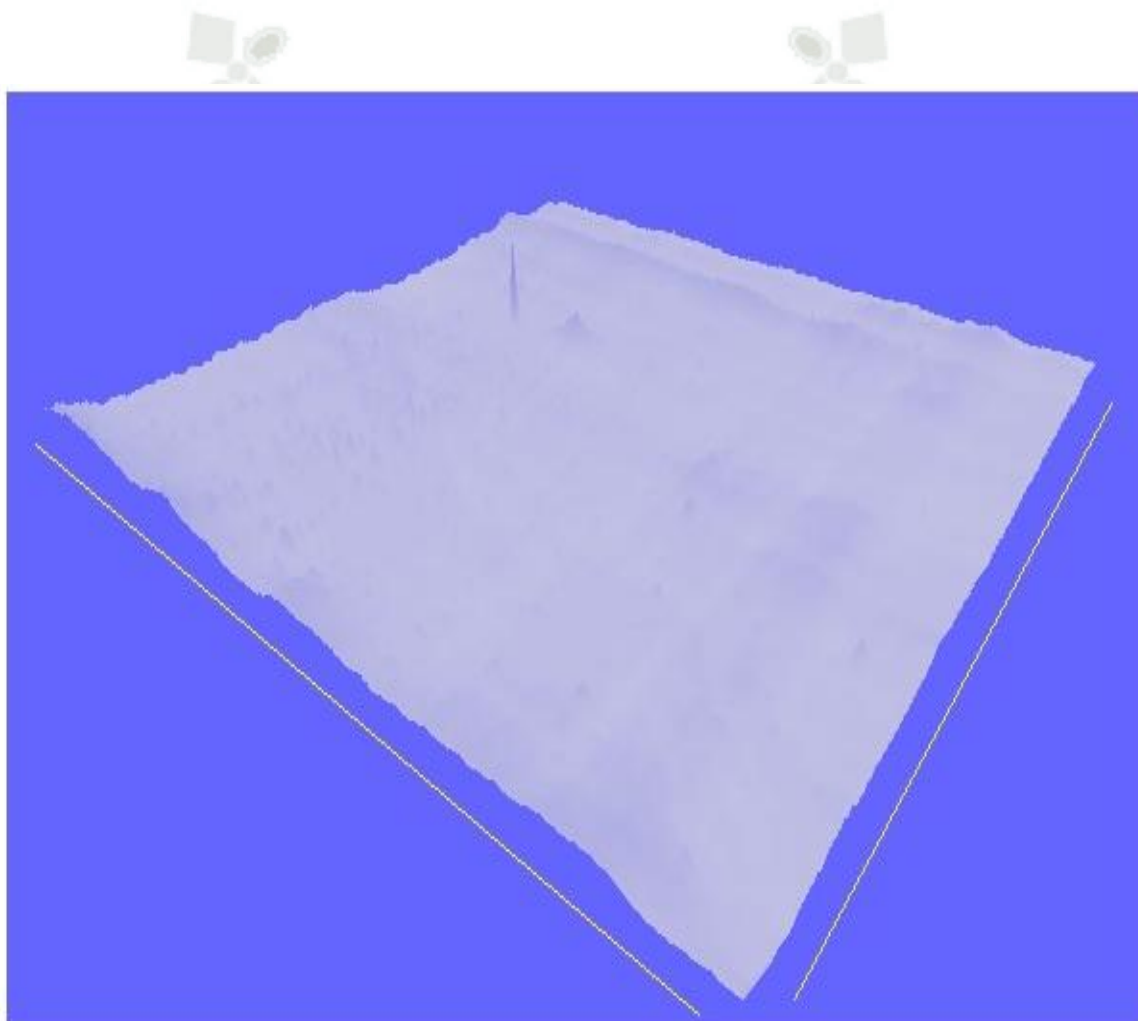


Tabla 3

Referencia de spots en relación entre el pI y Mm para la identificación del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* sin tratamiento en aislados de bolsas periodontales (día 14).

<i>Spot MR</i>	<i>pI</i>	<i>Mm</i>
1	5.8	110
2	5.7	111
3	5.8	67
4	5.7	58
5	5.9	97
6	5.9	97
7	5.9	48
8	5.5	45
9	5.1	37
10	5.3	29
11	6.2	38
12	6.4	43
13	7.1	46
14	7.5	28
15	7.6	35
16	7.8	33
17	8.3	36
18	7.6	45
19	6.8	58
20	6.3	98
21	7.1	112
22	7.3	113
23	7.2	97
24	7.4	99
25	7.6	75
26	7.4	68
27	7.8	66
28	8.1	69
29	8.4	67
30	8.7	114
31	8.6	46

Se dispone de la representación del punto isoelectrico y de la masa molecular del catorceavo día de control de los spots, evidenciando la expresión de 31 proteínas denominadas con números arábigos del número 1 al número 31 dentro de la muestra de sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* sin tratamiento en aislados de bolsas periodontales.

Figura 5

Electroforesis bidimensional (2D) del extracto proteico para la identificación del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* sin tratamiento en aislados de bolsas periodontales, donde se evidencian 31 spots visibles en el padrón de referencia resaltados de color amarillo (día 14).

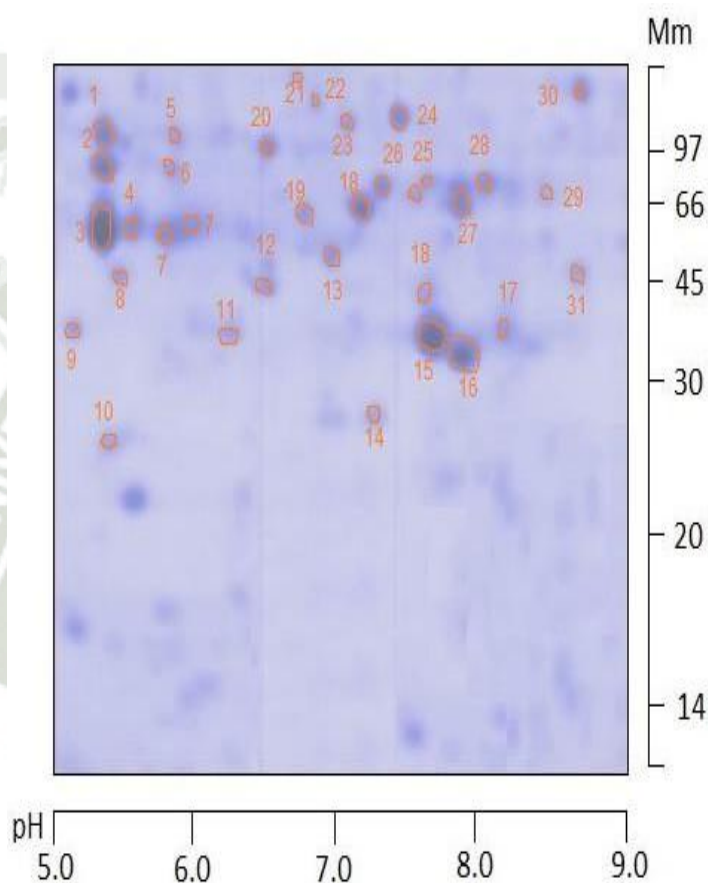
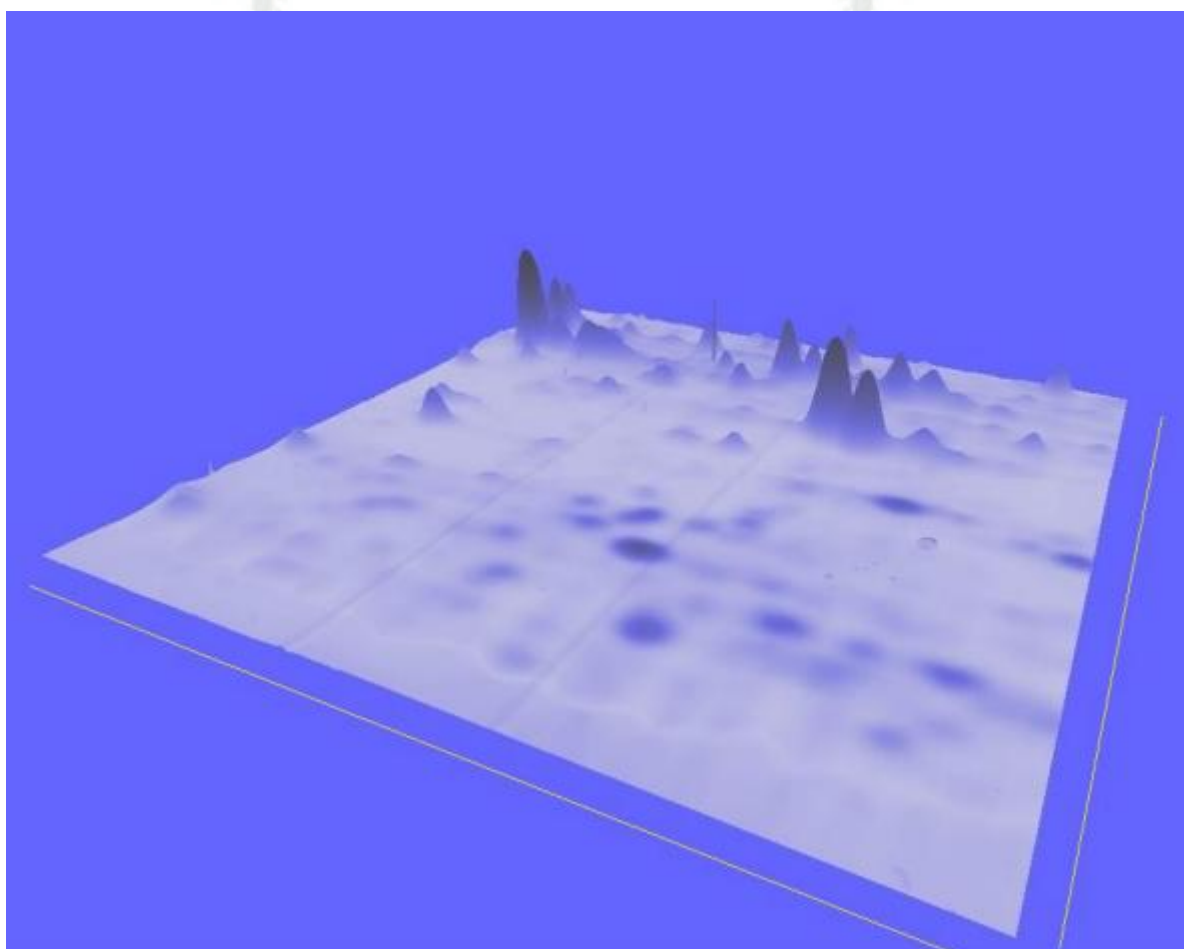


Figura 6

Representación tridimensional del gel de electroforesis bidimensional correspondiente al mapa de referencia proteico para la identificación del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* sin tratamiento en aislados de bolsas periodontales, generado mediante el software PD Quest Basic versión 8.0.1 (Bio-Rad, CA, USA) y teñido con Coomassie Blue (día 14).



Electroforesis bidimensional (2D) realizada a muestras de *Candida albicans* aisladas de bolsas periodontales en presencia de fluconazol del día 1, 7 y 14 del grupo control.

El gel bidimensional (2D) de electroforesis en poliacrilamida (SDS-PAGE) representó el perfil proteico obtenido en sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* sin tratamiento en aislados de bolsas periodontales. Las proteínas fueron separadas según su punto isoelectrico y peso

molecular, y posteriormente visualizadas mediante coloración con Coomassie Blue, utilizando para el análisis en el software PD Quest Basic versión 8.0.1 (Bio-Rad, CA, USA).

Durante el análisis de las muestras correspondientes a los días 1 y 7 del grupo control, no se logró detectar la presencia de señales proteicas (spots) en los mapas de referencia obtenidos mediante electroforesis bidimensional, lo cual sugiere una baja o nula expresión proteica detectable bajo las condiciones experimentales aplicadas. No obstante, en la evaluación correspondiente al día 14 de control, tras la superposición de los geles bidimensionales mediante el software especializado, se logró evidenciar una señal clara de la presencia visible de 7 proteínas, denominadas como Ca-1, Ca-2, Ca-3, Ca-4, Ca-5, Ca-6 y Ca-7 respectivamente.



Tabla 4

Referencia de spots en relación entre el pI y Mm para la identificación del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas periodontales (día 1).

<i>Spot MR</i>	<i>pI</i>	<i>Mm</i>	<i>Spot MR</i>	<i>pI</i>	<i>Mm</i>
0	5.0	0	0	0	97
0	6.0	0	0	0	66
0	7.0	0	0	0	45
0	8.0	0	0	0	30
0	9.0	0	0	0	20
			0	0	14

Se dispone de la representación del punto isoeléctrico y de la masa molecular del primer día de control de los spots, no se encontró respuesta en ambas partes debido a la ausencia de spots dentro de la muestra de sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas periodontales con el objetivo de evidenciar su reacción proteica, no se evidencio la expresión de proteínas.

Figura 7

Electroforesis bidimensional (2D) del extracto proteico para la identificación del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas periodontales, donde no se evidencian spots en el padrón de referencia (día 1).

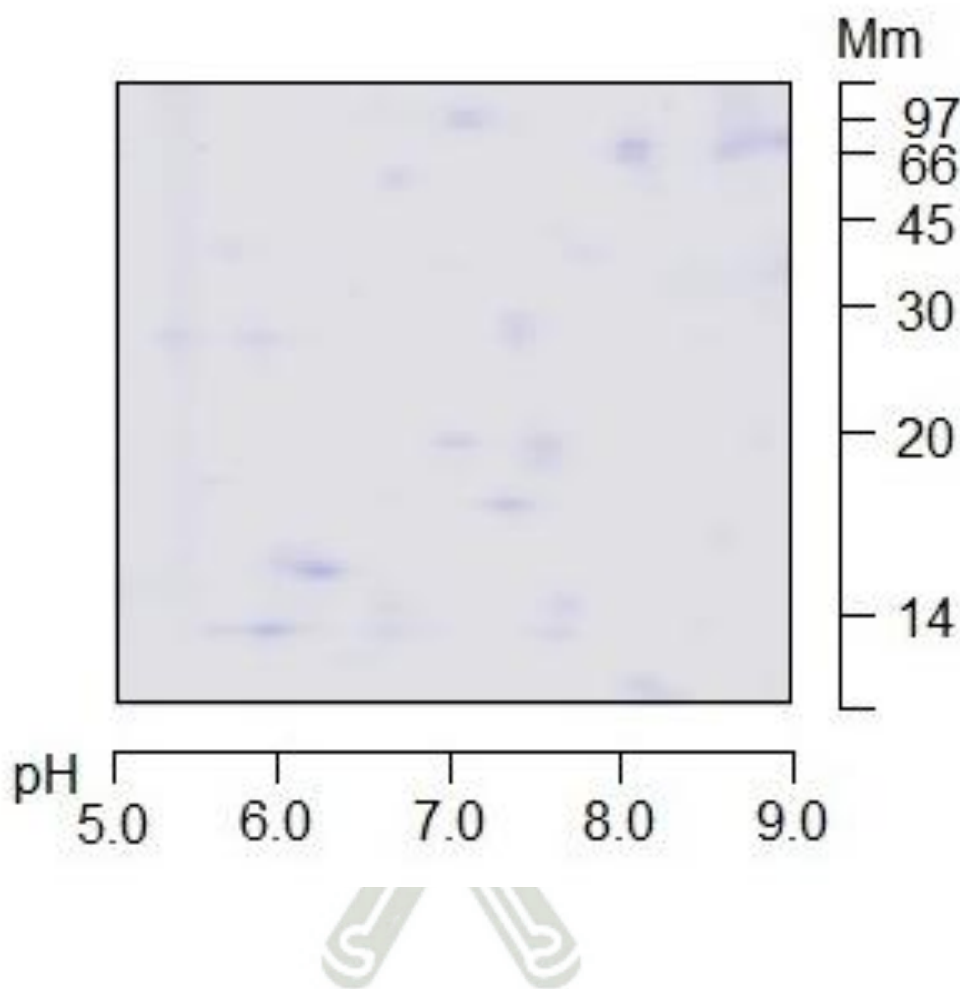


Figura 8

Representación tridimensional del gel de electroforesis bidimensional correspondiente al mapa de referencia proteico para la identificación del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas periodontales, generado mediante el software PD Quest Basic versión 8.0.1 (Bio-Rad, CA, USA) y teñido con Coomassie Blue (día 1).

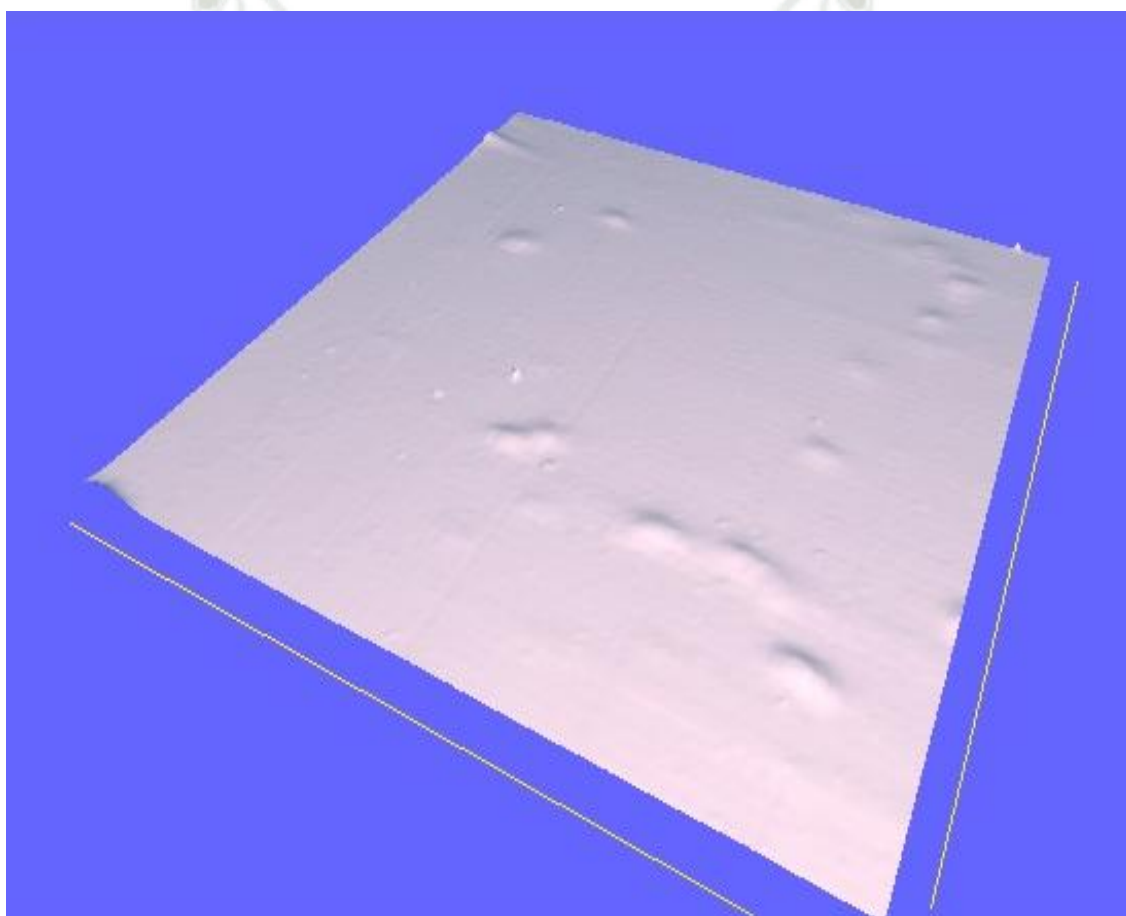


Tabla 5

Referencia de spots en relación entre el pI y Mm para la identificación del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas periodontales (día 7).

<i>Spot MR</i>	<i>pI</i>	<i>Mm</i>	<i>Spot MR</i>	<i>pI</i>	<i>Mm</i>
0	5.0	0	0	0	97
0	6.0	0	0	0	66
0	7.0	0	0	0	45
0	8.0	0	0	0	30
0	9.0	0	0	0	20
			0	0	14

Se dispone de la representación del punto isoeléctrico y de la masa molecular del séptimo día de control de los spots, no se encontró respuesta en ambas partes debido a la ausencia de spots dentro de la muestra de sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas periodontales con el objetivo de evidenciar su reacción proteica, no se evidencio la expresión de proteínas.

Figura 9

Electroforesis bidimensional (2D) del extracto proteico para la identificación del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas periodontales, donde no se evidencian spots en el padrón de referencia (día 7).

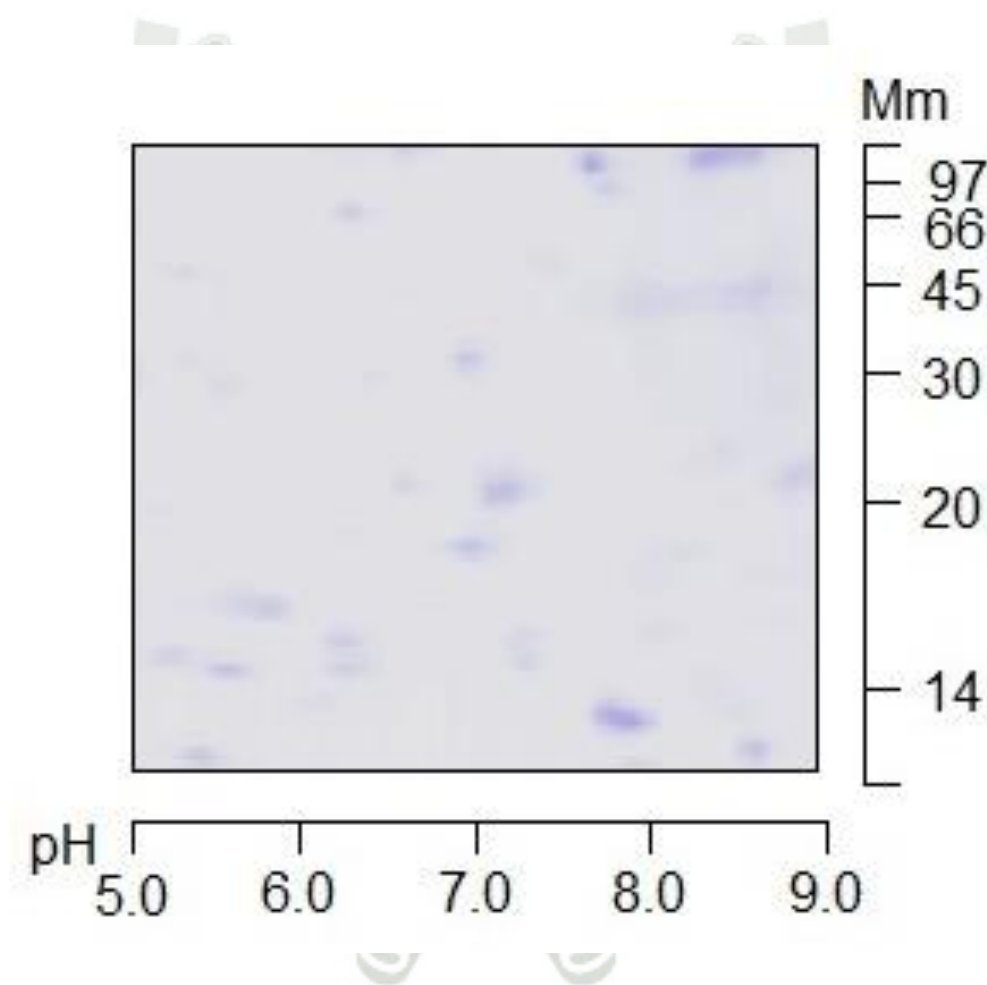


Figura 10

Representación tridimensional del gel de electroforesis bidimensional correspondiente al mapa de referencia proteico para la identificación del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas periodontales, generado mediante el software PD Quest Basic versión 8.0.1 (Bio-Rad, CA, USA) y teñido con Coomassie Blue (día 7).

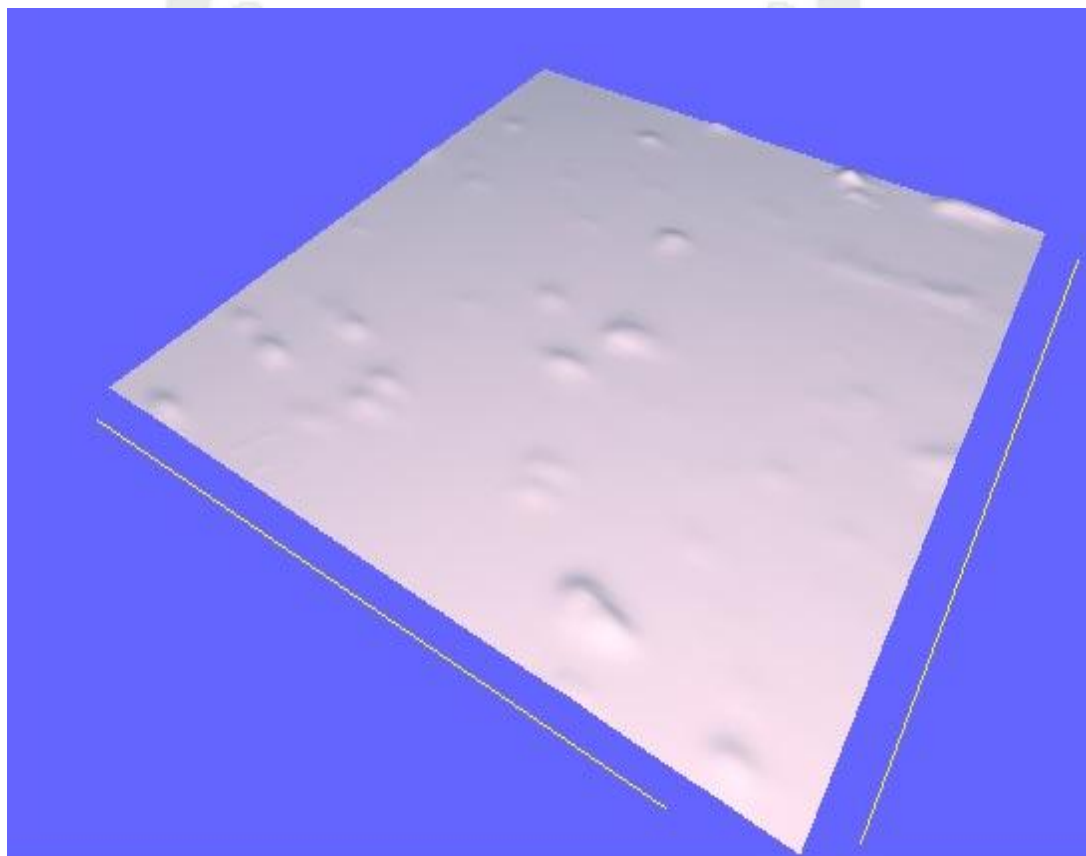


Tabla 6

Referencia de spots en relación entre el pI y Mm para la identificación del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas periodontales (día 14).

<i>Spot MR</i>	<i>pI</i>	<i>Mm</i>
Ca_1	5.4	25
Ca_2	7.3	28
Ca_3	8.3	26
Ca_4	7.2	18
Ca_5	7.2	13
Ca_6	7.3	15
Ca_7	8.2	12

Se dispone de la representación del punto isoeléctrico y de la masa molecular del catorceavo día de control de los spots, evidenciando la expresión de 7 proteínas identificadas como Ca-1 hasta Ca-7 dentro de la muestra de sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas periodontales.

Figura 11

Electroforesis bidimensional (2D) del extracto proteico para la identificación del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas periodontales, donde se evidencian 7 spots en el padrón de referencia que estuvieron en el rango de 5.0 a 9.0 de pI y masas en torno de 14 a 30kDa, resaltando estos spots de color rojo además de los que ya se encontraban sin tratamiento de color amarillo (día 14).

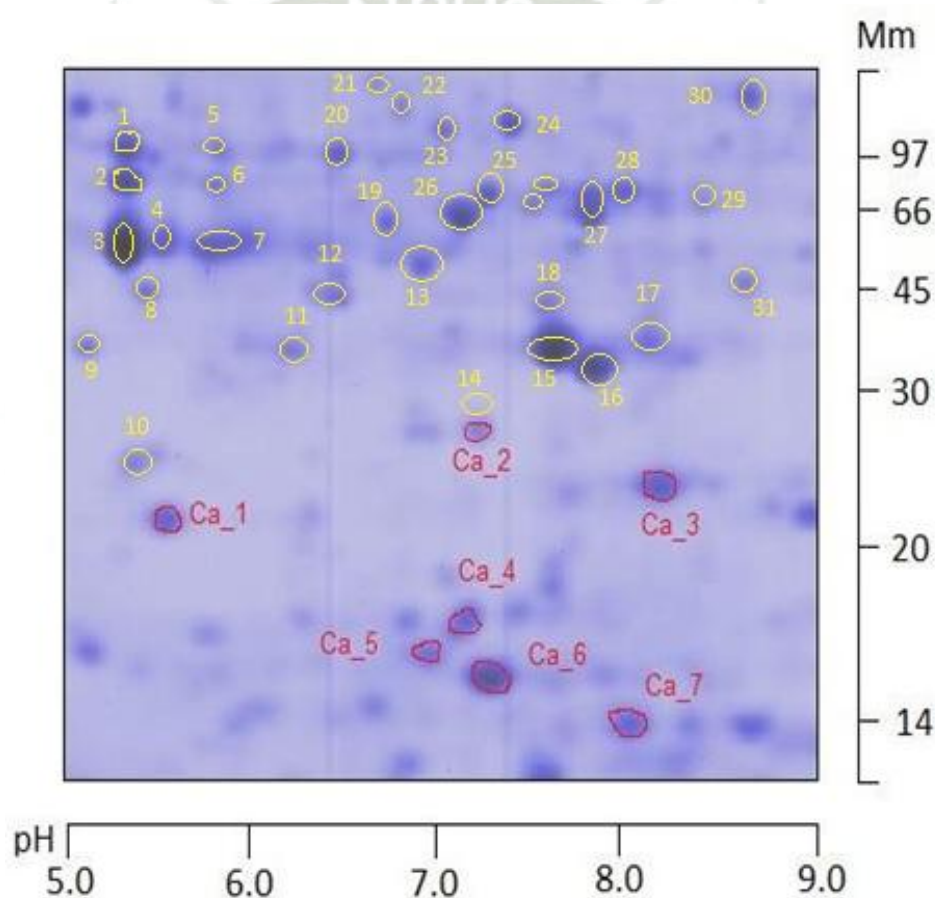


Figura 12

Representación tridimensional del gel de electroforesis bidimensional correspondiente al mapa de referencia proteico para la identificación del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas periodontales, generado mediante el software PD Quest Basic versión 8.0.1 (Bio-Rad, CA, USA) y teñido con Coomassie Blue (día 14).

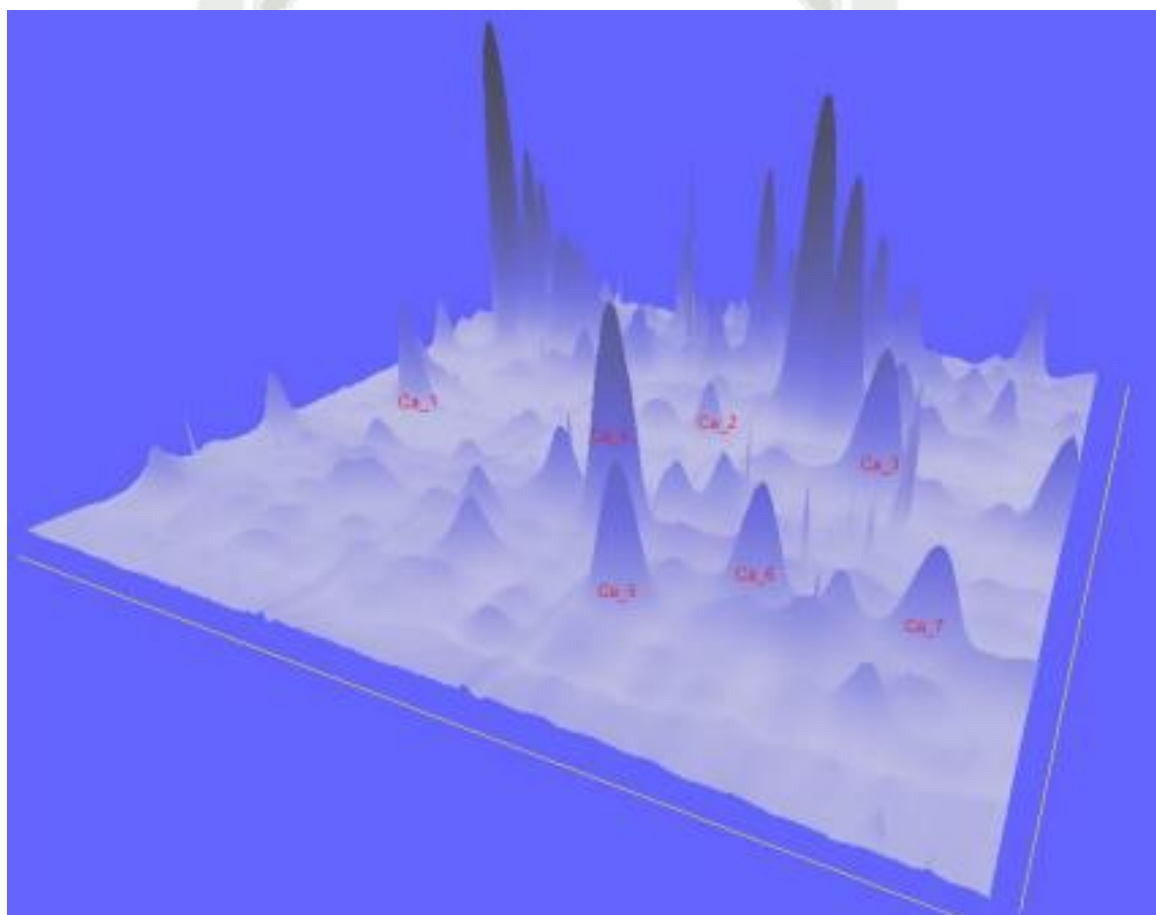


Tabla 7

Referencia de spots con el código de acceso de cada proteína seguida de su secuencia del péptido con sus respectivos pI y Mm para el análisis del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas a los días de control (1, 7 y 14) que no se encontraron en la muestra sin tratamiento.

N	Spot	Accession	Secuencia del Péptido	Mm	pI
1	Ca_1	P78595.2	... IKKEDRVILDHVDGWVKPGQITALMGASGA GKTTLLNCLSERVTTGIITDGERLVNGHALD ...	6484.43	6.32
2	Ca_2	P46598.1	...RAPFDAFESK KKKNNIKLYVRRVFITDDA EELIPEWLSFIK...	4955.74	9.26
3	Ca_3	Q59QC7.1	... PQPETLQSSIPATTSGSPGMSYPGCPSNSDPF GRSSDKSLPNISP NMSIPANPLSDPLTQGM R ...	6501.21	4.48
4	Ca_4	P10613.2	... KIREEILNYFVTDESFKLKEKTHGVANVMKT QPEITIFTASRSLFGDEMRRIFDRSFAQLYSDL DK...	7804.90	7.15
5	Ca_5	Q5A4G2.1	... ILNQFEIGIAEQYGTLS DCLKPKENLIHIFARN MPVKMYISLKSFLVSVYFHLFLYYEHK...	7154.45	8.17
6	Ca_6	A0A1D8PN96.1	... KLIDLYYEETSMINILVDES RVRSLFAAYN NFAEPIATKRRRFKLSELLMTSILLISLSCLT EDDFSEER...	8498.81	4.73
7	Ca_7	WCC72268.1	... KIFNHPRYLKNQMSLEIKRATTAIPVMVLLTI PFFLLELNGYSFLYLDINECTGGYKAILWQIP K...	7589.07	9.23

Detección de las señales proteicas tras su análisis mediante espectrometría de masas ESI-Q-TOF MS/MS y posterior procesamiento con el software DNA Star versión 6.0 para la identificación proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas periodontales.



Tabla 8

Referencia de spots con el código de acceso asociada al nombre de cada molécula con sus respectivos organismos a los cuales pertenece para el análisis del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas a los días de control (1, 7 y 14) que no se encontraron en la muestra sin tratamiento.

	<i>Spot</i>	<i>Molécula</i>	<i>Organismo</i>	<i>ACCESION</i>
1	Ca_1	Cdr2p	<i>Candida albicans</i> SC5314	P78595.2
2	Ca_2	Hsp90	<i>Candida albicans</i> SC5314	P46598.1
3	Ca_3	Upc2p	<i>Candida albicans</i> SC5314	Q59QC7.1
4	Ca_4	Sterol 14-demethylase	<i>Candida albicans</i> SC5314	P10613.2
5	Ca_5	Mrr1p	<i>Candida albicans</i> SC5314	Q5A4G2.1
6	Ca_6	Tac1p	<i>Candida albicans</i> SC5314	A0A1D8PN96.1
7	Ca_7	C5 6 desaturase, partial	<i>Candida albicans</i>	WCC72268.1

Representación de la relación del spot con la molécula y organismo al que pertenece, utilizando como referencia la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot para la identificación proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas periodontales.

1.1. Estudio de Homología Secuencial

Esta investigación dio como resultado distintas secuencias de 7 proteínas en las que se realizó un estudio de homología para identificar la familia de pertenencia, basado en encontrar las

funciones de estas proteínas para el análisis del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas a los días de control (1, 7 y 14) que no se encontraron en la muestra sin tratamiento.

Los estudios de homología de la secuencia del spot Ca_1 a Ca_7 mostraron una identidad del 100% cada uno, de acuerdo con la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot. El estudio de homología ayudo a identificar la familia a la cual el “spot” encontrado podría pertenecer y así determinar sus posibles funciones. Los resultados de esta identificación se remarcaron de color rojo en cada una de las proteínas.

Los alineamientos de la secuencia de aminoácidos obtenida del spot Ca_1 (Query_6426092), guarda relación con proteínas de la familia P78595.2 (Multidrug resistance protein CDR2), Q5ANA3.2 (Pleiotropic drug resistance protein CDR1) y P43071.1 (Multidrug resistance protein CDR1).

Los alineamientos de la secuencia de aminoácidos obtenida del spot Ca_2 (Query_6839642) guarda relación con proteínas de la familia P46598.1 (Heat shock protein 90 homolog.), Q8J2M3.1 (Heat shock protein HSP82) y P02829.1 (Heat shock protein Hsp90 heat-inducible isoform).

Los alineamientos de la secuencia de aminoácidos obtenida del spot Ca_3 (Query_8643440) guarda relación con proteínas de la familia Q59QC7.1 (Sterol uptake control protein 2).

Los alineamientos de la secuencia de aminoácidos obtenida del spot Ca_4 (Query_7374833) guarda relación con proteínas de la familia P10613.2 (Sterol 14-alpha demethylase), P14263.2 (Sterol 14-alpha demethylase.) y P10614.1 (Sterol 14-alpha demethylase).

Los alineamientos de la secuencia de aminoácidos obtenida del spot Ca_5 (Query_7857764) guarda relación con proteínas de la familia Q5A4G2.1 (Multidrug resistance regulator 1).

Los alineamientos de la secuencia de aminoácidos obtenida del spot Ca_6 (Query_9685199) guarda relación con proteínas de la familia A0A1D8PN96.1 (Transcription factor TAC1).

Los alineamientos de la secuencia de aminoácidos obtenida del spot Ca_7 (Query_10073822) guarda relación con proteínas de la familia Q59VG6.1 (Sterol-C5-desaturase ERG3), O93875.1 (Sterol-C5-desaturase) y Q8NJ57.1 (Sterol-C5-desaturase).

Figura 13

Representación de los alineamientos de las secuencias de aminoácidos obtenida por digestión triptica del spot Ca_1 a Ca_7 relacionadas sus familias de proteínas para el análisis del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de Candida albicans tratadas con fluconazol en aislados de bolsas a los días de control (1, 7 y 14) que no se encontraron en la muestra sin tratamiento.

✓ Query_6426092	1	-----IKKEDRVIL	9
✓ P78595.2	797	LKGS LKKHKR KTAASNKGDI EAGPVAGKLDYQDEAEAVNNEKFTEKGTSGSVDFPENREIFFWRDLTYQVKIKKEDRVIL	876
✓ Q5ANA3.2	799	LKGS LKKHKR KTAASNKGDI EAGPVAGKLDYQDEAEAVNNEKFTEKGTSGSVDFPENREIFFWRDLTYQVKIKKEDRVIL	878
✓ P43071.1	799	LKGS LKKHKR KTAASNKGDI EAGPVAGKLDYQDEAEAVNNEKFTEKGTSGSVDFPENREIFFWRDLTYQVKIKKEDRVIL	878
✓ Query_6426092	10	DHVDGWVKGPGQITALMGASGAGKTTLLNCLSERVTTGIITDGERLVNGHALD-----	61
✓ P78595.2	877	DHVDGWVKGPGQITALMGASGAGKTTLLNCLSERVTTGIITDGERLVNGHALDSSFSRISIGYVQQQDVHLETTTVREALQF	956
✓ Q5ANA3.2	879	DHVDGWVKGPGQITALMGASGAGKTTLLNCLSERVTTGIITDGERLVNGHALDSSFSRISIGYVQQQDVHLETTTVREALQF	958
✓ P43071.1	879	DHVDGWVKGPGQITALMGASGAGKTTLLNCLSERVTTGIITDGERLVNGHALDSSFSRISIGYVQQQDVHLETTTVREALQF	958
✓ Query_6839642	1	-----RAPDFAFESKKKKNNIKLYVRRVITDDAEELIPEWLSFIK-----	41
✓ P46598.1	317	ILFVPKRAPDFAFESKKKKNNIKLYVRRVITDDAEELIPEWLSFIKGVVDSIDLPLNLSREMLQNNKILKIRKNIVKK	396
✓ Q8J2M3.1	315	ILFIPKRAPDFAFESKKKKNNIKLYVRRVITDDAEELIPEWLSFVKGVVDSIDLPLNLSREMLQNNKIMKVIKKNIVKK	394
✓ P02829.1	320	ILFIPKRAPDFAFESKKKKNNIKLYVRRVITDDAEELIPEWLSFVKGVVDSIDLPLNLSREMLQNNKIMKVIKKNIVKK	399
✓ Query_8643440	1	-----PQPETLQSSIPATTSGPSGMSYPGCPNSNDPF	32
✓ Q59QC7.1	241	TTNSEFKESNQRKSQTQMPQPPTVPIITSMGAATTTSSHQANMPSRSKPQPETLQSSIPATTSGPSGMSYPGCPNSNDPF	320
✓ Query_8643440	33	GRSSDKSLPNISPNMISIPANPLSDPLTQGM-----	63
✓ Q59QC7.1	321	GRSSDKSLPNISPNMISIPANPLSDPLTQGMRLNMLDLKLMFHYTSVVANTITGAGISDTNIWNCIDPKLAFEHPLMH	400
✓ Query_7374833	1	---KIREEILNYFVTDSEFKLEKTHGVANVMKTQPEITIFTASRSLFGDEMRRIFDRSFAQLYSDLDK-----	66
✓ P10613.2	158	YVPKIREEILNYFVTDSEFKLEKTHGVANVMKTQPEITIFTASRSLFGDEMRRIFDRSFAQLYSDLDKGFTPIINFVFPN	237
✓ P14263.2	158	YVPKIREEILNYFVNDVSFKTKERDGHGASVMKTQPEITIFTASRCLFGDEMRSFDRSFAQLYADLDKGFTPIINFVFPN	237
✓ P10614.1	166	YVPLIAEEVYKYFRDSKNFRLNERTTGTIDVMVTOPEMTIFTASRSLLGKEMRAKLDTFAYLYSDLDKGFTPIINFVFPN	245
✓ Query_7857764	1	-----ILNQFEI	7
✓ Q5A4G2.1	641	YAFGTPKLIIGDDFYDTKVPFIEEGMENLIDKSLDQVVTKSVPFGYFSIYNSVDQILKILSVSRRSKVSEICKILNQFEI	720
✓ Query_7857764	8	GIAEQYGTLSACLKPKENLIHIFARNMPVKMYISLSFLSVYFHLFLYYEHK-----	60
✓ Q5A4G2.1	721	GIAEQYGTLSACLKPKENLIHIFARNMPVKMYISLSFLSVYFHLFLYYEHKNDSLFFYLRLKILKTGAGDIMPYFEL	800
✓ Query_9685199	1	-----KLIDLYYEETSMINILVDES	20
✓ A0A1D8PN96.1	241	EKTLGSYGEEYLTPIRNLPLVFHSELKPYIMKWIDPPVVDKLRKKLLESFPPTDSKLISKLIDLYYEETSMINILVDES	320
✓ Query_9685199	21	RVRSLFAAYNNFAEPIATKRRRFLKSELLMTSILLISLSCLTEDDFSEER-----	72
✓ A0A1D8PN96.1	321	RVRSLFAAYNNFAEPIATKRRRFLKSELLMTSILLISLSCLTEDDFSEERITTPASSTSSNYSAASANLGDYKNRNL	400
✓ Query_10073822	1	-----KIFNHPRYLKNQ	12
✓ Q59VG6.1	81	KIASYQDKSEIYGLAPKFFPATDFINTSFLARSNIFRETLSFIITTFGWLlyFIVAYLSYVVFDDKKIFNHPRYLKNQ	160
✓ Q93875.1	81	KIASYQDKSEIYGLAPKFFPATDFINTSFLARSNIFRETLSFIITTFGWLlyFIVAYLSYVVFDDKKIFNHPRYLKNQ	160
✓ Q8NJ57.1	81	KIASYQDKSEIYGLAPKFFPATDFIDTSFLRSNIFREVLTSFIITTFGWLlyFIVAYLSYVVFDDKKIFNHPRYLKNQ	160
✓ Query_10073822	13	MSLEIKRATTAPVMVLLTIPFFLLELNGYSFLYLDINECTGGYKAILWQIPK-----	65
✓ Q59VG6.1	161	MSLEIKRATTAPVMVLLTIPFFLLELNGYSFLYLDINECTGGYKAILWQIPKILFTDCGIYFLHRWLHWPSVYKVLHK	240
✓ Q93875.1	161	MSLEIKRATTAPVMVLLTIPFFLLELNGYSFLYLDINECTGGYKAILWQIPKILFTDCGIYFLHRWLHWPSVYKVLHK	240
✓ Q8NJ57.1	161	MSLEIKRATSAIPVMVLLTIPFFLLELNGYSFLYEEINESTGGYKAILWQIPKILFTDCGIYFLHRWLHWPSVYKALHK	240

1.2 Proteínas obtenidas (Ca_1, Ca_2, Ca_3, Ca_4, Ca_5, Ca_6 y Ca_7) y sus funciones.

El spot Ca_1 (Cdr2p) es una proteína es de tipo transporte y se haya en la membrana celular también cumple la función de evacuar elementos antifúngicos de la misma célula, creando una resistencia a estos en especial al fluconazol (28).

El spot Ca_2 (Hsp90) es una proteína que actúa como acompañante de otras proteínas para que estas puedan plegarse y estabilizarse. Esta se relaciona con el *Candida albicans*, ayudando a la levadura a aguantar los antifúngicos (29).

El spot Ca_3 (Upc2p) es una proteína que tiene una función de ejercer un efecto protector sobre la célula, al mantener el potencial de membrana que se ve alterado por la acción del superóxido. Se relaciona con la *Candida albicans*, de forma que esta proteína ayuda a reparar el ergosterol de la membrana (30).

El spot Ca_4 (sterol 14-demethylase) es una enzima que está involucrada en el proceso de formación de compuestos esteroides como el ergosterol, que es muy importante para la membrana de la *Candida albicans* (31).

El spot Ca_5 (Mrr1p) esta es una proteína (factor de transcripción) de tipo reguladora en relación con la *Candida albicans*, la cual promueve la MDR1, que es un tipo de bomba para expulsar antifúngicos. Regula la expresión de ciertos genes encontrados en la célula como una especie de encendedor (32).

El spot Ca_6 (Tac1p) es una proteína (factor de transcripción), maneja la estimulación de bombas de eflujo dentro del *Candida albicans*, provocando que esta sea más resistente (33).

El spot Ca_7 (C5 6 desaturase, partial) esta es un tipo de enzima cuya capacidad se basa en transformar ácidos grasos saturados en insaturados, esencial para la membrana celular (34).

Figura 14

Representación tridimensional del spot Ca-01 (Cdr2p) efectuado para facilitar la visualización de la estructura espacial de la proteína completa, cuya secuencia fue deducida de novo, destacando de color rojo la región conservada con el propósito de examinar posibles dominios estructurales compartidos con otras proteínas pertenecientes a la misma familia para el análisis del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas a los días de control (1, 7 y 14) que no se encontraron en la muestra sin tratamiento.

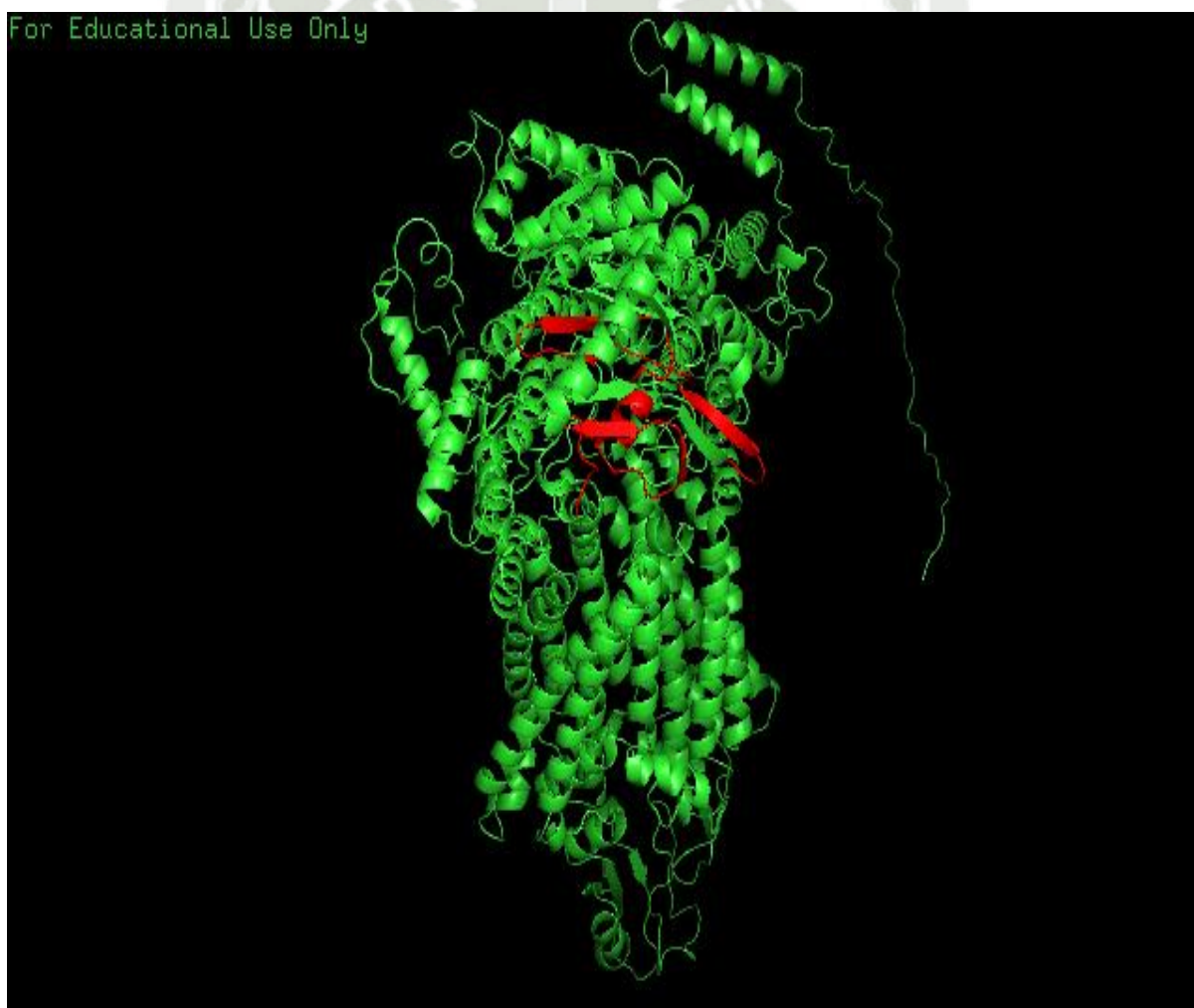


Figura 15

Representación tridimensional del spot Ca-02 (Hsp90) efectuado para facilitar la visualización de la estructura espacial de la proteína completa, cuya secuencia fue deducida de novo, destacando de color rojo la región conservada con el propósito de examinar posibles dominios estructurales compartidos con otras proteínas pertenecientes a la misma familia para el análisis del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas a los días de control (1, 7 y 14) que no se encontraron en la muestra sin tratamiento.

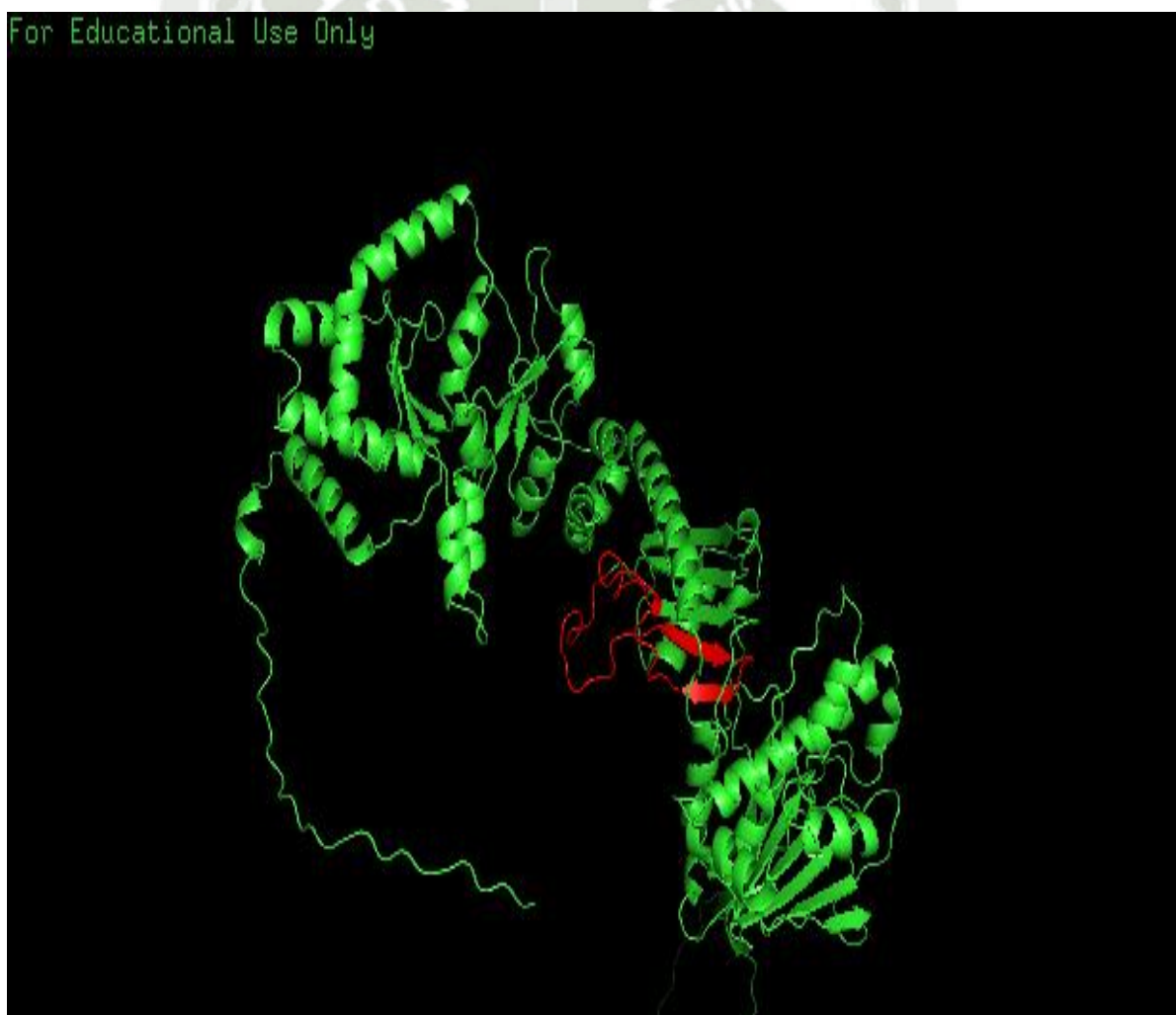


Figura 16

Representación tridimensional del spot Ca-03 (Upc2p) efectuado para facilitar la visualización de la estructura espacial de la proteína completa, cuya secuencia fue deducida de novo, destacando de color rojo la región conservada con el propósito de examinar posibles dominios estructurales compartidos con otras proteínas pertenecientes a la misma familia para el análisis del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas a los días de control (1, 7 y 14) que no se encontraron en la muestra sin tratamiento.

For Educational Use Only

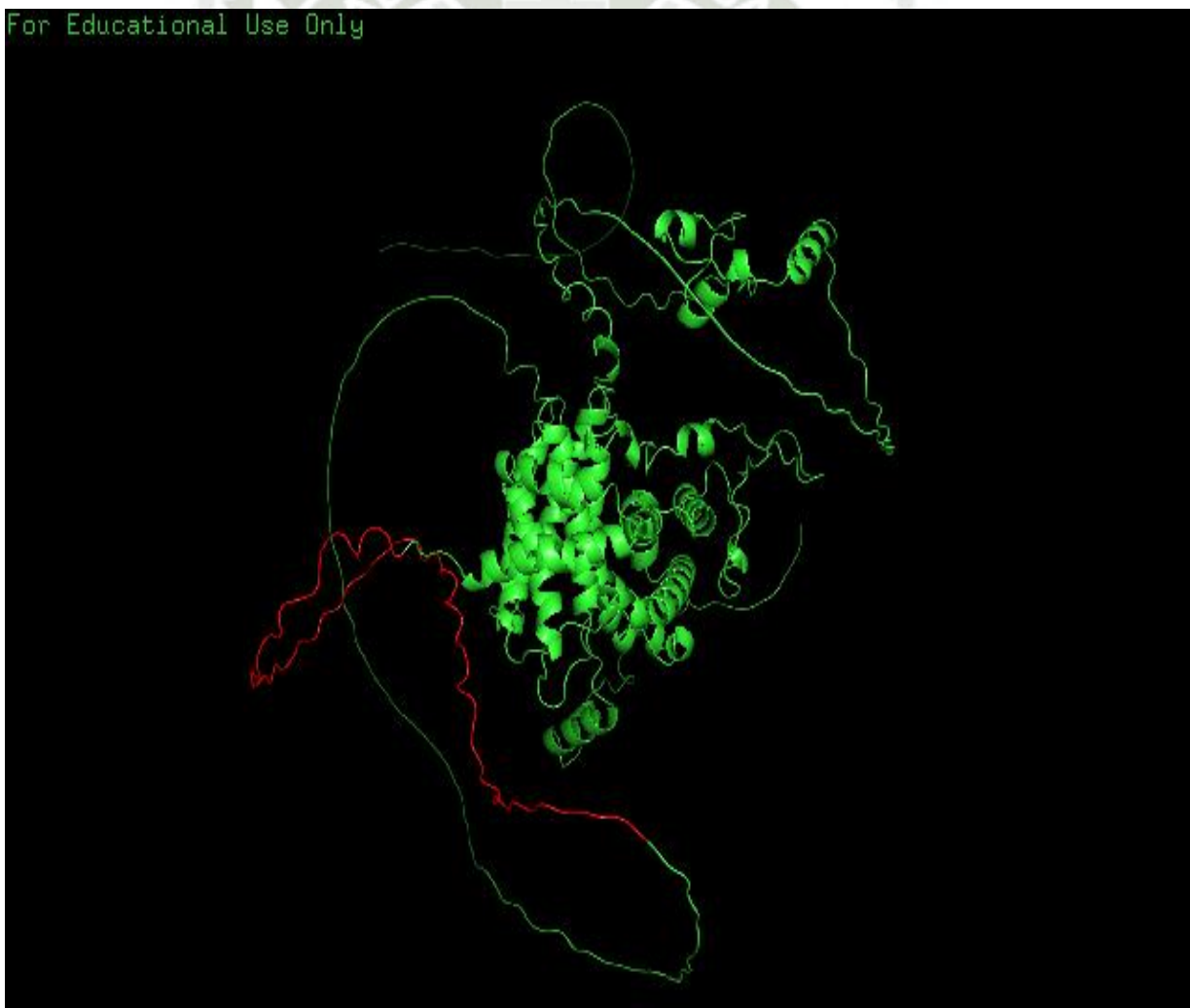


Figura 17

Representación tridimensional del spot Ca-04 (sterol 14-demethylase) efectuado para facilitar la visualización de la estructura espacial de la proteína completa, cuya secuencia fue deducida de novo, destacando de color rojo la región conservada con el propósito de examinar posibles dominios estructurales compartidos con otras proteínas pertenecientes a la misma familia para el análisis del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas a los días de control (1, 7 y 14) que no se encontraron en la muestra sin tratamiento.

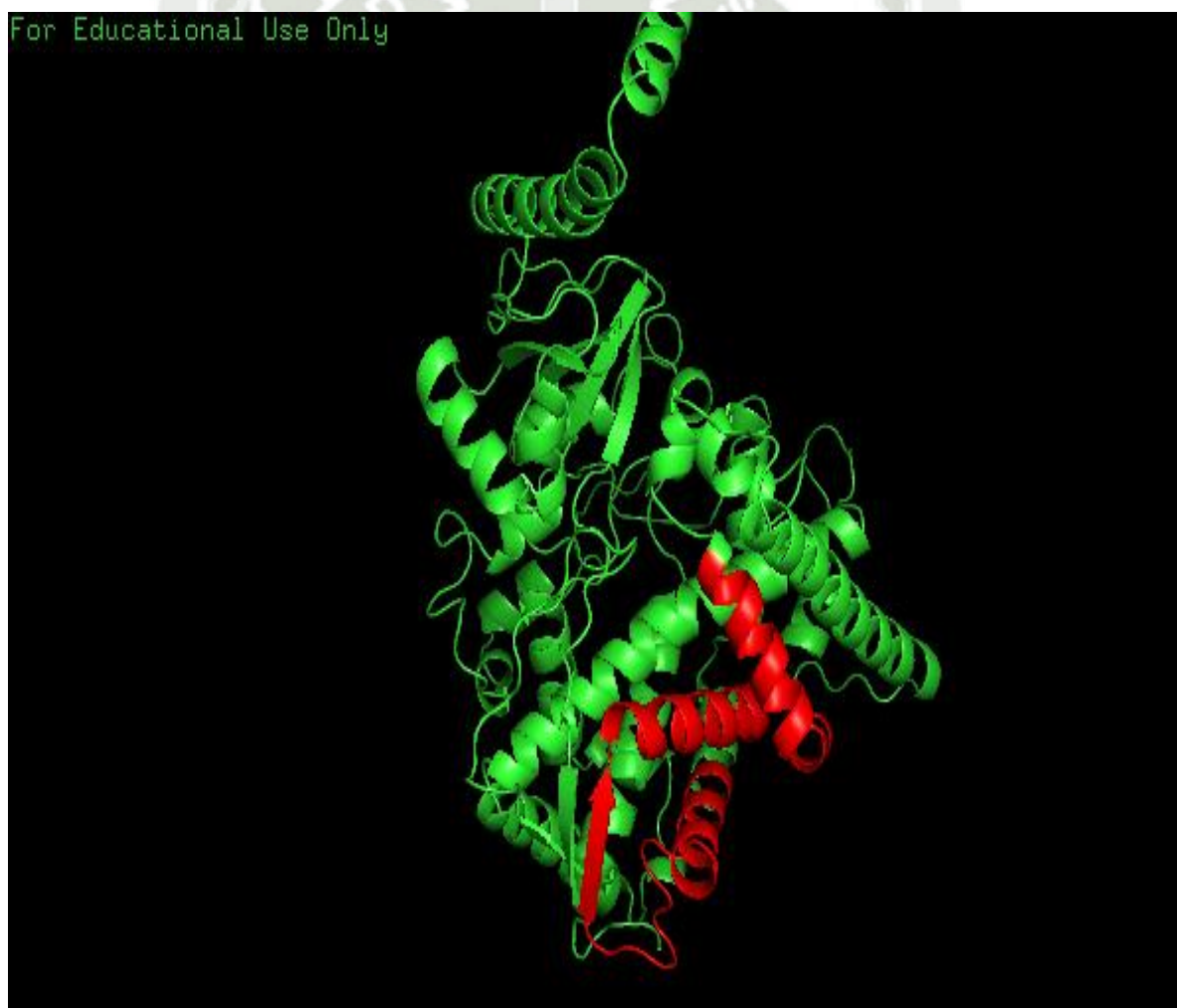


Figura 18

Representación tridimensional del spot Ca-05 (Mrr1p) efectuado para facilitar la visualización de la estructura espacial de la proteína completa, cuya secuencia fue deducida de novo, destacando de color rojo la región conservada con el propósito de examinar posibles dominios estructurales compartidos con otras proteínas pertenecientes a la misma familia para el análisis del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas a los días de control (1, 7 y 14) que no se encontraron en la muestra sin tratamiento.

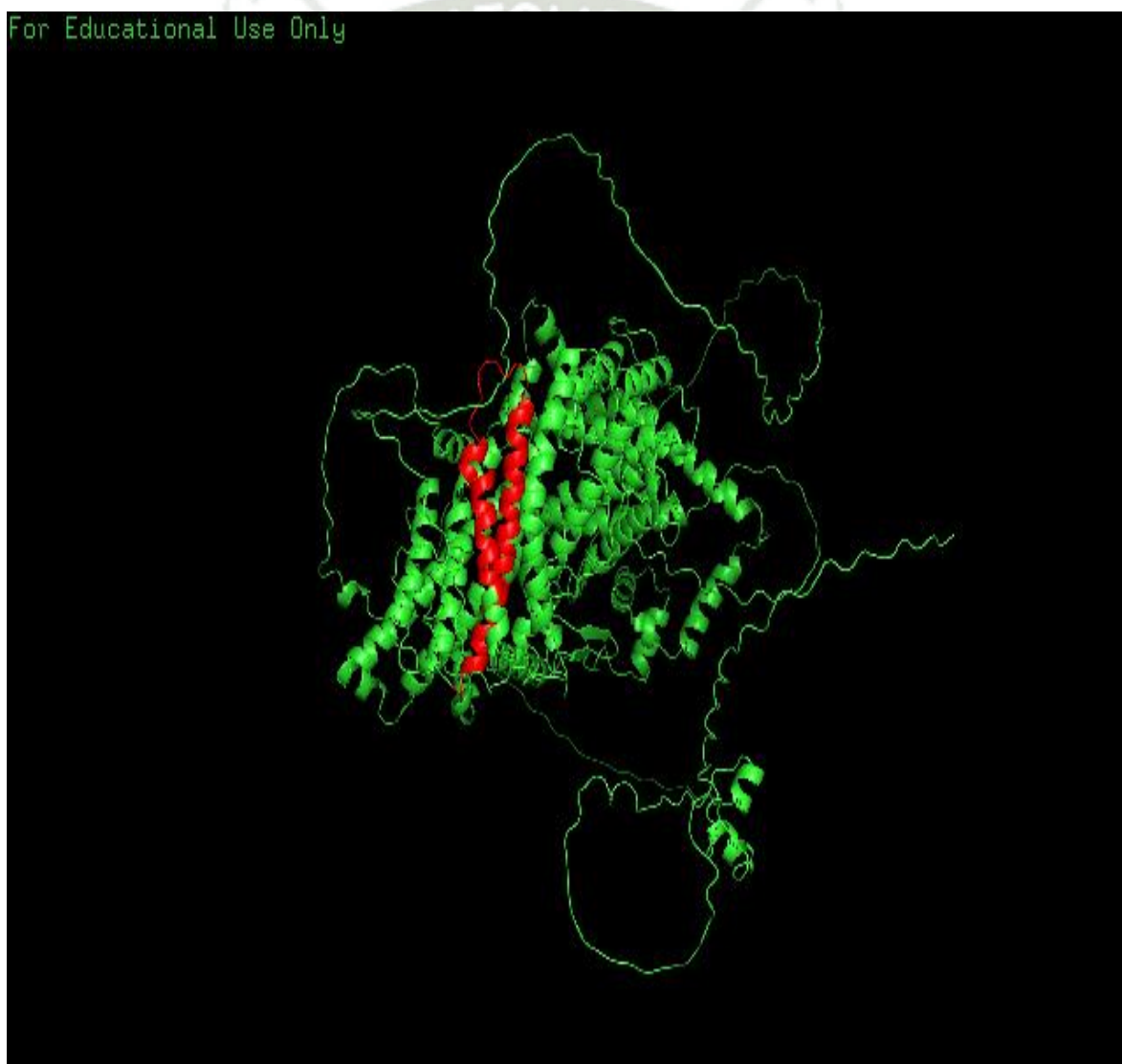


Figura 19

Representación tridimensional del spot Ca-06 (Tac1p) efectuado para facilitar la visualización de la estructura espacial de la proteína completa, cuya secuencia fue deducida de novo, destacando de color rojo la región conservada con el propósito de examinar posibles dominios estructurales compartidos con otras proteínas pertenecientes a la misma familia para el análisis del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas a los días de control (1, 7 y 14) que no se encontraron en la muestra sin tratamiento.

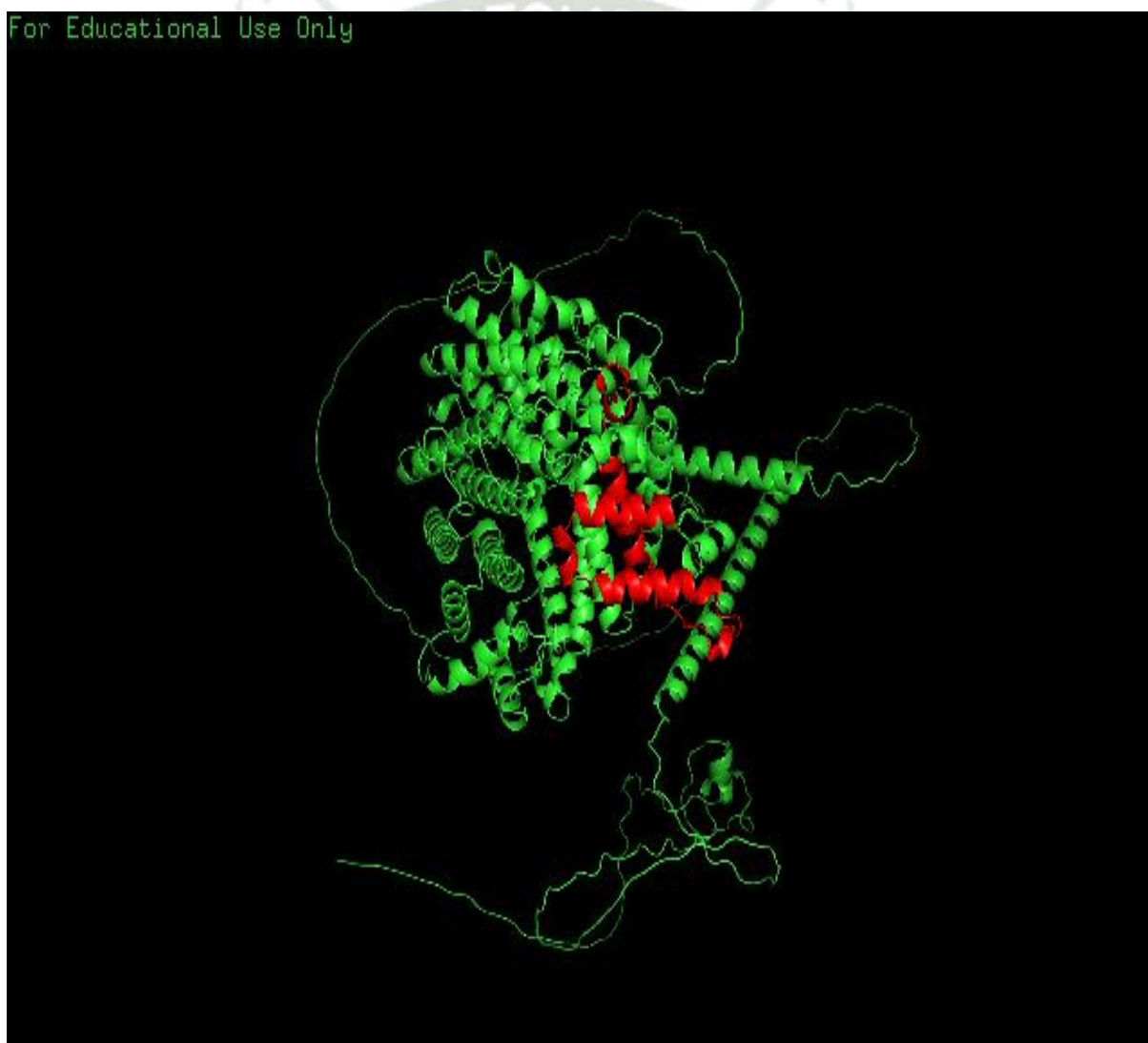
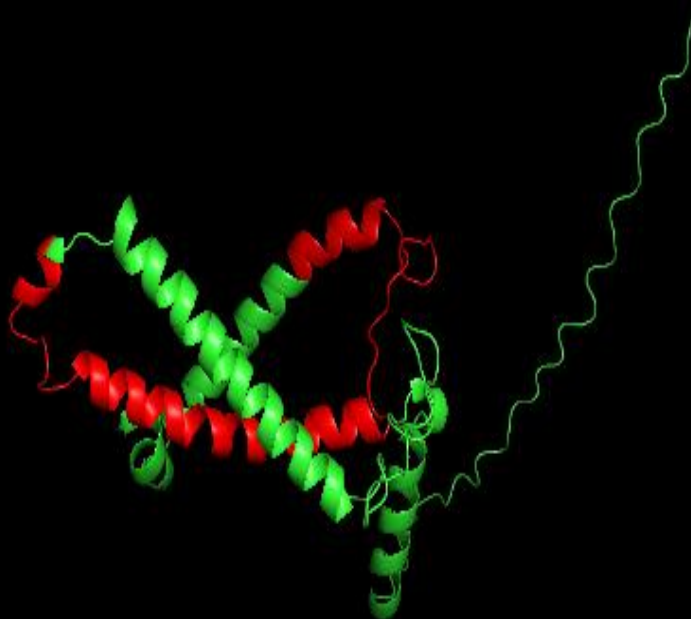


Figura 20

Representación tridimensional del spot Ca-07 (C5 6 desaturase, partial) efectuado para facilitar la visualización de la estructura espacial de la proteína completa, cuya secuencia fue deducida de novo, destacando de color rojo la región conservada con el propósito de examinar posibles dominios estructurales compartidos con otras proteínas pertenecientes a la misma familia para el análisis del nivel de expresión proteómica del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* tratadas con fluconazol en aislados de bolsas a los días de control (1, 7 y 14) que no se encontraron en la muestra sin tratamiento.

For Educational Use Only



2. DISCUSIÓN

Los resultados encontrados en este estudio evidencian diferencias acerca del nivel de expresión de proteínas del sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* en aislados de bolsas periodontales tanto al comparar cultivos tratados con fluconazol con cultivos sin tratamiento de fluconazol.

Este enfoque ofrece una visión detallada de las proteínas producidas por el hongo, lo que podría revelar mecanismos moleculares claves relacionados con la resistencia a tratamientos como el fluconazol y su capacidad para sobrevivir en microambientes orales específicos. Además, el análisis proteómico proporciona información crucial para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y mejorar el manejo clínico de infecciones fúngicas orales, sobre todo en pacientes con condiciones que favorecen la colonización de *C. albicans*, como las bolsas periodontales (24).

Dentro de los límites de este estudio se demostró que en el cultivo tratado con fluconazol se encontraron siete proteínas que no se encontraban dentro de las treinta y uno proteínas que se hallaron en el cultivo con la ausencia de tratamiento. En particular, estas siete proteínas podrían tener ciertos mecanismos o funciones que estarían relacionados con la resistencia al fluconazol, estas proteínas fueron identificadas como: Ca_1 (Cdr2p), Ca_2 (Hsp90), Ca_3 (Upc2p), Ca_4 (sterol 14-demethylase), Ca_5 (Mrr1p), Ca_6 (Tac1p) y Ca_7 (C5 6 desaturase, partial), que luego de ya realizada la identificación individual se puede decir que Ca_1 participa como bomba de eflujo; Ca_2 funciona como chaperona molecular; Ca_3, Ca_5 y Ca_6 como factores de transcripción; y Ca_4 junto con Ca_7 intervienen en la ruta biosintética del ergosterol (23, 24, 25, 26, 36, 37).

El estudio titulado “El transportador de casete de unión a ATP (ABC) Cdr2p de *Candida albicans* confiere resistencia a la caspofungina” de los autores Manuela Schuetzer-Muehlbauer, Birgit Willinger, Gerd Krapf, Sabine Enzinger, Elisabeth Presterl, Karl Kuchler (2003). Confirma que la resistencia a los antifúngicos podría tener una fuerte relación con el Cdr2p (Candida Drug Resistance - Ca_1) de la *Candida albicans*, ya que señala que este es una proteína que se encuentra en la membrana y cuyo objetivo es expulsar sustancias tóxicas hacia el exterior de esta, también es conocida como bomba de eflujo ABC (24).

Para que Cdr2p pueda expulsar sustancias invasivas utiliza energía del ATP, provoca la hidrolización del ATP, ósea, lo descompone en ADP y fosfato inorgánico. Este proceso libera

cierta cantidad de energía la cual usa la proteína para cambiar de forma abriendo un espacio en la membrana y así expulsar estas sustancias tóxicas fuera de la célula (24).

Este factor de resistencia de la *Candida albicans* en relación a esta proteína puede ser reafirmado por la investigación titulada “Marcada virulencia y resistencia a los azoles en *Candida albicans* aislada de pacientes con enfermedad periodontal” de los autores Eric Monroy-Pérez, Rosa María Rodríguez-Bedolla, Javier Garzón, Felipe Vaca-Paniagua, Ernesto Arturo-Rojas Jiménez, Gloria Luz Paniagua-Contreras (2020), que a diferencia de los resultados obtenidos, aclara que existe un alto índice de aparición de genes CDR1 que está relacionada íntimamente con la resistencia a los azoles, que a pesar que la proteína encontrada no es la misma puede este gen tenga una gran relación con la proteína Cdr2p ya que la proteína Cdr1p producida por el gen CDR1, son proteínas homólogas, ósea, que su estructura y función es similar es decir que ambas son bombas de eflujo (23).

Otra de las proteínas detectadas en este estudio que podría estar asociada a mecanismos de resistencia frente a antifúngicos es la Heat Shock Protein 90 (Hsp90 - Ca₂), nombrada así porque fue identificada originalmente en células sometidas a estrés térmico, contexto en el cual su expresión aumenta considerablemente como parte de la respuesta celular destinada a proteger y mantener funcionales otras proteínas. Esta proteína se clasifica como una chaperona molecular, encargada de acompañar, estabilizar, plegar adecuadamente y evitar la degradación prematura de otras proteínas, especialmente en situaciones de estrés, como ocurre cuando *Candida albicans* es expuesta al antifúngico fluconazol. En estas condiciones, Hsp90 cumple un rol esencial para garantizar la supervivencia del hongo, al participar indirectamente en el desarrollo de resistencia antifúngica mediante la regulación y el soporte funcional de proteínas clave asociadas a este proceso, como las bombas de eflujo Cdr1p y Cdr2p. La sobreexpresión de estas bombas está regulada por el factor de transcripción Tac1p, el cual también está influenciado por la actividad de Hsp90. Esta chaperona se une a proteínas inestables o mal plegadas (conocidas como clientes) y, utilizando ATP, modifica su estructura para ayudarles a alcanzar una conformación funcional. Durante este proceso, Hsp90 atrapa a la proteína cliente, facilita su correcto plegamiento y, una vez finalizada la hidrólisis del ATP, la libera ya estable. Este mecanismo ha sido ampliamente estudiado y confirmado por el trabajo titulado “Funciones de Hsp90 en la morfogénesis y virulencia de *Candida albicans*” de los autores de Robbins y Cowen (2023), donde se destaca el papel central de Hsp90 no solo en la morfogénesis y virulencia del hongo, sino también como un regulador clave en la respuesta al estrés

antifúngico. En este sentido, su función no es aislada, sino que forma parte de una red compleja de señalización y adaptación celular, consolidándose como un elemento determinante en la capacidad de *Candida albicans* para resistir los efectos del fluconazol (25).

En el estudio titulado “Las mutaciones en el factor de transcripción Mrr2p contribuyen a la resistencia al fluconazol en aislamientos clínicos de *Candida albicans*” de los autores Ying Wang, Jin-Yan Liu, Ce Shi, Wen Jing Li, Yue Zhao, Lan Yan y Ming Jie Xiang (2015) menciona que las proteínas Upc2p (Unsaturated fatty acid Permeability Control - Ca_3), Mrr1p (Multidrug Resistance Regulator - Ca_5) y Tac1p (Transcriptional Activator of CDR genes - Ca_6) podrían contribuir a la resistencia al fluconazol, que son las mismas proteínas halladas en esta investigación, el estudio comparado menciona que estos son factores de transcripción (interruptores), es decir, que intervenir en el proceso mediante el cual la información genética contenida en el ADN se convierte en proteínas funcionales. Para lograr esto, estas proteínas reconocen y se adhieren a secuencias específicas del ADN, que suelen encontrarse en las zonas cercanas al inicio de los genes, conocidas como promotores o regiones reguladoras. Al unirse a estos sitios, el factor de transcripción puede favorecer o impedir que la maquinaria celular responsable de leer el ADN (la ARN polimerasa) comience la producción de ARN mensajero. Este ARN, posteriormente, será traducido en una proteína. Estas tres proteínas, aunque comparten la misma categoría funcional, cada una cumple un papel específico en la activación de distintos genes que permiten a *Candida albicans* adaptarse y sobrevivir frente al estrés antifúngico. Por un lado, Upc2p regula genes relacionados con la síntesis de ergosterol, entre ellos ERG11, que codifica el enzima blanco del fluconazol (sterol 14-desmetilasa). Cuando esta vía se ve comprometida por la acción del fármaco, Upc2p puede inducir la sobreexpresión de estos genes para compensar la pérdida de ergosterol, manteniendo así la integridad de la membrana celular fúngica. Por su parte, Mrr1p está asociado a la activación de genes como MDR1, que codifica una bomba de eflujo de tipo MFS (Major Facilitator Superfamily), la cual se encarga de expulsar sustancias tóxicas, incluyendo fluconazol, hacia el exterior de la célula. Esto reduce la concentración intracelular del fármaco, disminuyendo su efectividad. Finalmente, Tac1p actúa sobre los genes CDR1 y CDR2, responsables de codificar bombas de eflujo del tipo ABC (ATP-Binding Cassette), que también eliminan activamente fluconazol del interior celular. Además, Tac1p puede verse influenciada por señales de estrés como las que estabiliza la proteína Hsp90, lo que amplifica su capacidad de respuesta ante tratamientos antifúngicos. En conjunto, estos tres factores de transcripción configuran una red reguladora

que permite a *C. albicans* reprogramar su expresión génica en favor de la supervivencia, generando así un fenotipo resistente ante la exposición a fluconazol (26).

Finalmente, entre los hallazgos más relevantes se identificaron dos enzimas clave de la ruta del ergosterol en *Candida albicans*: sterol 14-demethylase (Ca_4, también conocida como Erg11p y codificada por el gen ERG11) y C5,6-desaturase (partial) (Ca_7). La primera de ellas desempeña una función esencial al eliminar un grupo metilo en la posición 14 de los esteroides precursores, lo que permite la síntesis de ergosterol, un componente fundamental para la estabilidad y funcionalidad de la membrana celular fúngica. Dado su papel central, Erg11p es el blanco principal del fluconazol, el cual se une a esta enzima e interrumpe su actividad, afectando directamente la integridad de la membrana y provocando la muerte del hongo. No obstante, la sobreexpresión del gen ERG11 o mutaciones en su proteína pueden reducir la eficacia del tratamiento, facilitando el desarrollo de resistencia. Por otro lado, la enzima C5,6-desaturase participa en una etapa más tardía de la misma ruta biosintética, introduciendo un doble enlace entre los carbonos 5 y 6 de los intermediarios esteroides. Aunque también contribuye a la producción de ergosterol, no constituye un blanco directo del fluconazol. Un estudio previo titulado “Modelado matemático de la resistencia al fluconazol en la vía del ergosterol de *Candida albicans*” realizado por Yu, Moron-Espiritu y Lao (2022), incluyó en su análisis estas dos enzimas, concluyendo que, si bien ambas forman parte de la ruta afectada por el tratamiento, solo Erg11p representa un objetivo farmacológico eficaz. Según este modelo computacional, la inhibición parcial de C5,6-desaturase no mejora sustancialmente la acción antifúngica, lo que limita su valor terapéutico en comparación con Erg11p. Por tanto, aunque ambas enzimas están implicadas en la vía metabólica influenciada por el fluconazol, sólo una de ellas (Erg11p) tiene un rol decisivo en la respuesta terapéutica y en el desarrollo de resistencia (37).

En resumen, esta investigación sugiere que las proteínas identificadas podrían estar involucradas en distintos mecanismos de resistencia al fluconazol en *Candida albicans* mencionadas en el estudio “Objetivos de *Candida albicans* que potencialmente actúan en sinergia con el fluconazol” de los autores Hui Lu, Manjari Shrivastava, Malcolm Whiteway, Yuanying Jiang (2021), ya sea mediante la alteración de rutas metabólicas clave, como la del ergosterol, o a través de la regulación de genes asociados a bombas de eflujo y factores de transcripción. La presencia de estas proteínas en los resultados apoya la hipótesis de que *C. albicans* posee una red compleja y multifactorial de adaptación frente al estrés antifúngico. Por

tanto, comprender su expresión y función no solo permite explicar parte de la variabilidad en la respuesta terapéutica, sino que también abre posibilidades para futuras investigaciones orientadas al diseño de estrategias más eficaces de tratamiento (36).

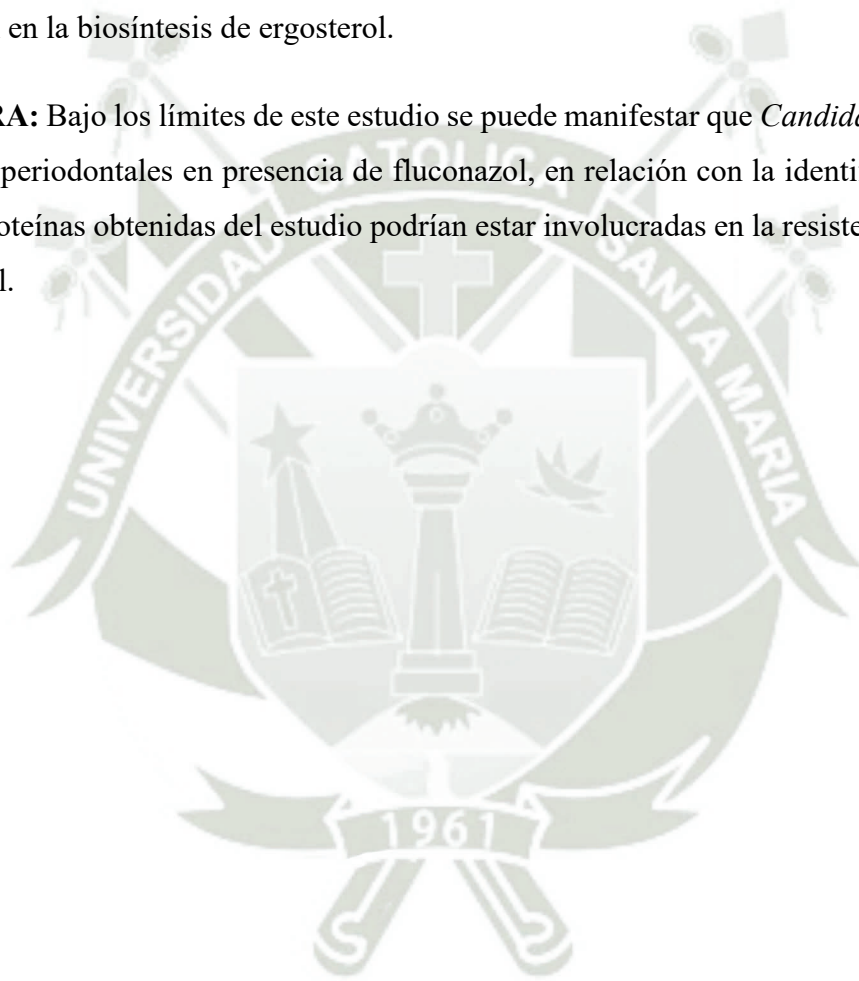


CONCLUSIONES

PRIMERA: Se identificó por electroforesis bidimensional 2D, 31 proteínas expresas, cuales tienen una participación en la constitución estructural y funcional en *Candida albicans*.

SEGUNDA: Se determinó que las proteínas obtenidas del proceso fueron Ca_1, Ca_2, Ca_3, Ca_4, Ca_5, Ca_6 y Ca_7 de las cuales Ca_1 es una bomba de aflujo, Ca_2 es una chaperona molecular, Ca_3, Ca_5 y Ca_6 son factores de transcripción, Ca_4 y Ca_7 son enzimas que participan en la biosíntesis de ergosterol.

TERCERA: Bajo los límites de este estudio se puede manifestar que *Candida albicans* aislada de bolsas periodontales en presencia de fluconazol, en relación con la identificación proteica, que las proteínas obtenidas del estudio podrían estar involucradas en la resistencia del hongo al fluconazol.



RECOMENDACIONES

PRIMERA: Se recomienda futuros tesisistas y posibles investigadores a investigar el mecanismo de acción de *Candida albicans*.

SEGUNDA: Se recomienda futuros tesisistas y posibles investigadores investigar el mecanismo de acción de otros antifúngicos contra el *Candida albicans*.

TERCERA: Se recomienda futuros tesisistas y posibles investigadores a investigar profundamente el nivel de expresión proteómico con relación a la supervivencia de *Candida albicans* con otros antifúngicos.



REFERENCIAS

1. Calderone R, Clancy CJ. Candida and Candidiasis. 2nd ed. Calderone RA, Clancy CJ, editors. Washington, D.C., DC: American Society for Microbiology; 2011.
2. WHO. (2021). Global action on antifungal resistance. World Health Organization. Disponible en: <https://www.who.int>
3. Martínez, P., Gómez, J., & Suárez, L. (2022). Estudio de la resistencia antifúngica en *Candida albicans* en pacientes con periodontitis. Revista Peruana de Microbiología, 18(2), 45-58.
4. Ministerio de Salud. (2022). Informe sobre resistencia a antifúngicos en Perú. Disponible en: <https://www.minsa.gob.pe>
5. Sánchez, R., Pacheco, L., & Valverde, C. (2023). Resistencia antifúngica en *Candida albicans*: Análisis local en pacientes con periodontitis. Boletín de Investigaciones Clínicas, 7(1), 33-47.
6. Pintado V, Ruiz-Garbajosa P, Aguilera-Alonso D, Baquero-Artigao F, Bou G, Cantón R, et al. Executive summary of the consensus document of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC) on the diagnosis and antimicrobial treatment of infections due to carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl) [Internet]. 2023;41(6):360–70. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimce.2022.06.014>
7. Quero S, Párraga-Niño N, García-Núñez M, Sabrià M. Proteómica en enfermedades infecciosas. Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet]. 2016;34(4):253–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2014.07.015>
8. Nazir M, Al-Ansari A, Al-Khalifa K, Alhareky M, Gaffar B, Almas K. Global prevalence of periodontal disease and lack of its surveillance. ScientificWorldJournal [Internet]. 2020;2020:2146160. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2020/2146160>.
9. Badran Z, Gaudin A, Struillou X, Amador G, Soueidan A. Periodontal pockets: A potential reservoir for SARS-CoV-2? Med Hypotheses [Internet]. 2020;143(109907):109907. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109907>

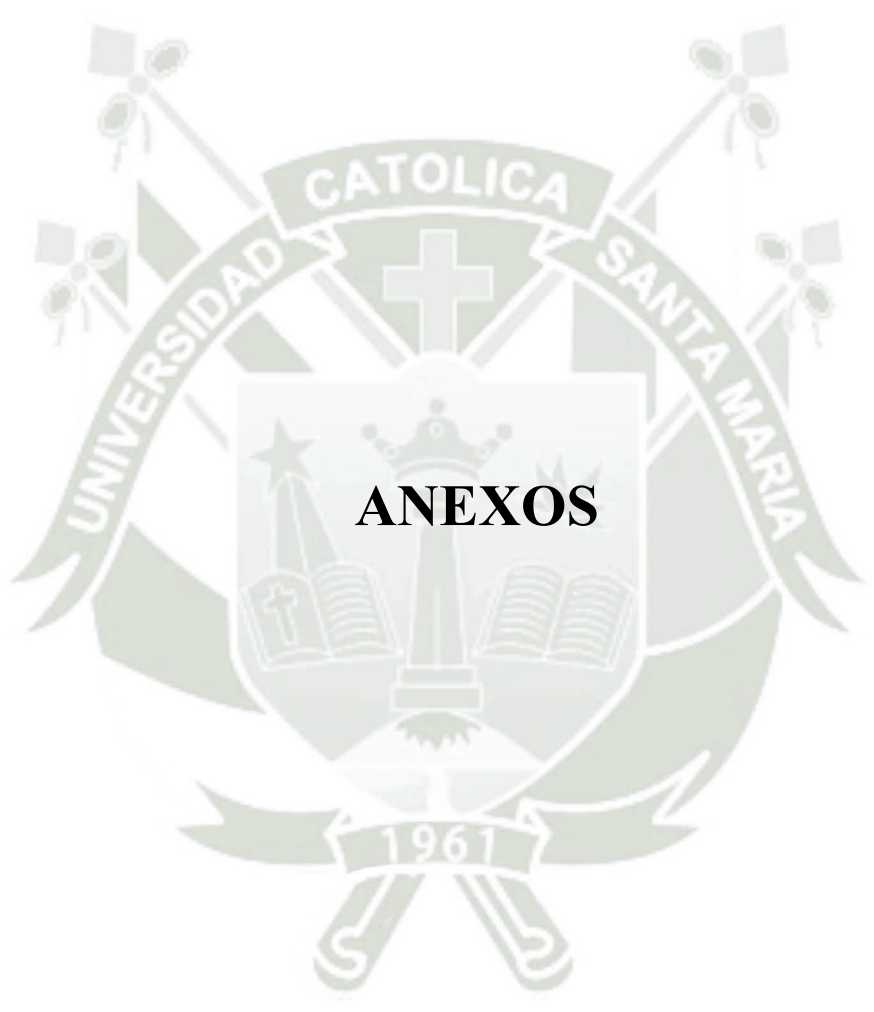
10. Hellstein JW, Marek CL. Candidiasis: Red and white manifestations in the oral cavity. Head Neck Pathol [Internet]. 2019;13(1):25–32. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s12105-019-01004-6>
11. Contaldo M, Di Stasio D, Romano A, Fiori F, Della Vella F, Rupe C, et al. Oral candidiasis and novel therapeutic strategies: Antifungals, phytotherapy, probiotics, and photodynamic therapy. Curr Drug Deliv [Internet]. 2023;20(5):441–56. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2174/1567201819666220418104042>
12. Lopes JP, Lionakis MS. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. Virulence [Internet]. 2022;13(1):89–121. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2021.2019950>
13. Patel M. Oral Cavity and *Candida albicans*: Colonisation to the Development of Infection. Pathogens [Internet]. 2022;11(3):335. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens11030335>
14. Kwon T, Lamster IB, Levin L. Current concepts in the management of periodontitis. Int Dent J [Internet]. 2021;71(6):462–76. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/idj.12630>
15. Wang W-Y, Cai H-Q, Qu S-Y, Lin W-H, Liang C-C, Liu H, et al. Genomic variation-mediating fluconazole resistance in yeast. Biomolecules [Internet]. 2022;12(6):845. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/biom12060845>
16. Jabri B, Iken M, Achmit M, Rida S, Ennibi OK. Occurrence of *Candida albicans* in periodontitis. Int J Dent [Internet]. 2021;2021:5589664. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2021/5589664>
17. Ponde NO, Lortal L, Ramage G, Naglik JR, Richardson JP. *Candida albicans* biofilms and polymicrobial interactions. Crit Rev Microbiol [Internet]. 2021;47(1):91–111. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/1040841X.2020.1843400>
18. Czajka KM, Venkataraman K, Brabant-Kirwan D, Santi SA, Verschoor C, Appanna VD, et al. Molecular mechanisms associated with antifungal resistance in pathogenic *Candida* species. Cells [Internet]. 2023;12(22):2655. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/cells12222655>
19. Feng Y, Lu H, Whiteway M, Jiang Y. Understanding fluconazole tolerance in *Candida albicans*: implications for effective treatment of candidiasis and combating invasive

- fungal infections. J Glob Antimicrob Resist [Internet]. 2023;35:314–21. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2023.10.019>
20. Boahen CK, Oelen R, Le K, Netea MG, Franke L, van der Wijst MGP, et al. Integration of *Candida albicans*-induced single-cell gene expression data and secretory protein concentrations reveal genetic regulators of inflammation. Front Immunol [Internet]. 2023;14:1069379. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2023.1069379>
21. Kramarz K, Saada AA, Lambert SAE. The analysis of recombination-dependent processing of blocked replication forks by bidimensional gel electrophoresis. Methods Mol Biol [Internet]. 2021;2153:365–81. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-0716-0644-5_25
22. Jannetto PJ, Danso D. Mass spectrometry. Clin Biochem [Internet]. 2020;82:1. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2020.06.003>
23. Monroy-Pérez E, Rodríguez-Bedolla RM, Garzón J, Vaca-Paniagua F, Arturo-Rojas Jiménez E, Paniagua-Contreras GL. Marked virulence and azole resistance in *Candida albicans* isolated from patients with periodontal disease. Microb Pathog [Internet]. 2020;148(104436):104436. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104436>
24. Schuetzer-Muehlbauer M, Willinger B, Krapf G, Enzinger S, Prestler E, Kuchler K. The *Candida albicans* Cdr2p ATP-binding cassette (ABC) transporter confers resistance to caspofungin. Mol Microbiol [Internet]. 2003;48(1):225–35. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03430.x>
25. Robbins N, Cowen LE. Roles of Hsp90 in *Candida albicans* morphogenesis and virulence. Curr Opin Microbiol [Internet]. 2023;75(102351):102351. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2023.102351>
26. Wang Y, Liu J-Y, Shi C, Li W-J, Zhao Y, Yan L, et al. Mutations in transcription factor Mrr2p contribute to fluconazole resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. Int J Antimicrob Agents [Internet]. 2015;46(5):552–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.08.001>
27. Edu.pe. [citado el 9 de mayo de 2025]. Disponible en: <https://repositorio.ucsm.edu.pe/items/03189061-d004-412e-87b8-5703c7a3c519>

28. S, Rahkhoodae F, Raymond M. Relative contributions of the *Candida albicans* ABC transporters Cdr1p and Cdr2p to clinical azole resistance. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2009;53(4):1344–52. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00926-08>
29. Kim SH, Iyer KR, Pardeshi L, Muñoz JF, Robbins N, Cuomo CA, et al. Genetic analysis of *Candida auris* implicates Hsp90 in morphogenesis and azole tolerance and Cdr1 in azole resistance. *MBio* [Internet]. 2019;10(1):e02529-18. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.02529-18>
30. Schubert S, Barker KS, Znaidi S, Schneider S, Dierolf F, Dunkel N, et al. Regulation of efflux pump expression and drug resistance by the transcription factors Mrr1, Upc2, and Cap1 in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2011;55(5):2212–23. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01343-10>
31. RCSB Protein Data Bank. RCSB PDB - 5FSA: Crystal structure of sterol 14-alpha demethylase (CYP51) from a pathogenic yeast *Candida albicans* in complex with the antifungal drug posaconazole [Internet]. Rcsb.org. [citado el 9 de abril de 2025]. Disponible en: https://www.rcsb.org/structure/5FSA?utm_source=chatgpt.com
32. Morschhäuser J, Barker KS, Liu TT, BläB-Warmuth J, Homayouni R, Rogers PD. The transcription factor Mrr1p controls expression of the MDR1 efflux pump and mediates multidrug resistance in *Candida albicans*. *PLoS Pathog* [Internet]. 2007;3(11):e164. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.0030164>
33. Morio F, Pagniez F, Besse M, Gay-andrieu F, Miegerville M, Le Pape P. Deciphering azole resistance mechanisms with a focus on transcription factor-encoding genes TAC1, MRR1 and UPC2 in a set of fluconazole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2013;42(5):410–5. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.07.013>
34. Luna-Tapia A, Butts A, Palmer GE. Loss of C-5 sterol desaturase activity in *Candida albicans*: Azole resistance or merely trailing growth? *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2019;63(1). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01337-18>
35. Hajishengallis G, Chavakis T, Lambris JD. Current understanding of periodontal disease pathogenesis and targets for host-modulation therapy. *Periodontol 2000* [Internet]. 2020;84(1):14–34. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/prd.12331>

36. Lu H, Shrivastava M, Whiteway M, Jiang Y. *Candida albicans* targets that potentially synergize with fluconazole. Crit Rev Microbiol [Internet]. 2021;47(3):323–37. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/1040841X.2021.1884641>
37. Yu PK, Moron-Espiritu LS, Lao AR. Mathematical modeling of fluconazole resistance in the ergosterol pathway of *Candida albicans*. mSystems [Internet]. 2022;7(6):e0069122. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/msystems.00691-22>





ANEXOS

Anexo 1

Solicitud para el uso del Laboratorio de Química y Proteínas de la UCSM

Solicito: Autorización del coordinador principal del Laboratorio de Química y Proteínas de la UCSM

Señor:

Dr. Luis Ponce Soto

Coordinador principal del Laboratorio de Química y Proteínas

Gabriel Alejandro Nuñez Talavera, identificado con DNI 72193496 y el código de alumno 2020203841, bachiller en Odontología.

Ante usted me presento y expongo que, me encuentro en proceso de realización de mi tesis: Análisis del nivel de expresión proteómico de los factores de supervivencia en sobrenadante de cultivos de *Candida albicans* aisladas de bolsas periodontales en presencia de fluconazol UCSM. Arequipa, 2025. Asesorado por el Dr. Obando Pereda, Gustavo Alberto.

Por lo que solicito a usted la autorización para la obtención y proceso de mis muestras para desarrollar mi proyecto, para optar por el título de Cirujano Dentista en la UCSM.

Por lo expuesto, espero acceda a mi solicitud.

Arequipa, 19 de febrero del 2025



Nuñez Talavera, Gabriel Alejandro
DNI 72193496

Anexo 2 Declaración Jurada de Autorización



Vicerrectorado de
Investigación

El que suscribe **Profesor Luis Alberto Ponce Soto Ph.D.** con DNI N°29546298, Docente Investigador y Coordinador del laboratorio de Química de Proteínas del Vicerrectorado de Investigación F-401, de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa.

DECLARO:

Que el trabajo de Investigación denominado: ***“Análisis del nivel de expresión proteómico de los factores de supervivencia en sobrenadante de cultivos de Candida albicans aisladas de bolsas periodontales en presencia de fluconazol”***, se realizará por el Alumno: ***Núñez Talavera Gabriel Alejandro*** y docente ***Dr. Gustavo Alberto Obando Pereda*** en las instalaciones del laboratorio de Química de Proteínas, bajo mi supervisión.

Se expide la presente a solicitud de los interesados para los fines debidos.

Arequipa, 20 de febrero del 2025.

Atentamente,



Profesor Luis Alberto Ponce Soto
Coordinador del Laboratorio de Química de Proteínas
Vicerrectorado de Investigación
Universidad Católica de Santa María
ORCID: 0000-0001-5976-2913
<https://orcid.org/0000-0001-5976-2913>
Other IDs
Scopus Author ID: 8987609300
ResearcherID: [B-1328-2017](#)

vrinvestigacion@ucsm.edu.pe

Teléfono: 382038. Anexo 1111

Universidad Católica de Santa María de Arequipa – Perú

Anexo 3
Fotografías debidas del procedimiento de laboratorio

Figura 21.
Desinfección de cámara eflujo



Figura 22.
Rotulación de sobrenadantes día 01



Figura 23.
Rotulación de sobrenadantes día 07

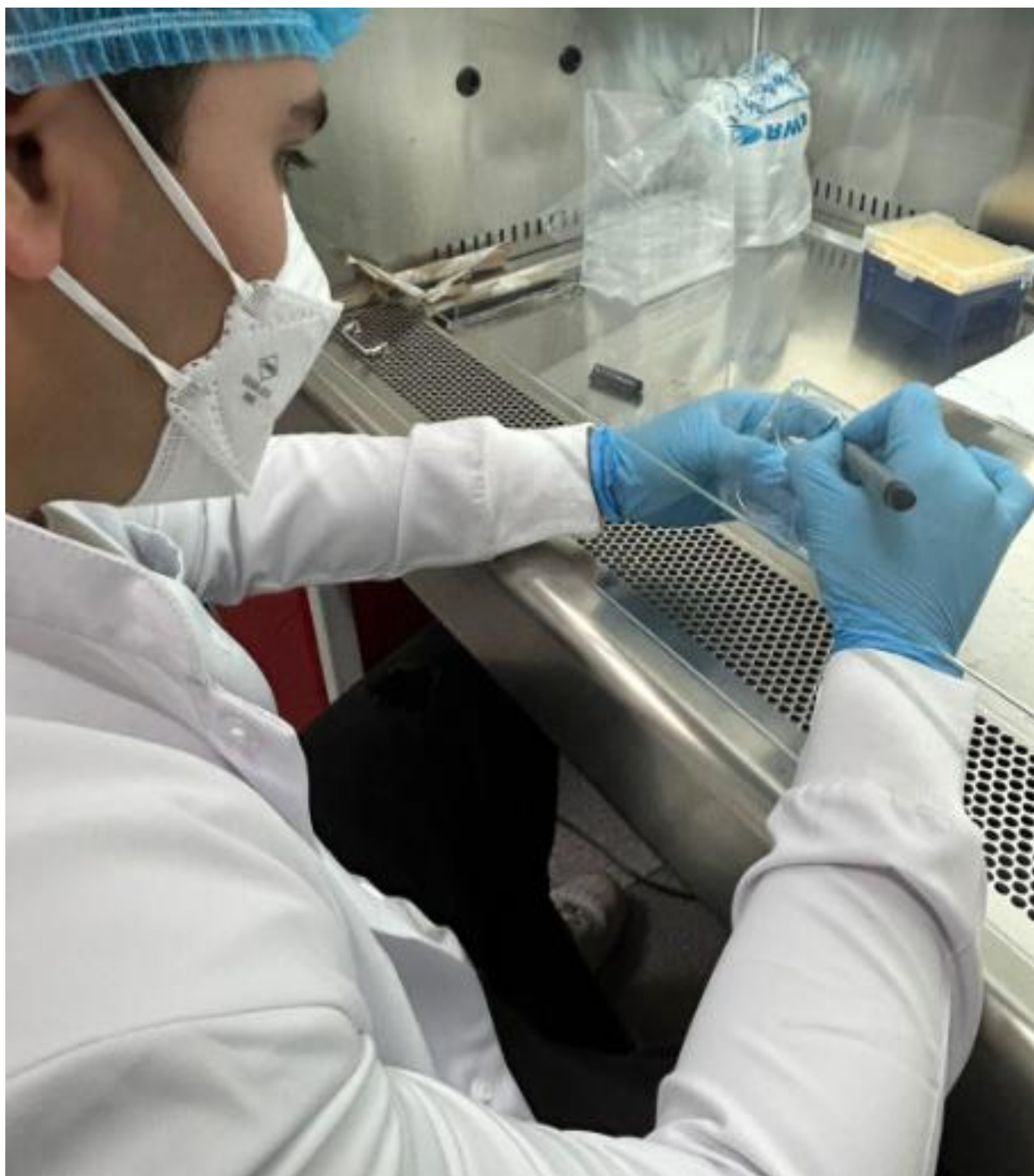


Figura 24.
Rotulación de sobrenadantes día 14



Figura 25.
Preparación del agar para días 1, 7 y 14 en presencia y ausencia de fluconazol



Figura 26.
Preparación del cultivo de *Candida albicans*



Figura 27.
Colocación de fluconazol en sobrenadante



Figura 28.
Colocación de muestras en estufa



Figura 29.
Colocación el tubo de ensayo con agua destilada, preparando la solución



Figura 30.
Sobrenadante de *Candida albicans* con fluconazol



Figura 31.
Sobrenadante de *Candida albicans* sin fluconazol



Figura 32.
Colocación de tubo de ensayo con tapa en vortex para la preparación de sobrenadante



Figura 33.
Preparación de sobrenadante



Anexo 4

Ficha de Recolección de Datos

Anexo 5 Preparación de Muestras

LABORATORIO DE QUIMICA DE PROTEINAS F-401 VRI -UCSM
Responsable: Prof. Luis Alberto Ponce Soto

PREPARACION DE MUESTRAS DE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL PARA ANALISIS DE SECUENCIA VIA ESPECTROMETRÍA DE MASAS ESI-Q-TOF-MS/MS

1. Recorte del spots o spots de interés para el análisis de secuencia, con la ayuda de un bisturí, a menos que se disponga de un robot.
2. Colocar la muestra con ayuda de una pinza en un ependorff de 1.5 ML.
3. Eliminar la presencia de la acrilamida con ayuda de sales:
Estas pueden ser:
 - a) Urea
 - b) Guanidina
 - c) EDTA
 - d) Glicerol
 - e) DMSO
 - f) Acetonitrilo
4. Se añade 500 UI de la sal o sustancia orgánica como Acetonitrilo (usado en LAQUIP).
5. Vortex por 10 minutos.
6. Sonicar por 30 minutos
7. Centrifugar a 6000 rpp por 10 minutos.
8. Colocar en un tubo con filtro de ultra centrifugación Amicon™ Ultra-15 para eliminar por completo la presencia de acrilamida.
9. Centrifugar a 6000 rpp por 20 minutos
10. Descartar el filtro.
11. Liofilizar por 12 horas.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANALISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS ESI-Q-TOF-MS/MS

1. Re-suspender el tubo ependorff de muestra con acetonitrilo concentrado en un volumen de 300 UI.
2. Añadir 100 UI de agua MilliQ. (agua desionizada, apirogenada, esteril con conductividad de 0.005 ohmios (Ω)).
3. Colocar con la ayuda de una jeringa de 10 uL en el loop del equipo de masas.
4. Cerrar la llave compuerta.
5. Programar el espectrómetro en el modo TANDEM para el análisis correspondiente.

ANÁLISIS DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS ESI-Q-TOF-MS/MS EN TANDEM

1. Programar el análisis del espectro de modo espectral:
 - a) Masa intacta de la proteína.
 - b) Adición de las proteasas, SV8 de *Staphylococcus aureus*, tripsina bovina, quimitripsina bovina y bromuro de cianógeno para la hidrólisis por canales separados.
 - c) Análisis espectral de péptidos generados con ayuda del software específico.
 - d) Elección de los péptidos viables para el análisis de secuencia.
 - e) Secuenciamiento físico.
2. Análisis Bioinformático de la secuencia a través de:
 - a) NCBI Blast
 - b) Mascot
 - c) DNA Star

Anexo 6
Dictamen Comité de Ética de Investigación

COMITÉ DE ÉTICA INSTITUCIONAL DE INVESTIGACIÓN UCSM



**DICTAMEN COMITÉ DE ETICA DE INVESTIGACION
UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA**

SUJETOS DE ESTUDIO:

5 muestras de tejido gingival saludable y 5 muestras de tejido gingival inflamado (gingivitis).

RIESGO DEL ESTUDIO:

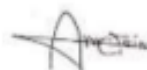
Mínimo

OBSERVACIONES, SUGERENCIAS:

Debe proteger confidencialidad de la data sensible

DICTAMEN:

DICTAMEN FAVORABLE
100 - 2023



Águeda Muñoz del Carpio Toia
Comité Institucional de Ética de la Investigación UCSM

Cualquier duda comunicarse a: comiteeticainvestigacionucsm@gmail.com

Anexo 7

Correlación de proteínas (FASTA)

Correlación de proteínas (FASTA)

Cdr2p [*Candida albicans* SC5314] (CA 1).

>sp|P78595.2|CDR2_CANAL RecName: Full=Multidrug resistance protein CDR2

MSTANTSLSQQLDEKPWVDASDNSSVQEYQGFDATASHNIQDLARKLTHGSTNGDHHSAN
DLARYLSHMSDIPGVSPFNGNISHEQLDPDSENFNAKYWVKNLKKLFESDSYKPSKLGVA
YRNLRAYGIANDSDYQPTVTNALWKFTTEAINKLKPPDDSKYFDILKSMDAIMRPGELTVVL
GRPGAGCSTLLKTIAVNTYGFHIGKESQITYDGLSPHDIERHYRGDVIYSAETDVHFPPLSVG
DTLEFAARLRTPQNRGEGIDRETYAKHMASVYMATYGLSHTRNNTNVGNDFVRGVSGGERK
RVSIAEASLSGANIQCWDNATRGLDSATALEFIRALKTSATILDTTPLIAIYQCSQDAYELFDN
VVVLYEGYQIFFGKASKAKEYFENMGWKCPQRQTTADFLTSLTNPAREPLPGYEDKVPRT
AQEFETFWKNSPEYAELTKEIDEYFVECERSNTGETYRESHVAKQSNNTRPSSPYTVSFFMQV
RYVIARNFLRMKGDPSIPLISILSQLVMGLILASVFFNLRKSTDFTYFRGGALFFSVLFNAFSSL
LEILSLYEARPIVEKHKRYALYRPSADALASHISELPVKLLMTMSFNIVYYFMVNLRRTAGNFF
FYWLMCASCTLVMSHMFERSIGAVTTTITATAMSLSTVFLAMIIYAGFVLPIPIYILGWSRWIRYI
NPVTYIFESLMVNEFHGREFECGQYIPSGPGFENLPVENKVCTTVGSTPGSTVVQGTEYIKLA
YQFYSSHKWRNFGITVAFVFFLGVYVALTEFNKGAMQKGEIVLFLKGSLKKHKRKTAAASN
KGDIEAGPVAGKLDYQDEAEAVNNEKFTEKGSTGSDVFPENREIFFWRDLTYQVK **IKKEDRV**
ILDHVDGWVKPGQITALMGASGAGKTLLNCLSERVTTGIITDGERLVNGHALDSSSFQRSIGY
VQQQDVHLETTTVREALQFSAYLRQSNKISKKEKDDYVDYVIDLLEMTDYADALVGVAGE
GLNVEQRKRLTIGVELVAKPKLLLFLDEPTSGLDSTAWSICKLMRKLADHGQAILCTIHQPS
ALIMAEFDKLLFLQKGGRTAYFGELGENCQTMINYFEKYGADPCPKEANPAEWMLQVVGGA
APGSHAKQDYFEVWRNSSEYQAVREEINRMEAELSKLPRDNDPEALLKYAAPLWKQYLLVS
WRTIVQDWRSPGYIYSKLILVISSSLFIGFSFFKSKNNLQGLQSQMLAVFMFFVPFTTFIDQML
PYFVKHRAVVEVREAPSRTFSWFAFIAGQITSEIPFQIVVGTISYFCWYYPVGLYANAEPDTSV
NSRGVLMWMLLTAIFYVYTSTMGQLAISLNELIDNAANLATTFTLCLMFCGVLAGPNVIPGF
WIFMYRCNPFTYLIQAILSTGLANAKVTCAPRELVTLPKPPMGETCSSFIGPYTEAAGGYFSTN
SDGTCSVCRIDSTNQFLESINALFSQRWRNFGIFVAFIGINIILTIFFYWLARVPKGNREKKMKK

Hsp90 family chaperone [*Candida albicans* SC5314] (CA 2).

>sp|P46598.1|HSP90_CANAL RecName: Full=Heat shock protein 90 homolog

MADAKVETHEFTAIEISQLMSLIINTVYSNKEIFLRELISNASDALDKIRYQALSDPSQLESEPEL
FIRIIPQKDQKVLEIRDSGIGMTKADLVNNLGTIAKSGTKSFMEALSAGADVSMIGQFGVGFY
SLFLVADHVQVISKHNDDEQYVWESNAGGKFTVTLDDETNERLGRGTMLRFLFKEDQLEYLE
EKRIKEVVKKHSEFVA YPIQLVVTKEVEKEVPETEEEDKAAEEDDKPKLEE VKDEEDEKKE
KKTKTVKEEVTETEELNKTPLWTRNPSDITQDEYNFYSISNDWEDPLAVKHFSVEGQLE
FRAILFVPK **RAPFDAFESKKKKNNIKLYVRRVFITDDAEELIPEWLSFIK**GVVDSIDLPLNSR
EMLQQNKILKVIRKNIVKKMIETFNEISEDQE QFNQFYTAFSKNIKLGIHEDAQNRQSLAKLL
RFYSTKSSEEMTSLSDYVTRMPEHQKNIYYITGESIKAVEKSPFLDALKAKNFEVLFMVDPID
EYAMTQLKEFEDKKLVDTKDFELEESDEEKAAREKEIKEYEPLTKALKDILGDQVEKVVVS
YKLVDAPAAIRTGQFGWSANMERIMKAQALRDTTMSSYMSSKKTFEISPSSPIKELKKKVVET
DGAEDKTVKDLTLLFDLTALLTSGFTLDEPSNFAHRINRLIALGLNIDDDSEETA VEPEATTATTA
STDEPAGESAMEEVD

Upc2p [*Candida albicans* SC5314] (CA 3).

>sp|Q59QC7.1|UPC2_CANAL RecName: Full=Sterol uptake control protein 2

MMMTVKQESPNSTLNTSEFSSDENLKTNNSEPPKKVSKSSTGKRKYHQKSRNGCSTCKKRR
VKCDEQRPVCGNCTKLKLDGCLHEPLENLTNKKDIANNEPPSKKRKRKVSTVSAASDSES
TTQQATPSLTSPSNHSQDIKTQPVIPPTNPLSALSSGLLSAGNLNNLNV AHLVNNLSGLGDLN
LASLGNLASLSNLASLAQLPIDLSNLGSLDSPAASNIAASFLGSAAATTVPPTTNSEFKESNQ
RKSQTQMPPQPTVPITSMGAATTTSSHQQANMPSRSK **QPETLQSSIPATTSGSPGMSYPGCP**
NSDPFGRSSDKSLPNISPNMSIPANPLSDPLTQGMSNLNMLDLKLMFHYTSVVANTITGAGI
SDTNIWNC DPKLA FEHPFLMHSILAFSATHLSRTEKGLDQC VTCHRGDALRLLREAVLNINA
DNTDALVASALILIMDSL ANASFPSSSTSPKSLPASAWIFHVKGAA TILTA VWPLTEASRFYKFI
SVDLGDLDGIINQGVNMNKS KGDIRENSA YYTDLECHDADIADLFPVLLDSPYLITLAYLNKL
HKERYKSDFILRIFAFPALLDKQFMGLMSGDVKAMRIMRSYYKLLRSFTTEMKDKVWFLE
GVSQVLPVNVEEYAGGAGGMHMMMDFLGGGPAIVDDNEIDAEITKFDPSGTLTNKLIDTDN
LPSVLTSNLDLMQGDNGFMNMK

sterol 14-demethylase [*Candida albicans* SC5314] (CA 4).

>sp|P10613.2|CP51_CANAL RecName: Full=Lanosterol 14-alpha demethylase; Short=LDM;
AltName: Full=Cytochrome P450 51; AltName: Full=Cytochrome P450-14DM; AltName:
Full=Cytochrome P450-LIA1; Short=CYPLI; AltName: Full=Ergosterol biosynthesis protein 11;
AltName: Full=Sterol 14-alpha demethylase

MAIVETVIDGINYFLSLSVTQQISILLGVFPVYNLVWQYLYSLRKDRAPLVFYWIPWFGSAAS
YGQQPYEFFESC RKQYGDVFSFMLLGKIMTVYLGPKGHEFVFNAKLS DVSAEDAYKHLTTP
VFGKGVYDCPN SRLMEQKKFAKFALT TDSFKRYVP **KIREEILNYFVTDESFKLKEKTHGVA**
NVMKTQPEITIFTASRSLFGDEMRRIFDRSFAQLYSDLDKGFTPINFVFPNLPLPHYWRRDAA
QKKISATYMK EIKSRRE RGDIDPNRDLIDSLIHSTYKDG VKMTDQEIANLLIGILMGGQHTS
ASTSAWFLHLG EKPHLQDVYI QEVVELLKEKGGDLNDLTYEDLQKLPSVNNTIKETLRMH
MPLHSIFRKVTNPLRIPETNYIVPKGHYVLVSPGYAHTSERYFDNPEDFDPTRWD TAAKAN
SVSFNSSDEV DYGFGK VSKGVSSPYLPFGGGRHRCIGE QFAYVQLGTILTT FVYNLRWTIDGY
KVPDPDYSSMVLPTEPAEIIWEKRETCMF

Mrr1p [*Candida albicans* SC5314] (CA 5).

>sp|Q5A4G2.1|MRR1_CANAL RecName: Full=Multidrug resistance regulator 1

MSIATTPITPKSPKSTEPQVRKRKKVSTVCTNCRKRKIRCDRQHPCNNCIKSKKHNA CVYDD
GQVSPANFSTNGSSHGNTVPESRPYEESARIPRFD AEAPRKKSKPNTPNNERKNSKKSPDNT
VANNQQTASENEVTITLSELNMLKQRLQNIEANINAQSNPQSNPSYVPQTPAYPTQPNILPPP
SFNSWSPKQSNERV MFSPQQLTTNYNVSHTRGQSPSIQLPPLSFKDTPRASIDSAPLYSEMSP
PRSDLIASSLTSPESIQMSVSGDVVG VNPYLN ETETINFYDGYTSICVRDFRRVNHGPF AWSSL
MRKDKALSSLWNHILKKKEKKNVASQTFVFGQDVHEISQENTQLVASESNESETKFKKKTLE
TFGFNDVVPYDILKKKLQTQINKTTSPLGLTYEEQVNMELQLVDRIHQQLPKKKVLWKLID
RFFSLLYPFMPFLDEIDFRESVTKIIGET EYKDEKIKELKVEKRLDLAVIGVLLIILRMSYLSLFC
NKESVNEMRLKTTDPSPEAQDMKYLLQNPIGISLIDSAQNCLQYFDIFRKTSM PVLQCA YFLQ
LYHIFAPEDGDDGDGADTYALNSMVVRMAYSMGLNREPDNFKDVLNDKRQNH LGRKIWH
FLVIGDVHNSYAFGTPKLGDDFYDTKVPFIEEGNENLIDKSLDQYVTKSVFPGYFSIYNSVDQ
ILKLILSVSRRSKVSEICK **ILNQFEIGIAEQYGTLS DCLKPKENLIHIFARNMPVKMYISLKSFLV**
SVYFHLFLYYEHKNDLSLFFYLRLKLTGAGDIMPHYFELLGNSEVVCDMVINPKLIQIIHKA
NQINIALIIRVNMSIYRMKNSQHHAENCKKDDFYYSYKELCKFSSCLTRCAEVGIAAVSKLS
TRYYYAWKITKGHNFLKTTITSM EFFEYKESTNAQEITLPKYKLEQIADLENICEVALNKLKGT
SVMGDEFCSNVNYKKYKGDQTYSTSSSSSTPNKDSPLDSRKYTNDFGLDLVNNQEIDKIWL

QMLSLKSEEAAQQRRQQESQPFTSSQSQSQSPLTSANQGYMPRPESRRGSYYGNTPFALENLN
FDGFGGQSKSSNNGEADLSSFDFFVDLPFDQLFTN

Tac1p [*Candida albicans* SC5314] (CA 6).

>sp|A0A1D8PN96.1|TAC1_CANAL RecName: Full=Transcription factor TAC1; AltName:
Full=Transcriptional activator of CDR genes 1; AltName: Full=Zn(2)-Cys(6) DNA-binding domains
containing protein 2

MDTSSSSGTHPSTFNNLTKQQELTGNDPNDTNRKRIRVACDSCRRKKIKCNGSYPCGNCIQA
KNTSNCHFTERPVRKKLKPTKQDNKSTANSNGVSKRKYNDTFSGNSINIKTEKQENTTFGIN
DNKSSDLESRLSRIENSMSRMMHTLENFSQNFMTQAIRNNHSNSSMFNNNSLSPTPSEDFNKS
AFDSEEQQTSHSYKNLKDVRKDANELLKLRNWDEFVGTHTSITCIFSRESLDWMEKTLGSYGE
EYLTPIRNLPLVFHSELKPYIMKWIDPPVVDKLQRKKLLESPFPTDSKLIS **KLIDLYYEETSMIN**
ILVDESVRSLFAAYNNFAEPIATKRRRFLSELLMTSILLISLSCLTEDDFSEERITTPASST
SSNYSAAANLLGDYNKNRLIALQNSLENSAIFYYHRISVISEGLETVEALLMFIYVESNWLT
SFFNYTITVTIRFAQEIGLHRAETYNNDLEEATKRRKIWWFCYFFDIEFSFKSGKPPVINTND
VTTNSDEDLLRVITQLKQYGPLSPKDRMYSVCHTISTSLDLSGSDSICLDILKIIQSGDILDD
PFYFQFCALLQSRIRSNSYHDLFIASAEKRDFSSISNTLEKLNADMFEAMYLADAEAKPRFYN
DPKFTSVQASTGTSIRRDITLAMKLTFFSHLMIINRYPLMIATEDSKFDDRVIKFRNLSLDSART
ILMLIKGWHRESASALFYNWAIFYPVAAYLVLAIAINHPQLPESGTNLNLLIETSLSFFKSSK
QWNSSNDSQDKQQNSTICVNKIVAIELIVRLMLRVVIKVEYLHNNVEILANNPALQNLQEA
EEKFPDIFQNHAEFTSKMIALVGASPFGGCGSRNTSSCNLRDNSTNHGQNNMNPSPITNTNTY
NSNINTGSNSTGEPQVCYAQSPSYNASLSNIINNESTGRSPATSTINQSMMNENYDLFNDYLI
DNSAVNLPFSQFNNLPNFFFDNNLGI

C5 6 desaturase, partial [*Candida albicans*] (CA 7).

>WCC72268.1 C5 6 desaturase, partial [*Candida albicans*]

FSQIDFPSLPNLDSDFTNSTLISSNNFNISNVNPATIPSYLFSKIASYQDKSEIYGLAPKFFPATDF
INTSFLARSNIFRETLSLFIITTIFGWLLYFIVAYLSYVFVFDK **KIFNHPRYLKNQMSLEIKRATT**
AIPVMVLLTIPFFLLELNGYSFLYLDINECTGGYKAILWQIPKFILFTDCGIYFLHRWLHWPSV
YKVLHKPH



Anexo 8

Tabla comparativa de los niveles de expresión en cultivo de *Cándida albicans* en ausencia (control) y presencia de fluconazol (tratamiento).

<i>Cultivo de Candida albicans en ausencia de fluconazol</i>	<i>Cultivo de Candida albicans en presencia de fluconazol</i>
31 spots de expresión revelado en el gel de electroforesis bidimensional 2D en pI y masa molecular semejantes al cultivo en presencia de fluconazol	31 spots de expresión revelado en el gel de electroforesis bidimensional 2D en pI y masa molecular semejantes al cultivo en ausencia de fluconazol
	07 spots de expresión revelado en el gel de electroforesis bidimensional 2D sólo en presencia de fluconazol.

Anexo 9

Protocolo de Electroforesis Bidimensional (2D) Bio Rad

*Material*es

1. Micropipetas
2. puntas de 1 mL
3. puntas de 20-200 μ L
4. guantes de nitrilo o latex
5. tubos de 15 mL
6. tubos de 50 mL
7. tubos de 1.5 mL
8. gradillas para tubos
9. gradilla para geles grandes
10. criocajas
11. jeringas de 10 mL
12. jeringa Hamilton 20 μ L
13. vaso de precipitados
14. parafilm
15. pegamento adhesivo de barra
16. recipientes de plástico
17. matraces de 250 mL
18. probetas de diversos volúmenes (100 mL – 2 L)
19. vortex
20. centrifuga
21. potenciómetro
22. fuente de poder (rango 5000 V y una corriente de 110 mA)
23. cámara de 1D tubo de vidrio
24. embudo de acrílico para geles 1D
25. cámara de 2D
26. enfriador peltier para cámara de 2D
27. cristales para 2D
28. cassette para geles de 2D
29. Soporte universal
30. aro para recipientes
31. nuez para soporte universal
32. manguera de silicona
33. broches para manguera
34. acetatos
35. neoprenos del tamaño de los cristales de 2D

Reactivos

1. Agarosa
2. Acrilamida
3. Bis-acrilamida
4. Persulfato de amonio
5. TEMED
6. Tris base

7. Tris HCl
8. Glicina
9. SDS
10. Sacarosa
11. Polivinilpolipirrolidona (PVPP)
12. Urea
13. Tiourea
14. Tributildifosfato (TBP)
15. CHAPS
16. Ditiotreitól (DDT)
17. Brilliant blue G230
18. Isopropanol
19. Metanol
20. Fenol
21. Acetato de amonio
22. Coomassie
23. Anfolitas
24. NP-40

Procedimiento

Geles de 1D

1. Proceda hacer la extracción proteica como está descrito en el método: gel de acrilamida
2. Teniendo las muestras extraídas se almacenan a -80°C hasta su uso
3. Prepare alícuotas de acrilamida para los geles de 1D (ver tabla 1)
4. Corte los tubos capilares a 23.5 cm de largo (luz 3mm y 1mm de grosor)
5. Se coloca en el recipiente del embudo para preparar los geles de 1D con 6 mL de la alícuota de 1D
6. Se agregan anfolitas según sean las necesidades del experimento (ejemplo: 108.4 μL anfolitas 3-10 pH, suplementada con 162.1 μL anfolitas 6-8 pH) NOTA: suplementar con otro rango más estrecho de pH enriquece la ventana de entidades electroforéticas, permitiendo mejorar la visualización de las manchas del gel.
7. Se agrega a la alícuota 42.5 μL de Persulfato de amonio al 10% y 21 μL de TEMED
8. Teniendo la alícuota preparada con las anfolitas y el TEMED se colocan los capilares dentro del embudo para después colocar armar el embudo y el vial
9. Se sumerge con mucho cuidado dentro del contenedor para 1D, para que el agua entre por los orificios del embudo y suba por capilaridad la acrilamida en el tubo de vidrio
10. Se deja polimerizar 1 hora la acrilamida
11. Habiendo polimerizado el gel se procede a colocar cada capilar en la cámara de 1D agregando un empaque en la parte superior
12. Se coloca en la parte inferior de la cámara el buffer ácido agregando 1.4 mL de ácido fosfórico al 85% en 2L de agua ultra pura

13. Se colocan los capilares junto con la parte interna de la cámara y se agrega el buffer básico agregando 10 mL de NaOH 10N y 990 mL de agua ultra pura. NOTA: tener cuidado de no mezclar o salpicar por ningún motivo ambos buffer o de que no haya fugas, ya que esto ocasionara que no se de un enfoque de proteínas efectivo.
14. Teniendo ambos buffers colocados retire las burbujas de aire dentro de los capilares agregando el buffer básico con una jeringa hamilton
15. Coloque posteriormente de 30-50 μ L de buffer de solubilización en una dilución 2:1. NOTA: el buffer puede estar teñido con azul de bromofenol para mejorar su visualización. Este paso es importante ya que se evita el contacto de la muestra proteica con el NaOH
16. Cierre la cámara y conecte a la fuente de poder y proceda a realizar un pre-enfoque a 1000 V por 45 min.
17. Después quite la tapa y cargue con una jeringa hamilton 500 μ g de proteína extraídas y solubilizadas como esta descrito en método: gel de acrilamida
18. Cargada la muestra cierre la cámara y conectela a la fuente de poder a 1000 V/h durante 23.5 horas. NOTA: coloque alguna marca en el tubo para no perder el orden de las muestras.
19. Antes de terminar la corrida usted debe preparar los geles para 2D con 2 horas de anticipación (ver abajo). NOTA: si usted carece de experiencia en geles 2D tome sus precauciones y aumente el tiempo
20. Terminada la corrida de los geles de 1D retire el buffer básico de los capilares y coloque los capilares sobre hielo
21. Utilice una jeringa y un expulsor de geles
22. Retirado el gel, se coloca en un contenedor con buffer de equilibrio (ver tabla 2) y se deja incubando por 5 min cambie el buffer dos veces y deje otros 5 min. NOTA: existen métodos rápidos para visualizar las bandas de la 1D sin afectar la 2D.

Geles 2D

NOTA: Antes de que finalice la 1D usted debe preparar sus geles para la segunda dimensión

1. Antes de armar su caster gel verifique que todo su material esta previamente lavado y seco. NOTA: use mezcla crómica para lavar el material de vidrio
2. Arme el caster gel de 2D
3. Prepare el soporte universal con el vaso que contendrá la acrilamida para los geles de 2D
4. Prepare la disolución de acrilamida para los geles en un vaso de precipitados y sobre un agitador magnético NOTA: puede utilizar un clip en lugar de un magneto de mosca.
5. Teniendo la mezcla de los geles se coloca en el recipiente unido al caster gel evitando en todo momento hacer burbujas. NOTA: Generalmente se preparan los geles al 12%

6. Abra las pinzas de presión con mucho cuidado para que la acrilamida entre al caster y evitando la formación de burbujas. NOTA: si usted observa burbujas puede dar unos golpes sutiles al caster
7. La acrilamida debe llegar hasta el borde de los vidrios evitando derrames
8. Posteriormente agrega isopropanol al 50% y espere aprox. 1h o hasta alcanzar totalmente la polimerización observando el remanente en el vaso unido al caster gel. NOTA: varios factores como la temperatura y el oxígeno pueden afectar la polimerización, tome sus precauciones.
9. Habiendo terminada la polimerización desarme con mucho cuidado el caster gel
10. Lave con agua corriente los vidrios quitando los remanentes de la polimerización
11. Coloque los vidrios previamente lavados en una gradilla
12. Coloque las tripas de los geles de 1D y adhiéralas con agarosa al 1% y Tris-Gly-SDS 1X. NOTA: agregue azul de bromofenol en la agarosa para visualizar el frente de corrida.
13. Coloque los vidrios en la cámara de 2D.
14. Llene el tanque de la cámara con Tris-Gly-SDS 1X en la parte de abajo y coloque los empaques si su cámara los lleva.
15. Llene hasta donde indique su cámara en la parte superior con Tris-Gly-SDS 2X.
16. Cierre la cámara y programe su fuente de poder a 1000V/h durante 24 horas. NOTA: usted puede aumentar el voltaje y correr sus geles en menos tiempo, pero esto requiere de optimización.

Preparación de Reactivos para Electroforesis 1D y 2D

1. Electroforesis Gel Gradiente de 10 a 20% Sacarosa

1.1 Soluciones:

a) Solución Acrilamida 30:0,8

- Acrilamida 30 gr
- Bisacrilamida 0,8 gr
- H₂O psq 100 ml

b) Tampón Tris-HCl 1,5 M pH 8,8

- Tris PM = 121,1 36,33 gr
- H₂O psq 200 ml

c) Tampón Tris-HCl 1,0 M pH 6,8

- Tris Pm = 121,1 30,275
- H₂O psq 250 ml
- Acertar a pH para 6,8 com HCl

d) Tampón de la Muestra

	Diluido 5 ml	Tres veces 2,8 ml
Tris-HCl 1 M pH 6,8	400 μ l	800 μ l
SDS 20%	500 μ l	1000 μ l
Glicerol 87%	500 μ l	1000 μ l
Agua Milli Q	3,1 mll	-
Azul de Bromofenol 0,2%	30 μ l	60 μ l

e) Solución SDS 20%

- Sodio Dodecil Sulfato 2,000 gr
- H₂O psq 2,000 ml

f) Tampón de Corrida 10X

- Tris-HCl PM = 121,1 15,200 gr
- Glicina PM = 72,200 gr
- H₂O psq 300 ml
- Sodio Dodecil Sulfato 5,000 gr
- Corregir el pH para 8,3. Si el SDS no disuelve llevar a calentamiento.

g) Persulfato de Amonio (PSA) 10%

- Persulfato de de Amonio 100 mg=0,100 g
- H₂O psq 1000 ml

h) Temed Bioered – Concentrado

I. DTT 1 M

- DTT 0,3086
- H₂O psq 0,250

1.2 Método

Protocolo

A. Gel de Corrida

Soluciones	BIG GEL		MINI GEL	
	10 %	20%	10%	20%
Acrilamida 30:0,8	5,025 ml	9,975 ml	6,700 ml	13,300 ml
Sacarosa	-	2,250 gr	-	3,000 gr
Tris/HCl 1,5 M pH 8,8	3,750 ml	3,750 ml	5,000 ml	5,000 ml
SDS 20%	75 µL	75 µL	100 µL	100 µL
H2O Milli Q	6,150 ml	-	8,200 ml	-
PSA 10%	11,2 µL	45 µL	60 µL	15 µL
TEMED	06 µL	06 µL	07 µL	07 µL

Obs.- Retirar 1000 µL de cada recipiente antes de colocar el gel en la (s) placa (s)

B. Gel de Aplicación

Soluciones	BIG GEL		MINI GEL	
	5%		5%	
Acrilamida 30 : 0,8	1,875 ml		3,500 ml	
Tris/HCl 1,0 M pH 6,8	1,425 ml		2,600 ml	
SDS 20%	57 µL		105 µL	
H2O Milli Q	7,875 ml		14,700 ml	
PSA 10%	57 µL		120 µL	
TEMED	12 µL		25 µL	

Usar:

	Gel de Aplicación		Gel de Corrida	
	BIG GEL		MINI GEL	
Voltage Constante	100 V	160 V	60 V	100 V
Amperaje Constante	25 mA	30 mA	25 mA	40 mA

Electroforesis en Condiciones Nativas

A) Running Gel

% del Gel	Bis-Acrilamida	Tris-HCl 1 M pH 8,8	Agua Milli Q
18,7 %	18,7 ml	11, 2 ml	-----
17 %	17 ml	11, 2 ml	2,05 ml
15 %	15 ml	11, 2 ml	3,85 ml
12,5 %	12,5 ml	11,2 ml	6,35 ml
10 %	10 ml	11,2 ml	8,85 ml
7,5 %	7,5 ml	11,2 ml.	11,35 ml

Después de mezclar los reactivos, adicionar:

10 µL de TEMED

100 µL de PSA 10% (Persulfato de amonio) hecho en la hora

B) Stacking Gel

% del gel	Bis-Acrilamida	Trsi-HC 1 M pH 6,8	Agua Milli Q
5 %	1,7 ml	1,25 ml	7,0 ml
3 %	1 ml	1,25 ml	8,95 ml

Después de mezclar los reactivos, adicionar:

5 µL de TEMED

50 µL PSA 10% (Persulfato de amonio) hecho en la hora

C) Running Buffer

Tris

30,3 gr

Glicina pH = 8,3

144,2 gr

Agua Milli Q qps

1000 ml

Obs. Antes de usar diluir 10X y acertar el pH para 8,3

A) Preparación de Suple Buffer (SB)

Reactivos	Volume	[] final
Glicerol	0,25 ml	10 %
Tris 1 M pH = 6,8	0,2 ml	0,08 %
Azul de Bromofenol	0,125 ml	0,2 %
Agua Milli Q	0,75 ml	0,2 %

OBS: En el caso de que su muestra ya contenga glicerol, adicionar lo correspondiente en agua.

B) Preparación del Stain y Desain

Solución	Metanol	Ac.Acetico	C.Blue	Agua Milli Q
Stain	400 ml	100 ml	500 mg	500 ml
Destain	400 ml	100 ml	-----	500 ml

Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Para quatro placas mini gel. (Para todos os casos preparar la mitad).

A. Running Gel

% del Gel	Bis-Acrilamida	Tris-HCl 1M pH 8,8	Agua Milli Q	SDS 20%
18,7 %	18,7 ml.	11,2 ml.	-----	0,15 ml.
17 %	17 ml.	11,2 ml.	1,9 ml.	0,15 ml
15 %	15 ml.	11,2 ml.	3,7 ml.	0,15 ml.
12,5 %	12,5 ml.	11,2 ml.	6,2 ml.	0,15 ml.
10 %	10 ml.	11,2 ml.	8,7 ml.	0,15 ml.
7,5 %	7,5 ml.	11,2 ml.	11,2 ml.	0,15 ml

Después de mezclar los reactivos, adicionar:

10 a 20 µl. de TEMED

100 µl de PSA 10% (hecho em la hora)

B. Stacking Gel

% del gel	Bis-Acrilamida	Tris-HCl 1M pH 6,8	Agua Milli Q	SDS 20 %
5%	1,7 ml.	1,25 ml.	7,0 ml.	0,05 ml.
3%	1 ml.	1,25 ml.	7,7 ml.	0,05 ml.

Después de mezclar los reactivos adicionar :

5 µl. de TEMED
50 µl. De PSA 10%

- C. Running Buffer (Tampón de corrida 10X Tris-HCl 0,025M)
- | | |
|--------------------------|----------|
| Tris | 15,2 gr. |
| Glicina | 72,2 gr. |
| H ₂ O milli Q | 500 ml. |
| SDS | 5 gr. |

Colocar aproximadamente 300 ml. De água y ajustar pH para 8,3, después adicionar 5,0 gr. de SDS (si no se disuelve, llevar a calentamiento).

OBS. Antes de usar diluir 10X o RB, y acertar el pH para 8,3

Generalmente se prepara 250 ml. De RB, (25 ml. De RB y completar para 250 ml. Con agua milli-Q).

Considerar que es para 4 placas la preparación del gel, si fueran 2 hay que reducir a la mitad las cantidades.

GEL DE TRICINA – SDS-PAGE – Analytical Biochemistry 166; 368 – 375 (1987)

01 . Soluções

A . Tampão Catodo Tris-HCl 0,1 M / Tricina 0,1M / SDS 0,1% pH 8.25

B . Tampão Anodo Tris-HCl 0,2 M pH 8.90

C . Tampão do Gel Tris-HCl 3,0 M / SDS 0,3 % pH 8.43

D . Solução de Acrilamida e Bisacrilamida 49,5%T; 3 %C

- | | |
|--------------------------------------|------|
| - Porcentagem de Acrilamida (w/v) | 48,0 |
| - Porcentagem de Bisacrilamida (w/v) | 1,5 |

E . Solução de Acrilamida e Bisacrilamida 49,5%T; 6 %C

- | | |
|--------------------------------------|------|
| - Porcentagem de Acrilamida (w/v) | 46,5 |
| - Porcentagem de Bisacrilamida (w/v) | 3,0 |

Obs.: T = Total percentage concentration of both monomers (Acrilamida e Bisacrilamida).
C = Total percentage concentration of the crosslinker

02 . Método e Protocolo

A . Para Big-Gel

Porcentagem do gel	Solução 49,5%T; 3%C	Solução 49,5%T; 6%C	Tampão do Gel	Glicerol	Ureia	H ₂ O
Spacer Gel	6,1 ml	-	10 ml	-	-	13,9 ml
10%T; 3%C	6,1 ml	-	10 ml	4,0 gr	-	9,9 ml
16,5%T; 3%C	10 ml	-	10 ml	4,0 gr	-	9,9 ml
16,5%T; 6%C	-	10 ml	10 ml	4,0 gr	-	9,9 ml
16%T; 6%C 6M Ureia	-	10 ml	10 ml	-	10,8 gr	9,9 ml

PSA 10 % 100 μ L
TEMED 10 μ L

B . Para Mini-Gel

Porcentagem do gel	Solução 49,5%T; 3%C	Solução 49,5%T; 6%C	Tampão do Gel	Glicerol	Ureia	H ₂ O
Spacer Gel	3,05 ml	-	5 ml	-	-	6,95 ml
10%T; 3%C	3,05 ml	-	5 ml	2,0 gr	-	4,95 ml
16,5%T; 3%C	5 ml	-	5 ml	2,0 gr	-	4,95 ml
16,5%T; 6%C	-	5 ml	5 ml	2,0 gr	-	4,95 ml
16%T; 6%C 6M Ureia	-	5 ml	5 ml	-	5,4 gr	4,95 ml

PSA 10 % 50 μ L
TEMED 10 μ L

C . Stacking Gel

	Solução 49,5%T; 3%C	Solução 49,5%T; 6%C	Tampão do Gel	Glicero l	Ureia	H ₂ O
STACKING GEL	1,0 ml	-	3,1 ml	-	-	8,40 ml

PSA 10 % 100 μ L
TEMED 10 μ L

Preparación de soluciones:

- PSA 10 % (Persulfato de amonio)
10 gr PSA ----- 100 ml de Agua
0,1 g PSA ----- 1 ml de Agua
OBS: Preparar en el día y conservar com papel de aluminio
- Acrilamida / Bisacrilamida 30 : 0,8
Para 100 ml.:
30 gr. De acrilamida
0,8 gr de bisacrilamida
- Reparo de la Bis-Acrilamida
0,8 gr de Bis ----- 30 gr de acrilamida ----- 100 ml agua
- Tris-HCl 1 M pH 8,8
Para 500 ml:
60,55 gr
Corregir pH para 8,8 com HCl
- Tris-HCl 0.5M pH 6,8
Para 500 ml.
60,55 gr
Corregir pH para 6,8 com HCl
- Tampón de la muestra
Concentraciones finales
Tris-HCl 0,08 M pH 6,8

SDS 2%
Glicerina 10%
Azul de Bromofenol 0,02%

Cantidades para 5 ml. (usando soluciones stock)

SDS 20%	500 µL
Glicerol 87%	500 µL
Tris-HCl 1M pH 6,8	400 µL
Agua	3,1ml
Bromofenol 0,2 %	25 – 30 µL

6. SDS 20%
Para 100 ml. de agua.:
20 gr de Sodio dodecil sulfato

7. Tampón de Corrida 10X
Concentraciones finales
Tris-HCl 0,025 M pH 8,3
Glicina 0,18 M
SDS 1%

Para 500 ml
15,2 gr Tris
72,2 glicina,
Colocar aprox. 300 ml. de agua y ajustar pH para 8,3. Después adicionar 5,0 gr de SDS (Si no disuelve, llevar a calentamiento).

8. Persulfato de Amônio (PSA) 10%
100 mg/ml
Para 500 µl : 50 mg de PSA (0,0500 g)

9. TEMED
Bio Rad ya listo

10. DTT 1 M
Masa : 154,3
Para : 5 ml. : 0,7715
Para : 2,5 ml. : 0,3086 g

11. Colorante Azul de Coomasie
Para 250 ml.
Coomasie blue R-250 0,25% : (0,0625 g)
Metanol 40% (100 ml.)
Acido acético 10% (25 ml.)
Agua 50% (125 ml.)

12. Descolorante
Para 1000 ml.
Metanol 40% (400 ml.)
Acido acético 10% (100 ml.)
Água 50% (500 ml.)

Método:

- a) Fijación por 10 minutos en TCA 5%
- b) Impregnación con solución colorante por overnight
- c) Revelación visual, colocar el gel, en solución descolorante
- d) Parar la reacción del colorante, colocar el gel en agua

13. Coloración por plata

13.1 Soluciones :

- | | | |
|----|-----------------------------|--------------|
| A. | Solución fijadora | |
| | - Alcohol metílico 40 % | 40 ml |
| | - Acido acético 10 % | 10 ml. |
| | - Formol | 100 ml. |
| | - H2O psq | 100 ml. |
| B. | Etanol 50% | |
| | - Alcohol etílico | 50 ml. |
| | - H2O psq | 100 ml. |
| C. | Solución reductora 0,02% | |
| | - Tiosulfato de sodio | 0,04 gr. |
| | - H2O | 200 ml. |
| D. | Solución colorante 0,2% | |
| | - Nitrato de plata | 0,2 gr. |
| | - H2O psq | 100 ml. |
| | - Formol | 100 µl. |
| E. | Solución Reveladora 3 – 6 % | |
| | - Carbonato de sodio | 3-6 gr. |
| | - Solución reductora 0,02 % | 4 ml. |
| | - H2O psq | 100 ml. |
| | - Formol | 100-150 µl.* |

13.1 Método

- a) Fijación por una hora con agitación u overnight a 4C
- b) Lavada 2 con etanol 50% 3 veces por 20 minutos.
- c) Oxidación, por una hora agitando.
- d) Lavada 2 con agua destilada, 3 veces por 20 minutos.
- e) Impregnación con colorante de plata por 20 min. Agitando.
- f) Lavada 3 con agua destilada, 3 veces por 20 minutos.
- g) Parar la reacción con ácido acético 5%