



**UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR**

**“ANÁLISIS DEL PERFIL DE PROTEÍNAS DE LA PARED  
CELULAR DE *C. glabrata* Y *C. parapsilosis* RESISTENTES AL  
FLUCONAZOL”**

**TESIS**

**Que para obtener el grado de Maestro en Biología Molecular y  
Celular**

**PRESENTA**

**Q.F.B KARINA CORRAL PÉREZ**

**Durango, Dgo.**

**Agosto 2018**



**UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR**

**“ANÁLISIS DEL PERFIL DE PROTEÍNAS DE LA PARED  
CELULAR DE *C. glabrata* Y *C. parapsilosis* RESISTENTES AL  
FLUCONAZOL”**

**TESIS**

Que para obtener el grado de Maestro en Biología Molecular y Celular

**PRESENTA**

**Q.F.B KARINA CORRAL PÉREZ**

**Durango, Dgo.**

**Agosto 2018**



**UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR**

**“ANÁLISIS DEL PERFIL DE PROTEÍNAS DE LA PARED  
CELULAR DE *C. glabrata* Y *C. parapsilosis* RESISTENTES AL  
FLUCONAZOL”**

**TESIS**

**Que para obtener el grado de Maestro en Biología Molecular y  
Celular**

**PRESENTA**

**Q.F.B KARINA CORRAL PÉREZ**

**APROBADA POR EL DIRECTOR DE TESIS**

---

**D.C. ESTELA RUÍZ BACA**

**Durango, Dgo.**

**Agosto 2018**



**UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR**

**“ANÁLISIS DEL PERFIL DE PROTEÍNAS DE LA PARED  
CELULAR DE *C. glabrata* Y *C. parapsilosis* RESISTENTES AL  
FLUCONAZOL”**

**TESIS**

**Que para obtener el grado de Maestro en Biología Molecular y  
Celular**

**PRESENTA**

**Q.F.B KARINA CORRAL PÉREZ**

**APROBADA POR EL COMITÉ TUTORAL**

**D.C ESTELA RUÍZ BACA**

\_\_\_\_\_

**D.C MA. LETICIA SAUCEDO MENDIOLA**

\_\_\_\_\_

**D.C ANGÉLICA MARÍA LÓPEZ RODRIGUEZ**

\_\_\_\_\_

**Durango, Dgo.**

**Agosto 2018**

## **DEDICATORIA**

A mis hermanas, amigos, a mis padres y personas que se han sumado a mi vida y han logrado ser parte importante de ella a lo largo de cada etapa de mis estudios.

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi principal agradecimiento es para mis padres José Luis Corral Martínez y Esperanza Pérez Covarrubias, quienes me han motivado a seguir adelante para ser una profesionista, por su amor incondicional, pero sobre todo por su apoyo moral y económico.

A mis hermanas, quienes estuvieron conmigo en gran parte de mi recorrido para llegar a esta etapa final y brindarme consejos.

A mi asesora de tesis D.C Estela Ruíz Baca, por el apoyo, orientación, tiempo y conocimientos que compartió conmigo para el desarrollo de mi proyecto de tesis.

A mis profesores, quienes compartieron sus conocimientos en cada uno de los semestres que me impartieron clases.

A mis compañeros de estudio, quienes me brindaron su amistad y compañía en cada una de las etapas de la maestría hasta el final.

Finalmente, a cada una de las personas que sumaron cosas positivas a mi vida durante este gran reto que me propuse hace dos años.

## ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Micromolar
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
BrEt	Bromuro de etidio
CI	Candidiasis invasiva
CDR1	Región determinante de la complementariedad 1
CDR2	Región determinante de la complementariedad 2
DEPC	Dietilpirocarbonato
DIGE	Electroforesis diferencial en gel
DNTPs	Desoxirribonucleótidos
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas

ESI	Ionización por electrospray
h	Hora
HCl	Ácido clorhídrico
ICAT	Etiqueta de afinidad codificada por isótopos
IEF	Isoelectroenfoque
KOH	Hidróxido de potasio
kDa	Kilodalton
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LC-MS/MS	Espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida
LC-ESI-HDMS <sup>E</sup>	Espectrometría de masas por ionización por electrospray acoplada a cromatografía líquida
min	Minutos
MALDI	Desorción ionización asistida por láser
MALDI-TOF	Desorción ionización asistida con láser en matriz
PAS	Ácido periódico de Schiff
PAGE-2D	Electroforesis en geles de poliacrilamida bidimensionales
pb	Pares de bases
PC	Pared celular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

pH	Potencial de Hidrógeno
PI	Punto isoeléctrico
PM	Peso molecular
PMSF	Fenilmetilsulfonyl fluoruro
PPC	Proteínas de pared celular
R	Resistente
RF	Resistente con fluconazol
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscripción
S	Sensible
s	Segundos
S-DD	Susceptible dependiente de la dosis
SDS	Dodecilsulfato sódico
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SELDI-TOF	Desorción- ionización asistida con láser en superficie
UCI	Unidad de cuidados intensivos
YPG	Extracto de levadura, peptona de caseína y Dextrosa

# ÍNDICE

	Páginas
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>I</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>II</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>III</b>
<b>ÍNDICE</b> .....	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>IX</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>X</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XII</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Candidiasis .....	1
1.1.2 <i>Candida</i> spp.....	1
1.1.3 Formas clínicas.....	3
1.2 Epidemiología .....	4
1.3 Factores de patogenicidad.....	5
1.3.1 Capacidad de adherencia de las levaduras a diferentes superficies .....	5
1.3.2 Producción de enzimas extracelulares .....	6
1.3.3 Formación de biopelículas .....	6
1.3.4 Morfogénesis .....	7
1.4 Pared celular.....	8
1.5 Diagnóstico .....	10
1.6 Tratamiento.....	10
1.6.1 Antifúngicos .....	11
1.7 Mecanismos de resistencia.....	13
1.7.1 Resistencia a los azoles .....	14
1.7.2 Resistencia a las equinocandinas.....	15
1.7.3 Resistencia a los polienos .....	15
1.8 Herramientas utilizadas para el estudio de los mecanismos de resistencia fúngica .....	16
1.8.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida en dos dimensiones .....	17
1.8.2 Espectrometría de masas .....	18
1.8.3 Otras técnicas proteómicas .....	19
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	<b>21</b>

<b>III. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>26</b>
<b>IV. HIPÓTESIS</b> .....	<b>27</b>
<b>V. OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
5.1 Objetivo general .....	28
5.2 Objetivos específicos .....	28
<b>VI. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
6.1 Organismo y condiciones de cultivo .....	29
6.2 Extracción de proteínas de la pared celular (PPC) .....	29
6.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE).....	30
6.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida en dos dimensiones (PAGE-2D) 30	
6.5 Identificación de proteínas mediante Espectrometría de Masas LC-ESI- HDMSE <sup>E</sup> .....	31
6.6 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa .....	31
6.6.1 Extracción de RNA.....	31
6.6.2 Retrotranscripción.....	32
6.6.3 Amplificación del gen de interés por PCR punto final .....	32
6.7 Análisis estadístico.....	33
<b>VII. RESULTADOS</b> .....	<b>34</b>
7.1 Extracción de proteínas de la pared celular (PPC) .....	34
7.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS- PAGE) .....	34
7.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida en dos dimensiones (PAGE-2D) .....	35
7.4 Identificación de proteínas mediante Espectrometría de Masas LC-ESI- HDMSE <sup>E</sup> .....	39
7.5 Validación de los datos proteómicos mediante RT-PCR.....	40
7.5.1 Extracción de ARN.....	41
7.5.2 Retrotranscripción (RT).....	42
7.5.3 Amplificación del gen de interés por PCR punto final .....	43
<b>VIII. DISCUSIONES</b> .....	<b>46</b>
<b>IX. CONCLUSIONES</b> .....	<b>50</b>
<b>X. REFERENCIAS</b> .....	<b>51</b>
<b>XI. ANEXOS</b> .....	<b>57</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág
<b>Figura 1</b>	Morfología microscópica y macroscópica de <i>Candida</i> spp.....	2
<b>Figura 2</b>	Formas clínicas de candidiasis superficial.....	3
<b>Figura 3</b>	Adherencia de una levadura a la mucosa del intestino.....	6
<b>Figura 4</b>	Fases de formación de biopelículas de <i>Candida</i> spp <i>in vitro</i>	7
<b>Figura 5</b>	Micrografía de una hifa verdadera, levadura (blastoporas) y la forma pseudohifa de <i>C. albicans</i> .....	8
<b>Figura 6</b>	Esquema de la pared celular de <i>C. albicans</i> .....	9
<b>Figura 7</b>	Mecanismos de acción de las principales familias de antifúngicos de uso clínico.....	13
<b>Figura 8</b>	Mecanismos de resistencia a los azoles en <i>C. albicans</i> .....	15
<b>Figura 9</b>	Esquema de electroforesis bidimensional.....	18
<b>Figura 10</b>	Análisis de PPC de <i>C. glabrata</i> S, R y RF y <i>C. parapsilosis</i> S, R y RF mediante SDS-PAGE.....	35
<b>Figura 11</b>	Análisis del perfil de PPC de <i>C. glabrata</i> S, R y RF mediante PAGE-2D.....	37
<b>Figura 12</b>	Análisis del perfil de PPC de <i>C. parapsilosis</i> S, R y RF mediante PAGE-2D.....	38
<b>Figura 13</b>	Análisis de la integridad del ARN extraído de las cepas S, R y RF de <i>C. glabrata</i> mediante electroforesis.....	42
<b>Figura 14</b>	Análisis de la integridad del ARN extraído de las cepas S, R y RF de <i>C. parapsilosis</i> mediante electroforesis.....	42
<b>Figura 15</b>	Productos de amplificación de los genes <i>GMP1</i> , <i>ADH1</i> y <i>TUB2</i> de las cepas S, R y RF de <i>C. glabrata</i> .....	44
<b>Figura 16</b>	Productos de amplificación de los genes <i>ENO1</i> , <i>FBA1</i> y <i>TUB2</i> de las cepas S, R y RF de <i>C. parapsilosis</i> .....	44
<b>Figura 17</b>	Análisis de la expresión de genes en las cepas S, R y RF de <i>C. glabrata</i> y <i>C. parapsilosis</i> por RT-PCR.....	45

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág</b>
<b>Tabla 1</b> Oligonucleótidos utilizados en este estudio.....	33
<b>Tabla 2</b> Cuantificación de PPC de <i>C. glabrata</i> y <i>C. parapsilosis</i> .....	34
<b>Tabla 3</b> Proteínas identificadas por espectrometría de masas acoplada a LC-ESI-HDMS <sup>E</sup> en <i>C. glabrata</i> .....	39
<b>Tabla 4</b> Proteínas identificadas por espectrometría de masas acoplada a LC-ESI-HDMS <sup>E</sup> en <i>C. parapsilosis</i> .....	40
<b>Tabla 5</b> Cuantificación del ARN extraído de las cepas S, R y RF de <i>C. glabrata</i> y <i>C. parapsilosis</i> .....	41
<b>Tabla 6</b> Cuantificación del ADNc sintetizado por RT de las cepas S, R y RF de <i>C. glabrata</i> y <i>C. parapsilosis</i> .....	43

## RESUMEN

**INTRODUCCIÓN.** Las proteínas de pared celular (PPC) fúngica se consideran potentes inmunomoduladores como blancos antifúngicos. Hasta la fecha, no se han realizado estudios sobre PPC de cepas resistentes de *Candida* a los antifúngicos. La identificación y caracterización de proteínas relacionadas a la resistencia antifúngica nos permite identificar genes y mecanismos relacionados a la resistencia antifúngica; este conocimiento podría ser de ayuda para diseñar nuevas herramientas terapéuticas.

**METODOLOGIA.** Para analizar las PPC de *C. glabrata* y *C. parapsilosis* resistentes al fluconazol, las cepas sensibles (S) y resistente (R) de ambas especies, fueron cultivadas en medio YPD con y sin fluconazol por 7 h. Las células fueron cosechadas por centrifugación, lavadas, y rotas mecánicamente con perlas de vidrio. Primero, las PC fueron obtenidas por centrifugación, luego lavadas y liofilizadas. Las PPC fueron extraídas con SDS y  $\beta$ -mercaptoetanol y después se precipitaron con etanol al 70%. Las PPC se analizaron mediante geles PAGE-2D y los spots seleccionados fueron secuenciados por espectrometría de masas acoplada a LC-ESI-HDMS. La validación de los datos proteómicos se realizó evaluando la expresión de dos genes que codifican para las PPC seleccionadas de cada especie a nivel transcripcional mediante RT-PCR. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa teñidos con BrEt y analizados utilizando un software ImageJ 1.51j8 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Los datos fueron analizados por ANOVA y T de Student. Una  $p < 0.05$  fue considerada estadísticamente significativa. Para el análisis estadístico se utilizó el software IBM SPSS v. 21.0.

**RESULTADOS.** Una expresión diferencial de 15 y 17 proteínas fue observada en los análisis PAGE-2D de PPC de *C. glabrata* (S, R y RF) y *C. parapsilosis* (S, R, y RF) respectivamente, de las cuales se eligieron 6 proteínas para cada especie cuya expresión diferencial fue mayor en comparación al resto. Estas proteínas se identificaron mediante espectrometría de masas acoplada a LC-ESI-HDMS. Las proteínas identificadas fueron Adh1, Fba1, Subunidad ribosomal 40S, Bmh1p, Gmp1, Quinona, Pst2p, Pre1 en *C. glabrata* y Eno1, Pgk, Fba1, Erg6, Cetoácido

reductoisomerasa, Bmh1p en *C. parapsilosis*. Se eligieron los genes *ENO1/FBA1* de *C. parapsilosis* y *GMP1/ADH1* de *C. glabrata* para validar los datos proteómicos mediante RT-PCR. Los valores numéricos de las intensidades de las bandas arrojados por El software Image J 1.51j8 fueron normalizados con el gen constitutivo *TUB2*. En *C. glabrata*, la expresión de *GMP1* entre la cepa S y R, así como R y RF fue significativa; mientras que la *ADH1* entre la cepa S y R también fue significativa. En *C. parapsilosis*, la expresión de *ENO1* entre la cepa R y RF fue significativa; mientras que la de *FBA1* en ninguna de las cepas mostró significancia.

**CONCLUSIONES.** Nuestros resultados sugieren que las proteínas identificadas están asociadas a la PC y pudieran estar involucradas en los mecanismos de resistencia a la familia de los azoles en *C. glabrata* y *C. parapsilosis*.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION.** Cell Wall proteins (CWP) are considered potent immunomodulators as antifungal targets. To date, studies on CWP of resistant strains of *Candida* to antifungals have not been carried out. The identification and characterization of proteins related to antifungal resistance allows us to identify genes and mechanisms related to antifungal resistance; this knowledge could be used to design new therapeutic tools.

**METHODOLOGY.** To analyze the CWP of *C. glabrata* and *C. parapsilosis* resistant to fluconazole, the susceptible (S) and resistant (R) strains of both species were cultured in YPD medium with and without fluconazole for 7 h. The cells were harvested by centrifugation, washed, and mechanically broken with glass beads. First, the CWs were separated by centrifugation, then washed and lyophilized. The CWPs were extracted with SDS and  $\beta$ -mercaptoethanol and then precipitated with 70% ethanol. The CWPs were analyzed by PAGE-2D gels and the spots were sequenced by mass spectrometry coupled to LC-ESI-HDMS. The validation of the proteomic data was performed by evaluating the expression of the genes that code for the CWP selected from each species at the transcriptional level by RT-PCR. The PCR products were visualized on agarose gels stained with BrEt and analyzed using ImageJ 1.51j8 software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). The data were analyzed by ANOVA and Student's T test. A  $p < 0.05$  was considered statistically significant. The IBM SPSS v. Software was used for the statistical analysis. 21.0.

**RESULTS.** A differential expression of 15 and 17 proteins was observed in the PAGE-2D analyzes of CWP of *C. glabrata* (S, R and RF) and *C. parapsilosis* (S, R, and RF) respectively, of which 6 proteins were chosen for each species whose expression was greater in comparison to the rest. These proteins were identified by mass spectrometry coupled to LC-ESI-HDMS. The proteins identified were Adh1, Fba1, 40S ribosomal subunit, Bmh1p, Gmp1, Quinone, Pst2p, Pre1 in *C. glabrata* and Eno1, Pgk, Fba1, Erg6, Ketoacid reductoisomerase, Bmh1p in *C. parapsilosis*. The genes *ENO1 / FBA1* of *C. parapsilosis* and *GMP1 / ADH1* of *C. glabrata* were chosen to validate the proteomic data by RT-PCR. The numerical values of the band intensities thrown by the software Image J 1.51j8 were normalized with the

constitutive gene *TUB2*. In *C. glabrata*, the expression of *GMP1* between S and R strain, as well as R and RF was significant; while the *ADH1* between S and R strain was also significant. In *C. parapsilosis*, the expression of *ENO1* between R and RF strain was significant; whereas the *FBA1* in none of the strains showed significance.

**CONCLUSIONS.** Our results suggest that the identified proteins are associated with the cell wall and may be involved with the mechanisms of resistance to the azole family in *C. glabrata* and *C. parapsilosis*.

# I. INTRODUCCIÓN

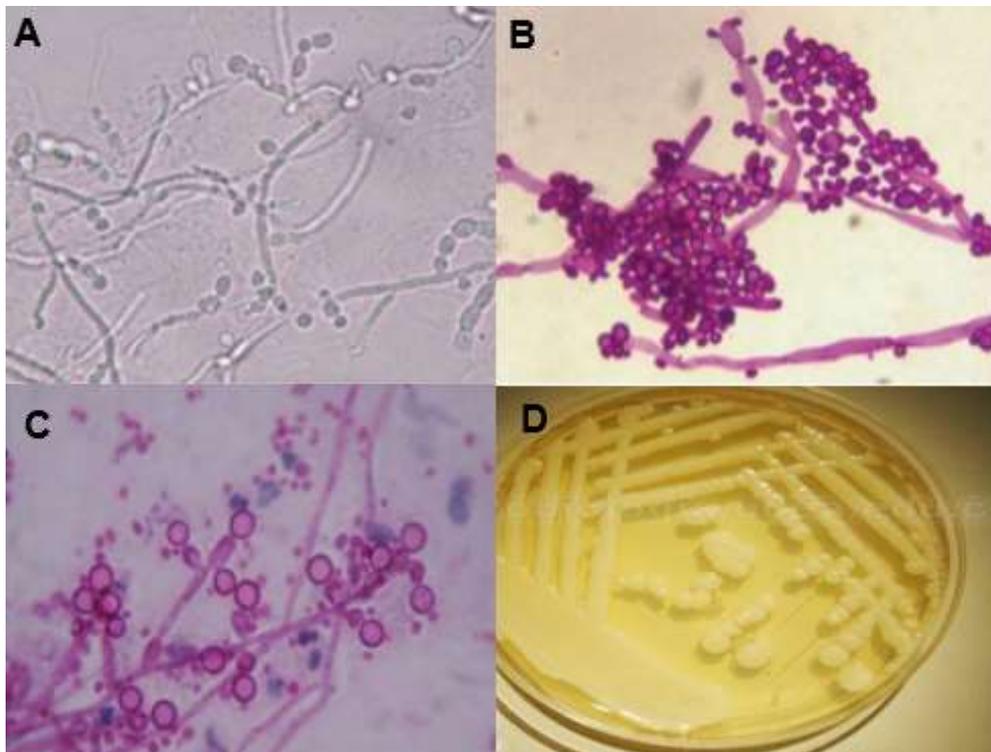
## 1.1 Candidiasis

La candidiasis es una micosis infecciosa no contagiosa producida por algunas especies de levaduras pertenecientes al género *Candida*. *Candida* spp son microorganismos principalmente oportunistas que pertenecen a la flora saprofita habitando el tracto gastrointestinal, sistema urogenital y membranas mucosas de las vías respiratorias (Gołębek *et al.*, 2015). Se ha presentado recientemente un incremento de la enfermedad, posiblemente por la mayor exposición a los factores de riesgo, los cuales incluyen el tratamiento con esteroides, citostáticos o inmunosupresores, el incremento del SIDA, el trasplante de órganos y las enfermedades como la diabetes, la leucemia y el linfoma. Los recién nacidos y los ancianos son más propensos al desarrollo de infección por *candida*. La candidiasis superficial (infección de las membranas mucosas, de la piel y de las uñas) es una de las formas clínicas más comunes, es característicamente crónica y recurrente; además puede ser el inicio de una candidiasis sistémica o invasiva (Palacios *et al.*, 2011).

### 1.1.2 *Candida* spp

*Candida* spp son levaduras eucariotas diploides representativos del reino fungi, encontrándose más de 200 tipos de especies en la actualidad. *Candida*, necesita un huésped con alteraciones inmunitarias para ir más allá de la colonización de epitelios (Vega-Sánchez *et al.*, 2015). Las especies del género *Candida* son muy heterogéneos, crecen como levaduras (blastoporas que miden entre 2 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro), con la mayoría de las especies produciendo un crecimiento filamentosos (pseudohifas o pseudomicelio), algunas especies también pueden producir auténticas hifas y/o clamidiosporas (Fig. 1) (Lim *et al.*, 2012). Taxonómicamente, pertenece al filo *Ascomycetes*, clase *Blastomycetes*, orden *Cryptococcales*, familia *Cryptococcaceae* y género *Candida* (Palacios *et al.*, 2011).

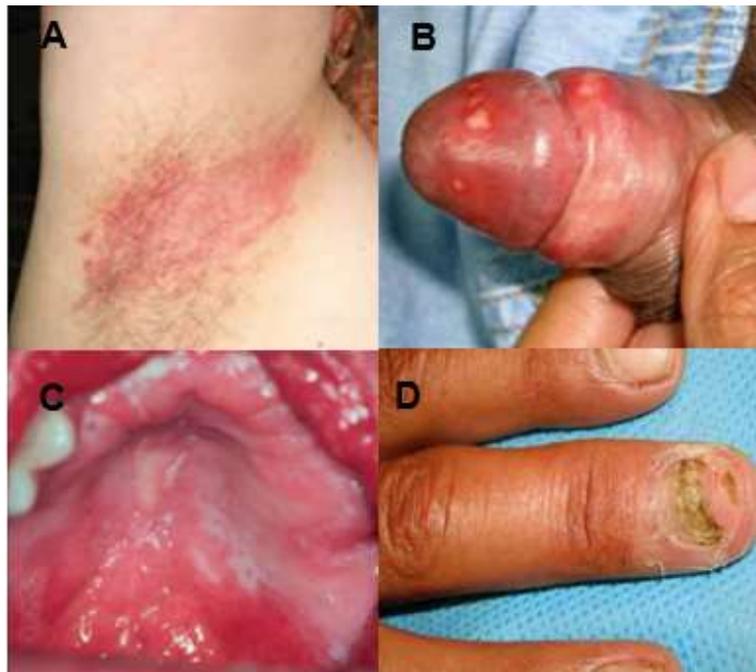
Actualmente se han distinguido 16 especies patógenas de *Candida*: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. pelliculosa*, *C. kefyr*, *C. lipolytica*, *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. rugosa*, *C. norvegensis* y *C. auris* (Gołabek et al., 2015), siendo *C. albicans* el agente causal más común de candidiasis superficiales y sistémicas (Reyes y Arenas, 2007). Recientemente *C. auris* ha sido una especie preocupante por su potencial para la transmisión nosocomial y su capacidad para desarrollar resistencia a todas las clases de antifúngicos, la cual surgió como una nueva causa de candidemia y candidiasis invasiva en 2009 (Riat et al., 2018).



**Figura 1. Morfología microscópica y macroscópica de *Candida* spp.** **A)** Examen directo de *Candida* spp, se observan pseudohifas (KOH, 10%, 40x). **B)** Pseudohifas y blastosporas de *Candida* spp (PAS, 100x). **C)** Clamidoconidios en medio de agar de harina de maíz (PAS, 60x). **D)** Cultivo de *Candida* spp en Agar Sabouraud dextrosa: Colonias lisas, plegadas, rugosas o membranosas, brillantes, de color blanco o ligeramente beige (Bonifaz, 2012).

### 1.1.3 Formas clínicas

Las candidiasis superficiales se clasifican en: cutánea, mucosa (oral, vulvo-vaginal y balano-prepucial), unguilar, mucocutánea crónica y granulomatosa, presentándose con mayor frecuencia (Fig. 2) (Palacios *et al.*, 2011). La Candidiasis Invasiva (CI) o sistémica engloba una amplia variedad de enfermedades graves oportunistas, que incluye candidemia, endocarditis, meningitis, endoftalmitis y afectación de diversos órganos profundos, son de evolución aguda o crónica y generalmente severas. *C. albicans* es la causa más común de la candidemia, pero en los últimos años se ha aumentado el aislamiento de especies no-*albicans* de *Candida*, entre los más destacados se tienen a *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei* (El Ahmed *et al.*, 2012).



**Figura 2. Formas clínicas de candidiasis superficial. A)** Cutánea: Placa eritematosa con pápulas satélites en el pliegue axilar. **B)** Mucosa balano prepucial: placas blancas en pene sobre base eritematosa. **C)** Mucosa oral: Candidiasis pseudomembranosa: las placas blancas se desprenden al raspado. **D)** Ungular: Distrofia unguilar, cromoniquia y paroniquia secundaria a *Candida* spp (Palacios *et al.*, 2011; Rey *et al.*, 2015).

## 1.2 Epidemiología

En los últimos diez años se observó un importante incremento en las infecciones producidas por levaduras, debido probablemente a la utilización de procedimientos de diagnóstico y/o terapéuticos agresivos, así como al incremento de pacientes inmunocomprometidos. *Candida* spp es el principal agente causal a nivel mundial de infecciones producidas por levaduras (72,8 casos/millón de habitantes cada año) (Pemán y Quindós, 2016), y coloniza el tracto gastrointestinal y genitourinario en 30 a 60% de los seres humanos. Sin embargo, bajo condiciones de inmunosupresión pueden causar infecciones oportunistas denominadas candidiasis (Fuentes *et al.*, 2014). Se han descrito más de 200 especies de *Candida* asociadas a infecciones en el ser humano, siendo *C.albicans* la especie más común causante de candidiasis superficial e invasiva, en segundo lugar, se encuentra *C. glabrata* y en tercero *C. parapsilosis* (García- Vidal y Carratalà, 2012; Pais *et al.*, 2015).

*C. albicans* predomina en países del norte de Europa y Suiza (60%), fue igualmente aislada en los demás países de Europa y Estados Unidos (45-58%). En Asia y Sudamérica se aisló en menor proporción (40-42%). Por otro lado, las especies no *albicans* predominan en Asia. *C. glabrata* se reportó en estudios de Estados Unidos (18-24%) y en Reino Unido (22.7%), y los índices más bajos fueron reportados en Brasil y Kuwait (5.6%). *C. parapsilosis* se aisló frecuentemente en Kuwait (30.6%), Sudamérica (21.3%), España (23%) y Australia (19.9%), y en menor proporción en el Norte de Europa y Suiza. *C. tropicalis* se encontró en mayor proporción en Sudamérica (24.2%) y Taiwan (22.4%), en menor proporción en el Norte de Europa. *C. kruseii* fue la especie menos reportada en todas las regiones geográficas (en un rango de 1-4%). *C. auris* es la quinta causa más común de candidemia en la India y múltiples casos se han reportado en Pakistán, Corea del Sur, Israel, Kuwait, Sudáfrica, Kenya, Estados Unidos, Colombia y Venezuela. En Europa, los mayores brotes han ocurrido en London (UK) y Valencia (España). Otras especies de *Candida* se aislaron en un 9% de los casos (Falagas *et al.*, 2010). En América Latina (sin incluir a México) *C. albicans* se encontró en un 50%, *C. tropicalis* en 20% y *C. parapsilosis* en 16% (Riat *et al.*, 2018; Torre-Saldaña *et al.*, 2014).

La CI afecta a más de 250,000 personas por año en todo el mundo y provoca más de 50,000 muertes, ocupando el cuarto lugar a nivel mundial como la enfermedad más frecuente en el torrente sanguíneo, aunque esta estadística corresponde a las unidades de cuidados intensivos (UCI). Se ha descrito que la CI presenta una incidencia en América Latina de 2,49 casos /1,000 admisiones, lo que corresponde a 0,37 casos por cada 1,000 pacientes al día (Nucci *et al.*, 2010) con una mortalidad del 49% en pacientes enfermos y tan solo en México presenta una incidencia de 2 a 14 casos por 100,000 personas (Kullberg y Arendrup, 2015). Al año se tienen al menos 3.5 muertes por cada 100,000 habitantes (Corzo-León, 2015).

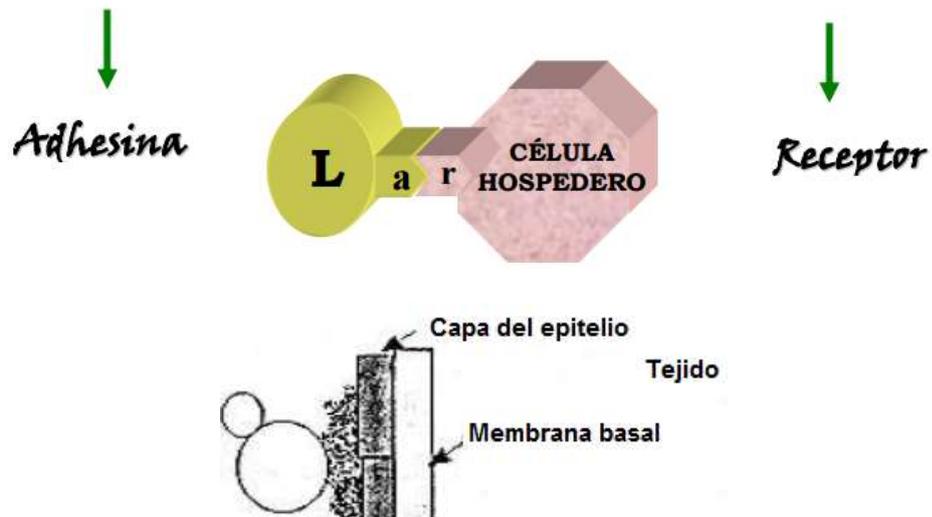
### **1.3 Factores de patogenicidad**

No existe un factor que pueda ser considerado por sí solo como responsable de la patogenicidad, sino que se ha propuesto una combinación de diferentes factores que contribuyen a una o más etapas de la infección.

Los principales factores de virulencia que han sido estudiados en profundidad para *C. albicans* (aunque algunos de ellos han sido encontrados en otras especies) son los siguientes:

#### **1.3.1 Capacidad de adherencia de las levaduras a diferentes superficies**

Es una interacción fuerte entre una adhesina de la levadura y un receptor de la célula del hospedero (Fig. 3). Una adhesina se define como una biomolécula que promueve la adherencia de *C. albicans* a las células del huésped o a sus ligandos específicos. Se han descrito proteínas de *C. albicans* que se unen a varias proteínas de la matriz extracelular de las células de mamífero, como fibronectina, laminina, fibrinógeno y colágeno tipo I y IV. Existen diferentes tipos de adhesinas en *Candida*, como Als, Hwp1p, Int1p y Eap1 (Rivera *et al.*, 2005).



**Figura 3. Adherencia de una levadura a la mucosa del intestino.** Se observa una levadura de *C. albicans* adherida a las células endoteliales del intestino, efecto que se presenta por la presencia de adhesinas en la levadura (Rivera *et al.*, 2005).

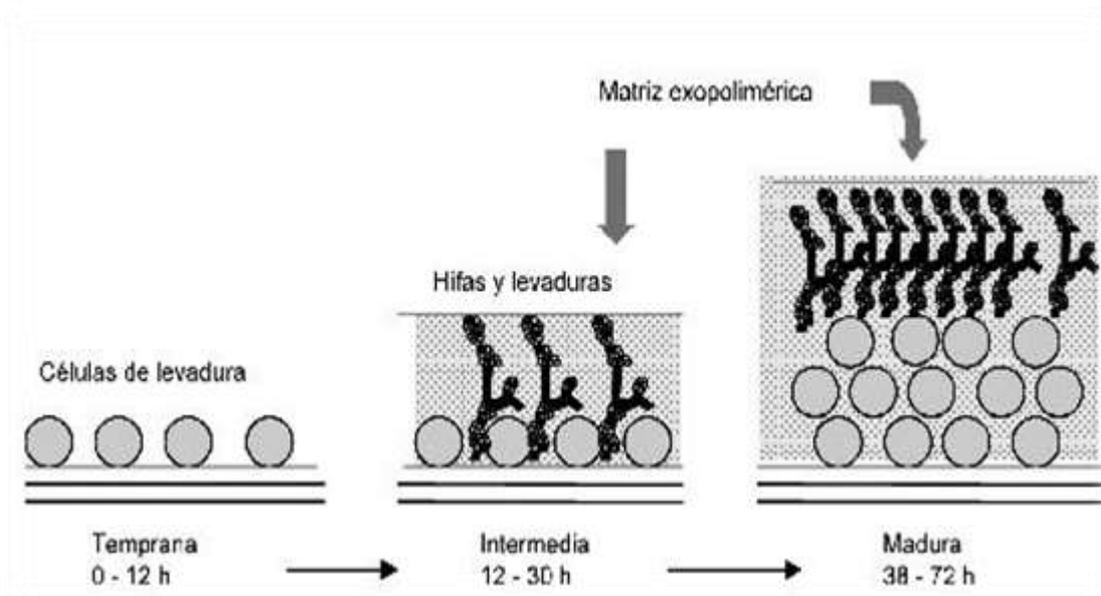
### 1.3.2 Producción de enzimas extracelulares

Las enzimas pueden proponerse como determinantes de virulencia en *Candida*, ya que tienen la capacidad de romper polímeros que proporcionan nutrientes accesibles para el crecimiento de los hongos, así como de inactivar las moléculas útiles en la defensa del organismo. Las principales enzimas extracelulares relacionadas con la patogénesis de *Candida* son las proteasas, fosfolipasas y lipasas (De la Calle-Rodríguez *et al.*, 2012).

### 1.3.3 Formación de biopelículas

Las biopelículas de *C. albicans* consisten en una estructura de levaduras e hifas embebidas en una matriz extracelular producida por sí misma, que contribuyen a la dificultad en el tratamiento de pacientes con infecciones sistémicas, debido a la alta resistencia a la respuesta inmune, a los medicamentos antifúngicos y a que genera una falla en artefactos médicos como catéteres y válvulas cardíacas que le sirven al hongo como superficie de adhesión. Para su formación es necesario que las levaduras se unan a la superficie del látex, silicona o plástico por medio de adhesinas, empiecen a formar tubos germinales, se adhieran fuertemente a las células endoteliales y finalmente originen hifas, las cuales maduran dentro de una

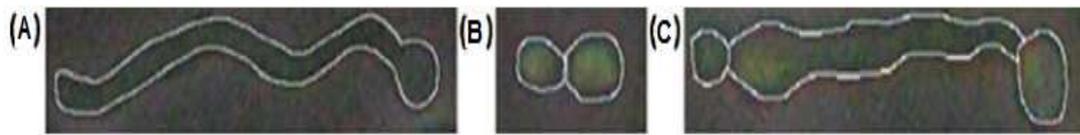
matriz extracelular (Fig. 4). La producción de farnesol, propicia la liberación de las levaduras recién formadas en la biopelícula para diseminarse y colonizar una nueva superficie. La mayor capacidad de *C. albicans* para formar biopelículas en estas superficies es la razón por la que esta especie es más patógena que las que son menos capaces de formar estas estructuras, como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. krusei* (De la Calle-Rodríguez *et al.*, 2012).



**Figura 4. Fases de formación de biopelículas de *Candida* spp *in vitro*.** La morfogénesis se activa cuando la levadura entra en contacto con la superficie y la capa de las células basales. Tiene un papel importante de anclaje de la biopelícula a la superficie, siguiendo el orden: adhesión temprana, crecimiento, proliferación y maduración (Rivera *et al.*, 2005).

### 1.3.4 Morfogénesis

*C. albicans* es capaz de someterse a la transición de la forma de levadura (blastoporas) a las formas filamentosas (hifas y pseudohifas) (Fig. 5). La conversión de la forma unicelular de levadura al crecimiento filamentosos es esencial para la virulencia de *C. albicans*. La forma de levadura es útil para la difusión del hongo en el torrente sanguíneo, mientras que las formas filamentosas, especialmente la forma hifa, tienen la capacidad de penetrar barreras anfitrionas (Lim *et al.*, 2012).



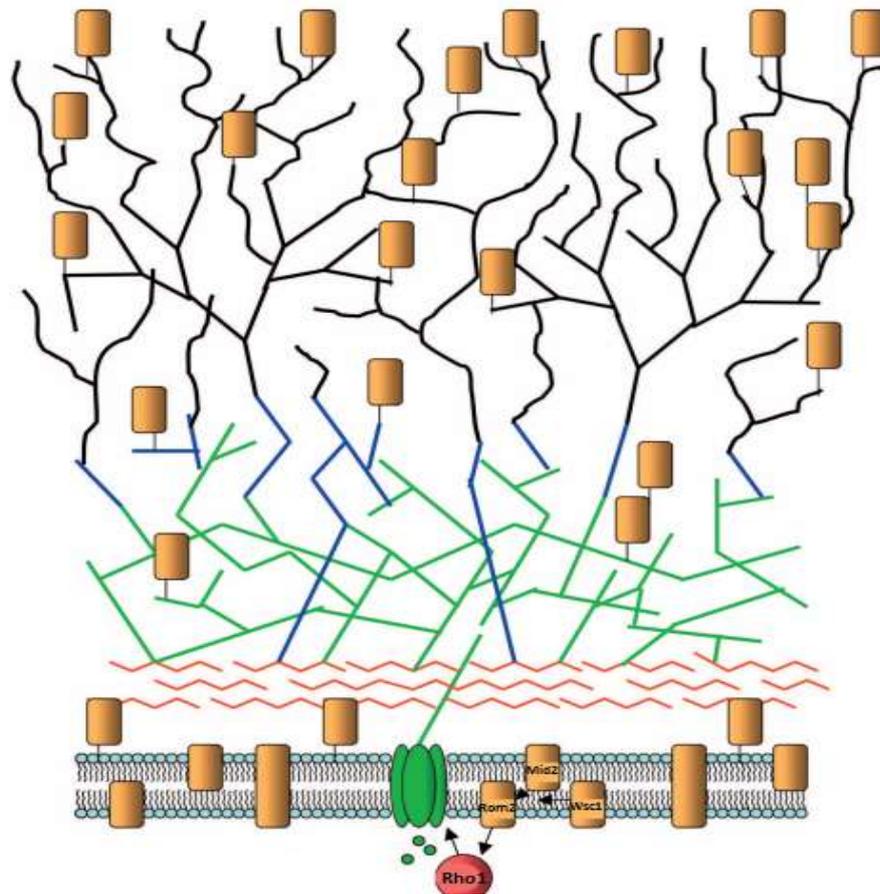
**Figura 5. Micrografía de una hifa verdadera, levadura (blastoporas) y la forma pseudohifa de *C. albicans*.** **A)** Hifas verdaderas, tienen filamentos largos con lados paralelos y no hay constricciones obvias entre las células; **B)** los filamentos de pseudohifas se asemejan a levaduras alargadas con lados más anchos, desiguales y permanecen unidos uno del otro en el sitio de constricción; **C)** las levaduras de forma ovoide y separadas fácilmente una de la otra durante los ciernes (Lim *et al.*, 2012).

## 1.4 Pared celular

La pared celular (PC) de los hongos es una estructura con gran plasticidad, que da la forma a la célula, controla la permeabilidad celular y protege a la célula de los cambios osmóticos. Además de estas importantes funciones, constituye el lugar de interacción con el medio externo, localizándose en ella las adhesinas y un gran número de receptores que, tras su activación, desencadenarán una compleja cascada de señales en el interior de la célula. Dada su localización en el exterior de la célula, la pared es el primer lugar de interacción con el hospedador, jugando un papel muy importante en el desarrollo de la acción patógena fúngica, está compuesta básicamente de polisacáridos y proteínas. Entre los polisacáridos destacan la quitina, el glucano y el manano o el galactomanano. Las proteínas generalmente están asociadas a polisacáridos formando glicoproteínas. Todos estos componentes están asociados entre sí dando lugar a una estructura rígida. Las proteínas de la pared celular (PPC) tienen diversas funciones, participando en el mantenimiento de la forma celular, interviniendo en los procesos de adhesión (Als y Hwp1), protegiendo a la célula de sustancias extrañas, participando en la absorción de moléculas, transmitiendo señales al citoplasma y sintetizando y remodelando los componentes de la pared. El  $\beta$ -1,3-D-glucano es el componente estructural más importante de la pared y representa el 50-60% del peso seco de esta estructura, además se sintetiza por un complejo de enzimas situado en la membrana plasmática, denominadas glucano sintetetas. La actividad de la  $\beta$ -1,3-D-glucano sintetasa se encuentra regulada por el ciclo celular y está bajo el control

del gen *RHO1*. La proteína Rho1 se activa por las proteínas Rom1 y Rom2 y esta última a su vez se activa por las glicoproteínas de la pared celular Wsc1 y Mid2 (Fig. 6). La disrupción del gen *RHO1* es letal (Pontón, 2008).

La PC es una estructura esencial para los hongos y su eliminación o los defectos en su formación tienen efectos profundos en el crecimiento y la morfología de la célula fúngica, pudiendo causar la muerte celular por lisis. Dado el papel vital que la PC juega en la fisiología de la célula fúngica, es considerada una diana muy importante para la acción de los fármacos antifúngicos (Pontón, 2008).



**Figura 6. Esquema de la pared celular de *C. albicans*.** Los polisacáridos de la PC están representados en diferentes colores: quitina (rojo)  $\beta$ -1,3-D-glucano (verde),  $\beta$ -1,6-D-glucano (azul) y mananos (negro). Las proteínas están representadas por rectángulos de color naranja. Las subunidades de la  $\beta$ -1,3-D-glucano sintetasa en la membrana plasmática están coloreadas en verde (Pontón, 2008).

## 1.5 Diagnóstico

El diagnóstico de la candidiasis tanto superficial como sistémica se puede realizar mediante diversas técnicas con variabilidad de sensibilidad y especificidad. El examen directo y cultivos como el CHROMagar son realizados de rutina, aunque son poco sensibles y específicos. Sin embargo, para la CI existen técnicas más sensibles y específicas como el análisis serológico, utilizando el citoplasma y pared celular de *Candida* por su diversidad de antígenos como la enolasa en la fracción celular y los mananos en pared celular, este último puede combinarse con el ensayo ELISA para mayor sensibilidad.

Actualmente la prueba más utilizada en los pacientes inmunocomprometidos es la detección de 1,3  $\beta$  glucano (BDG), polisacáridos presentes en todas las especies de *Candida*. La carencia de glucanasas en los humanos que puedan digerir estos polisacáridos facilita emplearlos para el diagnóstico de CI y de infecciones asociadas con la presencia de biopelículas. Otros métodos diagnósticos de CI se basan en la detección de anticuerpos contra antígenos de *Candida* en pared celular y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Ruiz-Baca *et al.*, 2013).

La toma de muestra es variable, ya que la candidiasis puede presentarse en todas las partes del cuerpo, pudiéndose recolectar exudado, escamas, sangre, esputo, orina, LCR, etc. (Bonifaz, 2012).

## 1.6 Tratamiento

El tratamiento depende del tipo de candidiasis y al factor predisponente al que esté ligado; en ocasiones la terapia es sencilla y solo requiere de tratamientos tópicos, mientras que en otras situaciones es necesario que sea por vía sistémica y por tiempo prolongado (Bonifaz, 2012). A la hora de elegir el tratamiento de una candidiasis se deberá valorar la localización y extensión de la infección, la susceptibilidad *in vitro* del aislado, el mecanismo de acción y la toxicidad relacionada con el fármaco, además de considerar el uso previo de profilaxis medicamentosa (Izquierdo y Santolaya, 2014).

La instauración temprana de tratamiento antifúngico es esencial para mejorar el pronóstico. A falta de pruebas microbiológicas que permitan establecer un diagnóstico precoz, el tratamiento debe establecerse necesariamente de forma empírica. Hasta principios de la pasada década, el tratamiento de elección de la infección invasiva por *Candida* spp. fue fluconazol, reservándose las formulaciones lipídicas de anfotericina B para el tratamiento de las infecciones más graves. La experiencia adquirida durante los últimos 10 años en el tratamiento de la candidiasis invasiva con el empleo de las diferentes equinocandinas, ha hecho que diferentes Sociedades Médicas se replantearan las recomendaciones respecto al tratamiento de elección (Cardozo y Mensa, 2015). Por otro lado, las infecciones por *C. glabrata* son difíciles de tratar, ya que por sus características genéticas presenta resistencia a fármacos azólicos, principalmente a fluconazol (Tapia, 2008). Recientemente se han realizado ensayos *in vitro* sobre la combinación de dos o más antifúngicos para el tratamiento de *C. albicans* y se ha encontrado un efecto más eficaz cuando están combinados, tal es el caso del triclosán y el fluconazol, quienes mostraron una actividad sinérgica al emplearse combinados en una cepa de *C. albicans*, esto debido a la posibilidad de actuar en más de un blanco terapéutico. Este nuevo hallazgo puede ser el inicio del desarrollo de una nueva forma de tratamiento para la candidiasis invasiva causada por diferentes especies de *Candida* (Scorzoni *et al.*, 2017).

### **1.6.1 Antifúngicos**

Los antifúngicos son compuestos naturales o sintéticos, que pueden producir modificaciones en estructuras básicas de la célula fúngica inhibiendo su desarrollo y alterando su viabilidad. Actualmente, existen varias clases de antifúngicos disponibles en el mercado y más efectivos usados para el tratamiento de infecciones por *Candida* estos son los azoles, polienos y equinocandinas (Tobar *et al.*, 2011) (Fig. 7).

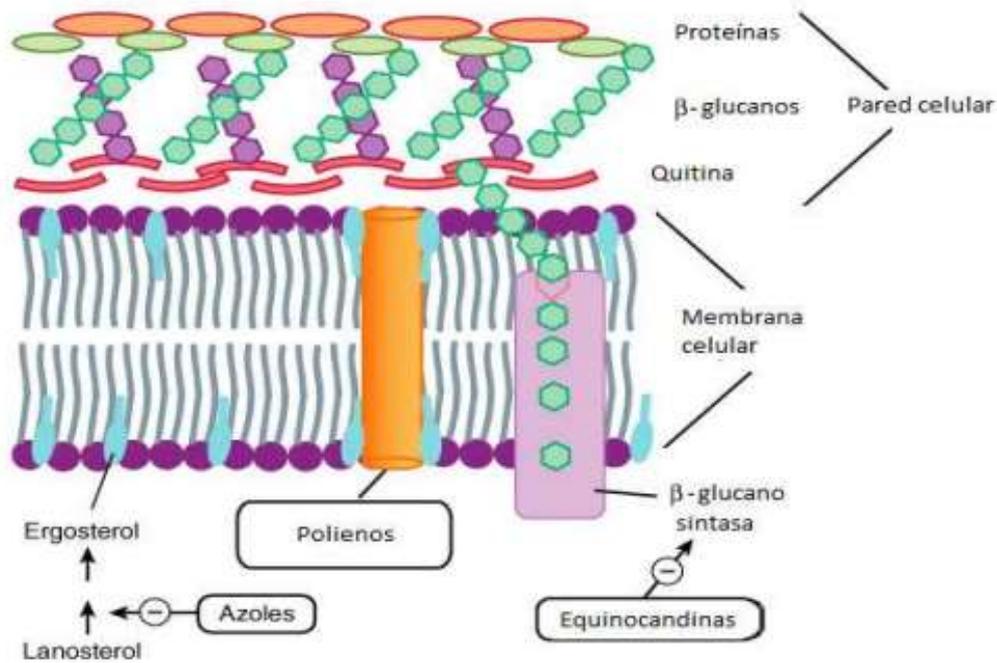
Los azoles, tal como el ketoconazol, fluconazol e itraconazol, inhiben la biosíntesis del ergosterol, el cual es el principal esteroide de la membrana de hongos. Los azoles

ejercen su actividad por unión específicamente al grupo hemo del sitio activo de la enzima citocromo P450 14  $\alpha$ -lanosterol desmetilasa (Erg 11).

Los polienos, incluyendo la anfotericina B, natamicina y nistatina son antimicóticos anfipáticos que se dirigen al ergosterol dentro de la membrana celular de los hongos. Después de la unión al ergosterol, estos agentes se expanden a la bicapa lipídica, formando canales en la membrana, que conducen a la pérdida de potasio intracelular y otras moléculas, lo que resulta en la muerte del hongo.

Las equinocandinas, tales como caspofungina, anidulafungina y micafungina, son hexapéptidos cíclicos acilados que ejercen su actividad fungicida inhibiendo competitivamente a la  $\beta$ -1,3-glucano sintasa, una enzima requerida para la biosíntesis de la PC. La inhibición de esta proteína resulta en la ausencia de  $\beta$ -glucanos requeridos normalmente en la pared celular, causando la muerte celular.

Estos agentes también tienen significantes limitaciones que restringen su uso clínico. Los azoles son fungistáticos, están asociados con interacciones droga-droga y se ven obstaculizados por la aparición de especies de *C. albicans* resistentes a los azoles. Los polienos tienen efectos adversos, tales como nefrotoxicidad, falla renal y toxicidad relacionada a la infusión. Las equinocandinas son algo costosas y han sido asociadas con fiebre, tromboflebitis, así como toxicidad hepática y aunque las equinocandinas son efectivas contra cepas de *Candida* resistentes al fluconazol, ha habido casos de resistencia para esta clase de droga en *C. albicans*. A la vista de estas limitaciones, la identificación de nuevas dianas antifúngicas y el desarrollo de nuevos agentes antifúngicos están garantizados para el tratamiento eficaz de infecciones de *Candida* (Hoehamer *et al.*, 2010).



**Figura 7. Mecanismos de acción de las principales familias de antifúngicos de uso clínico.** Las equinocandinas inhiben la enzima  $\beta$ -glucano sintasa. Los azoles inhiben la vía de síntesis de ergosterol y los polienos interrumpen la membrana celular uniéndose al ergosterol (Katzung *et al.*, 2009).

## 1.7 Mecanismos de resistencia

En la actualidad, el aumento de la falla al tratamiento con antifúngicos se debe principalmente al surgimiento de levaduras resistentes, inducido por la aparición de nuevas especies patógenas o a la prescripción irracional de antifúngicos como profilaxis y al aumento de las dosis terapéuticas entre otros factores.

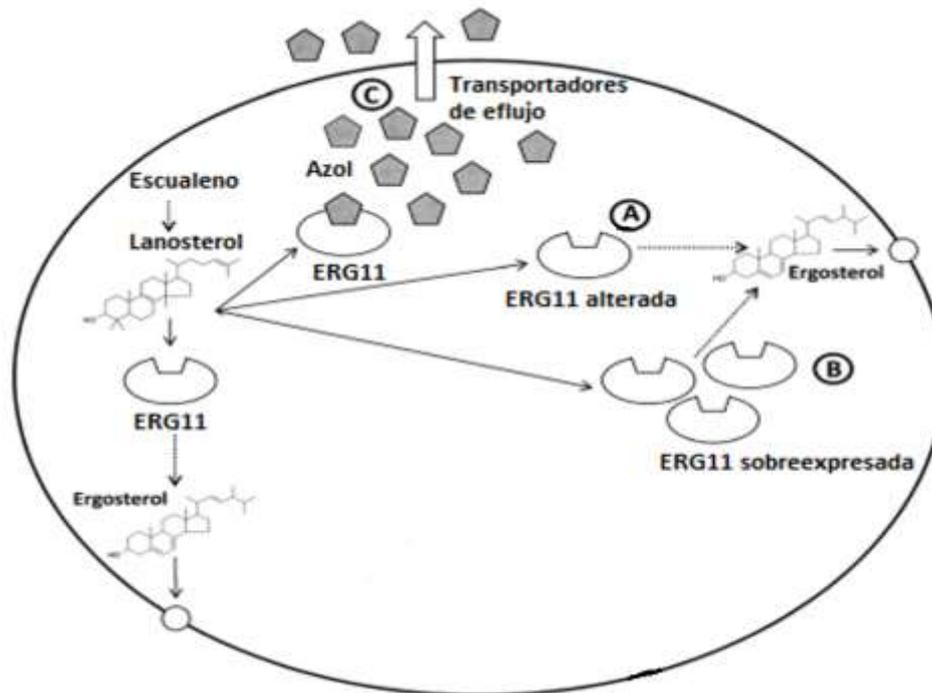
La resistencia es un cambio de sensibilidad o susceptibilidad al antifúngico que puede medirse *in vitro* por métodos de laboratorio apropiados. Existen dos tipos generales de resistencia: la intrínseca, que de por sí se tiene al antifúngico antes de que entre en contacto con éste y la adquirida, que induce la levadura cuando coexiste con el antifúngico. También se han descrito otros tipos de resistencias, la resistencia homogénea cuando todas las colonias de una cepa son por completo sensibles o resistentes a un mismo antifúngico. Otro fenómeno interesante es el de la resistencia cruzada positiva, cuando una cepa es resistente a más de un antifúngico mediada por el mismo factor genético y la resistencia cruzada negativa,

cuando un factor regula a un antifúngico, pero al mismo tiempo incrementa la sensibilidad a otro (Gutierrez *et al.*, 2012).

### 1.7.1 Resistencia a los azoles

La 14 alfa-lanosterol desmetilasa (ERG11) la cual es codificada por el gen *ERG11*, es una enzima involucrada en la biosíntesis del ergosterol y un blanco de los azoles (Song *et al.*, 2004). Se han asociado varias alteraciones genéticas con el gen *ERG11* de *C. albicans*, cuya secuencia ya es conocida, tales como mutaciones puntuales en la región de codificación y la sobreexpresión. Se han identificado diez mutaciones en *ERG11* en aislamientos clínicos resistentes a los azoles. Las sustituciones R467K, I471T, G464S, S405F y K143R están relacionadas a aislados clínicos de *C. albicans* resistentes a los azoles, aunque también se les ha relacionado con otras especies no albicans tales como *C. dubliniensis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* y recientemente a *C. parapsilosis*, sin embargo, estos hallazgos no se han descrito para *C. glabrata* (White, 1997; Scorzoni *et al.*, 2017).

En presencia del fluconazol, *C. albicans* incrementa la expresión de *ERG11* como un mecanismo compensatorio para no agotar el ergosterol, debido al aumento en la concentración de la enzima 14 - $\alpha$ - lanosterol desmetilasa, requiriendo cantidades grandes de antifúngico para inhibir la enzima, originando resistencia (López-Ávila *et al.*, 2016; Scorzoni *et al.*, 2017). Otro de los mecanismos de resistencia a los azoles es la activación de bombas de flujo que llevan a la disminución de la concentración de la droga en la enzima blanco dentro de la célula fúngica. La regulación de las bombas de flujo esta codificada por los genes *MDR* y *CDR*, y en la resistencia a los azoles en *C. albicans* están asociados *MDR1*, *CDR1* y *CDR2* (Fig.8). Particularmente, las bombas de flujo codificadas por los genes *MDR* son usualmente selectivos para fluconazol (Pfaller, 2012; Pais *et al.*, 2015).



**Figura 8. Mecanismos de resistencia a los azoles en *C. albicans*.** ERG11 es un punto esencial en la biosíntesis del ergosterol, requerido para la estabilidad y funcionalidad de la membrana. La resistencia a los azoles puede ocurrir mediante **A)** una ERG11 alterada (mutaciones puntuales), **B)** sobreexpresión de ERG11 y **C)** sobreexpresión de transportadores de flujo (Parker *et al.*, 2014).

### 1.7.2 Resistencia a las equinocandinas

Mutaciones en el gen que codifica a los elementos del complejo del 1,3- $\beta$ - glucano sintetasa han sido asociadas con la resistencia de *Candida* a las equinocandinas. Son mutaciones puntuales en dos regiones “hot-spot” (HS1 y HS2) de *FKS1*, gen que codifica para subunidad catalítica mayor y menor del 1,3- $\beta$ - glucano sintetasa. Este mecanismo de resistencia ha sido demostrado en *C. albicans* y especies de *Candida* no *albicans* (*C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* y *C. dubliniensis*) (Pfaller, 2012).

### 1.7.3 Resistencia a los polienos

Actualmente, la resistencia de fúngicos a los polienos es muy baja, y se puede atribuir en los pocos casos presentados a la disminución del acceso del fármaco al

blanco debido al contenido alterado de ergosterol en la membrana celular, a la acumulación de otros esteroides, el aumento de la actividad catalasa, llevando a la reducción del daño oxidativo (Pfaller, 2012).

## **1.8 Herramientas utilizadas para el estudio de los mecanismos de resistencia fúngica**

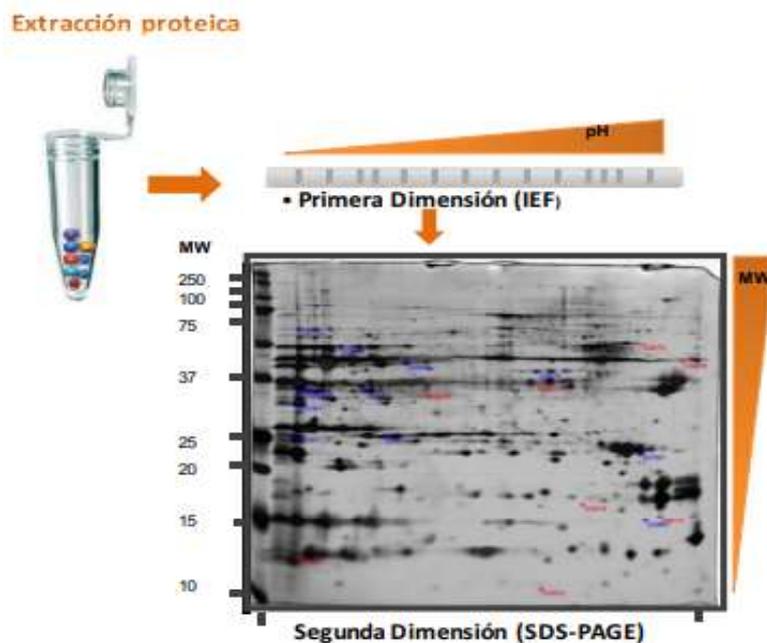
Para entender la dinámica de los procesos celulares y la forma en que éstos se alteran en las distintas enfermedades es necesario el estudio de las proteínas y sus interacciones bajo un estímulo determinado, la complejidad, el ensamble y el funcionamiento de un organismo en relación con su ambiente. A través de los años las tecnologías genómicas se han utilizado en el estudio de los mecanismos de resistencia fúngica. Recientemente, la proteómica, definida como el análisis global de las proteínas celulares ha sido ampliamente utilizada para el estudio de los mecanismos implicados en resistencia fúngica de diversos hongos tal como *C. glabrata* (Yoo *et al.*, 2012; Yoo *et al.*, 2013; Rogers *et al.*, 2006; Loureiro y Penha *et al.*, 2010), *C. albicans* (Hooshdaran *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2012; Hoehamer *et al.*, 2010) y *Cryptococcus gatti* (Chong *et al.*, 2012).

La evaluación de perfiles de proteínas en respuesta a una modificación de resistencia fúngica puede representar un aproximación válida y útil para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. El descubrimiento y caracterización de proteínas relacionadas a la resistencia antifúngica hace posible la identificación de genes adicionales y mecanismos relacionados al desarrollo de esta. El estudio a nivel molecular de los mecanismos de resistencia de *Candida* frente a los antifúngicos se considera una estrategia para poder evitar las consecuencias que el desarrollo de la resistencia puede ocasionar a largo plazo, y para desarrollar moléculas más potentes y seguras que las eviten (Shen *et al.*, 2015).

Entre las técnicas de estudios proteómicos tenemos:

### 1.8.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida en dos dimensiones

La electroforesis en dos dimensiones fue desarrollada en los años 70 con la finalidad de separar complejas mezclas de proteínas y para visualizar las diferencias de expresión. Este método se aplica para separar proteínas en base a sus propiedades, como son el punto isoeléctrico (pI) y el peso molecular (PM). En la primera dimensión las proteínas son separadas por isoelectroenfoque (IEF) de acuerdo a su pI, las proteínas migran a través de un gradiente de pH inmovilizado. En la segunda dimensión las proteínas son reducidas, alquiladas y corren en un gel de poliacrilamida PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate- Poliacrylamide Gel Electrophoresis) según su movilidad relativa proporcional a su PM (Fig. 9). Esta técnica se ha convertido en una de las más utilizadas en los estudios proteómicos en diferentes organismos y tejidos (Cuesta- Astroz y Segura- Latorre, 2012). El mayor problema de esta metodología era la reproducibilidad, debida principalmente a los gradientes de anfólitos utilizados para el IEF. En la metodología tradicional, se utilizaban “anfólitos acarreadores” (CA del inglés carrier ampholyte), con los que resultaba difícil alcanzar el equilibrio durante el IEF presentándose un corrimiento del gradiente de pH hacia el cátodo y un fenómeno de meseta en el centro del gel, dando una baja reproducibilidad en los patrones de proteínas de un gel a otro. Estos inconvenientes se solucionaron con la aparición de los gradientes de pH inmovilizados en poliacrilamida (IPG del inglés immobilized pH gradients; Bjellqvist *et al.*, 1982). La reproducibilidad, la facilidad de hacer comparaciones entre muestras y la posibilidad de separar proteínas punto por punto en un gel micropreparativo (que permite la extracción del polipéptido y la identificación posterior por cualquier técnica basada en microsecuencia por composición de aminoácidos o espectrometría de masas entre otras), ha situado la metodología de separación de proteínas en geles de dos dimensiones (PAGE-2D) entre una de las más usadas e importantes técnicas para estudios en proteómica, enfocados a resolver preguntas biológicas (Rabilloud, 2002).



**Figura 9. Esquema de electroforesis bidimensional.** La técnica PAGE-2D se basa en la separación de una mezcla de proteínas en dos dimensiones. La primera dimensión consiste en separar las proteínas en función del pI en una tira de poliacrilamida con un gradiente de pH inmovilizado. Posteriormente, la tira se coloca en la parte superior del gel SDS- PAGE y las proteínas son separadas en función del PM (segunda dimensión) (De la Torre, 2004).

### 1.8.2 Espectrometría de masas

De manera similar al avance técnico de la electroforesis en dos dimensiones, los adelantos en la identificación de proteínas mediante espectrometría de masas han contribuido al desarrollo vertiginoso que ha tenido la proteómica en los últimos años. El método de Edman fue la técnica principal de identificación de proteínas y fue usado con éxito, aunque fue considerado un método lento (un péptido por día) y poco sensible. La espectrometría de masas ha evolucionado permitiendo el análisis rutinario de muestras complejas en muy poco tiempo lo que la ha convertido en una herramienta muy exitosa en proteómica. La espectrometría de masas es una técnica analítica que mide la relación carga-masa ( $m/z$ ) de iones basándose en su comportamiento en un campo magnético. La muestra es convertida en iones y vaporizada haciendo uso de técnicas como MALDI (desorción ionización asistida por láser) o ESI (ionización por electrospray). MALDI es una técnica de ionización por pulsos que puede ionizar biomoléculas de gran tamaño al utilizar la energía de

un láser para desorber y ionizar la muestra en presencia de una matriz capaz de absorber luz. En la técnica ESI, las muestras son ionizadas a presión atmosférica al hacer fluir la muestra por un capilar en presencia de una corriente eléctrica. Originalmente la técnica de identificación de proteínas comprende la digestión de la proteína, análisis por MALDI y búsqueda en bases de datos. Cada proteína en la base de datos es digerida teóricamente, generando miles de péptidos teóricos. Los datos experimentales de masas de péptidos, la huella digital de masas de péptidos, son comparados con las masas teóricas, con lo que se calcula y se asigna una calificación. Esta calificación refleja la similitud entre las masas teóricas y experimentales, la proteína más probable será entonces la que presente la mayor correspondencia entre los péptidos experimentales y teóricos. Adicionalmente este análisis puede realizarse en tandem, para esto el equipo debe ser capaz de seleccionar un determinado fragmento y someterlo a una nueva fragmentación y análisis (Sandoval- Usme *et al.*, 2009; Cuesta- Astroz y Segura- Latorre, 2012).

### **1.8.3 Otras técnicas proteómicas**

A pesar que la electroforesis bidimensional es la herramienta más tradicional y hasta el momento una de las más empleadas en proteómica, es una técnica que requiere una gran cantidad de muestra y una minuciosa ejecución. Debido a esto, se han diseñado estrategias para facilitar su desarrollo, un ejemplo es la electroforesis diferencial en gel (DIGE), técnica basada en el marcaje fluorescente de las proteínas previo a su separación, lo que otorga una gran precisión en la cuantificación, además permite separar varias muestras proteicas en un mismo gel, incrementando la reproducibilidad y la fiabilidad del análisis de expresión diferencial de muestras (Sandoval- Usme *et al.*, 2009).

El desarrollo de otras técnicas, que acoplan a la separación la espectrometría de masas, ha logrado facilitar el análisis, mejorar la resolución, la sensibilidad, además han permitido disminuir la cantidad de muestra y el tiempo empleado. Entre ellas se encuentran desorción/ionización asistida con láser en superficie (SELDI-TOF), así como otros métodos que incluyen arreglos de proteínas en fase reversa, microarreglos de anticuerpos y marcación de afinidad codificada por isótopos (ICAT), que surgen como una alternativa para la electroforesis bidimensional. El

ICAT permite la identificación y análisis cuantitativo y comparativo de proteínas encontradas en fluidos biológicos por cromatografía microcapilar de acoplamiento con espectrometría de masas, ionización de electrospray en tandem. La ventaja que tiene la técnica del ICAT sobre otras técnicas proteómicas es que permite analizar proteínas de menor abundancia. El acoplamiento de la cromatografía líquida con espectrometría de masas LC-MS ha tenido un gran impacto para el análisis de moléculas pequeñas. El sistema de LC-MS/MS puede ser automatizado, lo que permite que haya una mejoría notable en la reproducibilidad, la resolución, facilidad del manejo de las muestras y un rango dinámico para la cuantificación, y en el caso de muestras complejas, como las empleadas en el análisis de proteínas, la identificación por espectrometría de masas puede hacerse de forma completamente automática (Sandoval- Usme *et al.*, 2009).

## II. ANTECEDENTES

En los últimos años, se ha producido un incremento en infecciones por levaduras del género *Candida* lo que ha llevado al uso de nuevos agentes antifúngicos, observándose un aumento considerable en la resistencia a algunos de estos agentes (Gómez-Quintero, 2010). En México, aunque no se han cuantificado los casos de resistencia en hospitales de atención general y de especialidades, se ha observado un incremento importante en el número de pacientes con micosis que no responden a los tratamientos; en algunos casos ha sido posible demostrar deficiencias inmunológicas. En otros, el comportamiento clínico hace sospechar resistencia a los antifúngicos, principalmente en quienes reciben estos medicamentos como profilaxis (en casos de trasplantes, sida, enfermedades autoinmunes tratadas con corticosteroides) o a dosis elevadas (Manzano-Gayosso *et al.*, 2008).

Los azoles constituyen la familia más numerosa de fármacos antifúngicos más comúnmente utilizados para el tratamiento de las infecciones por *Candida* (Shen *et al.*, 2015). Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la 14- $\alpha$ -lanosterol demetilasa (*ERG11*) en la ruta biosintética del ergosterol. A nivel molecular, diversos mecanismos de resistencia a los antifúngicos se han estudiado, entre los descritos se encuentran: mutaciones puntuales del gen *ERG11*, la sobreexpresión de este gen (Golabek *et al.*, 2015) y las bombas de flujo como CDR1, CDR2 y MDR1 (Pfaller *et al.*, 2012; Fuentes *et al.*, 2014; Golabek *et al.*, 2015; Pais *et al.*, 2015). La generación de biofilms y el secuestro del antifúngico por vacuolas intracelulares son otros de los mecanismos que puede mediar la resistencia antifúngica (Maebashi *et al.*, 2002; Scorzoni *et al.*, 2017).

La genómica y la proteómica son herramientas moleculares que han facilitado la identificación y la comprensión de las formas de organización y función de los genes de los organismos, también identificar proteínas involucradas en la transducción de señales y proteínas relacionadas con una enfermedad entre otras. Además, estas herramientas se han empleado para el estudio de los mecanismos implicados en la resistencia fúngica (Cuesta-Astroz y Segura- Latorre, 2012).

Estudios genómicos hechos por Liu *et al.* (2005) sobre el análisis en el perfil de expresión génica de *C. albicans* tras la exposición a ketoconazol (azol), anfotericina B (polieno), caspofungina (equinocandina) y flucitosina (pirimidina), mostraron la sobreexpresión de 60 genes después de la exposición al ketoconazol, los cuales están involucrados en el metabolismo de ácidos grasos y el esterol, siendo los de mayor relevancia *NCP1*, *MCR1*, *CYB5*, *ERG2*, *ERG3*, *POT14 (ERG10)*, *ERG25*, *ERG251* y *ERG11*, así mismo, se incrementó la expresión de genes asociados a la resistencia a los azoles, tal como *CDR1*, *CDR2*, *IFD4*, *DDR48* y *RTA3*. Así mismo, la anfotericina B produjo la sobreexpresión de 87 genes, siendo los más relevantes aquellos involucrados en el transporte de pequeñas moléculas, como *ENA21*, y en el estrés oxidativo, como *YHB1*, *CTA1*, *AOX1* y *SOD2*. Por otro lado, la caspofungina produjo la sobreexpresión de 81 genes, los de mayor importancia codifican para proteínas de PC como la subunidad *GSL22* de la  $\beta$ -1,3-glucano sintasa, *PHR1*, *ECM21*, *ECM33* y *FEN12*. Finalmente, la flucitosina produjo la sobreexpresión de 383 genes, siendo los de mayor relevancia aquellos que codifican a proteínas involucradas en la biosíntesis de purinas y pirimidinas, tal como *YNK1*, *FUR1* y *CDC21*. Estos datos son de utilidad para entender el mecanismo de acción y mecanismos de resistencias para los agentes antifúngicos.

En cuanto a análisis proteómicos para la identificación de mecanismos asociados a la resistencia antifúngica, en *C. albicans* se han hecho en fracciones citoplásmicas. En un estudio por Hooshdaran *et al.* (2004) en el cual examinaron cambios en el proteoma de fracciones citoplásmicas de dos aislados clínicos de *C. albicans* que presentaban resistencia al fluconazol, los resultados mostraron la identificación de 17 proteínas totales expresadas diferencialmente de las cuales 13 proteínas se sobreexpresaron y 4 proteínas disminuyeron su expresión. Las proteínas sobreexpresadas se identificaron como una reductasa (Grp2p) y cuatro isoformas de aril-alcohol-deshidrogenasa (lfd1p, lfd4p, lfd5p y lfd6p) las cuales fueron asociadas a la resistencia. Por otro lado, Hoehamer *et al.* (2010) identificaron cambios en la abundancia de proteínas totales en fracciones citoplásmicas de *C. albicans* usando electroforesis en gel de poliacrilamida en dos dimensiones (PAGE-2D) y espectrometría de masas MALDI-TOF para aclarar la respuesta adaptativa específica y no específica al ketoconazol (azol), anfotericina B (polieno) y

casposfungina (equinocandina), identificando un total de 132 proteínas que corresponden a 126 genes cuya expresión cambió tras la exposición a estos agentes antifúngicos. De estas, 39 proteínas se expresaron diferencialmente tras exponerse la cepa al ketoconazol, de las cuales las más relevantes fueron un esteroil transmetilasa (Erg6) y una aldo-ceto reductasa (Csh1), la primera involucrada en la biosíntesis del ergosterol y la segunda no ha sido bien determinada. Las proteínas DL-glicerol fosfatasa (Rhr2) y adenil ciclasa que responde al estrés (Asr2) se expresaron tras exponerse la cepa de *C. albicans* a la anfotericina B, estas proteínas están involucradas al estrés osmótico. En respuesta a la exposición de la cepa a la casposfungina se identificó una mayor expresión de la proteína de unión a GTP (Rho1), la cual está involucrada principalmente en la biosíntesis de pared celular.

En otro estudio Wang *et al.* (2012) realizaron un análisis proteómico utilizando proteínas totales de fracciones citoplásmicas de dos aislados de *C. albicans*, uno sensible y otro resistente al fluconazol. Los resultados mostraron la sobreexpresión de 15 proteínas, entre ellas la más relevante fue el alcohol deshidrogenasa (Adh1) el cual mostró una mayor sobreexpresión en la cepa resistente. La localización de la proteína Adh1 se encuentra limitada a la superficie celular y al citoplasma, y la cual está involucrada en la formación de biofilms y otros procesos biológicos.

Otras de las especies utilizadas en análisis proteómicos para la identificación de proteínas citoplásmicas y membranales relacionadas a la resistencia antifúngica son *C. glabrata* y *C. gatti*. Un estudio en *C. glabrata* realizado por Rogers *et al.* (2006) quienes utilizaron fracciones membranales de dos cepas, una susceptible y otra cepa que adquirió resistencia a los azoles, mostraron la sobreexpresión de dos proteínas en la cepa resistente las cuales se identificaron como Cdr1. También se observó la sobreexpresión de Erg11 en la cepa resistente, proteína involucrada en la síntesis del ergosterol, confirmando la sobreexpresión de estos genes en cepas de *C. glabrata* resistentes a los azoles. En otro estudio hecho por Loureiro y Penha *et al.* (2010) los cuales examinaron cambios del proteoma en la fracción citoplásmica de dos cepas de *C. glabrata* una susceptible y otra cepa resistente a los azoles a la cual se le indujo con bromuro de etidio (BrEt) pequeñas mutaciones en el ADN mitocondrial, observaron la sobreexpresión de isoformas de la

hexoquinasa sugiriendo un posible mecanismo de compensación para la producción de energía de la glucosa. También detectaron la sobreexpresión de cistationina beta sintasa y la S- adenosilmetionina sintetasa en la mutante inducida por BrEt, por lo que pudiera impactar en la vía de biosíntesis del ergosterol implicada en la resistencia a los azoles, ya que estas enzimas están involucradas en el metabolismo de la homocisteína y la síntesis de S-adenosilmetionina. Otra proteína que se sobreexpresó fue la proteína de choque térmico 12 (Hsp12), proporcionando así nuevos conocimientos sobre la comprensión actual de la resistencia a los azoles. Así mismo, Yoo Il *et al.* (2012) llevaron a cabo un análisis proteómico de fracciones citoplásmicas y membranales de dos aislados de *C. glabrata*, uno susceptible y otro resistente al fluconazol en orden para entender el mecanismo de resistencia a los azoles. Los resultados mostraron cambios en los niveles de expresión de proteínas celulares y membranales entre ambas cepas de *C. glabrata*. Entre las diferencias a nivel de expresión proteica se observaron 39 proteínas en la fracción celular y 26 proteínas en la fracción membranal, entre ellas la de mayor relevancia fue la proteína de choque térmico de 70 kDa (Hsp70) de la fracción membranal, al responder más severamente al estrés inducido por el fluconazol en comparación a la Hsp70 de la fracción celular y del resto de las proteínas expresadas. La Hsp70 ha sido asociada a la formación biofilm en *C. glabrata*. Otro análisis proteómico realizado en tres aislados de *C. glabrata* uno susceptible, otro susceptible dependiente de la dosis (S-DD) y otro resistente al voriconazol fue el de Yoo Il *et al.*, (2013), quienes en sus resultados mostraron un aumento en la expresión de proteínas en la fracción citoplásmica (38 proteínas) de la cepa resistente comparada con la fracción membranal (17 proteínas) de la cepa susceptible y de la cepa dependiente de la dosis. En la fracción membranal de la cepa resistente se observó una disminución de expresión proteica (37 proteínas) comparada con la fracción citoplásmica de la cepa susceptible y de la cepa dependiente de la dosis (18 proteínas), siendo la de mayor relevancia la Hsp70 al observarse una mayor expresión en la fracción citoplásmica que en la fracción membranal de la cepa resistente. Este hallazgo indicó que la Hsp70 está relacionada a la resistencia al voriconazol de *C. glabrata*.

En un análisis proteómico posterior de fracciones citoplásmicas hecho por Chong *et al.* (2012) en una cepa de *C. gatti* sensible en presencia y ausencia al fluconazol

identificaron un total de 195 proteínas en la cepa no tratada, y 152 proteínas en la cepa tratada con el fluconazol, de las cuales la ATPasa implicada en la degradación de proteínas mediada por ubiquitina (homólogo de la levadura: CDC48), ATPasa perteneciente a la familia de la Hsp70 (homólogo de la levadura: SSC1) y la proteína nuclear SM D3 del complejo anular requerido para la biogénesis de pequeñas ribonucleoproteínas nucleares (homólogo de la levadura: SMD3) fueron consideradas como posibles blancos farmacológicos para las terapias sinérgicas con el fluconazol.

A la fecha son pocos los estudios realizados del proteoma de la PC en relación a la resistencia antifúngica en especies del género *Candida*. En un estudio reciente, Vitali *et al.* (2016) analizaron la composición del proteoma de la PC mediante PAGE-2D y LC-ESI-MS/MS de cepas sensibles y resistentes a los azoles de *C. glabrata* asociado a biofilm, logrando identificar 6 proteínas relacionadas a pared celular y a la formación de biofilm tales como una hidrolasa, una lipofosfolipasa (PLB1), fosfoglicerato mutasa (GMP), superóxido dismutasa (SOD1) y dos proteínas no caracterizadas.

Dada la importancia que tiene la PC en la célula fúngica en el desarrollo de la acción patógena fúngica, se considera de gran relevancia realizar estudios del proteoma de la PC en especies *Candida* resistentes a los antifúngicos con la finalidad de identificar proteínas y mecanismos relacionados al desarrollo de esta para el desarrollo de nuevas estrategias profilácticas contra esta micosis.

### III. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, las infecciones fúngicas invasivas debidas a las especies de *Candida* son la causa principal de altos índices de morbilidad y mortalidad en pacientes hospitalizados e inmunocomprometidos. El incremento de la resistencia a los antifúngicos en *Candida* spp., plantea la necesidad de buscar diferentes estrategias con el objetivo de identificar nuevas opciones terapéuticas más selectivas y específicas.

Las Proteínas de la Pared Celular (PPC) fúngica se consideran potentes inmunomoduladores como blancos antifúngicos, ya que no se encuentran en humanos. A la fecha, no se han hechos estudios sobre el perfil de PPC de cepas de *Candida* spp resistentes a los antifúngicos. En base a estos antecedentes en la presente propuesta se plantea hacer un análisis comparativo del perfil de las PPC de *C. glabrata* y *C. parapsilosis* resistentes al fluconazol. La identificación y caracterización de proteínas relacionadas a la resistencia antifúngica hace posible la identificación de genes adicionales y mecanismos relacionados al desarrollo de esta; conocimiento, que se considera esencial para el desarrollo de nuevas estrategias profilácticas y terapéuticas eficaces que eviten los problemas que están apareciendo en la actualidad de infecciones por cepas resistentes de este hongo.

## IV. HIPÓTESIS

Existe un perfil de expresión diferencial de PPC entre cepas sensibles y resistentes al fluconazol de *C. glabrata* y *C. parapsilosis* asociado a la resistencia a este antifúngico.

## V. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Analizar el perfil de las Proteínas de la Pared Celular (PPC) de *C. glabrata* y *C. parapsilosis* resistentes al fluconazol.

### 5.2 Objetivos específicos

1. Llevar a cabo la extracción de proteínas de pared celular (PPC) de las cepas de *C. glabrata* y *C. parapsilosis* sensibles y resistentes al fluconazol.
2. Analizar el perfil de PPC extraídas de las cepas de *C. glabrata* y *C. parapsilosis* mediante geles bidimensionales.
3. Identificar mediante espectrometría de masas la(s) proteína(s) que se expresen diferencialmente entre las cepas sensibles y resistentes de *C. glabrata* y *C. parapsilosis*.
4. Demostrar la expresión de genes que codifiquen para las PPC seleccionada.

## VI. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Organismo y condiciones de cultivo

Para este estudio se utilizaron las cepas sensible y resistente al fluconazol de *C. glabrata* y *C. parapsilosis*, además, una cepa resistente la cual fue sometida al fluconazol. Para cultivar las células levaduriformes de *Candida* se utilizó medio líquido YPG (Extracto de levadura 0.3%, peptona de caseína 1%, dextrosa 2%, pH 7.5). Las células levaduriformes crecieron por 7 h a 30°C y a DO<sub>0.2</sub> nm, se cosecharon por centrifugación a 7000 rpm por 10 min y fueron lavadas dos veces con buffer de lavado (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, suplementado con PMSF 1 mM) y se mantuvieron a 20°C hasta su uso.

### 6.2 Extracción de proteínas de la pared celular (PPC)

Las células levaduriformes se resuspendieron en buffer de lisis y fueron lisadas con perlas de vidrio (0.45-0.5 mm de diámetro) en un homogeneizador de células MSK (Braun Melsungen, Alemania) alternando periodos de rompimiento (40 s) y enfriamiento (60 s) hasta que todas las células estuvieron rotas. Para aislar la fracción correspondiente a la PC, el homogenado celular se centrifugó a 3500 rpm por 15 min a 4°C, y la pastilla se lavó varias veces con buffer de lavado para remover cualquier componente intracelular. Para obtener el peso seco de las fracciones de PC, se liofilizaron por 24 h a -52°C. Las PPC se extrajeron de acuerdo al método reportado por Ramírez-Quijas *et al* (2015). Brevemente, las PC se resuspendieron en un buffer de extracción (SDS al 2% y β-mercaptoetanol al 5%) y se hirvieron por 5 min. Posteriormente se centrifugaron a 6800 rpm por 10 min y el sobrenadante se precipitó con etanol al 70% por 2 h a -20°C. Finalmente las proteínas se cuantificaron mediante el método de Bradford y fueron almacenadas a -70°C hasta su uso.

### **6.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)**

Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie.

### **6.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida en dos dimensiones (PAGE-2D)**

La PAGE-2D se llevó a cabo utilizando tiras de 7 cm con gradiente de pH inmovilizado (pH 4-7; Bio-Rad). Brevemente, muestras conteniendo 100 µg de PPC fueron sometidas a un protocolo de limpieza para eliminar sustancias que pudieran interferir con la electroforesis PAGE-2D, para lo cual se utilizó el kit de limpieza de Bio-Rad (2D Clean Up Kit). Las muestras conteniendo 100 µg de proteínas se resuspendieron en 140 µL de buffer de rehidratación [Urea 7 M, thiourea 2M, CHAPS 4 %, DTT 50 mM, anfolitas (Biolyte <sup>3</sup>/<sub>10</sub>) al 0.2% y azul de bromofenol 0.001%], las tiras se rehidrataron por 16 h y posteriormente se sometieron a un isoelectroenfoque (IEF) con un gradiente de voltaje de 0 a 250 V por 15 min, 250 V a 4000 V por 2 h y finalmente 4000 V hasta completar 8,000 V/h, después del IEF, las tiras se equilibraron por 15 min con cada una de las soluciones de equilibrio (Tris-HCl 0.375 mM, pH 8.8, urea 6 M, glicerol 20%, SDS 2%, DTT 2% y iodoacetamide 2.5%) en agitación constante. Para la segunda dimensión, las tiras del IEF se colocaron en la parte de arriba de un gel PAGE al 10% y cubiertas con agarosa overlay 0.5%. Las proteínas fueron separadas por 1 h a 95 V en una unidad Mini-protean III Cell (Bio-Rad), y posteriormente teñidas por tinción de Plata. Las imágenes fueron capturadas usando un fotodocumentador ChemiDoc™ XRS+System (Bio-Rad) y analizadas con el software de análisis PDQuest™ 2-D (Bio-Rad).

## **6.5 Identificación de proteínas mediante Espectrometría de Masas LC-ESI-HDMSE<sup>E</sup>**

Las proteínas seleccionadas fueron cortadas de los geles bidimensionales y se mandaron secuenciar mediante espectrometría de masas por ionización por electrospray acoplado a cromatografía líquida (LC-ESI-HDMSE<sup>E</sup>) en la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica, Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales del Cinvestav.

## **6.6 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa**

Para demostrar la expresión del transcrito que codifica para las PPC seleccionadas entre las cepas sensible y resistente de *C. glabrata* y *C. parapsilosis* se llevó a cabo el ensayo mediante RT-PCR (del inglés, Reverse transcription polymerase chain reaction) como se describe a continuación:

### **6.6.1 Extracción de RNA**

La extracción de RNA se realizó mediante la técnica de Trizol modificado de la siguiente manera: los cultivos celulares en fase levaduriforme de las cepas sensible y resistente al fluconazol de *C. glabrata* y *C. parapsilosis*, así como la cepa resistente sometida al fluconazol, fueron centrifugados a 3,500 rpm durante 10 min. La pastilla celular fue lavada exhaustivamente con dietilpirocarbonato al 1% (DEPC, Sigma-Aldrich). Posteriormente las células fueron lisadas mediante lisis mecánica con ayuda de un mortero con pistilo y usando nitrógeno líquido. Después de la lisis de las células en presencia del Trizol la muestra se incubó por 5 min a temperatura ambiente, para lograr la completa disociación del complejo nucleoproteína, se adicionó a la muestra 200 µL de cloroformo y se incubó de 2-3 min a temperatura ambiente. Después la muestra fue centrifugada a 12,000 rpm/ 15 min a 4 °C, la fase acuosa (que contiene el RNA) se colectó y se colocó en un tubo nuevo, se adicionaron 500 µL de alcohol isopropílico (Karal) frío, se agitó suavemente y se

incubó a temperatura ambiente por 10 min, para después centrifugar a 12,000 rpm/ 10 min a 4°C, se retiró el isopropanol y se adicionó un mililitro de etanol frío al 75% grado biología molecular y se centrifugó a 7,500 rpm / 5 min a 4 °C. Se eliminó el exceso de etanol y la pastilla fue resuspendida en 35 µL de agua DEPC y se almacenó a -20°C. Una vez realizada la extracción, la integridad del RNA se analizó por medio de electroforesis.

### **6.6.2 Retrotranscripción**

Brevemente, se trató 1µL de RNA total, 1 µL de DNasas , 1µL de Buffer 10 X y H<sub>2</sub>O hasta completar 10 µL de reacción la cual se incubó a 37 °C por 30 min, se le agregó 1µL de EDTA y se incubó a 65 °C por 10 min para inactivar la ADNasa. Posteriormente se cuantificó el RNA tratado con ADNasa y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para verificar la integridad. Para la síntesis de ADNc primero se preparó el RNA blanco y primer, para ello se usaron 9 µL del RNA tratado con ADNasa, 1 µL de oligo reverso, y el volumen final de la reacción fue de 11.6 µL, el cual se ajustó con H<sub>2</sub>O DEPC y se incubó a 70°C por 5 min, después a 4°C por 5 min. Posteriormente, se preparó la mezcla de transcripción reversa agregando al tubo anterior 4 µL de Buffer 5 X, 2.4 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 Mm, 1 µL de DNTP's y 1 µL de de ImProm-II™ Transcriptasa Reversa, obteniendo un volumen final de 20 µL. La reacción se incubó a 25°C por 5 min, después a 42°C por 60 min y finalmente a 70°C por 15 min para inactivar a la ImProm-II™ Transcriptasa Reversa. Finalmente se cuantificó el ADNc a 260 nm y se almacenó a -20°C hasta su uso.

### **6.6.3 Amplificación del gen de interés por PCR punto final**

Para demostrar la expresión del gen que codifique para las PPC seleccionadas se llevó a cabo a partir del ADNc sintetizado y utilizando los oligos generados a partir de la secuencia del gen de interés (Tabla 1). La amplificación del gen se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando un par de oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia del gen de interés. Como control

de expresión en las diferentes especies de *Candida* se utilizó el gen tubulina (*TUB2*) específico de *Candida*. Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% (p/v) teñidos con BrEt al 0.1% (p/v). Se utilizó un marcador de tamaño molecular de 50 pb de PROMEGA. Los geles se dejaron correr a 90V durante 60 min. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa teñidos con BrEt y analizados utilizando un software ImageJ 1.51j8 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Los datos de cuantificación de los productos de PCR se presentaron como la media  $\pm$  desviación estándar.

**Tabla 1.** Oligonucleótidos utilizados en este estudio.

Gen	Oligo	pb	Tm	Secuencia 5'--- 3'
<b><i>FBA1</i></b>	Fba1d	401	55.1	ATTGTTCTCMTCCCAYATGTTGG
	Fba1r		58.7	AGAACCACCGTGAAGACCAA
<b><i>ENO1</i></b>	Eno1d	292	55.1	GGTGACGAAGGTGGTGTY
	Eno1r		57.3	AAGCTTCCCAGTCATCTTCAGC
<b><i>ADH1</i></b>	Adh1d	362	55.7	AATGTCARGTACTCTGGTGTGTG
	Adh1r		57.5	ACACCRGCACACARAATTGGA
<b><i>GMP1</i></b>	Gmp1d	361	56.7	AGCAGCTTCTGGGTCCAA
	Gmp1r		56.6	AAGATCMTTCGATGTCCCACC
<b><i>TUB2</i></b>	Tub2d	261	57.9	GGTGCGCWTTTTGGGAAAC
	Tub2r		57.4	ACCTTTWGCCCAAACGTTTRCC

## 6.7 Análisis estadístico

Los valores numéricos de las intensidades reales de las bandas arrojados por el programa Image J 1.51j8 fueron normalizados con las intensidades reales del gen constitutivo (*TUB2*) de cada cepa. Posteriormente, se hizo el análisis estadístico T de student en IBM SPSS statistics 21.

## VII. RESULTADOS

### 7.1 Extracción de proteínas de la pared celular (PPC)

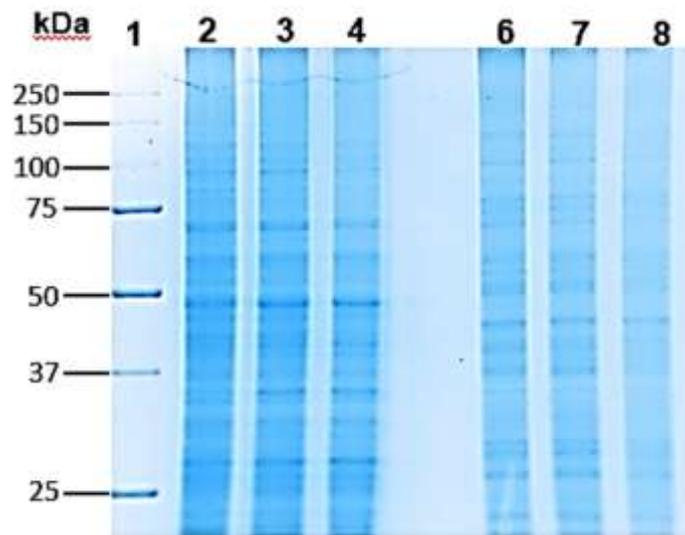
Se realizó la extracción de PPC de las cepas de *C. glabrata* S, R y RF y *C. parapsilosis* S, R y RF mediante el uso de SDS 2% y  $\beta$ -mercaptoetanol al 5%, las cuales se precipitaron con etanol al 70% y se cuantificaron mediante el método de Bradford a 560 nm (Tabla 2).

**Tabla 2.** Cuantificación de PPC de *C. glabrata* y *C. parapsilosis*.

Proteínas de Pared Celular (PPC)		
<i>C. glabrata</i>		$\mu\text{g/ml}$
518-H	Sensible	3.35
CGL43	Resistente	7.95
	Resistente c/ fluconazol	8.95
<i>C. parapsilosis</i>		$\mu\text{g/ml}$
1203-H	Sensible	0.803
735-H	Resistente	3
	Resistente c/ fluconazol	2.12

### 7.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS- PAGE)

Las PPC extraídas fueron separadas y analizadas mediante SDS-PAGE al 10% en donde se observó la integridad de las PPC. Además, los perfiles de proteínas fueron similares entre las cepas de la misma especie y diferentes entre especies (Fig. 10).



**Figura 10. Análisis de PPC de *C. glabrata* S, R y RF y *C. parapsilosis* S, R y RF mediante SDS-PAGE.** Gel de poliacrilamida al 10% teñido con Coomassie. Carril 1: Marcador de PM; Carril 2, 3 y 4: *C. glabrata* S, R y RF respectivamente; Carril 6, 7 y 8: *C. parapsilosis* S, R y RF respectivamente.

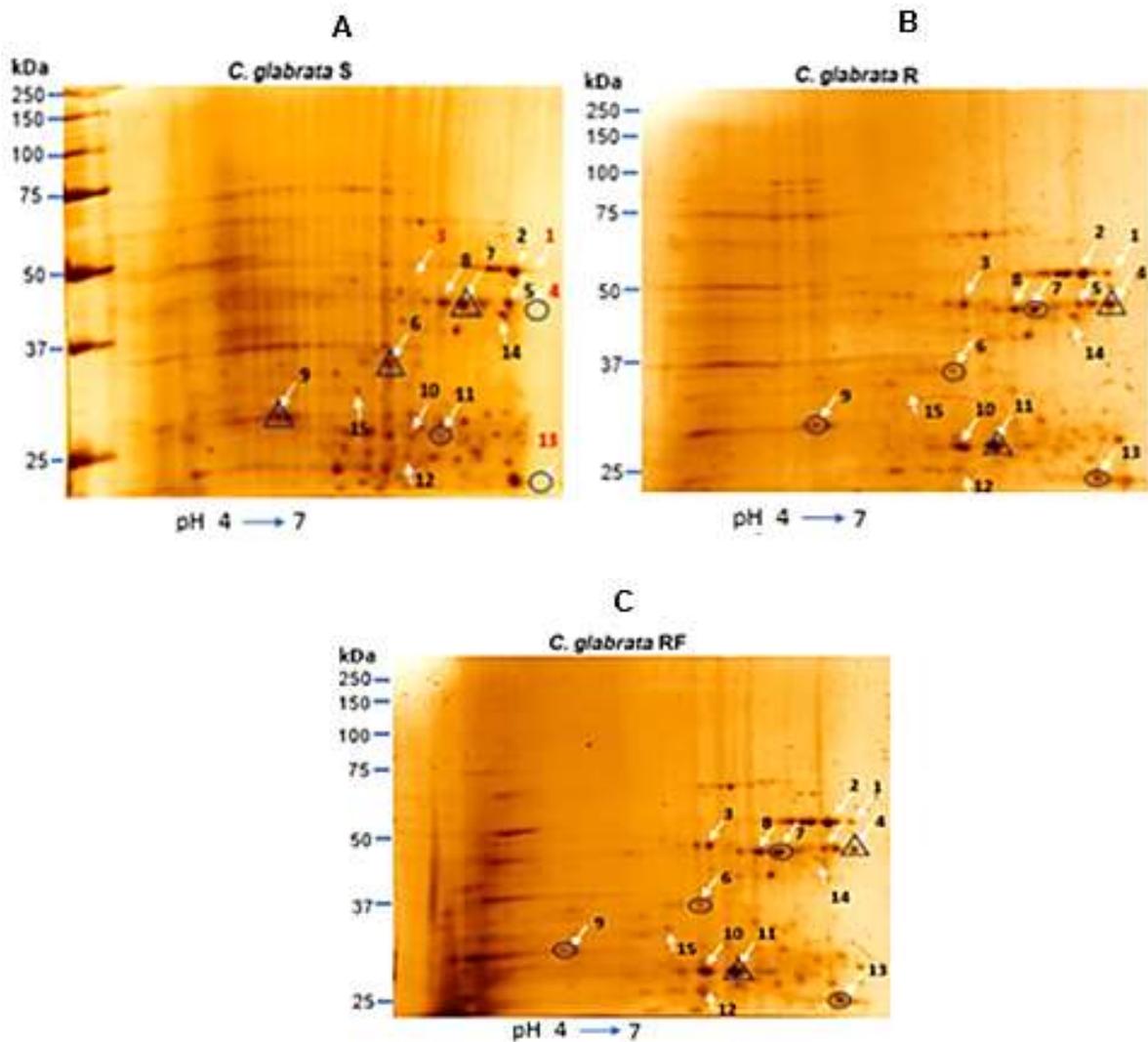
### 7.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida en dos dimensiones (PAGE-2D)

Para evaluar los cambios a nivel de expresión de proteínas entre las cepas de *C. glabrata* S, R y RF y *C. parapsilosis* S, R y RF se llevó a cabo la separación de proteínas mediante PAGE- 2D, identificando 15 y 17 proteínas expresadas diferencialmente en *C. glabrata* y *C. parapsilosis* respectivamente. De las proteínas identificadas se seleccionaron solamente 6 proteínas de cada especie para mandar secuenciar por espectrometría de masas acoplada a LC-ESI-HDMS<sup>E</sup> dado que fueron las que mostraron mayores cambios a nivel de expresión entre las condiciones analizadas.

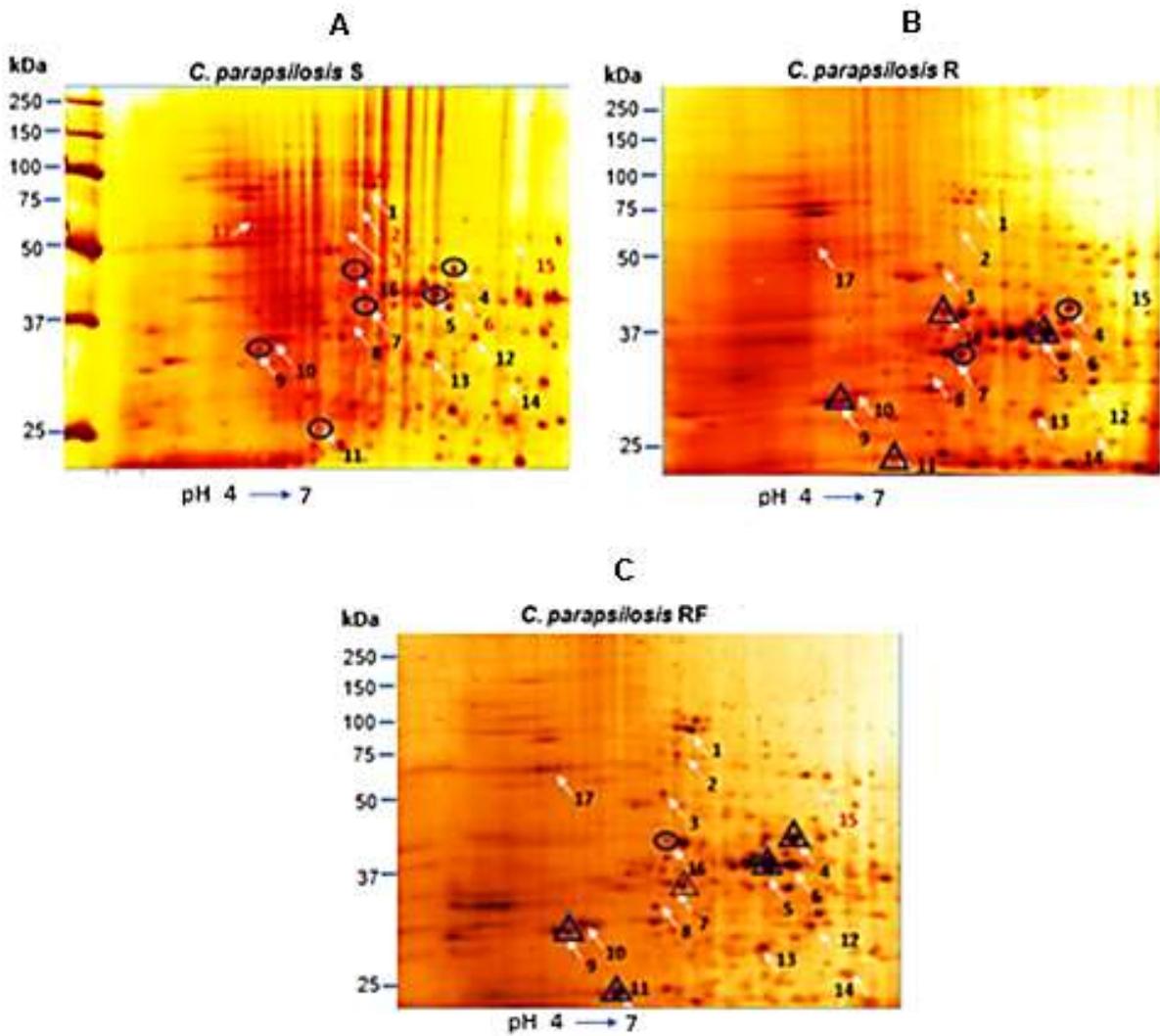
Las proteínas seleccionadas en *C. glabrata* oscilan entre pesos moleculares (PM) de 20 a 45 kDa (Fig. 11), mientras que en *C. parapsilosis* oscilan entre 25 a 50 kDa (Fig. 12). Los spots seleccionados para secuenciar en *C. glabrata* fueron el 4 (45 kDa), 6 (35 kDa), 7 (45 kDa), 9 (30 kDa), 11 (27 kDa) y 13 (20 kDa). El spot 4 se sobreexpresó en la cepa R y RF respecto a la cepa S en la cual se ve ausente. El

spot 6 mostró una sobreexpresión en la cepa S respecto a la R y RF, mientras que en el spot 7 y 9 la sobreexpresión se observó en la cepa S respecto a la cepa R y RF. En el spot 11 se observó una sobreexpresión en la cepa R y se mantiene en la RF, mientras que en el spot 13 se observó ausencia del spot en la cepa S, pero en la R y RF se observa el mismo nivel de expresión.

Para *C. parapsilosis* las proteínas que se mandaron secuenciar fueron los spots 4 (48 kDa), 5 (43 kDa), 7 (40 kDa), 9 (33 kDa), 11 (27 kDa) y 16 (45 kDa). Para el spot 4 se observó una sobreexpresión en la cepa RF con respecto a la cepa S y R. El spot 5 se sobreexpresó en la cepa R y RF, pero se vio disminuida la expresión en la cepa S. El spot 7 se sobreexpresó en la cepa RF con respecto a la cepa S y R. Para los spots 9 y 11 mostraron sobreexpresión en la cepa R y RF, pero se vio disminuída su expresión en la cepa S. Finalmente, el spot 16 solo se sobreexpresó en la cepa R y disminuyó su expresión en la cepa S y RF.



**Figura 11. Análisis del perfil de PPC de *C. glabrata* S, R y RF mediante PAGE-2D.** Las proteínas fueron analizadas mediante geles PAGE-2D teñidos con plata y utilizando tiras de 7 cm con un gradiente de pH de 4-7. Mediante flechas se encuentran señaladas las 15 proteínas identificadas que mostraron expresión diferencial, de las cuales se seleccionaron 6 cuya expresión diferencial fue mayor en comparación al resto, éstas están señaladas mediante triángulos (si se sobreexpresaron) y círculos (si disminuyeron la expresión) respecto a la cepa de referencia. A) PPC de *C. glabrata* S (518-H); B) PPC de *C. glabrata* R (CGL43) y C) PPC de *C. glabrata* RF (CGL43).



**Figura 12. Análisis del perfil de PPC de *C. parapsilosis* S, R y RF mediante PAGE-2D.** Las proteínas fueron analizadas mediante geles PAGE-2D teñidos con plata y utilizando tiras de 7 cm con un gradiente de pH de 4-7. Mediante flechas se encuentran señaladas las 17 proteínas identificadas que mostraron expresión diferencial, de las cuales se seleccionaron 6 cuya expresión diferencial fue mayor en comparación al resto, éstas están señaladas mediante triángulos (si se sobreexpresaron) y círculos (si disminuyeron la expresión) respecto a la cepa de referencia. A) PPC de *C. parapsilosis* S (1203-H); B) PPC de *C. parapsilosis* R (735-H) y C) PPC de *C. parapsilosis* RF (735-H).

## 7.4 Identificación de proteínas mediante Espectrometría de Masas LC-ESI-HDMSE<sup>E</sup>

Los 6 spots seleccionados de cada especie de *Candida* fueron secuenciados por espectrometría de masas acoplada a LC-ESI-HDMSE<sup>E</sup>, y también se realizó una búsqueda en Uniprot y Protein pilot para identificar las proteínas que corresponden a las secuencias obtenidas por espectrometría de masas, así como la posible función de las mismas.

En *C. glabrata* se lograron identificar 8 proteínas, un alcohol deshidrogenasa (Adh1) (spot 4), subunidad ribosomal 40S (spot 6), fructosa bifosfato aldolasa (Fba1) (spot 7), Bmh1p (spot 9), fosfoglicerato mutasa (Gpm1) (spot 9), quinona (spot 11), proteína de protoplasto secretado (Pst2p) (spot 13) y una Pre1 (spot 13). Las proteínas identificadas se encuentran enlistadas en la Tabla 3. Se presentaron dos casos de spots cuyos péptidos identificados pertenecieron a dos proteínas diferentes, tal es el caso del spot 9 y 11.

**Tabla 3.** Proteínas identificadas por espectrometría de masas acoplada a LC-ESI-HDMSE<sup>E</sup> en *C. glabrata*.

Spot	Proteínas identificadas	No de acceso	Peso (kDa)	pl	Péptidos identificados	Cobertura de secuencia (%)	Expresión		Función
							S/R	R/RF	
4	Alcohol deshidrogenasa (Adh1)	Q6FQA4_CANGA	37.943	6.01	7	15.91	Sobreexpresó	Disminuye expresión	Interacción con el huésped Formación de biofilm Procesos glicolíticos
6	Subunidad ribosomal 40S	Q6FW89_CANGA	30.316	5.85	10	21.30	Disminuye expresión	Sin cambio	Síntesis de proteínas
7	Fructosa bifosfato aldolasa (Fba1)	Q6FLL5_CANGA	39.527	5.49	4	12.19	Disminuye expresión	Sin cambio	Interacción con el huésped Procesos glicolíticos
9	Bmh1p	Q6FL46_CANGA	28.393	4.86	7	25.30	Disminuye expresión	Sin cambio	Exocitosis Transporte de vesículas Metabolismo de carbohidratos
9	Fosfoglicerato mutasa (Gpm1)	Q6FUX8_CANGA	27.590	6.55	3	16.60	Disminuye expresión	Sin cambio	Interacción con el huésped Procesos glicolíticos
11	Quinona	Q6FII7_CANGA	24.180	5.90	1	5.16	Sobreexpresó	Sin cambio	Pigmentación
13	Protoplasto secretado (Pst2p)	Q6FM13_CANGA	20.974	6.06	4	19.70	Sobreexpresó	Sin cambio	Respuesta al estrés
13	Pre1	Q6FRD0_CANGA	22.018	6.10	2	9.79	Sobreexpresó	Sin cambio	Degradación proteica

En *C. parapsilosis* se identificaron 6 proteínas, una enolasa (Eno1) (spot 4), fosfoglicerato quinasa (Pgk) (spot 4), fructosa bifosfato aldolasa (Fba1) (spot 5), esterol 24-C metiltransferasa (Erg6) (spot 7), cetoácido reductoisomerasa (spot 7) y Bmh1p (spot 11). Las proteínas identificadas se encuentran enlistadas en la Tabla 4. En *C. parapsilosis* también se identificaron en el spot 4 y 7 péptidos pertenecientes a dos proteínas diferentes, esto a causa de posibles solapamientos de proteínas que se pudo haber presentado durante la separación de las mismas en el gel PAGE-2D. También se presentó un caso en los spots 4 y 11 en los cuales se identificaron péptidos que correspondían a la enolasa 1, cuya causa pudo ser la separación de una subunidad de la proteína, ya que generalmente se encuentra en forma de dímero y está compuesta por dos subunidades distintas.

**Tabla 4.** Proteínas identificadas por espectrometría de masas acoplada a LC-ESI-HDMS<sup>E</sup> en *C. parapsilosis*.

Spot	Proteínas identificadas	No de acceso	Peso (kDa)	pI	Peptidos identificados	Cobertura de secuencia (%)	Expresión		Función
							S/R	R/RF	
4	Enolasa 1 (Eno1)	G8BCT3_CANPC	47.024	5.59	15	32.12	Sin cambio	Sobreexpresó	Procesos glicolíticos Respuesta al estrés
4	Fosfoglicerato quinasa (Pgk)	G8B5I4_CANPC	45.084	5.72	19	46.52	Sin cambio	Sobreexpresó	Interacción con el huésped Procesos glicolíticos
5	Fructosa bifosfato aldolasa (Fba1)	G8BI56_CANPC	39.841	5.37	9	33.98	Sobreexpresó	Sin cambio	Interacción con el huésped Procesos glicolíticos
7	Esterol 24-C-metiltransferasa (Erg6)	G8BJ82_CANPC	43.160	5.35	4	12.50	Sobreexpresó	Sin cambio	Metabolismo de lípidos
7	Cetoácido reductoisomerasa	G8B5K3_CANPC	44.57	6.30	2	5.04	Sobreexpresó	Sin cambio	Biosíntesis de aminoácidos
9	Bmh1p	G8B8N6_CANPC	30.596	4.72	15	40	Sobreexpresó	Sin cambio	Exocitosis Transporte de vesículas Metabolismo de carbohidratos
11	Enolasa 1 (Eno1)	G8BCT3_CANPC	47.024	5.59	11	21,87	Sin cambio	Sobreexpresó	Procesos glicolíticos Respuesta al estrés

## 7.5 Validación de los datos proteómicos mediante RT-PCR

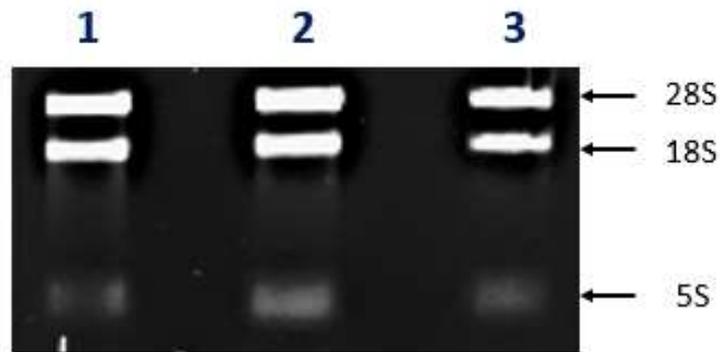
De todas las proteínas identificadas tanto en *C. glabrata* como *C. parapsilosis* S, R y RF, se seleccionaron dos proteínas de cada especie para hacer la validación de los datos proteómicos mediante RT-PCR, en base a su función identificada como proteínas involucradas en procesos de interacción con el huésped, en formación de biofilm y, además, consideradas como proteínas asociadas a pared celular. En *C. glabrata* se eligieron a la Adh1 y Gmp1, mientras que en *C. parapsilosis* a Eno1 y Fba11.

### 7.5.1 Extracción de ARN

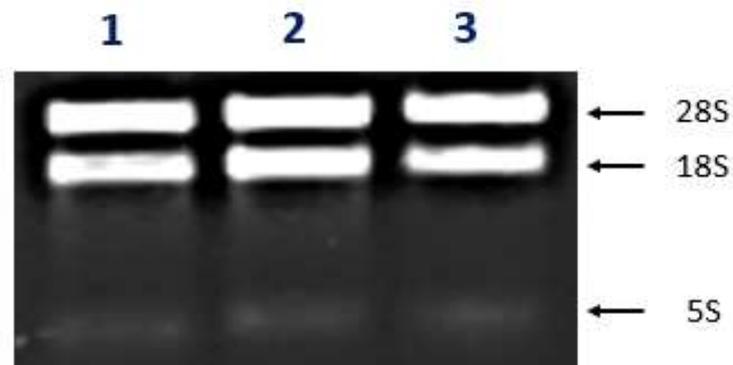
Para la validación de los datos proteómicos mediante RT-PCR, primero se realizó la extracción de RNA de las cepas de S, R y RF de *C. glabrata* y *C. parapsilosis*. Para ello, las células levaduriformes fueron lisadas de forma mecánica con ayuda de un mortero con pistilo y nitrógeno líquido. Posteriormente el ARN fue extraído por el método de TRIzol, obteniendo ARN de buena calidad de cada una de las cepas (Tabla 5). La integridad del ARN se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñido con BrEt. En los ARN extraídos de las cepas S, R y RF de *C. glabrata* (Fig. 13) y *C. parapsilosis* (Fig. 14) no se observó degradación y se lograron observar las tres subunidades ribosomales, la 28 S, 18 S y 5 S.

**Tabla 5.** Cuantificación del ARN extraído de las cepas S, R y RF de *C. glabrata* y *C. parapsilosis*.

<i>C. glabrata</i>			<i>C. parapsilosis</i>		
Cepa	( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	260/280	Cepa	( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	260/280
518-H S	3,96	2,16	1203-H S	5,47	2,12
CGL43 R	5,40	2,14	735-H R	5,52	2,15
CGL43 RF	6,66	2,13	735-H RF	2,88	2,12



**Figura 13. Análisis de la integridad del ARN extraído de las cepas S, R y RF de *C. glabrata* mediante electroforesis.** Gel de agarosa al 1% teñido con BrEt. Carril 1: ARN de la cepa S; Carril 2: ARN de la cepa R; Carril 3: ARN de la cepa RF. Se señalan mediante flechas las diferentes subunidades ribosomales presentes en el ARN: 28 S, 18 S y 5S.



**Figura 14. Análisis de la integridad del ARN extraído de las cepas S, R y RF de *C. parapsilosis* mediante electroforesis.** Gel de agarosa al 1% teñido con BrEt. Carril 1: ARN de la cepa S; Carril 2: ARN de la cepa R; Carril 3: ARN de la cepa RF. Se señalan mediante flechas las diferentes subunidades ribosomales presentes en el ARN: 28 S, 18 S y 5S.

### 7.5.2 Retrotranscripción (RT)

Una vez extraído el ARN, se realizó la RT para la obtención del ADN complementario (ADNc). Para ello, se utilizó el ARN extraído de cada una de las cepas S, R y RF de *C. glabrata* y *C. parapsilosis*, enzima Improm-II transcriptasa reversa y el oligo reverso específico de cada gen a evaluar. Las concentraciones de ADNc obtenido fueron aceptables en cada una de las cepas. La relación 260/280 de los ADNc sintetizados estuvo un poco por debajo de los límites de referencia indicando posible contaminación con proteínas (Tabla 6).

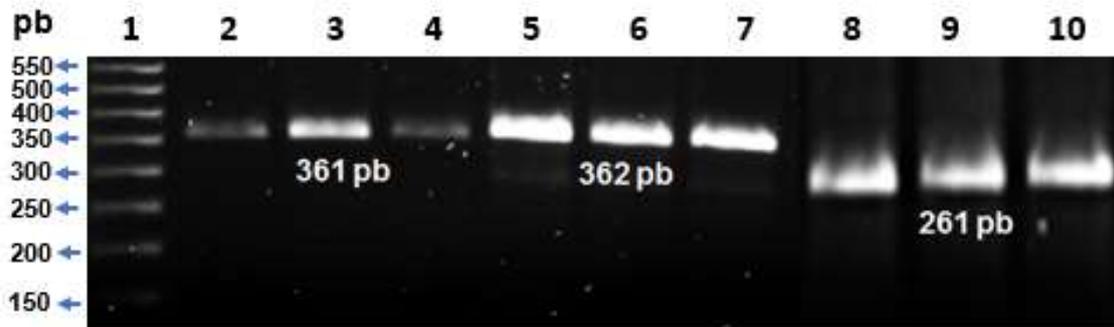
**Tabla 6.** Cuantificación del ADNc sintetizado por RT de las cepas S, R y RF de *C. glabrata* y *C. parapsilosis*.

<i>C. glabrata</i>			<i>C. parapsilosis</i>		
Cepa	Concentración (µg/µl)	260/280	Cepa	Concentración (µg/µl)	260/280
<b>518-H S</b>	0,64	1,56	<b>1203-H S</b>	0,69	1,55
<b>CGL43 R</b>	0,67	1,56	<b>735-H R</b>	0,67	1,55
<b>CGL43 RF</b>	0,6730	1,56	<b>735-H RF</b>	0,6885	1,55

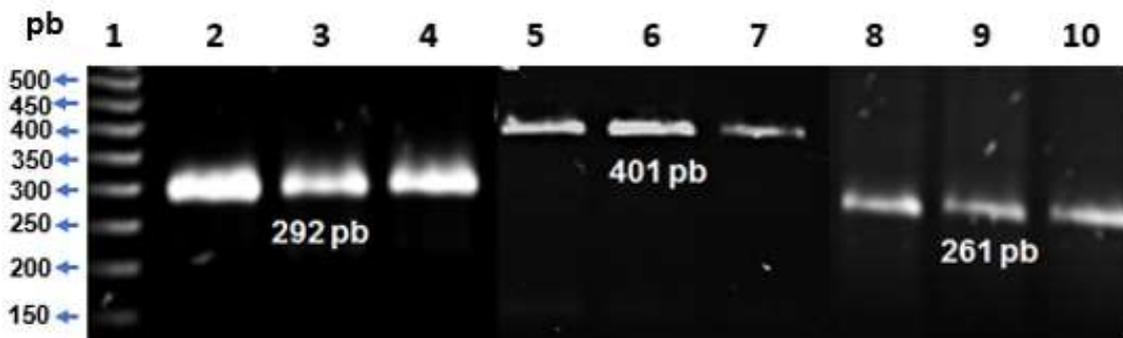
### 7.5.3 Amplificación del gen de interés por PCR punto final

Para la validación de los datos proteómicos mediante RT-PCR, en *C. glabrata* se eligieron las proteínas Adh1 (*ADH1*) y Gmp1 (*GMP1*), mientras que en *C. parapsilosis* se eligieron Eno1 (*ENO1*) y Fba1 (*FBA1*). Para las PCR punto final, se utilizó la enzima GoTaq Flexi DNA polimerasa de Promega, oligos específicos y el ADNc sintetizado por RT de cada una de las cepas de *Candida* analizadas. Los oligos específicos utilizados para la amplificación de los genes seleccionados se enlistados en la Tabla 1. Como gen constitutivo se utilizó el gen de Tubulina (*TUB2*).

Los productos amplificados por PCR fueron analizados en geles de agarosa al 2% teñidos con BrEt. Los fragmentos de cada gen amplificado para *C. glabrata* fueron: *GMP1* de 361 pb, *ADH1* de 362 pb y para *TUB2* de 261 pb (Fig. 15). Para *C. parapsilosis* los fragmentos de cada gen amplificado fueron *ENO1* de 292 pb, *FBA1* de 401 pb y para *TUB2* de 261 pb (Fig. 16).



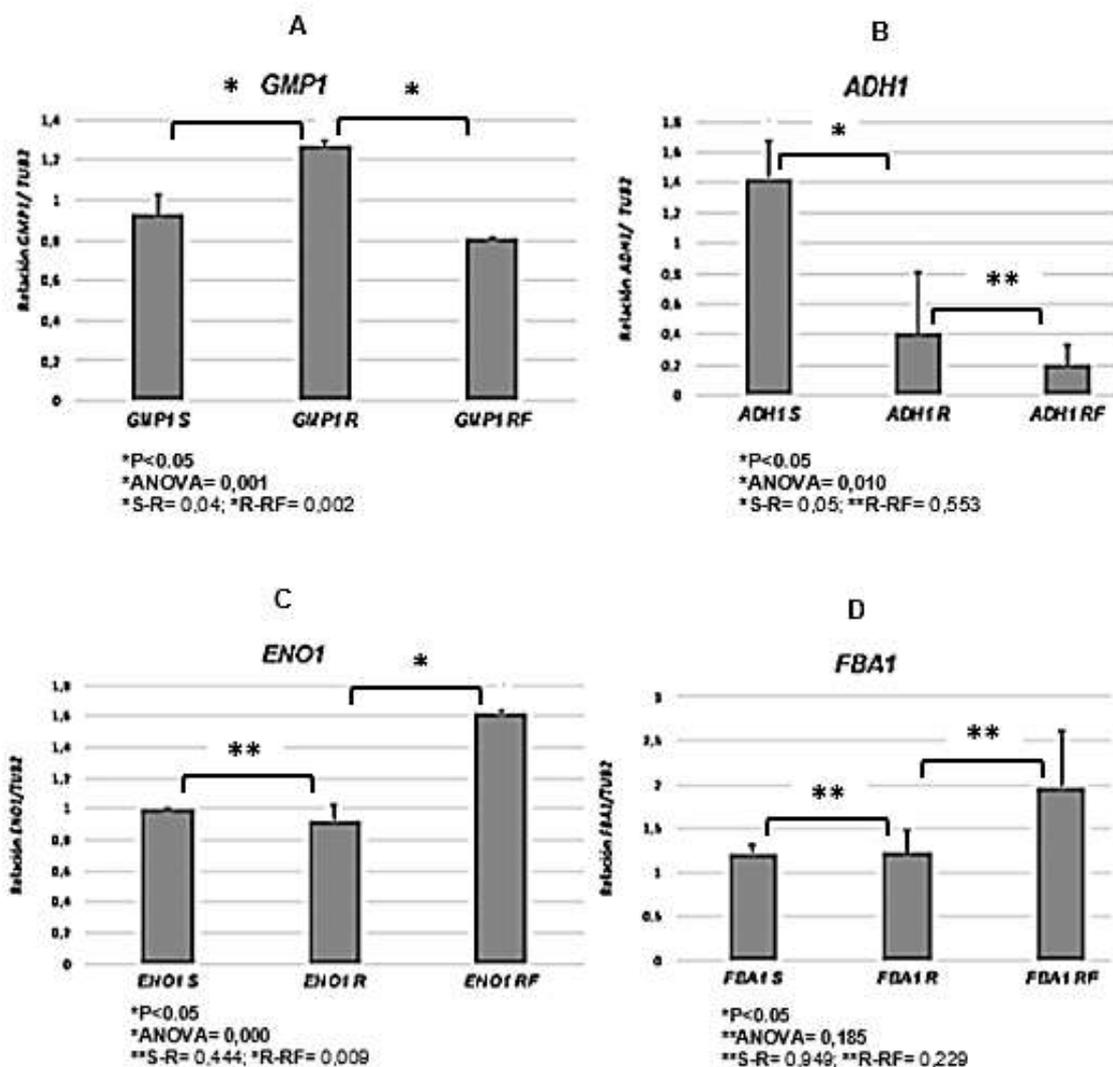
**Figura 15. Productos de amplificación de los genes *GMP1*, *ADH1* y *TUB2* de las cepas S, R y RF de *C. glabrata*.** Los productos amplificados fueron analizados en geles de agarosa al 2% teñidos con BrEt. 1) Marcador de tamaño molecular de 50 pb; 2) *GMP1* cepa S; 3) *GMP1* cepa R; 4) *GMP1* cepa RF; 5) *ADH1* cepa S; 6) *ADH1* cepa R; 7) *ADH1* cepa RF; 8) *TUB2* cepa S; 9) *TUB2* cepa R; 10) *TUB2* cepa RF.



**Figura 16. Productos de amplificación de los genes *ENO1*, *FBA1* y *TUB2* de las cepas S, R y RF de *C. parapsilosis*.** Los productos amplificados fueron analizados en geles de agarosa al 2% teñidos con BrEt. 1) Marcador de tamaño molecular de 50 pb; 2) *ENO1* cepa S; 3) *ENO1* cepa R; 4) *ENO1* cepa RF; 5) *FBA1* cepa S; 6) *FBA1* cepa R; 7) *FBA1* cepa RF; 8) *TUB2* cepa S; 9) *TUB2* cepa R; 10) *TUB2* cepa RF.

Se llevó a cabo un análisis semicuantitativo de la expresión de los genes analizados utilizando el software ImagJ 1.51j8 para obtener valores numéricos de cada una de las intensidades observadas en los geles de agarosa. Los valores obtenidos de las intensidades fueron normalizados utilizando el gen constitutivo *TUB2* (Fig. 17). Para determinar si presentaban diferencias significativas en la expresión de cada uno de los genes se aplicó la prueba de ANOVA en donde se observó diferencias significativas en la expresión de cada uno de los genes analizados ( $p < 0.05$ ). Posteriormente se aplicó la prueba T de student para ver las diferencias de la expresión de cada gen entre las especies de *Candida* analizadas, primero entre la

cepa S y R, posteriormente entre la cepa R y RF. En *C. glabrata*, la expresión diferencial de *GMP1* entre la cepa S y R, así como R y RF fue significativa ( $p < 0.05$ ); mientras que *ADH1* entre la cepa S y R también fue significativa ( $p < 0.05$ ). En *C. parapsilosis*, la expresión diferencial de *ENO1* entre la cepa R y RF fue significativa ( $p < 0.05$ ); mientras que *FBA1* en ninguna de las cepas mostro significancia ( $p > 0.05$ ) (Fig. 17).



**Figura 17. Análisis de la expresión de genes en las cepas S, R y RF de *C. glabrata* y *C. parapsilosis* por RT-PCR.** El análisis densitométrico de los productos de RT-PCR de cada gen analizado fue cuantificado usando el software ImageJ 1.51J8. Las barras representan el valor de la expresión de cada gen normalizado con el gen constitutivo *TUB2*. A) *GMP1*; B) *ADH1*; C) *ENO1*; D) *FBA1*. Los datos son presentados como el promedio  $\pm$  DS, n=3. \* Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). \*\* Diferencias no significativas ( $p > 0.05$ ).

## VIII. DISCUSIONES

La candidiasis es una micosis infecciosa no contagiosa producida por algunas especies de levaduras pertenecientes al género *Candida* (Gołabek *et al.*, 2015). *Candida* spp es el principal agente causal a nivel mundial de infecciones producidas por levaduras (72,8 casos/millón de habitantes cada año) (Pemán y Quindós, 2016). La candidiasis superficial es una de las formas clínicas más comunes, es característicamente crónica y recurrente, además puede ser el inicio de una candidiasis sistémica o invasiva (Palacios *et al.*, 2011).

Hasta principios de la pasada década, el tratamiento de elección para la candidiasis invasiva (CI) fue el fluconazol, antifúngico perteneciente a la familia de los azoles, pero la experiencia adquirida durante los últimos 10 años en el tratamiento de la CI con el empleo de las diferentes equinocandinas, ha hecho que diferentes sociedades médicas se replantearan las recomendaciones respecto al tratamiento de elección (Cardozo y Mensa, 2015). Actualmente, el aumento de la falla al tratamiento con antifúngicos se debe principalmente al surgimiento de levaduras resistentes. En México, aunque no se han cuantificado los casos de resistencia en hospitales de atención general y de especialidades, se ha observado un incremento importante en el número de pacientes con micosis que no responden a los tratamientos (Manzano-Gayosso *et al.*, 2008). Para los azoles, son tres mecanismos de resistencia ya descritos, tales como el uso de bombas de flujo, la sobreexpresión de *ERG11* y la presencia de mutaciones puntuales en el centro catalítico de *ERG11* (White, 1997; Pfaller, 2012; Pais *et al.*, 2015; López-Ávila *et al.*, 2016; Scorzoni *et al.*, 2017).

La proteómica se considera una herramienta útil para el estudio de los mecanismos implicados en la resistencia fúngica (Cuesta- Astroz y Segura- Latorre, 2012). Las proteínas de pared celular (PPC) fúngica se consideran potentes inmunomoduladores como blancos antifúngicos y a la fecha, no hay estudios proteómicos sobre el perfil de PPC de cepas de *Candida* resistentes a los antifúngicos. En base a estos antecedentes, el objetivo del presente estudio fue evaluar el perfil de PPC entre cepas Sensibles (S) y Resistentes (R) al fluconazol (F) de *C. glabrata* y *C. parapsilosis*.

Para este estudio se logró extraer fracciones enriquecidas de PC de cepas S, R y RF de *C. glabrata* y *C. parapsilosis*, a las cuales se procedió a extraer las PPC utilizando SDS y  $\beta$ -mercaptoetano. Las PPC extraídas fueron analizadas por SDS-PAGE 1-D y teñidas con azul de Coomassie (Fig. 10). En el análisis de perfil de proteínas se observó patrones similares entre cepas de la misma especie y diferentes patrones entre diferentes especies, demostrando la variabilidad de PPC que se expresan en *C. glabrata* y *C. parapsilosis*. Posteriormente, las PPC extraídas fueron analizadas mediante geles PAGE 2D observando un total de 15 y 17 PPC expresadas diferencialmente en *C. glabrata* (S, R y RF) (Fig. 11) y *C. parapsilosis* (S, R, y RF) (Fig. 12) respectivamente, de las cuales se eligieron 6 spots de cada especie, cuya expresión diferencial fue mayor al menos dos veces con respecto al control, para mandarlas secuenciar e identificar por LC-ESI-HDMS<sup>E</sup>. De los spots enviados a secuenciar se identificaron un total de 14 proteínas las cuales están involucradas en diversos procesos biológicos tales como adhesión, procesos glucolíticos, síntesis de proteínas, metabolismo de lípidos, de carbohidratos y transporte de vesículas, biosíntesis de aminoácidos, degradación proteica y proteínas de estrés. En *C. glabrata* se lograron identificar 8 proteínas: Adh1 (spot4), Subunidad ribosomal 40S (spot 6), Fba1 (spot 7), Bmh1 (spot 9), Gmp1 (spot9), Quinona (spot 11), Pst2p (spot 13) y Pre1 (spot 13) (Tabla 3). En *C. parapsilosis* se lograron identificar 6 proteínas: Eno1 (spot 4 y 11), Pgk (spot 4), Fba1 (spot 5), Erg6 (spot 7), cetoácido reductoisomerasa (spot 7) y Bmh1 (spot 9) (Tabla 4). La Fba1 fue identificada tanto en *C. glabrata* como *C. parapsilosis*. En el caso del spot 16 para *C. parapsilosis*, no se logró identificar ningún péptido ya que en la muestra se identificó queratina humana la cual se pudo haber contaminado el spot durante el manejo del gel, aun cuando se tuvieron los cuidados necesarios para su manipulación durante la tinción y corte.

Las proteínas Eno1, Fba1, Adh1, Gmp1 y PgK, en estudios previos por Serrano-Fujarte *et al.* (2016) fueron identificadas como PPC “multifuncionales” las cuales modificaron su expresión en respuesta al estrés oxidativo. Las proteínas “multifuncionales presentan diferente función según su localización en la célula, o bien, de acuerdo a Gomariz *et al.*, 2009 y Araújo- Silva *et al.*, 2017, carecen de secuencias señal para exportarse por la vía RE-Golgi y ser transportadas a la PC

por la vía de secreción clásica. Dichos autores sugieren que estas proteínas son transportadas a PC a través de vesículas extracelulares como un mecanismo de transferencia de proteínas al exterior de la célula.

Por otro lado, también se le ha adjudicado a Fba1 y Eno1 la participación como posibles factores de virulencia al ser consideradas proteínas de unión al plasminógeno humano, las cuales promueven su conversión a plasmina aumentando la capacidad fibrinolítica del hongo y el potencial de adhesión e invasión a células del huésped, además de estar involucrados en procesos glucolíticos (Chávez-Araújo *et al.*, 2015). En otro estudio, se reportó que las proteínas Adh1, Gmp1 y PgK presentan función de adhesina y están involucrados en procesos glucolíticos (Serrano-Fujarte *et al.*, 2016). Otro tipo de proteínas identificadas en este estudio están involucradas en el metabolismo de lípidos (Erg6), de carbohidratos y transporte de vesículas (Bmh1) y en la degradación proteica (Pre1), también en síntesis de proteínas (subunidad ribosomal 40S), biosíntesis de aminoácidos (cetoácido reductoisomerasa) y proteínas de estrés (Pst2p) (Hernández- Haro, 2014).

El impacto de proteínas, además de la 14- $\alpha$ -demetilasa (*ERG11*), en la vía de biosíntesis del ergosterol ha sido poco estudiado (Morio *et al.*, 2012), pero se ha demostrado la importancia reguladora de Esterol 24C- metiltransferasa (Erg6) en dicha vía mediante análisis de los niveles de esteroides en cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que sobreexpresan *ERG6* (Zhang *et al.*, 2009). Esta proteína tiene gran importancia en la organización de la PC, ya que esta depende fuertemente de la composición del esteroide de la membrana plasmática (Vandeputte *et al.*, 2008). Además, Erg6 cataliza un punto biosintético no encontrado en humanos, lo que pudiera sugerir un posible blanco antifúngico potencial (Jensen-Pergakes *et al.*, 1998).

Para la validación de los datos proteómicos se seleccionaron un total de 4 proteínas de interés, en función de sus antecedentes como proteínas asociadas a PC. Para *C. glabrata* se eligieron las proteínas Adh1 (*ADH1*) y Gmp1 (*GMP1*), mientras que en *C. parapsilosis* se eligieron Eno1 (*ENO1*) y Fba1 (*FBA1*). Dicha validación se realizó mediante un análisis semicuantitativo de la expresión de las proteínas

seleccionadas en *C. glabrata* y *C. parapsilosis* mediante RT-PCR (Fig. 17). De acuerdo a los resultados obtenidos, en *C. glabrata*, la expresión diferencial de *GMP1* entre la cepa S y R, así como R y RF fue significativa (Fig. 17, A); mientras que la *ADH1* entre la cepa S y R también fue significativa (Fig. 17, B). Los cambios de la expresión de la proteína Gmp1 mediante los geles PAGE-2D concuerda con el observado a nivel de transcrito. Adh1 presentó patrones de expresión similares en las cepas R y RF a los observados en su transcrito, pero en la cepa S se observa una mayor expresión en comparación a la proteína. En este caso el spot de la Adh1 de la cepa S no se logró detectar en los geles PAGE-2D lo cual puede estar asociado a que no hubo una buena separación de la proteína al encontrarse en una región del extremo del gel, por lo que para determinar la validación de los datos proteómicos una solución puede ser utilizar tiras con un gradiente de pH amplio de 3 a 10 y determinar la presencia de la Adh1 entre las cepas de *C. glabrata* S y R. En *C. parapsilosis*, la expresión diferencial de *ENO1* entre la cepa R y RF fue significativa (Fig. 17, A); mientras que la de *FBA1* en ninguna de las cepas mostró significancia (Fig. 17, B). Los cambios de la expresión de las proteínas Eno1 y Fba1 concuerdan con los observados a en su transcrito validando con esto los análisis protómicos obtenidos.

Nuestros resultados sugieren que las proteínas identificadas están asociadas a la PC y pudieran estar involucradas en los mecanismos de resistencia a la familia de los azoles en *C. glabrata* y *C. parapsilosis*, posibilitando la identificación de nuevos genes relacionados a esta, conocimiento esencial que nos puede ayudar para el desarrollo de nuevas estrategias profilácticas y terapéuticas eficaces que eviten los problemas que están apareciendo en la actualidad de infecciones por cepas resistentes de este hongo.

## IX. CONCLUSIONES

- En el análisis del perfil de PPC de *C. glabrata* S, R, y RF mediante PAGE-2D, se observaron 15 proteínas expresadas diferencialmente, de las cuales se eligieron 6 spots para su secuenciación e identificación por espectrometría de masas acoplada a LC-ESI-HDMS<sup>E</sup>, logrando identificar 8 proteínas: Adh1, Subunidad ribosomal 40S, Fba1, Bmh1, Gmp1, Quinona, Pst2p y Pre1.
- En el análisis del perfil de PPC de *C. parapsilosis* S, R, y RF se observaron 17 proteínas expresadas diferencialmente, de las cuales se eligieron 6 spots para su secuenciación e identificación, logrando identificar 6 proteínas: Eno1, Pkg, Fba1, Erg6, cetoácido reductoisomerasa y Bmh1.
- Los datos proteomicos obtenidos del análisis del perfil de PPC fueron validados mediante RT-PCR evaluando la expresión de los genes *GMP1* y *ADH1* para *C. glabrata* y los genes *ENO1* y *FBA1* para *C. parapsilosis*.

## X. REFERENCIAS

- Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Gorg A, Westermeier R. 1982. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods*. 6(4):317-339.
- Bonifaz A. 2012. *Micología medica básica*. Cuarta edición. Editorial Mc Graw Hill. Pp. 333-335.
- Cardozo C, Mensa J. 2015. Manejo de la candidiasis invasiva en el paciente no neutropénico. *Rev Esp Quimioter*. 28(1): 34-37.
- Chávez- Araújo EG, Weber- Shneider S, Bão-Nair S, Pereira- Augusto L, Bailão-Melo A, Borges- Luiz C, Soares- de Almeida CM. 2015. Analysis of Paracoccidioides secreted proteins reveals fructose 1,6-bisphosphate aldolase as a plasminogen-binding protein. *Bio Med Cen*. 15(53): 2-14.
- Chong HS, Campbell L, Padula MP, Hill C, Harry E, Li SS, Wilkins MR, Herbert B, Carter D. 2012. Time-Course Proteome Analysis Reveals the Dynamic Response of *Cryptococcus gattii* Cells to Fluconazole. *PLoS ONE* 7(8): e42835.
- Corzo-Leon D, Armstrong-James D, Denning D. 2015. Burden of serious fungal infections in Mexico. *Mycoses*. 58: 34-44.
- Cuesta- Astroz Y y Segura- Latorre C. 2012. Métodos proteómicos aplicados al estudio de la malaria: *Plasmodium falciparum*. *Acta Biol. Colomb*. 17(3): 463-484.
- De la calle- Rodríguez N, Santa-Veléz C, Cardona-Castro N. 2012. Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *Candida albicans* y hongos dermatofitos. *Rev CES Med*. 26(1): 43-55.
- De la Torre-Gómez C. 2004. Aplicación de técnicas de proteómica para el estudio de enfermedades neuromusculares. (Tesis doctoral). Universitat Autònoma de Barcelona.
- El Ahmed H, de la Fuente C, Arturo G, Fernandez R, Gonzáles E, Cantero J, Lardón M. 2012. Candidiasis cutánea generalizada en recién nacido a término. *Biomédica*. 32(2): 1-13.

- Falagas ME, Roussos N, Vardakas KZ. 2010. Relative frequency of *albicans* and the various non-*albicans Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. *Int J of Infect Dis*. 14: e954–e966.
- Fuentes M, Hermosilla G, Alburquerque C, Falconer MA, Amaro J, Tapia C. 2014. Caracterización de los mecanismos de resistencia a azoles en aislados clínicos chilenos de *Candida albicans*. *Rev Chilena Infectol*. 31(5): 511-517.
- García-Vidal C, Carratalà J. 2012. Patogenia de la infección fúngica invasora. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 30(3):151–15.
- Gołębek K, Katarzyna J, Owczarek A, Cuber P, Ślemp-Migiel A, Wiczowski A. 2015. Selected mechanisms of molecular resistance of *Candida albicans* to azole drugs. *ABC*. 62(2): 247–251.
- Gómez- Quintero CH. 2010. Resistencia de levaduras del género *Candida* al fluconazol. *Infectio*. 14(S2): 172-180.
- Gutiérrez- Martínez MJ, Araiza- Santibáñez J, Hernández MA, Chávez- Mayol JM, Rodríguez- Piñeyro OM, Bonifaz A. 2012. Estudio *in vitro* de antimicóticos contra cepas de *Candida* aisladas de pacientes del Hospital General de México OD. *Dermatol Rev Mex*. 56(2): 93-101.
- Hernández A, Vasallo PM, Torres A, Salido E. 1994. Análisis del RNA: Estudio de la expresión génica. *Nefrología*. 14(2): 145-162.
- Hoehamer CF, Cummings ED, Hilliard GM, Rogers D. 2010. Changes in the Proteome of *Candida albicans* in Response to Azole, Polyene, and Echinocandin Antifungal Agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 54(5):1655–1664.
- Hooshdaran MZ, Barker KS, Hilliard GM, Kusch H, Morschhäuser J, Rogers PD. 2004. Proteomic Analysis of Azole Resistance in *Candida albicans* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 48(7): 2733–2735.
- Izquierdo G, Santolaya ME. 2014. Candidiasis invasoras en recién nacidos: diagnóstico, tratamiento y prevención. *Rev Chilena Infectol*. 31(1): 73-83.
- Katzung B, Masters S, Trevor A. 2009. *Basic and Clinical Pharmacology*, 11th Edition. NY: McGraw-Hill Medical.

- Kullberg BJ, Arendrup MC. 2015. Invasive Candidiasis. *N Engl J Med.* 373: 1445-56
- Lim CSY, Rosli R, Seow HF, Chong PP. 2012. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 31:21–31.
- Liu, TT, Lee RE, Barker KS, Wei L, Homayouni R, Rogers. 2005. Genome-wide expression profiling of the response to azole, polyene, echinocandin, and pyrimidine antifungal agents in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.*49: 2226–2236.
- López- Ávila K, Lugo-Caballero C , Arias-León JJ, Zavala-Castro JE , Dzul-Rosado KR. 2016. Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. Una revisión. *Rev Biomed.* 27:127-136.
- Loureiro y Penha CV, Kubitschek PHB, Larcher G, Perales J, Rodriguez León I, Lopez- Bezerra LM, Bouchara JP. 2010. Proteomic analysis of cytosolic proteins associated with petite mutations in *Candida glabrata*. *Braz J Med Biol Res.* 43(12): 1203-1214.
- Maebashi K, Kudoh M, Nishiyama Y. 2002. A novel mechanism of fluconazole resistance associated with fluconazole sequestration in *Candida albicans* isolates from a myelofibrosis patient. *Microbiol Immunol.* 46: 317 – 326.
- Manzano- Gayosso P, Méndez- Tobar LJ, Hernández- Hernández F, López- Martínez R. 2008. *Gac Med Méx.* 144(1): 23-26.
- Nucci M, Queiroz F, Tobón A, Restrepo A, Colombo AL. 2010. Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America. *Clin Infect Dis.* 51(5): 561-570.
- Palacios CP, Gómez LM, Cardona N. 2011. Candidiasis mucocutánea: espectro clínico. *Rev Asoc Colomb Dermatol.*19: 239-244
- Parker J, Warrilow A, Price C, Mullins J, Kelly D, Kelly S. 2014. Resistance to antifungals that target CYP51. *J Chem Biol.* 7: 143–161.
- Pemán J, Quindós G. 2016. Aspectos actuales de las enfermedades invasoras causadas por *Candida* y otros hongos levaduriformes. *Rev Iberoam Micol.* 33(3): 133-139.

- Pérez- Chabela ML, Soriano- Santos J, Ponce- Alquicira E, Díaz- Tenorio LM. 2015. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS como herramienta en el estudio de las proteínas miofibrilares. NACAHEM. 9(2): 77-96.
- Pontón J. 2008. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. Rev Iberoam Micol. 25: 78-82.
- Rabilloud T. 2002. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. Proteomics. 2(1):3-10.
- Ramírez-Quijas MD, López-Romero E, & Cuéllar-Cruz M. 2015. Proteomic analysis of cell wall in four pathogenic species of *Candida* exposed to oxidative stress. Microb Pathog . 87:1-12.
- Rey O, Peñamaría- Mallón M, Rodríguez- Piñon M, Martín- Biedma B, Blanco-Carrión A. 2015. Candidiasis oral en el paciente mayor. Av. Odontoestomatol. 31 (3): 135-148.
- Reyes J, Arenas R. 2007. Candidiasis mucocutánea. Una revisión. Rev. Mex. De Micol. 25: 91-104.
- Riat A, Neofytos D, Coste AT, Harbarth S, Bizzini A, Grandbastien B, Pugin J, Lamoth F. 2018. First case of *Candida auris* in Switzerland: discussion about preventing strategies. Swiss Med Wkly. 148: 1-4.
- Rivera LE, Ramos AP, Desgarenes CP. 2005. Factores de virulencia en *Candida* sp. Dermatología Rev Mex. 49:12-27.
- Rogers PD, Vermitsky JP, Edlind TD, Hilliard GM. 2006. Proteomic analysis of experimentally induced azole resistance in *Candida glabrata*. J Antimicrob Chemother. 58: 434–438.
- Ruiz-Baca E, Cuellar-Cruz M, López-Romero E, Reyes-Montes MR, Toriello C. 2013. Fungal cell-wall antigens for the diagnosis of invasive fungal infections. Chapter 10. Nova Science Publishers, Inc. [https://www.novapublishers.com/catalog/product\\_info.php?products\\_id=40080](https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=40080).
- Sandoval- Usme MC, Umaña- Pérez A, Vallejo- Pulido AF, Arévalo- Ferro C, Sánchez- Gómez M. 2009. La proteómica en la era postgenómica. Acta biol. Colomb. 14(3): 19-30.

- Scorzoni L, de Paula e Silva ACA, Marcos CM, Assato PA, de Melo WCMA, de Oliveira HC, Costa-Orlandi CB, Mendes-Giannini MJS, Fusco-Almeida AM. 2017. Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis. *Front. Microbiol.* 8(36): 1-23.
- Serrano- Fujarte I, López- Romero E, Cuéllar- Cruz M. 2016. Moonlight-like proteins of the cell wall protect sessile cells of *Candida* from oxidative stress. *Microb Pathog.* 22-33.
- Shen Y, Zhang L, Jia X, Zhang Y, Lu H. 2015. Differentially expressed proteins in fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant isolates of *Candida glabrata*. *Drug Discov Ther.* 9(3): 191-196.
- Song JL, Harry JB, Eastman RT, Oliver BG, White TC. 2004. The *Candida albicans* Lanosterol 14--Demethylase (*ERG11*) Gene Promoter Is Maximally Induced after Prolonged Growth with Antifungal Drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(4): 1136–1144.
- Tapia S. 2008. *Candida glabrata*. *Rev Chil Infect.* 25 (4): 293.
- Tobar EA, Silva F, Olivares R, Gaete P, Luppi M. 2011. Candidiasis invasoras en el paciente crítico adulto. *Rev Chil Infect.* 28(1): 41-49
- Torres-Saldaña VA, Martínez- Velazquez M, Reséndiz- Sánchez J. 2014. Factores de riesgo y epidemiología de la candidemia en el Hospital Juárez de México. *Med Int Méx.* 30:121-132.
- Vega-Sánchez DC, Bernal-López LE, Villanueva-Recillas S, Arenas-Guzmán R. 2015. Infecciones urinarias por *Candida* spp. Estudio de 29 pacientes en un hospital general. *Med Int Méx.* 31:19-24.
- Wang Z, Zhang G, Zhang X, Wu S, Yin X, Zhang H. 2012. Proteomic analysis of fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Afr J Pharm Pharmacol.* 6(16): 1226-1230.
- White TC. 1997. The Presence of an R467K Amino Acid Substitution and Loss of Allelic Variation Correlate with an Azole-Resistant Lanosterol 14a Demethylase in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 41(7): 1488–1494.

Yoo JI, Choi CW, Kim HS, Yoo JS, Jeong YH, Lee YS. 2012. Proteomic Analysis of Cellular and Membrane Proteins in Fluconazole-Resistant *Candida glabrata*. *Osong Public Health Res Perspect.* 3(2): 74-78.

Yoo JI, Kim HS, Choi CW, Yoo JS, Yu JY, Lee YS. 2013. Proteomic Analysis of Intracellular and Membrane Proteins from Voriconazole-Resistant *Candida glabrata*. *Osong Public Health Res Perspect.* 4(6): 293-300.

Zhang Z, He X, Li W, Lu Y, Wang Z, Zhang B. 2009. Regulation role of sterol C-24 methyltransferase and sterol C-8 isomerase in the ergosterol biosynthesis of *Saccharomyces cerevisiae*. *Wei Cheng Wu Xue Bao.* 49(8): 1063-8.

## XI. ANEXOS



# 6<sup>o</sup> CONGRESO DE LA RAMA DE FISICOQUÍMICA, ESTRUCTURA Y DISEÑO DE PROTEÍNAS



UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO  
6 AL 10 DE NOVIEMBRE 2017  
DURANGO, MÉXICO



**Proteomic analysis of cell wall of *Candida glabrata* and *Candida parapsilosis* resistant to fluconazol**

Corral-Pérez, Karina; Saucedo-Mendiola, María Leticia; López-Rodríguez, Angélica; Tinoco-Favila, Juan Carlos; Martínez-Aguilar, Gerardo; Salcido-Gutiérrez, Lorena; Ruiz-Baca, Estela

Facultad de Ciencias Químicas UJED.

Hospital General 450, Secretaría de Salud Durango (SSD).

Hospital General zona No. 1 de Durango, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

karito\_anirak@hotmail.com

Cell wall proteins (CWPs) of fungus are considered potent immunomodulators as antifungal targets. To date, no studies have been done on CWPs of antifungal resistant strains of *Candida*. The identification and characterization of proteins related to antifungal resistance allows us to identify genes and mechanisms related to antifungal resistance; this knowledge could help to design new therapeutic tools. To analyze the CWPs of *C. glabrata* and *C. parapsilosis* resistant to fluconazol, strains sensitive (S), and resistant (R) of both species were cultured in YPD medium with and without fluconazole for 7 h. Cells were harvested by centrifugation, washed, and mechanically broken with glass beads. First, the CW were obtained by centrifugation, then washed and lyophilized. The CWPs were extracted with SDS and  $\beta$ -mercaptoethanol, then precipitated with 70% ethanol. The CWPs were analyzed by PAGE-2D gels and selected spots were sequenced by LC-MS/MS. A differential expression of 7 and 5 proteins were observed in the PAGE-2D analysis of CWPs of *C. glabrata* (S, R and RF) and *C. parapsilosis* (S, R, and RF), respectively. These proteins were identified by LC-MS/MS. Based on these results, we propose that these proteins may be involved in the mechanisms of antifungal resistance of *Candida*.



**6<sup>o</sup>** CONGRESO DE LA RAMA  
DE FISCOQUÍMICA, ESTRUCTURA  
Y DISEÑO DE PROTEÍNAS

**DURANGO, MEXICO**

**November 6-10, 2017**

Sociedad Mexicana de Bioquímica certify that

**Karina Corral Pérez**

Presented the poster entitled:

**Proteomic analysis of cell wall of *Candida glabrata* and *Candida parapsilosis*  
resistant to fluconazol**

By:

Corral-Pérez, Karina; Saucedo-Mendiola, María Leticia; López-Rodríguez, Angélica; Tinoco-Favila, Juan Carlos; Martínez-Aguilar, Gerardo; Salcido-Gutiérrez, Lorena; Ruiz-Baca, Estela.

At the 6° Congreso de la Rama de Fiscoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas held on  
November 6-10, 2017 in Durango, Durango, Mexico.

On behalf

The organizing Committee

Dr. Alfredo Téllez Valencia

Dra. Mariana Peimbert Torres



REVISTA DE INVESTIGACION CIENTIFICA DURANGUENSE  
VOLUMEN I, COMPLEMENTO NO. 1, JULIO-SEPTIEMBRE 2017  
ORGANO OFICIAL DE LA SECRETARIA DE SALUD DURANGUENSE

# Memorias de la **I Jornada Nacional de Investigación en Salud Durango 2017**

## Contenido

- Editorial, pág. 3
- Investigación básica, pág. 6
- Investigación Clínica, pág. 25
- Investigación en Biotecnología e Innovación, pág. 53
- Investigación en Ciencias Sociales y Humanidades, pág. 96
- Investigación en salud pública, pág. 120
- Casos clínicos, pág. 177



<http://salud.durango.gob.mx/es/saludconciencia>

JN-CAR-IB-16

## ANÁLISIS DEL PERFIL DE PROTEÍNAS DE LA PARED CELULAR DE *Candida glabrata* Y *Candida parapsilosis* RESISTENTES AL FLUCONAZOL

Cerral Pérez Karina<sup>1</sup>, Saucedo-Mendiola Leticia<sup>1</sup>, López-Rodríguez Angélica<sup>1</sup>, Tinoco-Favila Juan Carlos<sup>1</sup>, Martínez-Aguilar Gerardo<sup>1</sup>, Salcido-Gutiérrez Lorena<sup>2</sup>, Ruiz-Baca Estela<sup>3</sup>

1. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango (UJED), Durango.

2. Hospital General RSC Secretaría de Salud Durango (SSD), Durango.

3. Hospital General Área No. 1 de Durango Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Durango.

### INTRODUCCIÓN

Las Proteínas de la Pared Celular (PPC) fúngica se consideran potentes inmunomoduladores como blancos antifúngicos, ya que no se encuentran en humanos. A la fecha, no se han hecho estudios sobre el perfil de PPC de cepas de *Candida* spp. resistentes a los antifúngicos. La identificación y caracterización de proteínas relacionadas a la resistencia antifúngica posibilita la identificación de genes y mecanismos relacionados al desarrollo de esta; conocimiento esencial para el desarrollo de nuevas estrategias profilácticas y terapéuticas para infecciones por cepas resistentes de este hongo.

### OBJETIVO

Analizar el perfil de PPC de *C. glabrata* y *C. parapsilosis* resistentes al flucanazol.

### MATERIAL Y MÉTODO.

Se realizaron cultivos de 7h de cepas de *C. glabrata* y *C. parapsilosis* sensible (S), resistente (R) y resistente con flucanazol (RF). Las células se cosecharon por centrifugación, se lavaron y se rompieron mecánicamente con perlas de vidrio. Las PC se obtuvieron por centrifugación, se lavaron y liofilizaron. Las PPC se extrajeron con SDS y  $\beta$ -mercap-

toetanol y se precipitaron con etanol al 70%. Las PPC se analizaron mediante geles 2D.

### RESULTADOS.

En el análisis de las PPC mediante PAGE-2D de aislados de *C. glabrata* (S, R y RF) y *C. parapsilosis* (S, R y RF), se observó un perfil de expresión diferencial de 7 y 5 proteínas respectivamente.

### CONCLUSIONES.

Se observó un perfil de expresión diferencial de proteínas entre las cepas analizadas de *C. glabrata* (S, R y RF) y *C. parapsilosis* (S, R y RF) las cuales pueden estar asociadas a los mecanismos de resistencia antifúngica.

### PALABRAS CLAVE.

[Proteínas de pared celular \*C. glabrata\*, \*C. parapsilosis\*, Durango.](#)



El **Gobierno del Estado de Durango** a través de la  
**Secretaría de Salud** otorga la presente

# Constancia

A:

**Corral Pérez Karina, Saucedo Mendiola Leticia, López Rodríguez  
Angélica, Tinoco Favila Juan Carlos, Martínez Aguilar Gerardo,  
Salcido Gutiérrez Lorena, Ruiz-Baca Estela.**

Por su participación con el trabajo:  
**ANÁLISIS DEL PERFIL DE PROTEÍNAS DE LA PARED CELULAR DE Candida glabrata  
Y Candida parapsilosis RESISTENTES AL FLUCONAZOL**  
En el marco de la I Jornada Nacional de Investigación en Salud Durango 2017

**José Rosas Aispuro Torres**

Gobernador del Estado de Durango

**Dr. César Humberto Franco Mariscal**

Secretario de Salud y Dir. Gral. de los Servicios de Salud

Victoria de Durango, Dgo. a Agosto de 2017