



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“EFECTO DE UN EXTRACTO COMERCIAL DE TORONJA
SOBRE EL CRECIMIENTO Y EL DAÑO ESTRUCTURAL
DE *Candida albicans*”.

T E S I S :
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A :
MARIN RUIZ MARIA DE LOS ANGELES

ASESORES: DRA. LEONOR QUINTERO MORA
DR. CARLOS GERARDO GARCÍA TOVAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mi familia, amigos y a la UNAM.

“Hacía cada cosa como si
fuera un acto trascendental”

Gabriel García Márquez
El coronel no tiene quien le escriba.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por haberme regalado la infancia y la juventud más felices que jamás pude haber imaginado y por ser un maravilloso ejemplo de vida y fortaleza.

A mis hermanos Mary, Yaneth e Isaac por el orgullo y la inagotable dicha que me causa compartir la vida con ustedes.

A mis amigos por hacer de la vida un dulce caramelo.

A mis asesores por las enseñanzas, por su amistad, apoyo y buenos consejos, ¡GRACIAS!.

Finalmente a la Universidad Nacional Autónoma de México por todo lo que es y lo que representa para la juventud de este México del siglo XXI.

Esta tesis de licenciatura ha sido realizada gracias al apoyo de las siguientes becas de investigación.

PAPIIT IN202105-3, PAPIIT IN203106-3, PROFIP (UNAM).

	Págs.
1. ÍNDICE GENERAL	
1. ÍNDICE GENERAL	I
2. ÍNDICE DE FIGURAS	III
3. INDICE DE TABLAS	IV
4. LISTA DE ABREVIATURAS	V
5. RESUMEN	VI
6. INTRODUCCIÓN	1
6.1. Características de <i>Candida albicans</i>	1
6.2. Enfermedades producidas por <i>Candida albicans</i>	8
6.3. Generalidades de antimicóticos	12
6.4. Extracto de semillas de toronja (origen, uso y efecto en hongos)	16
7. JUSTIFICACIÓN	21
8. HIPÓTESIS	23
9. OBJETIVO GENERAL	24
10. OBJETIVOS PARTICULARES	24
11. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	25
12. MATERIALES Y MÉTODOS	27
12.1. Extracto de semillas de toronja	27
12.2. Cepas empleadas	30
12.3. Medios de cultivo empleados	30
12.4. Colorantes	30
12.5. Determinación de la CMI para la cepa de referencia y aislados clínicos	30
12.6. Determinación de las curvas de crecimiento	31
12.7. Formación de tubos germinativo	31

12.8. Tinción de Gram	32
12.9. Tinción con BrEt	33
12.10. Tinción con DAPI	33
13. RESULTADOS	34
13.1. Determinación de la CMI para la cepa de referencia y aislados clínicos.	34
13.2. Determinación de las curvas de crecimiento.	35
13.3. Formación del tubo germinativo.	37
13.4. Daño estructural.	41
13.4.1. Evaluación con tinción de Gram.	41
13.4.2. Evaluación con BrEt.	44
13.4.3. Evaluación con DAPI.	46
14. DISCUSIÓN	50
15. CONCLUSIONES	60
16. ANEXO	61
17. REFERENCIAS	63

INDICE DE FIGURAS

	Págs.
Fig. 1. Estructura desarrollada de la Nistatina.	13
Fig. 2. Estructura desarrollada de la Anfotericina B.	13
Fig. 3. Estructura desarrollada de la griseofulvina y la 5-fluocitocina.	14
Fig. 4. Estructura desarrollada de los antifúngicos del grupo de los azoles; ketoconazol e itraconazol.	15
Fig. 5. Estrategia experimental para realizar el estudio del efecto de EST sobre <i>C. albicans</i> .	26
Fig. 6. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de polifenoles en EST.	28
Fig. 7. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de flavonoides en EST.	29
Fig. 8. Porcentaje de cepas de <i>C. albicans</i> cuyo crecimiento fue inhibido por el EST.	34
Fig. 9. Determinación de la CMI del EST frente a <i>C. albicans</i> .	35
Fig. 10. Crecimiento de <i>C. albicans</i> con diferentes concentraciones de EST.	36
Fig. 11. Efecto fungicida y fungistático causado por el EST en <i>C. albicans</i> .	37
Fig. 12. Inhibición de la formación de tubo germinativo en <i>C. albicans</i> por acción de EST.	38
Fig. 13. Crecimiento en ADS (Sabouraud Dextrosa Agar) de <i>C. albicans</i> que no forma tubo germinativo.	39

Fig. 14.	Porcentaje de inhibición de la formación del tubo germinativo y colapsamiento celular	40
Fig. 15.	Tinción de Gram. Daños en la morfología de <i>Candida albicans</i> provocados por el EST.	42
Fig. 16.	Porcentajes de daños morfológicos observados con tinción de Gram.	44
Fig. 17.	Tinción con BrEt. Alteraciones en la membrana celular de <i>C. albicans</i> provocados por el EST.	45
Fig. 18.	Porcentaje de levaduras con incremento en la fluorescencia observado con BrEt.	46
Fig. 19.	Tinción con DAPI. Alteraciones a nivel nuclear de <i>C. albicans</i> provocados por el EST.	48
Fig. 20.	Porcentaje de levaduras con incremento en el tamaño del núcleo observado con DAPI.	49

INDICE DE TABLAS

		Págs.
Tabla 1.	Distribución de especies de <i>Candida</i> en diferentes países	10
Tabla 2.	Análisis químico del EST® (Citricidal®)	27

LISTA DE ABREVIATURAS

ADS	Sabouraud Dextrosa Agar
ATCC	American Type Culture Collection
CDS	Caldo Dextrosa Sabouraud.
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute.
CMI	concentración mínima inhibitoria.
DAPI	4', 6-Diamidino-2-fenilindol.
EST	Extracto de Semillas de Toronja.
EtBr	Bromuro de etidio.
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards.
ON	Incubación de toda la noche (Over Night).
UFC	Unidades Formadoras de Colonias.
UV	Luz ultravioleta.
YPD	Peptona, extracto de levadura y dextrosa.

RESUMEN

El extracto de toronja comercial (EST) es un producto elaborado a partir de semillas y pulpa de toronja. Diversos estudios *in vitro* demuestran la actividad biológica que tiene frente a una gran cantidad de bacterias, virus y hongos. En bacterias se ha demostrado que el EST altera la membrana y libera el contenido citoplasmático. Hasta el momento no se cuenta con información respecto al tipo de daño que causa sobre los hongos. En este trabajo se evaluó la actividad antifúngica que el EST tiene frente a *Candida albicans*, así como el daño estructural que provoca con la finalidad de establecer condiciones para poder realizar estudios encaminados a determinar su posible mecanismo de acción molecular. El extracto fue probado frente a treinta y seis cepas identificadas como *Candida albicans* y procedentes de aislados clínicos obtenidos de diferentes partes del cuerpo (1 de aspirado bronquial, 11 de cavidad oral, 1 de orina, 7 de piel, 4 de sangre y 12 de uñas). Se utilizó la cepa de referencia ATCC 10231 de *C. albicans* como control.

El efecto antifúngico fue evaluado por el método de dilución en agar dextrosa Sabouraud (ADS), determinando la CMI como la menor concentración donde no hubo crecimiento aun después de cinco días de incubación. Se inhibió el crecimiento de la cepa de referencia y del 94.44% de las cepas aisladas de muestras clínicas a una CMI de 0.2 mg/mL del EST, 2 cepas aisladas a partir de onicomicosis no presentaron inhibición del crecimiento aún a la concentración de 0.6 mg/mL. A concentraciones menores a la CMI se observa un efecto fungistático y a 0.2 mg/ml el efecto es fungicida en los primeros 5 minutos de contacto. Por medio de la tinción de Gram se ponen en evidencia

cambios en la morfología, colapsamiento y fragmentación celular a partir de la concentración de 0.5 mg/ml. A partir de esta misma concentración hubo inhibición de la formación del tubo germinativo y alteraciones en la membrana celular de acuerdo a los resultados obtenidos mediante tinción con bromuro de etidio. Empleando la tinción con DAPI, se observó un aparente aumento de tamaño del núcleo. Estos resultados demuestran que el EST inhibe el crecimiento de *C. albicans* posiblemente debido a alteraciones en la integridad de la membrana y pared como lo hace sobre las bacterias.

6. INTRODUCCION

6.1. Características de *Candida albicans*

Robin denominó a *C. albicans* en 1853 *Oidium albicans*, esta especie estuvo incluida en 100 sinónimos y pasada a través de 18 géneros, entre ellos el Género *Monilia*, en el cual estaba incluida la especie *Monilia candida*, luego *Monilia albicans*, hasta el trabajo de C.M. Berkhout, quien en 1923 propone el género *Candida* y la especie *albicans*, que fue aceptado por el 3er Congreso Internacional de Microbiología en Nueva York en 1939 (Calderone 2002, Carlile 2001).

C. albicans, agente etiológico de la candidiosis, se encuentran actualmente clasificado taxonómicamente de la siguiente forma (Calderone, 2002):

Clasificación taxonómica

Categoría	Nombre
Reino:	<i>Fungi</i>
Phylum:	<i>Ascomicota</i>
Orden:	<i>Saccharomycetales</i>
Familia:	<i>Saccharomycetaceae</i>
Género:	<i>Candida</i>

Desde la época de Hipócrates se sabe que *Candida* es el agente causal de varias enfermedades pero se comienza a estudiar a partir de 1940. Lagenbeck, en 1839 fue el primero en demostrar la presencia de un hongo parecido a la levadura en las lesiones

causadas por aftas, su hallazgo fue confirmado por Gruby en 1842 y el agente causal fue denominado *Oidium albicans* (Samson 1990).

El Género *Candida* comprende más de 150 especies de las cuales se ha demostrado que las de mayor importancia clínica son: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. guilliermondi*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*. (Calderone 2002, Carlile 2001, Alcamo 2003).

C. albicans presenta dimorfismo, es decir, que se puede observar como una célula oval levaduriforme de 2 a 4 micras, con paredes finas hasta formas filamentosas con extremos redondos de 3 a 5 micras de diámetro y de longitud variable que se han identificado en tejidos infectados. Existen formas intermedias que en conjunto se denominan pseudohifas y que son células alargadas de levadura que permanecen unidas entre sí (Carlile 2001, Arenas 2003).

C. albicans también tiene una marcada tendencia a formar esporas grandes de pared gruesa, denominadas clamidoconidias, las cuales se observan cuando se cultivan en un medio especial como Agar Harina de Maíz; las clamidoconidias son terminales y tienen un diámetro de 7 a 8 micras y casi siempre se origina en el extremo del pseudomicelio (Alcamo 2003, Carlile 2001). Es una importante característica morfológica en la identificación de *C. albicans*. Asimismo, tiene la capacidad para producir tubos germinativos (filamentación en suero) cuando las colonias son inoculadas en 0,5 ml de suero humano a temperatura de 37°C observándose los resultados después de 2 o 3 horas (Arenas 2003).

La forma filamentosa del hongo (hifa), es una estructura microscópica tubular, la cual contiene múltiples unidades celulares divididas por septos y puede surgir a partir de blastoconidias o de hifas existentes. Esta crece continuamente por extensión apical. El tubo germinativo de *C. albicans* ha sido descrito como un tubo sin constricción en el punto de origen y tiene una apariencia similar a “espejo de mano” (Carlile 2001).

Las levaduras son microorganismos eucarióticos, las cuales se reproducen asexualmente por un proceso específico de división celular conocido como gemación. Este proceso de división implica la producción de nuevo material celular proveniente de la superficie de la blastoconidia. Cuando el brote o yema ha crecido y se encuentra en su tamaño óptimo, se suscita la división celular y se forma un tabique o septo entre las dos células. En lo que respecta a la reproducción sexual en *Candida*, taxonómicamente existen las telomórficas cuya reproducción es sexual y se clasifican como *Ascomycetos* en *C. albicans*, tal reproducción se lleva a cabo generando organismos heterocigotos lo que dificulta un poco la generación de mutantes debido al incremento en el índice de recombinación en comparación con *Saccharomyces cerevisiae* (Carlile 2001).

Candida albicans es una levadura Gram positiva cuya observación se mejora al utilizar blanco de calcoflúor. El cultivo se logra a temperatura ambiente de 24 a 48 h y en los medios habituales, como Sabouraud simple o con cloranfenicol y cicloheximida, donde se obtienen colonias lisas, blandas, brillantes, de color blanco o ligeramente beige; con el tiempo se hacen plegadas, rugosas o membranosas y a simple vista se observa el micelio sumergido (Arenas 2003).

La pared celular de hongos, plantas y bacterias presenta un gran número de funciones incluyendo protección, osmosis y permeabilidad, además que resulta de gran importancia en la interacción célula-célula. La pared celular de *C. albicans* está compuesta principalmente por los polisacáridos: manana, glucano y quitina (30-50%). Aunque la síntesis de los componentes de la pared celular está dinámicamente influenciada por las condiciones de crecimiento y por los estadios metabólicos, en la literatura existen datos acerca de la composición química de dicha pared. El polisacárido soluble manana representa aproximadamente entre 15.2% y 22.9% del peso seco y poco más de 40% de los polisacáridos de la pared celular del hongo. El D-glucano β -1,3 (soluble en alcali) y D-glucano β -1,6 (residuo insoluble en álcali obtenido por extracción con NaOH) constituyen entre 47% y 60% del peso seco de la pared celular. Otros componentes han sido reportados, tales como proteínas, en cantidades que oscilan entre 6% y 25%, lípidos entre 1% y 7% (algunos fosfolípidos son: fosfatidiletanolamina y fosfatidilglicerol) y quitina entre 0.6% y 9% del peso de la pared celular (Calderone 1991). Las proporciones de los componentes que constituyen la pared celular de las levaduras y de los tubos germinativos es relativamente similar, aunque la proporción del glucano soluble en álcali / insoluble en álcali (asociado a glucógeno) así como de quitina y la expresión proteínica varían de acuerdo con la forma de crecimiento (Carlile 2001, Wilfred 2000). Durante las primeras etapas de la formación del tubo germinativo, se sintetiza casi exclusivamente β -1-3 glucano. La quitina se encuentra en las células en forma de levadura, en las hifas y en los tubos germinales, aunque la proporción es mayor en las hifas (Chattaway 1968).

Algunos estudios ultraestructurales de la pared celular de *C. albicans* han demostrado una compleja microarquitectura. La pared tiene un espesor variable y está compuesta

por varias capas las cuales se han puesto de manifiesto por diferencias en la densidad electrónica. El número de capas y su morfología varían; esta variación está relacionada con varios factores tales como: la etapa de crecimiento celular, la forma de crecimiento (como levadura o como tubo germinativo), la capa seleccionada para su estudio, el medio de cultivo empleado para el crecimiento celular y los procedimientos de fijación. La mayoría de los investigadores han descrito cinco capas dentro de la pared celular, las cuales son (de adentro hacia afuera): una región rica en manoproteínas también llamada espacio periplásmico; la siguiente es la zona con mayor densidad electrónica y está formada por 1,3- β -glucano y 1,6- β -glucano; se observa una región rica en quitina y hay evidencia de que se establecen enlaces covalentes β -glucano-quitina; y por último, una zona que está compuesta por manoproteínas. Existe evidencia de que al menos algunas de las manoproteínas, así como la quitina, se encuentran unidas covalentemente a cadenas de glucano. Otras proteínas codificadas por la familia de genes PIR (proteins with internal repeats) se encuentran unidas por enlaces covalentes al 1,3- β -glucano. Otro grupo de manoproteínas forman una capa de fibrillas que se extienden hacia el ambiente externo, sin embargo, su estructura aún no ha sido detallada y tampoco se sabe con exactitud si se encuentran unidas a la membrana, unidas covalentemente al glucano o a la quitina o simplemente se encuentran atrapadas en la matriz de glucano (Calderone 1991, Masuoka 2004).

La manana ha sido identificada como el principal antígeno de la superficie celular de *C. albicans*. Basados en estudios de adsorción y aglutinación, agruparon a *C. albicans* en dos serotipos designados A y B (Calderone 1991, Hasenclever 1961).

Básicamente, la representación de las manoproteínas de la pared celular de *C. albicans* está constituida por residuos de manana unidos entre sí por enlaces α -1,6, los cuales se unen a la porción de proteína a través de dos residuos de N-acetil glucosamina (unidos entre sí por enlaces β -1,4) y un residuo de asparagina y manosa que se unen a la proteína a través de residuos de los aminoácidos serina y treonina (Calderone 1991, Sheppherd 1985).

La membrana plasmática es una estructura que reviste gran importancia, ya que los antimicóticos actúan a nivel de la misma, además de contener las enzimas responsables de la síntesis de la pared celular. Presenta una doble capa compuesta por lípidos y posee invaginaciones, que se observan como surcos de 200 a 300 nanómetros de longitud, por 35 a 40 nanómetros de espesor. La presencia de los lípidos en hongos es de gran importancia ya que se encargan de mantener la estructura y función de la membrana (Carlile 2001). Además de los lípidos, la membrana citoplasmática está compuesta por grandes cantidades de proteínas y carbohidratos en menor proporción.

En el citoplasma, al igual que en otras células eucarióticas, *C. albicans* presenta: ribosomas, mitocondrias, gránulos de glucógeno y vacuolas que, contienen en algunas ocasiones cuerpos lipídicos y gránulos de polifosfato. El núcleo es típico de una célula eucariótica, con membrana nuclear limitante, uno o varios nucléolos, DNA, RNA y varios cromosomas (Mandigan 2006).

Candida albicans puede crecer con diferentes morfologías: en levaduras, con hifas o pseudohifas y la forma filamentosa, importante en la invasividad de tejidos,

dependiendo de la fase del ciclo celular en la que se encuentre. Los diferentes estados morfológicos de la levadura se pueden inducir mediante factores como: pH, concentración de nutrientes, temperatura, disponibilidad de fosfato, etc., cuando *Candida* va a formar el tubo germinativo, una pequeña porción de su superficie se restringe, esta es la zona donde tendrá lugar el crecimiento apical del tubo germinativo que sufre progresivas elongaciones, la formación de éste requiere de la polarización apical de la actina del citoesqueleto, la cual forma un anillo, el mecanismo completo de esta polarización no se conoce en *C. albicans* sin embargo estudios en *Saccharomyces cerevisiae* indica que tiene lugar mediante la regulación de ciclinas dependientes de cinasas (Sepulveda 2001, G. Black 2002).

La importancia de los estudios sobre la morfogénesis de *Candida*, composición de la pared celular y variaciones de expresión en su superficie radica en la relación existente entre la fase del ciclo celular y la expresión de ciertos genes como los implicados en la regulación del dimorfismo y otros factores de virulencia como la expresión de proteínas de adhesión a células del hospedero (ej. enterocitos) y la secreción de enzimas (aspartil proteinasa y fosfolipasa B) ya que en *Candida* la formación de hifas o pseudohifas está relacionadas con la virulencia y patogenicidad del organismo, puesto que el proceso de morfogénesis es de gran importancia en la invasividad de *Candida* (Basilana 2005). El reconocimiento de las células epiteliales se realiza a través de manoproteínas de superficie (adhesinas) que se unen a receptores que contienen carbohidratos. No se conoce el número de estas manoproteínas y existen proadhesinas. El microorganismo también se une a queratinocitos, células endoteliales y proteínas de la matriz extracelular, como fibronectina, laminina, colágeno y entactina y, por tanto, parece poseer una adhesina de superficie del tipo integrina. En la mayoría de los casos, la

adhesina para cada una de estas proteínas del huésped es una manoproteína (Calderone 2002).

6.2. Enfermedades producidas por *Candida albicans*

Los microorganismos son actualmente causa de múltiples enfermedades y *Candida albicans* es el hongo que se encuentra con mayor frecuencia en infecciones fúngicas humanas seguido por *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, y *C. krusei* las cuales han adquirido mayor importancia en los últimos años, dependiendo del país estudiado, del tipo de paciente, de la edad etc. La mayor incidencia se presenta en pacientes con alteraciones inmunológicas graves como diabetes, neoplasias, SIDA, quemaduras extensas, o en pacientes cuyo tratamiento compromete las defensas naturales del organismo como es el uso de antibióticos, presencia de catéteres intravenosos, nutrición parenteral, sistemas de monitorización intravascular, prótesis intravasculares, cirugía abdominal múltiple, trasplantes de órgano sólido, administración de esteroides (Galva 2006).

El aumento en la incidencia puede deberse en parte al uso indiscriminado de antifúngicos sintéticos para controlar la enfermedad, principalmente azoles (ketoconazol, itraconazol, fluconazol, etc.) y antibióticos poliénicos (nistatina, anfotericina B) (Pontón 2002) los cuales no solo tienen como desventaja su elevada toxicidad (Calderone 2001) sino que también generan resistencia presumiblemente porque modifican la expresión de genes.

En el estudio SENTRY realizado entre 1997 y 1999, en el que se valoraron las infecciones de la sangre en USA, Canadá, Latinoamérica y Europa encontraron que las candidemias constituían el 3% de todas las infecciones sanguíneas comunitarias y el 9% de las nosocomiales. De igual forma se observó que *Candida* spp. ocupaba el 4º lugar de los agentes etiológicos más frecuentes. En la tabla 1 se muestra la distribución de las especies más importantes del género *Candida* en los países incluidos en dicho estudio (Galva 2006).

Tabla 1. Distribución de especies de *Candida* en diferentes países.

Especies de <i>Candida</i>	USA	Canadá	América latina	Europa
<i>C. albicans</i>	55	60	45	58
<i>C. glabrata</i>	21	12	6	10
<i>C. parapsilosis</i>	11	16	25	19
<i>C. tropicalis</i>	9	6	16	7
<i>C. krusei</i>	2	2	1	1
<i>Candida</i> spp.	2	4	7	5

En México se realizó un estudio durante tres años para evaluar la prevalencia de levaduras que colonizaban o infectaban la cavidad oral de 111 pacientes con infección por VIH (51 adultos y 60 niños) y de 201 personas sanas no infectadas por el VIH (109 adultos, 92 niños). *Candida albicans* fue la especie aislada con mayor frecuencia. Setenta y uno de los 85 aislamientos eran *C. albicans* (83,5%); veintisiete de estos aislamientos procedían de niños con infección por VIH y 44 se aislaron de personas no infectadas por VIH. Sesenta y dos aislamientos de *C. albicans* pertenecían al serotipo A

siendo el serotipo más prevalente. Se aislaron especies no *C. albicans* (*Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* y *Saccharomyces cerevisiae*) en el 16,5% de los pacientes colonizados y en el 38,5% de los pacientes con candidiasis o enfermedades asociadas a *Candida*. Hubo nueve episodios de infección o colonización mixta (Sánchez 2005).

Candida es una levadura que se encuentra ampliamente extendida en la naturaleza. Se ha aislado del suelo, de animales, de objetos inanimados, de alimentos y de ambientes hospitalarios, sin embargo, la principal fuente de infección humana es la endógena ya que los microorganismos del género *Candida* son oportunistas que se encuentran como comensales en cavidad bucal, intestino, vagina, secreción bronquial y tracto urinario (Cossart 2005).

Las infecciones por *Candida spp.* se producen por tres mecanismos: por invasión de cepas colonizantes del tracto gastrointestinal o la piel; como consecuencia de transmisión vertical en el neonato, o en raras ocasiones por transmisión horizontal (Galván 2006).

La transición entre el estado comensal y el patogénico ocurre generalmente con el desequilibrio en los mecanismos de defensa del organismo, un cambio en el balance de la flora microbiana y lesión de los tegumentos. Tales estados pueden presentarse debido a procedimientos médicos como cirugías, terapias médicas de inmunosupresión, por la presencia de enfermedades como leucemia, SIDA, diabetes, desordenes metabólicos o bien por el consumo de drogas o la realización de dietas (Galván 2006).

La infección por *C. albicans* se puede manifestar de manera superficial, como en piel y uñas, en mucosas expuestas o se disemina en forma generalizada a tejidos profundos lo que representa una forma invasiva más seria (Calderone 2002, Cossart 2005), daña folículos pilosos, causa vulvovaginitis, endocarditis, meningitis, úlceras, etc.

La candidosis se clasifica en: localizada, que puede ser mucocutánea (bucal, digestiva, vaginitis y balanitis, bronquial y pulmonar) o cutánea (intertrigos, paroniquia y onicomycosis, zona del pañal, vesiculopustular y folicular), diseminada y profunda (candidosis mucocutánea crónica, granuloma candidósico), sistémica (aparato genitourinario y riñones, endocarditis, meningitis, septicemia, candidemia yatrógena) y alérgica (candidides, eccema, asma, gastritis) (Arenas 2003).

6.3. Generalidades de antimicóticos.

Hoy en día se presenta el grave problema de la resistencia de los microorganismos a los fármacos antifúngicos debido, ya sea a la producción de una enzima (lactamasa) que es secretada y que inactiva la molécula (Carlile 2001), o bien, al generar un cambio de polaridad en el fármaco, a nivel de receptores, la polimerización y alargamiento de microtúbulos, inhibiendo la síntesis de proteínas, ergosterol o inhibiendo el ciclo de la respiración (Calderone 2002, Catalán 2006).

Los antifúngicos más comúnmente usados son:

La nistatina es un antifúngico del grupo de los macrólidos poliénicos (figura 2), con acción fungistática, que se obtiene a partir de *Streptomyces noursei*. Los polienos actúan

formando complejos insolubles con los esteroides de la membrana celular fúngica y alterando su permeabilidad, al formar canales iónicos. Está indicada, por su eficacia, en candidosis de mucosas (Ghannoum 1999).

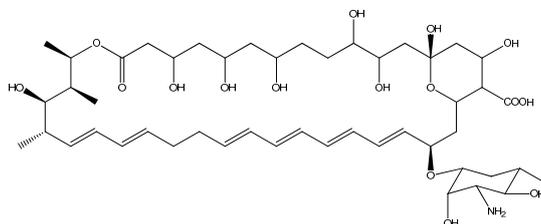


Fig. 1. Estructura desarrollada de la Nistatina.

La anfotericina B es un antifúngico del grupo de los macrólidos poliénicos (figura 3) altamente tóxico, aislado en 1956 de *Streptomyces nodosus*. Posee un amplio espectro de acción, desde hongos levaduriformes y filamentosos a protozoos. Su mecanismo de acción se logra mediante la interacción directa con el ergosterol de la membrana celular fúngica. La anfotericina B no interfiere con la síntesis de la membrana sino que la desestabiliza, su afinidad por el ergosterol incrementa la actividad de los canales de potasio que a altas concentraciones forma poros de 40-105 nm. En las membranas, esto produce pérdidas de potasio intracelular y de otras moléculas constituyentes lo que trae consigo un desequilibrio electrolítico en el interior de la célula y muerte de la misma. La anfotericina B inhibe una bomba de protones en *Candida albicans* e induce la peroxidación de los lípidos de membranas. Este compuesto tiene el mayor espectro de acción antifúngico conocido y muy elevada toxicidad (Carlile 2001, Fica 2004).

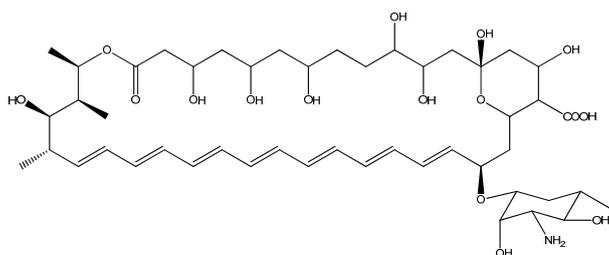


Fig. 2. Estructura desarrollada de la Anfotericina B.

La griseofulvina (figura 4) es un antibiótico natural producido por varias especies de *Penicillium*, especialmente *P. Griseofulvum*. Su espectro está restringido a dermatofitosis, careciendo de actividad frente a otros hongos patógenos. Actúa al unirse a los microtúbulos celulares, interfiriendo con la mitosis inhibiendo el crecimiento del hongo (Fernandez 2001).

La 5-fluocitocina (figura 4) actúa bloqueando la síntesis de ácido nucleico, se utiliza en tratamiento oral contra *Candida* (Fernandez 2001). La fluocitocina, un derivado fluorado de la citosina, se transforma en el organismo en 5-fluorouracilo (5-FU), un inhibidor no competitivo de la timidilato sintetasa y de la síntesis de DNA. No debe utilizarse en monoterapia pues los hongos pueden mutar y hacerse resistentes de forma rápida.

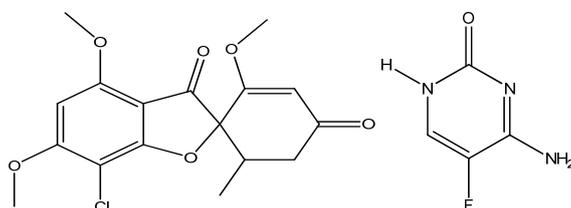


Fig. 3. Estructura desarrollada de la griseofulvina y la 5-fluocitocina.

El grupo de los azoles (figura 5) incluye tanto los imidazoles (*ketoconazol*, *miconazol*) como los triazoles (*fluconazol* e *itraconazol*). Los azoles son antifúngicos sintéticos caracterizados por la presencia en su estructura de un anillo azólico de 5 átomos, unido a otros anillos aromáticos. De todos ellos, solo tres se pueden utilizar en micosis sistémicas (*ketoconazol*, *fluconazol* e *itraconazol*). El primero en utilizarse fue el *ketoconazol*, pero ha sido sustituido por el *fluconazol* que posee una serie de ventajas

relacionadas con su espectro de acción, su farmacocinética y toxicidad. Por último, se ha incorporado recientemente a la terapéutica el itraconazol. De forma general, podemos decir que estos derivados azólicos (particularmente fluconazol) son considerados fármacos de segunda elección en el tratamiento de las infecciones sistémicas producidas por diversos hongos, tras la anfotericina B. Interfieren con la síntesis de ergosterol, al inhibir la C14-alfadesmetilasa, una enzima acoplada al citocromo P-450 y que transforma lanosterol en ergosterol. Esta inhibición altera la fluidez de la membrana, aumentando la permeabilidad y produciendo una inhibición del crecimiento celular y de la replicación. Esta inhibición del citocromo P-450 es responsable de los efectos adversos que los azoles pueden causar en humanos (Arikan 1999).

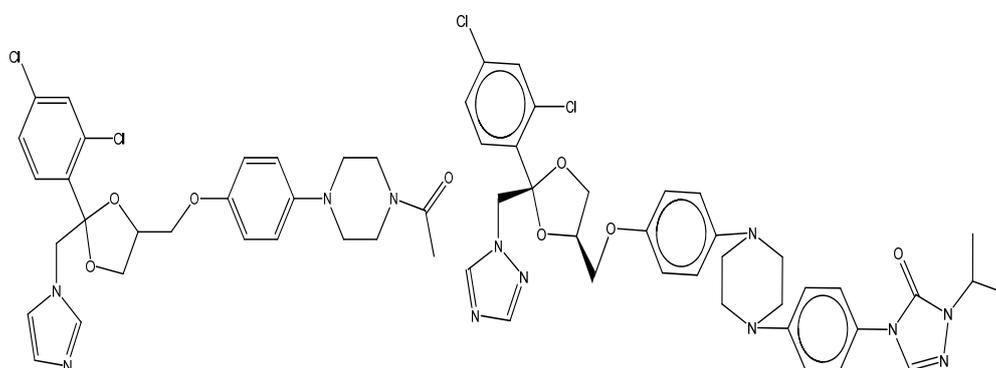


Fig. 4. Estructura desarrollada de los antifúngicos del grupo de los azoles; ketoconazol e itraconazol.

Con respecto a lo anterior, se sabe que el antifúngico ideal debe reunir las siguientes características: acción fungicida (mejor que fungistática), amplio espectro frente a los hongos causantes de micosis superficiales y cutaneomucosas (dermatofitos, levaduras del género *Candida*, *Pityrosporum* y mohos), actividad *in vitro* demostrada con pruebas de sensibilidad (CMI) para los hongos mencionados, probada eficacia clínica en la

resolución de las distintas dermatomicosis, de fácil accesibilidad, disponible en farmacia sin prescripción médica obligada, disponible en diversas presentaciones, de fácil aplicación, capaz de alcanzar una alta concentración en los tejidos lesionados, con actividad antifúngica permanente, tolerabilidad y escasa producción de efectos adversos e interacciones farmacológicas, tratamientos cortos, que no requiera la monitorización del paciente con pruebas analíticas, y con buena relación costo-eficacia.

6.4. Extracto de semillas de toronja (origen, usos y efecto en hongos)

Hoy en día la sociedad tiene un especial interés por los productos de origen natural. Según informes de la OMS, aproximadamente el 80% de la población mundial utiliza productos naturales con fines medicinales. Además se ha informado de que un gran número de medicamentos antibacterianos y antitumorales provienen de fuentes naturales. Asimismo la FDA aprobó, entre 1983 y 1994, 520 nuevos fármacos de los cuales el 39% eran de origen natural o sus derivados. Las especies de plantas conocidas oscilan entre 250.000 y 500.000 esta es una riqueza que no se aprovecha totalmente, su uso en el tratamiento de enfermedades es ancestral por lo que nos ha permitido acumular un gran conocimiento etno-farmacológico (López 2002).

Los cítricos se originaron hace unos 20 millones de años en el sudeste asiático. El extracto de toronja fue elaborado por Jacob Harris en 1980 (16), es un antimicrobiano de amplio espectro no tóxico obtenido de las semillas, pulpa y membranas blancas del pomelo. Al pomelo, el mayor en tamaño de las frutas cítricas, también se le conoce con el nombre de toronjo, toronja, grapefruit o pamplemusa (Zomlefer 2004).

TAXONOMÍA DEL POMELO (Zomlefer 2004)

Categoría	Nombre
<u>Reino:</u>	<u><i>Plantae</i></u>
<u>División:</u>	<u><i>Magnoliophyta</i></u>
<u>Clase:</u>	<u><i>Magnoliopsida</i></u>
<u>Subclase:</u>	<u><i>Rosidae</i></u>
<u>Orden:</u>	<u><i>Sapindales</i></u>
<u>Familia:</u>	<u><i>Rutaceae</i></u>
<u>Género:</u>	<u><i>Citrus</i></u>
<u>Especie:</u>	<u><i>paradisi</i></u>

El extracto de semillas de toronja está conformado por: aminoácidos, ácidos grasos, oligosacáridos, triterpenos, limoneno, flavonoides; quercetina, hesperidina, neohesperidina, glicósido de camperol, apigenina, rutinósidos, poncirina, etc. (Dembinski 2004, Cvetnic 2004), naringina, ácido ascórbico y compuestos cuaternarios derivados de los bioflavonoides presentes en el extracto original. Presenta ventajas en comparación con los amonios cuaternarios al no verse afectado por la materia orgánica y los detergentes, en comparación con los yodóforos y derivados de cloro, estos compuestos ácidos no se ven afectados por la temperatura, son más estables al almacenamiento, no son corrosivos, no son tóxicos y pueden ser usados en la mayoría de las superficies en que se procesan productos alimenticios, además de que no presenta efectos secundarios a la dosis terapéutica y generalmente tienen bajo costo (López 2002, Reagor 2002, Bentivegna 2002).

En las tiendas naturistas se cuenta con diferentes marcas del extracto de toronja a nivel mundial, así como diversas presentaciones: polvo, líquido concentrado, tabletas y spray. Actualmente tiene diversos usos como suplemento alimenticio, conservador en alimentos y cosméticos, como agente sanitizante y desinfectante. (Tirillini 2000, Giamperi 2004, López 2001, Ranzani 1995, Caloridominguez 1995, J. U. Ha 2001).

En la industria alimentaria ha sido usado de manera frecuente como desinfectante a partir de su aprobación por la Food and Drug Administration (FDA), USA No. 0013982. Su acción germicida es atribuible al efecto que tiene en el pH del medio debido a su naturaleza ácida, se propone que actúa sobre microorganismos contaminantes que pueden estar presentes en la mayoría de las industrias elaboradoras de alimentos desnaturalizando las proteínas y afectando el funcionamiento de la membrana celular (López 2002, <http://nutriteam.com>).

Otro de los usos del EST es como tratamiento naturopático. Es recomendado por los proveedores y médicos en infecciones menores de la piel, acné, verrugas, pie de atleta, en onicomycosis, en pacientes con vulvovaginitis y candidosis intestinal y sistémica (<http://nutriteam.com>), además sirve como gastroprotector y en el tratamiento de la pancreatitis inducida por isquemia-reperfusion en ratas (Gorinstein 2005, He K. 1998, Brzozowski 2005, Dembinski 2004, Ionescu 1990).

Se ha demostrado que el EST tiene la capacidad *in vitro* para matar o inhibir el crecimiento de 800 tipos de bacterias Gram negativas y Gram positivas potencialmente perjudiciales, 100 tipos de hongos, virus y parásitos protozoarios (Hegggers 2002, Cvetnic 2004, Woedtke 1999, Reagor 2002, López 2002, Eleraky 2002, Oyelami 2005).

La concentración a la cual el extracto de toronja es utilizado es muy baja por lo que resulta no tóxico para quien lo consume, lo cual es una indiscutible ventaja frente a los antifúngicos convencionales (Bentivegna 2002, <http://nutriteam.com>). Estudios de toxicidad realizados en fibroblastos de piel humana muestran un efecto citotóxico en un intervalo de diluciones de 1:1 a 1:128; sin embargo, a una dilución de 1:512 aún tiene efecto bactericida sin provocar daño en los fibroblastos (Hegggers 2002).

Se han realizado diversos estudios para conocer el efecto que tiene el EST sobre *Candida albicans*. En un estudio realizado por la Universidad Autónoma de Nuevo León se empleó el EST para el tratamiento de vaginitis causada por *Candida albicans* dándole seguimiento a 20 pacientes a las que se les administraron duchas de EST cada 12 horas por 3 días consecutivos. Las pacientes tenían entre 22 y 44 años y todas tenían vida sexual activa. Después de este tratamiento 15 de las pacientes mejoraron y 4 más tuvieron que repetirlo una vez más. De acuerdo a los estudios de laboratorio después de un tercer tratamiento el resultado también fue negativo para la última paciente. En el Comprehensive Health Center en Encintas California las candidosis crónicas han sido tratadas con excelentes resultados (<http://nutriteam.com>, Krajewska y col 2001), se emplearon 205 cepas de *C. albicans* provenientes de aislados clínicos y una cepa ATCC determinando, por el método de diluciones seriales, que el EST presenta actividad antifúngica sobre estas cepas pero su actividad es menor en dermatofitos y hongos filamentosos (Krajewska 2001). En otros estudios, empleando un extracto etanólico de semillas y pulpa de toronja y por medio de ensayos de difusión en agar y dilución en caldo se demostró que había un efecto fungicida sobre seis cepas de *Candida albicans* pertenecientes a la Colección de Microorganismos del Instituto de Microbiología de la

Universidad de Zagreb, Croacia. Este efecto se observó a partir de una concentración de 8.25% p/v (Cvetnic 2004). En un trabajo desarrollado por Ignacio C y Thai D (2005) se comparó la efectividad de tres compuestos naturales contra el miconazol en la inhibición del crecimiento de *C. albicans* y demostraron que el EST fue el compuesto natural con mayor actividad a una concentración de 100 a 120 µg/ ml, equivalente a la del miconazol (C. Ignacio 2005).

Existe un estudio enfocado a esclarecer el mecanismo de acción del extracto de toronja y éste se llevó a cabo en bacterias, encontrando que altera la membrana bacteriana al inhibir la actividad enzimática, rompiéndola y liberando el contenido citoplasmático. Esto se concluyó al trabajar con 10 tipos de bacterias gram-positivas y gram-negativas y ponerlas en contacto con el EST a una dilución de 1:512 por 15 minutos. El efecto fue demostrado por medio de microscopia electrónica. Estos datos son compatibles con los obtenidos en el estudio de Reagor et.al., 2002. Sin embargo, hasta la fecha no existe ningún reporte del mecanismo de acción en hongos.

7. JUSTIFICACION

En las últimas décadas ha habido un auge considerable de la medicina naturopática, donde se recurre a compuestos de origen natural para mantener la salud. Estos compuestos presentan enormes ventajas sobre algunos compuestos sintéticos como el hecho de que son de bajo costo, presentan un amplio espectro, son de fácil administración y no tóxicos a la dosis terapéutica, además de que los microorganismos no presentan resistencia a ellos. El EST se encuentra disponible comercialmente como suplemento alimenticio, desinfectante, sanitizante, conservador de alimentos y cosméticos y se comercializa como tratamiento para infecciones causadas por diversos microorganismos incluidas las levaduras.

En la actualidad, el análisis de la expresión genética es de vital importancia en el estudio del mecanismo de acción de diversos antifúngicos apoyando en gran medida a la industria farmacéutica. El empleo de técnicas de biología molecular como RT-PCR, DDRT-PCR y microarreglos han permitido estudiar mejor los mecanismos de acción de antifúngicos de uso común como los azoles, amfotericina B, equinocandinas y fluocitocina, permitiendo además entender los mecanismos de resistencia hacia los mismos y proponer otros sitios blanco para el diseño de nuevos antifúngicos (Lepak 2006, Sanglard 2003, de Backer 2001, Ribeiro 2007, Rogers 2002, Liu TT 2005).

Debido a que en los últimos años se ha incrementado el uso del EST para el tratamiento de infecciones causadas por hongos y a que no existe ningún trabajo previo respecto al mecanismo de acción en *Candida albicans*, nuestro interés es profundizar en él a nivel molecular. Para lo anterior es necesario determinar la CMI tanto de una cepa de referencia como de cepas aisladas de muestras clínicas, evaluando así su actividad biológica y seleccionando cepas que inhiban su crecimiento a concentraciones mayores

o por debajo de la CMI de la cepa de referencia; por otro lado, es necesario determinar las condiciones de crecimiento adecuadas para poder apreciar los diferentes daños provocados por el EST, los cuales finalmente nos permitirán seleccionar algunos genes implicados en estos daños para su posterior evaluación.

8. HIPÓTESIS

El EST es un producto de origen natural con propiedades antifúngicas que inhibe el crecimiento de *C. albicans* y provoca daño estructural presumiblemente a nivel de membrana.

9. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de un extracto comercial de semillas de toronja sobre el crecimiento y el daño estructural a *Candida albicans*.

10. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinación de la CMI del extracto de toronja sobre una cepa de referencia *C. albicans* 10231 y sobre diferentes cepas aisladas de diferentes muestras clínicas.
- Evaluar el efecto del extracto de toronja sobre la curva de crecimiento de la cepa de referencia de *C. albicans*.
- Evaluar el efecto fungicida del extracto de toronja sobre la cepa de referencia de *C. albicans*.
- Evaluar el daño estructural causado por el extracto de toronja sobre la cepa de referencia de *C. albicans* con ayuda de las tinciones de Gram, BrEt y DAPI.
- Evaluar el efecto del EST sobre la formación del tubo germinativo sobre la cepa de referencia *C. albicans*.

11. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental seguida en este trabajo se esquematiza en la fig. 5. Se evaluó el efecto del EST sobre el crecimiento de *C. albicans* empleando una cepa de referencia y 36 cepas aisladas de muestras clínicas, determinando la CMI para cada una de ellas. Se evaluó el efecto del EST en la curva de crecimiento de *C. albicans* y se realizaron ensayos para determinar si el efecto era fungicida o fungistático. Con estos datos se determinaron las condiciones de trabajo para evaluar el efecto del EST sobre la formación del tubo germinativo y se realizaron tinciones para poner en evidencia alteraciones morfológicas y daño a nivel de membrana y núcleo.

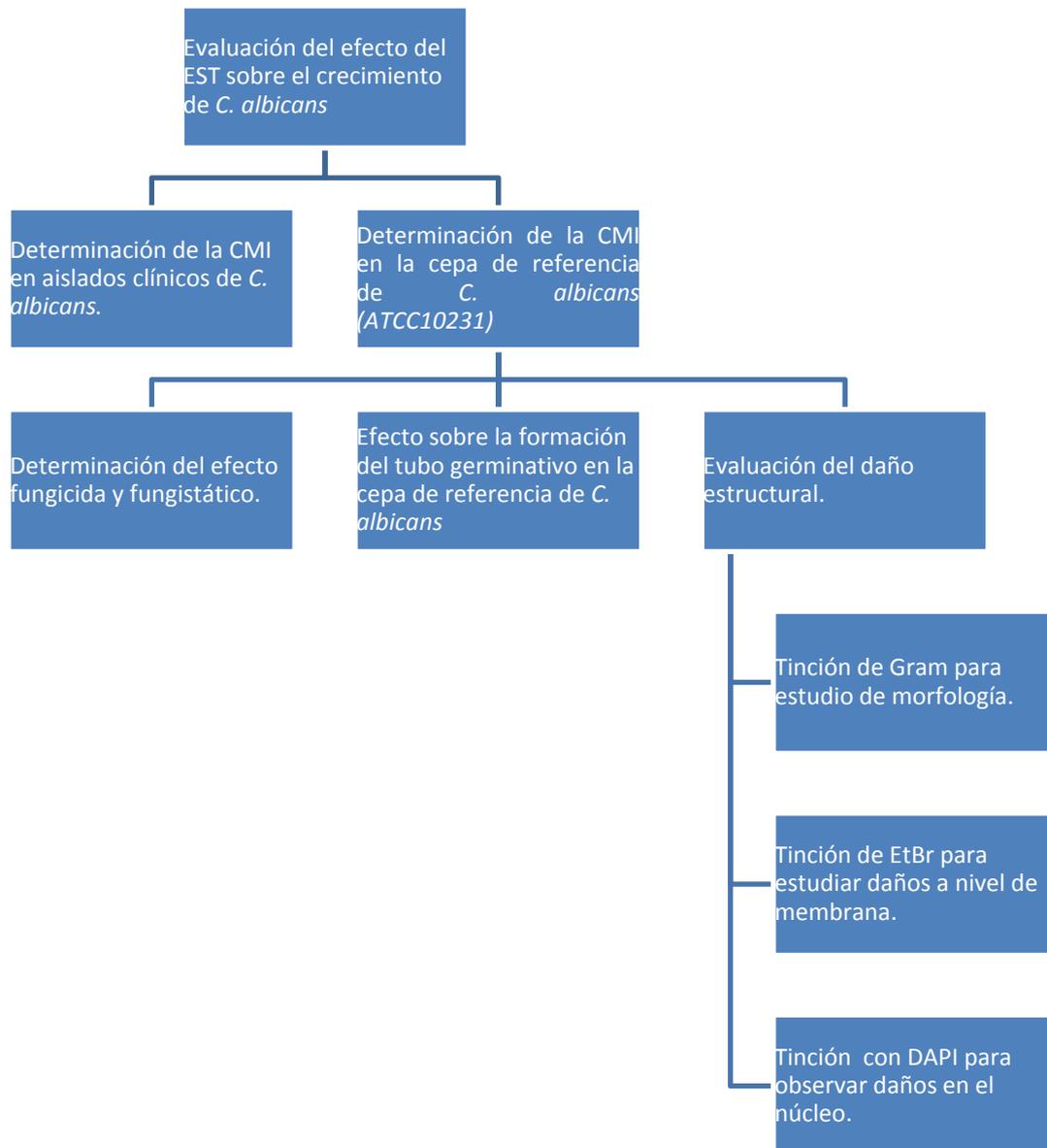


Fig. 5. Estrategia experimental para realizar el estudio del efecto de EST sobre *C. albicans*.

12. MATERIALES Y MÉTODOS

12.1. Extracto de Semillas de Toronja.

Extracto comercial de semillas de toronja (**NutriBiotic**), obtenido a partir de extracto de semillas y pulpa de toronja, se presenta en solución al 33% (v/v). Elaborado en E.U.A. por Bio/Chem Research®. Importado, procesado y envasado por Distribuidora de Productos y Materias Primas Alimenticias Hidalgo, S.A. de C.V.

Tabla 2. Análisis químico del EST® (Citricidal®). Determinado por Bio-Chem Research Lakeport, California

Descripción del ensayo	Resultados del ensayo	protocolo
polifenoles compuestos		
Compuestos cuaternarios derivados de bioflavonoides del EST	59.3%	HPLC 017
Ácido ascorbico	21.7%	AOAC
glicerol	39.6%	
Metales pesados	11.0 mg/kg	Grafito Absorción atómica
Pesticidas y PCBs	BDL	Cromatografía de gases
bacterias	negativo	cultivo

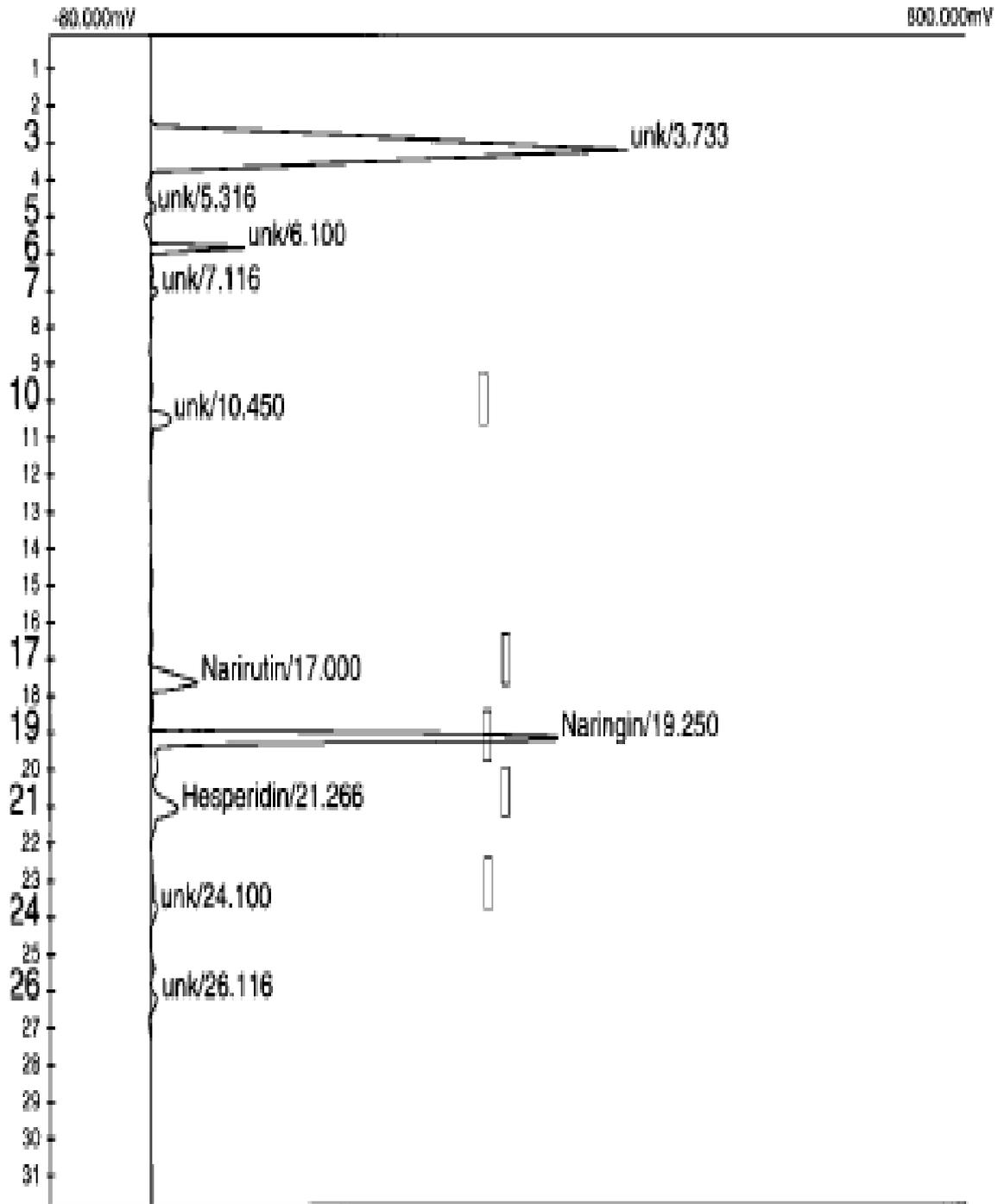


Fig. 6. **Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de polifenoles en EST.** HPLC usando una columna anth01. Los compuestos identificados fueron: número de retención de 1 a 15.350 es Eriocitrina, 96.96 ppm; 2 a 23.950 es Narirutina, 511.70 ppm; 3 a 27.250 es Naringina, 8830.27 ppm; 4 a 32.216 es Hesperidina, 286.14 ppm; 5 a 0.000 es Neohesperidina, 0.000 ppm (De Bio/Chem Research, Data file pp 28706 chr, Lakeport, CA).

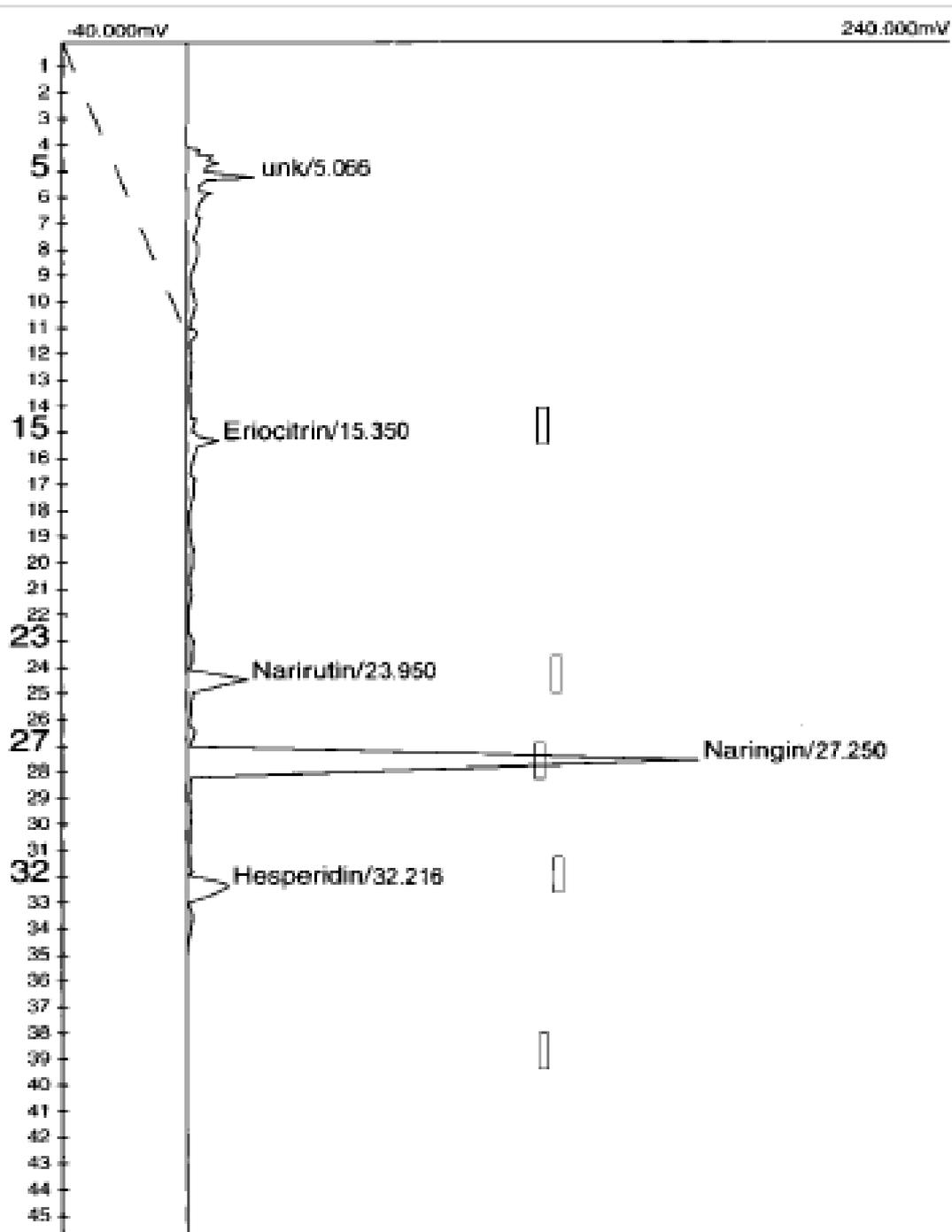


Fig. 7. **Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de flavonoides.** HPLC en Extracto de Semillas de Toronja (EST) usando columna Flan 06. Los compuestos identificados fueron: número de retención 1 a 0.000 es Eriocitrina, 0.00 ppm; 2 a 17.000 es Narirutina 960.27 ppm; 3 a 19.250 es Naringina, 15016.58 ppm; 4 a 21.266 es Hesperidina, 614.48 ppm; 5 a 0.000 es Neohesperidina, 0.00 ppm (de Bio/Chem Research, Data file Flav28706a, Lakeport, CA).

12.2. Cepas empleadas

Cepa de referencia *Candida albicans* ATCC 10231 y 36 cepas de *C. albicans* aisladas de muestras clínicas e identificadas por métodos tradicionales (filamentación en suero, producción de clamidioconidios en agar harina de maíz, crecimiento en CHROMagar *Candida*, asimilación de carbohidratos con el sistema API-20-AUX) en el Centro Médico Nacional y en el laboratorio de Micología Médica de la Facultad de Medicina UNAM.

12.3. Medios de cultivo empleados

Medio Agar Dextrosa Sabouraud (ADS, DIBICO) 65g/1 litro, Caldo Dextrosa Sabouraud (CDS) y medio de cultivo YPD (peptona 2%, extracto de levadura 1%, dextrosa 2%, agar 1.5%).

12.4. Colorantes

Bromuro de Etidio (BrEt, SIGMA) y medio de montaje con DAPI (UltraCruz™).

12.5. Determinación de la CMI para la cepa de referencia y aislados clínicos

Para determinar la CMI, el ADS a una temperatura de 40°C fué adicionado con concentraciones de 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 mg/mL (las concentraciones fueron ajustadas por dilución con agua), de EST y vaciado en placas de Petri estériles, se emplearon controles de ADS sin extracto. Las placas fueron inoculadas de forma masiva

empleando hisopos estériles embebidos en una suspensión de *Candida albicans* que contenía 1×10^6 UFC/mL (9) en solución salina estéril (0.5 Mac Farland). Todas las placas fueron incubadas a 35°C durante 48 horas y se extendió su observación hasta 5 días. La CMI fué la concentración más baja capaz de inhibir el crecimiento visible (Sawaya 2002).

12.6. Determinación de las curvas de crecimiento

Se partió de un cultivo de 12 hrs y se inocularon matraces con 5 mL de CDS (volumen final) para obtener una suspensión conteniendo 1×10^6 UFC/mL (0.5 de Mac Farland) de la cepa de referencia de *C. albicans*. Se adicionó extracto de toronja para obtener diferentes concentraciones correspondientes a la CMI determinada. Se incubaron en agitación (200 rpm) a 35°C durante 26 hrs, tomando alícuotas cada hora para medir la densidad óptica a 600 nm. Estas alícuotas se sembraron en medio ADS para determinar si el efecto era fungicida o fungistático determinado por ausencia o presencia de crecimiento (Coote 1998, con algunas modificaciones).

12.7. Formación de tubo germinativo

Se evaluó mediante la prueba de formación de tubo germinativo en suero humano para ello se partió de un cultivo de la cepa de referencia de *C. albicans* de 12 hrs de crecimiento (ON) del cual se tomaron 100 μ L para la inoculación de tubos con medio líquido YPD a fin de alcanzar un volumen de 2 mL, estos fueron adicionados con EST (0,05 mg/mL de EST) y se dejaron incubar durante 15, 30, 45 y 60 minutos. Se tomó una alícuota de 100 μ L y se puso en contacto con el suero. Después de tres horas de

incubación a 37°C se observó al microscopio para determinar la ausencia o presencia de la hifa (López 2004).

El análisis cuantitativo de la inhibición del tubo germinativo se realizó con un conteo por triplicado (experimentos independientes) de 100 células para determinar la inhibición del crecimiento del tubo germinativo y el colapso celular. El análisis estadístico se realizó con la prueba “t” de Student y una $p < 0.05$.

12.8. Tinción de Gram

Las laminillas fueron preparadas a partir de un cultivo de la cepa de referencia de *C. albicans* de 12 hrs de crecimiento que fue expuesto a concentraciones de 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, y 0.3 mg/mL de EST por un máximo de 5 horas, se realizó el frotis, después se adicionó cristal violeta (1 min.), se lavó con agua, se agregó la solución de lugol (30 seg.), se enjuagó con una solución ácido-alcohol (ver anexo) y finalmente se adicionó el colorante de contraste safranina (1 min.).

El análisis cuantitativo de los daños observados se realizó con un conteo por triplicado (experimentos independientes) de 100 células sometidas a las diferentes concentraciones de EST, para determinar las alteraciones provocadas: colapso celular, cambio de morfología y fragmentación. El análisis estadístico se realizó con la prueba “t” de Student y una $p < 0.05$.

12.9. Tinción con BrEt

Para la tinción de laminillas se colocaron 30 μ L del cultivo de *C. albicans* (previamente tratado con EST a las concentraciones correspondientes) sobre un portaobjetos, se fijó por 5 minutos a 37°C, después se adicionó la solución de BrEt (50 μ L de una solución de 1 mg/mL en agua /100 mL de agua) y se dejó actuar 30 segundos, los excesos fueron removidos con agua. La laminilla se observó a 100x con luz UV en el microscopio de fluorescencia. (Kesayan 2005).

El análisis cuantitativo del incremento en la intensidad de la fluorescencia se realizó con un conteo por triplicado (experimentos independientes) de 100 células sometidas a 0.05 y 0.1 mg/mL de EST. El análisis estadístico se realizó con la prueba “t” de Student y una $p < 0.05$.

12.10. Tinción con DAPI

Las laminillas se fijaron por 5 minutos a 37°C posteriormente se adicionó una pequeña gota de la solución de DAPI y se colocó en la superficie un cubreobjetos previamente desengrasado, las laminillas fueron observadas con el microscopio de fluorescencia y con el objetivo de inmersión a 100X. Se emplearon controles negativos sin EST y positivos con H₂O₂ (10 mM) y ácido acético (175mM) por 120 y 180 minutos, para todas las tinciones. De acuerdo a las indicaciones del proveedor.

El análisis cuantitativo del incremento en el tamaño del núcleo se realizó con un conteo por triplicado (experimentos independientes) de 100 células sometidas a 0.05 y 0.1

mg/mL de EST. El análisis estadístico se realizó con la prueba “t” de Student y una $p < 0.05$.

13. RESULTADOS

13.1. Determinación de la CMI para la cepa de referencia y aislados clínicos

De 36 muestras clínicas analizadas más la cepa de referencia *C. albicans*, solo 2 cepas no fueron inhibidas en su crecimiento por el EST (ambas provenientes de onicomycosis) aún a una concentración de 0.6 mg/mL, esto representa el 5.40 % del total estudiado (Fig. 8), la cepa de referencia y el resto de las muestras (34 cepas) presentaron una CMI de 0.2 mg/mL de EST. (Fig. 9).

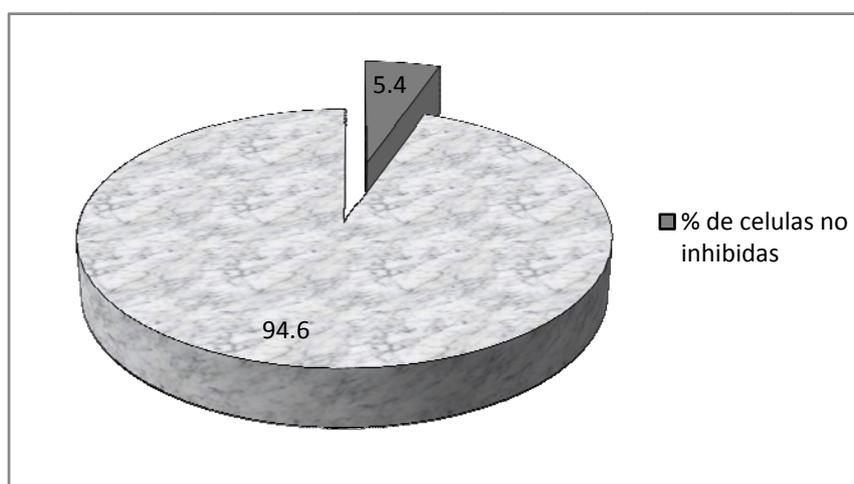


Fig. 8. **Porcentaje de cepas de *C. albicans* cuyo crecimiento fue inhibido por el EST.** Se muestra el porcentaje de cepas de *C. albicans* tanto procedentes de aislados clínicos como la cepa de referencia ATCC 10231 inhibidas por el EST.

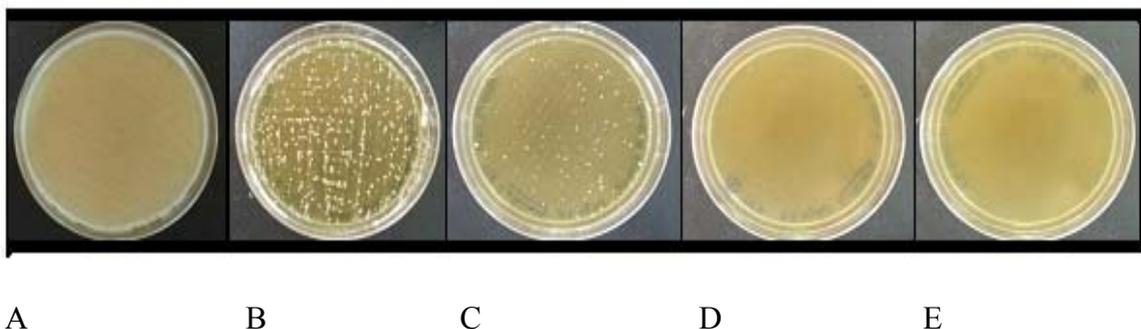


Fig. 9. Determinación de la CMI del EST frente a *C. albicans*. Se emplearon placas de ADS con diferentes concentraciones de EST, excepto el control, y se inocularon de forma masiva. Se muestran los resultados para la cepa de referencia ATCC 10231. La CMI corresponde a 0.2 mg/ml. A. control, B, C, D y E, tratamiento con EST a dosis de 0.05, 0.1, 0.2 y 0.3 mg/mL, respectivamente.

13.2. Determinación de las curvas de crecimiento.

Con la finalidad de determinar las concentraciones fungicida y fungistática del EST frente a la cepa de referencia *C. albicans* se construyeron curvas de crecimiento las cuales se realizaron por triplicado. Como se puede observar en el Fig. 12, no existe un incremento en la absorbancia de los cultivos de levaduras sometidos a la acción del EST a ninguna de las concentraciones experimentales (0.1, 0.2 y 0.3 mg/mL), es decir, hay inhibición del crecimiento en todas ellas, a diferencia del control que no fue sometido a la acción del EST y que mantiene su crecimiento exponencial.

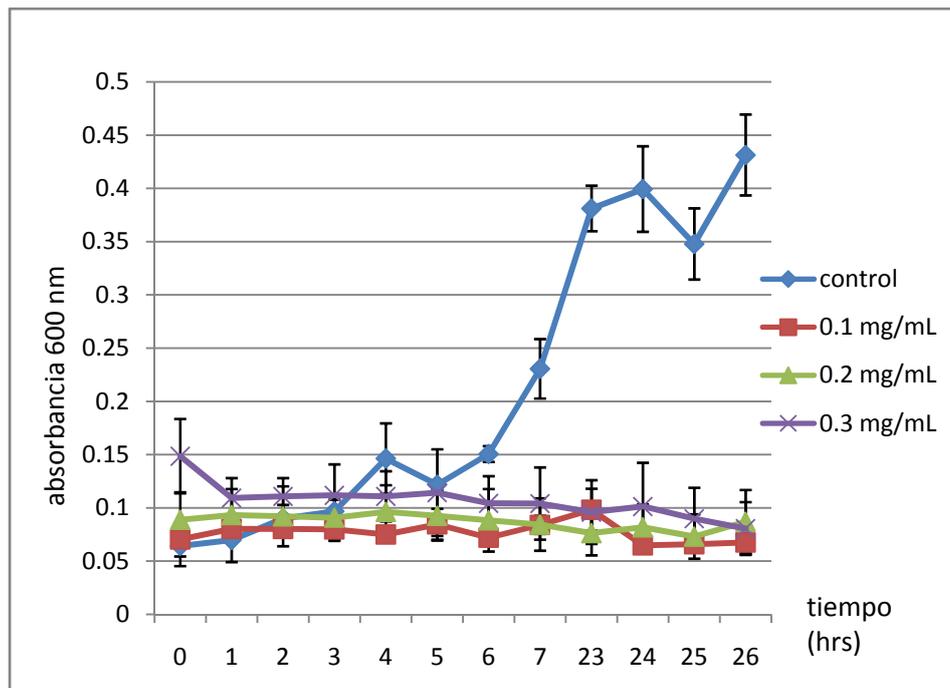


Fig. 10. Crecimiento de *C. albicans* con diferentes concentraciones de EST. Se observan las de crecimiento de la cepa de referencia de *C. albicans* con diferentes concentraciones de EST. El control sin EST presenta un crecimiento exponencial, el resto de las curvas no muestra un incremento en la absorbancia. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes.

En placas de ADS inoculadas con las levaduras después de ser sometidas a la acción del extracto por diferentes tiempos (muestras tomadas a cada hora) se determinó que la concentración 0.05 mg/mL de EST es fungistática durante las primeras 7 horas, como se puede observar por el crecimiento en la placa C de la figura 11. La concentración de 0.1 mg/ml fue fungicida hasta la cuarta hora, y las concentraciones de 0.2 y 0.3 mg/mL fueron fungicidas de forma inmediata (ausencia de crecimiento en las placas E y F en todas las horas a partir de la 1, solo hay crecimiento en la hora 0) (Fig. 11).

La Concentración Mínima Fungicida para la cepa de referencia fue de 0.2 mg/mL de EST, igual a la CMI.

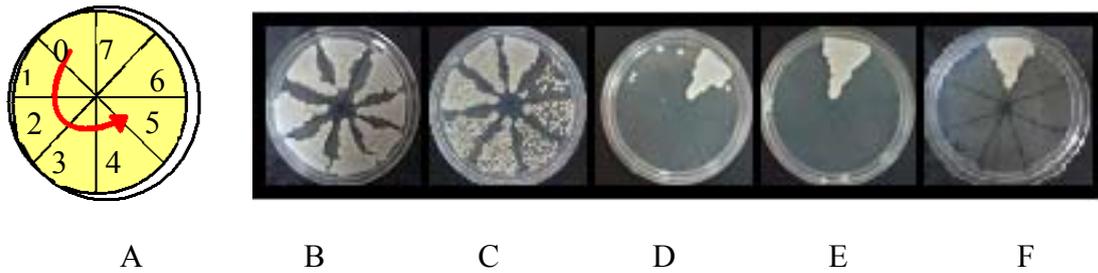


Fig. 11. Efecto fungicida y fungistático causado por el EST en *C. albicans*. Se empleó la cepa de referencia de *C. albicans*. A. Esquema que muestra el orden de inoculación de las placas con el correspondiente tiempo en horas. B, control sin EST. C, D, E y F, tratamiento con EST a dosis de 0.05, 0.1, 0.2 y 0.3 mg/mL, respectivamente.

13.3. Formación de tubo germinativo.

Se analizó la formación de hifas en la cepa de referencia de *Candida albicans* sometida a la acción de EST a una concentración no fungicida de 0.05 mg/mL estando en contacto por un máximo de 1 hora y encontrando que desde los 15 minutos de contacto entre la levadura y el extracto hay una inhibición de formación de la hifa cercana al 100%, causando además un colapsamiento en la levadura dependiente del tiempo de contacto con el EST. El 50% de las células presentan colapso celular después de 15 min. de contacto con el EST. El control sin EST desarrolla la hifa normal a partir de los 30 minutos y no presenta colapsamiento celular. El progreso en la formación de la hifa así como su inhibición se puede observar en la figura 12. En la Fig. 14 se observan los resultados de forma cuantitativa. Se inocularon muestras de estas levaduras que ya han perdido la capacidad de formación del tubo germinativo para corroborar que conservan su capacidad de crecimiento (Fig. 13) demostrando que aún permanecen viables.

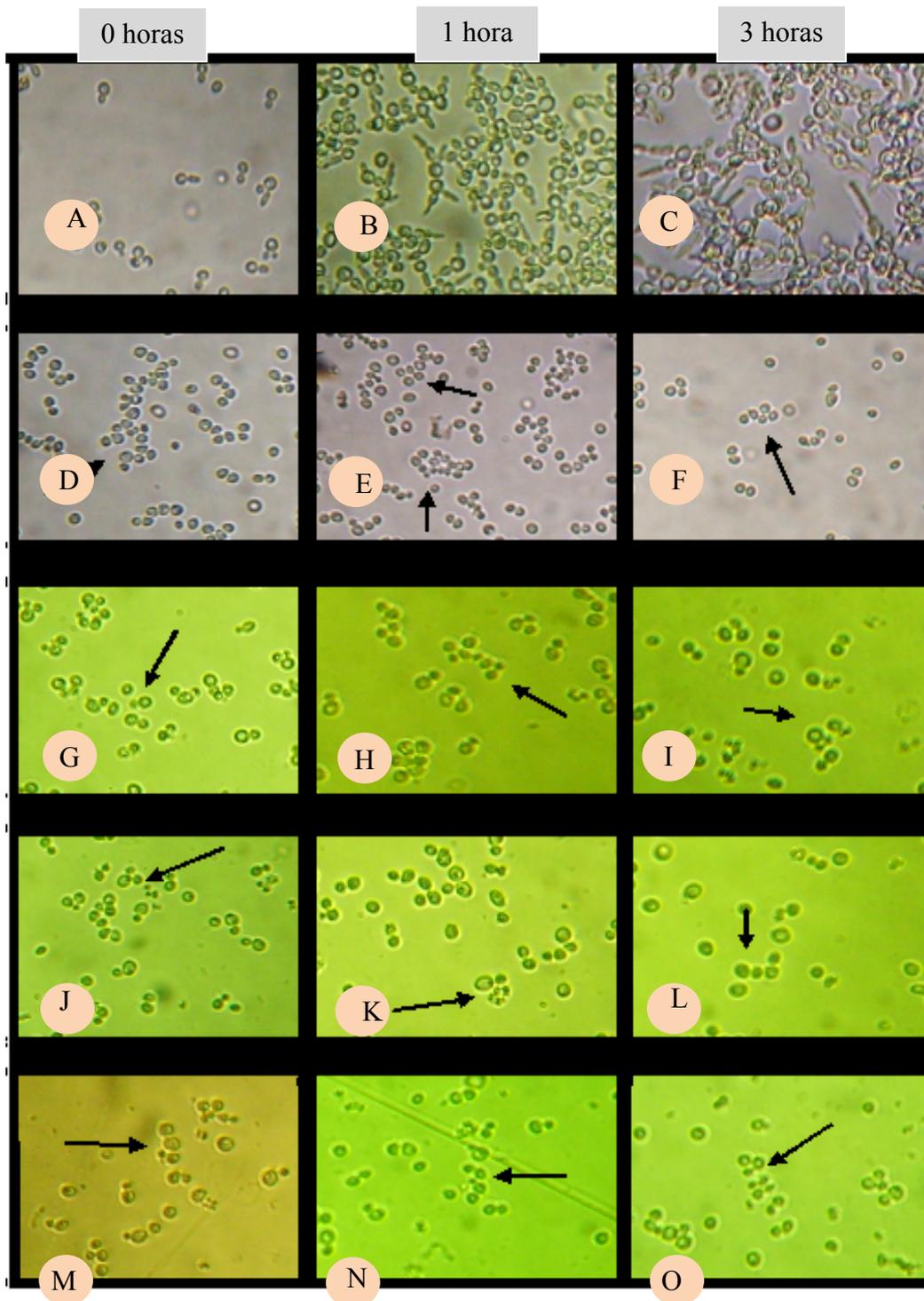
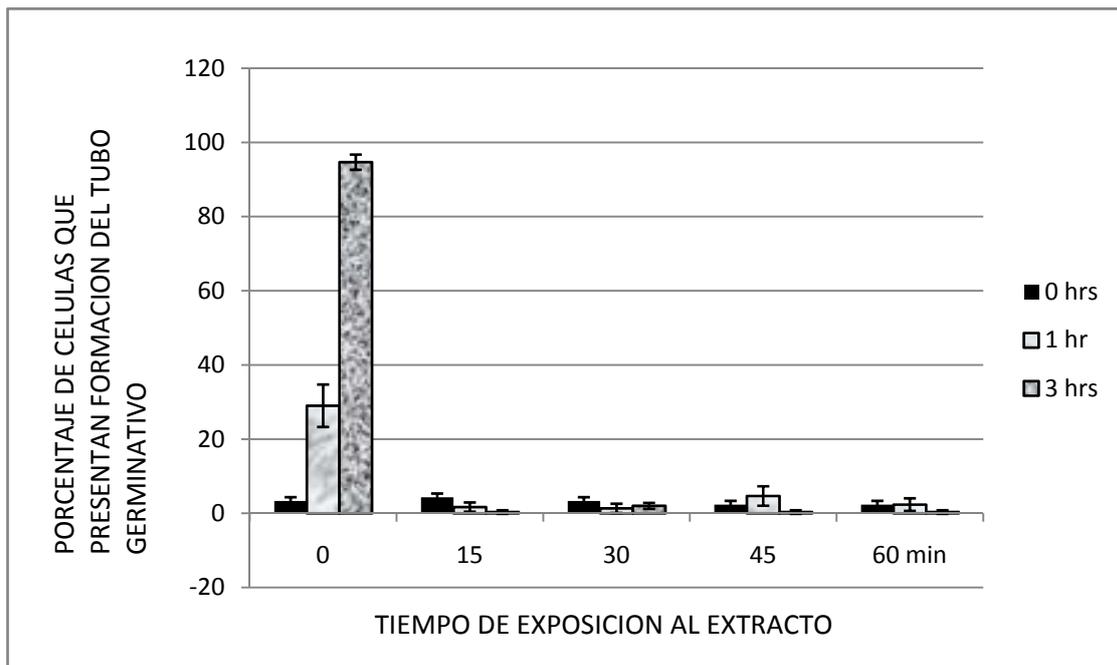


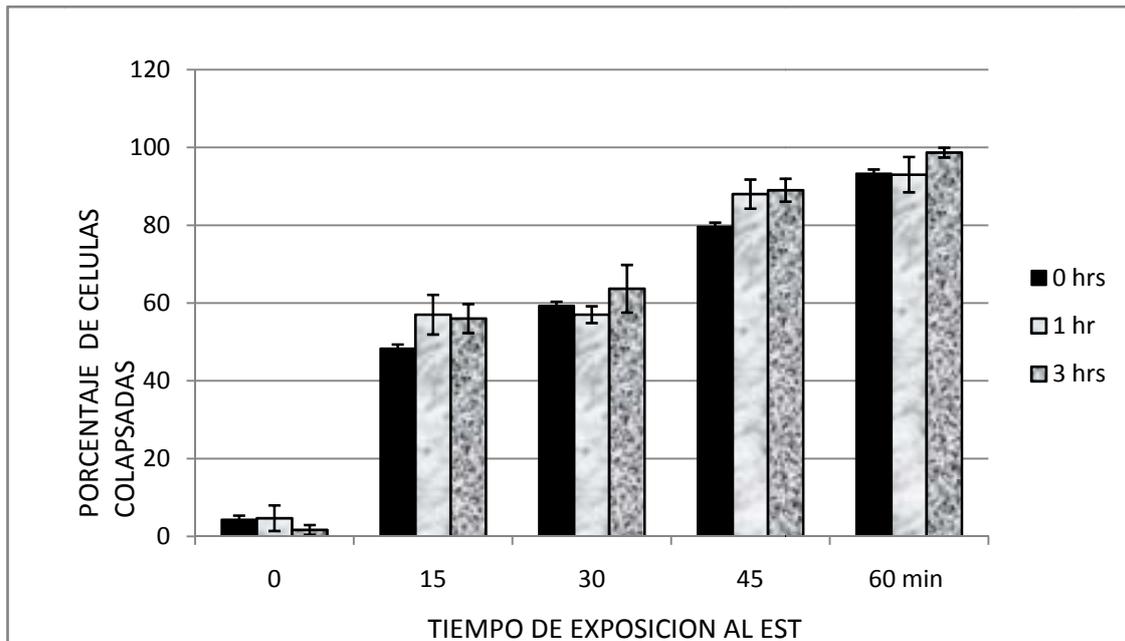
Fig. 12. Inhibición de la formación del tubo germinativo en *C. albicans* por acción del EST. A, B y C. Formación del tubo germinativo en el control, a partir de aquí todas las muestras fueron tratadas con 0.05 mg/mL de EST y las fotografías indican las mismas horas que el control; D, E y F, tratamiento con EST por 15 min; G, H e I, sometidas a la acción del EST por 30 min; J, K y L, tratamiento con EST por 45 min; M, N y O, tratamiento por 1 hora con EST. Las flechas indican colapso celular, cambio de forma e inhibición en la formación del tubo germinativo en todos los casos.



Fig. 13. Crecimiento en ADS (Sabouraud Dextrosa Agar) de *C. albicans* que no forma tubo germinativo. La levadura estuvo en contacto con EST a una concentración de 0.05 mg/mL, la muestra fue inoculada de forma inmediata. La flecha indica el orden de inoculación de las muestras con respecto al tiempo a partir (0, 15, 30, 45, 60 minutos).



A



B

Fig. 14. Porcentaje de inhibición de la formación del tubo germinativo y colapsamiento celular. Se muestra en la figura A el porcentaje de células capaces de formar tubo germinativo siendo el control el único que muestra desarrollo de hifas. En la figura B se observa que a mayor tiempo de contacto de la levadura con el EST corresponde una mayor cantidad de células colapsadas. En todos los casos hubo diferencias significativas (*) respecto al control, determinados por la prueba de “t” de Student con una $p < 0.05$.

13.4. Daño estructural.

13.4.1. Evaluación con tinción de Gram.

El daño en la morfología de la levadura *Candida albicans* en laminillas teñidas con Gram se observó desde la concentración 0.05 mg/mL y hasta 0.3 mg/mL de EST aumentando de forma proporcional respecto a la concentración y al tiempo de exposición al extracto. El daño se manifiesta como colapsamiento, cambios en la morfología y fragmentación de la levadura (Fig. 15). Para este experimento se emplearon testigos negativos sin EST y positivos con ácido acético y peróxido de hidrógeno. Se encontró colapsamiento celular en aproximadamente el 50% de las levaduras tratadas con concentraciones de 0.01 mg/mL o más, 50-86% de las levaduras

sufrieron cambios en la morfología a partir de 0.01 mg/mL y más del 50% sufrieron fragmentación celular a partir de 0.15 mg/mL incrementándose de forma proporcional con la concentración de EST (Figura 16).

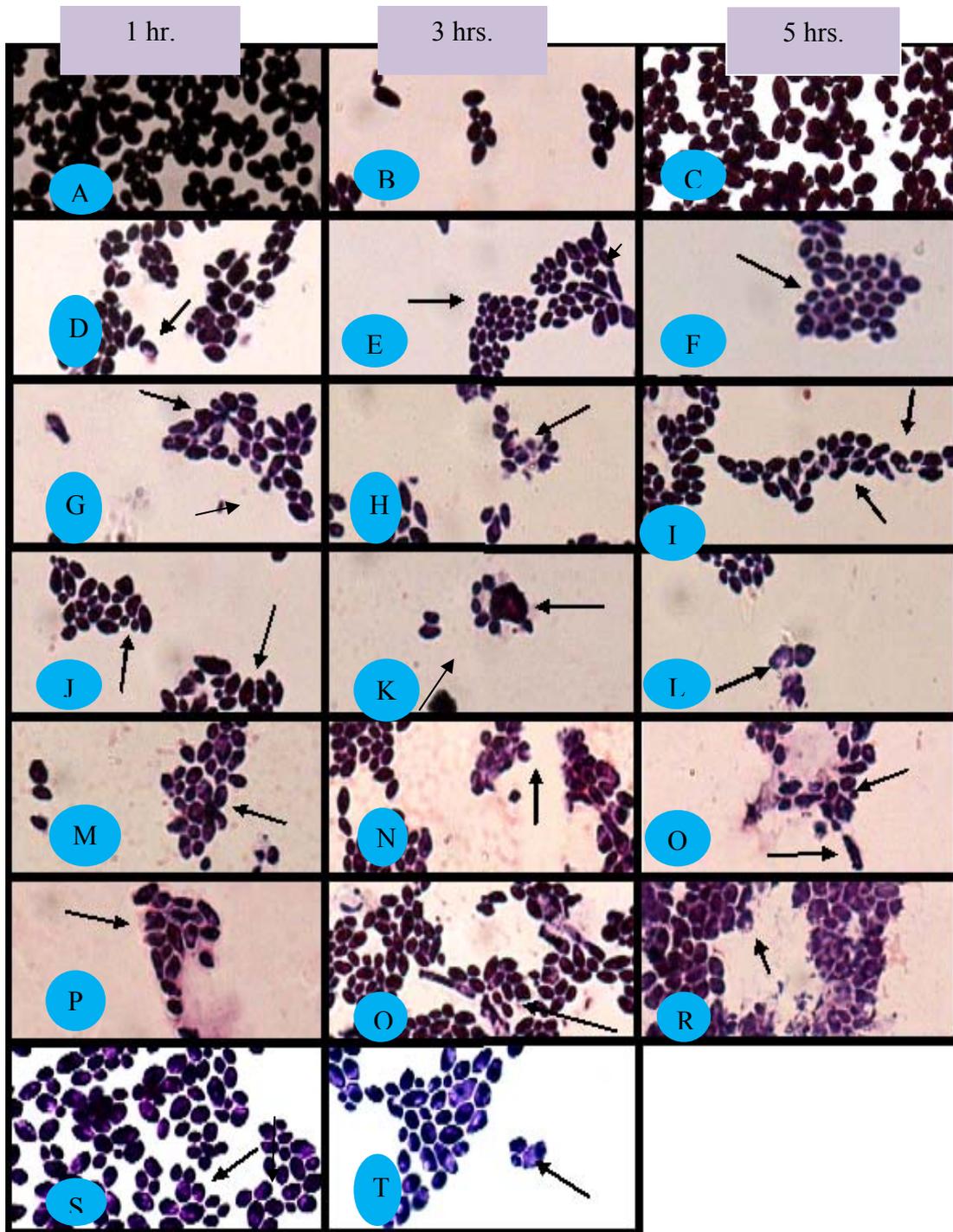
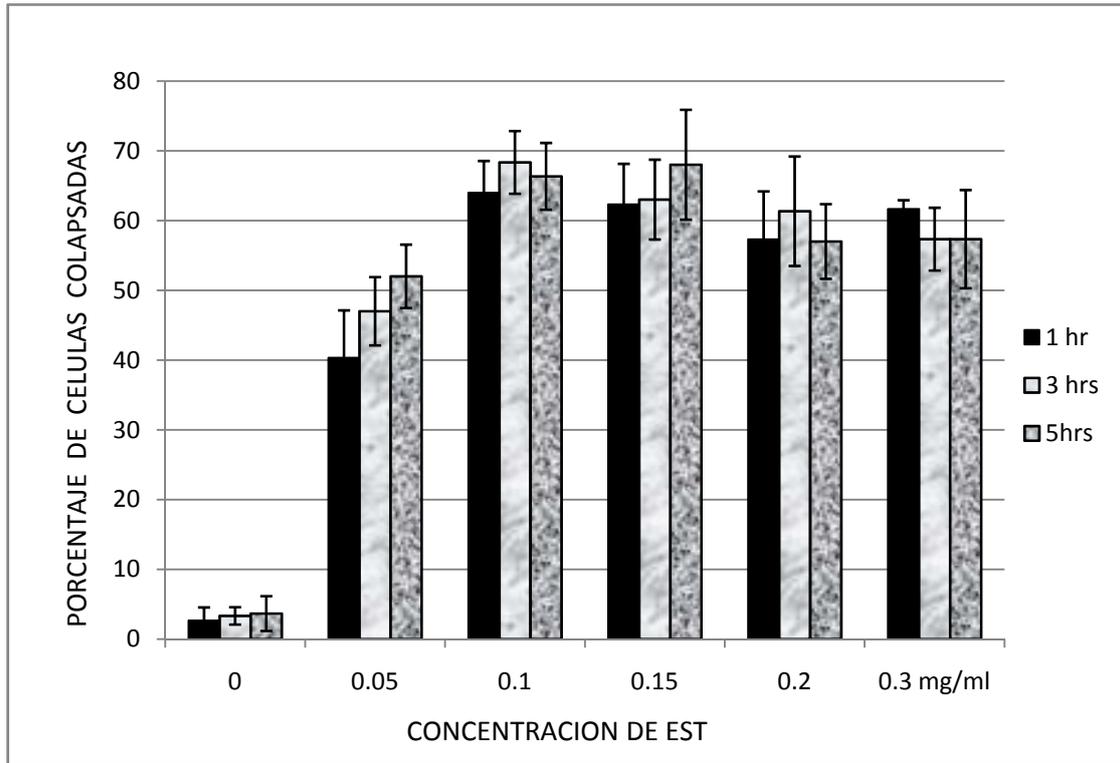
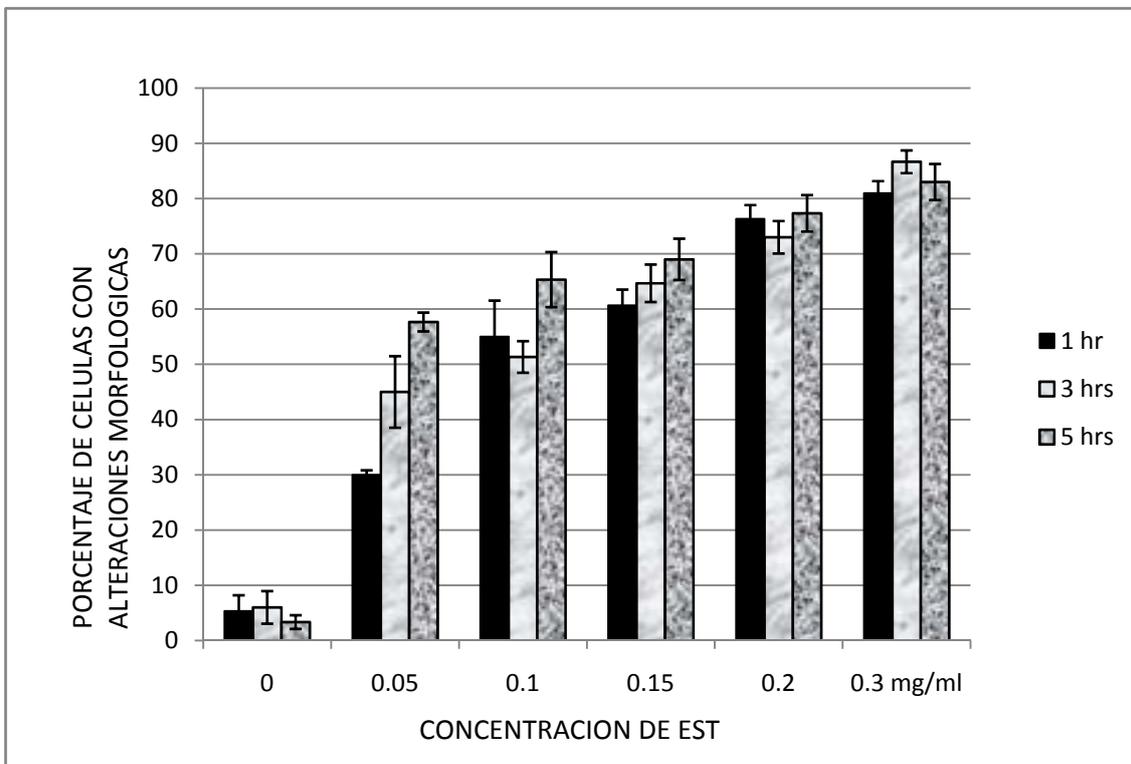


Fig. 15. Tinción de Gram. Daños en la morfología de *Candida albicans* provocados por el EST. A, B y C, controles con 1, 3 y 5 horas de incubación respectivamente (todas las muestras fueron tomadas a estos mismos tiempos, excepto los controles. positivos). D, E y F, levaduras incubadas con EST a 0.05 mg/mL, G, H e I, incubación con EST a 0.1 mg/mL; J, K y L, incubación con EST a 0.15 mg/mL; M, N y O, EST a 0.2 mg/mL; P, Q y

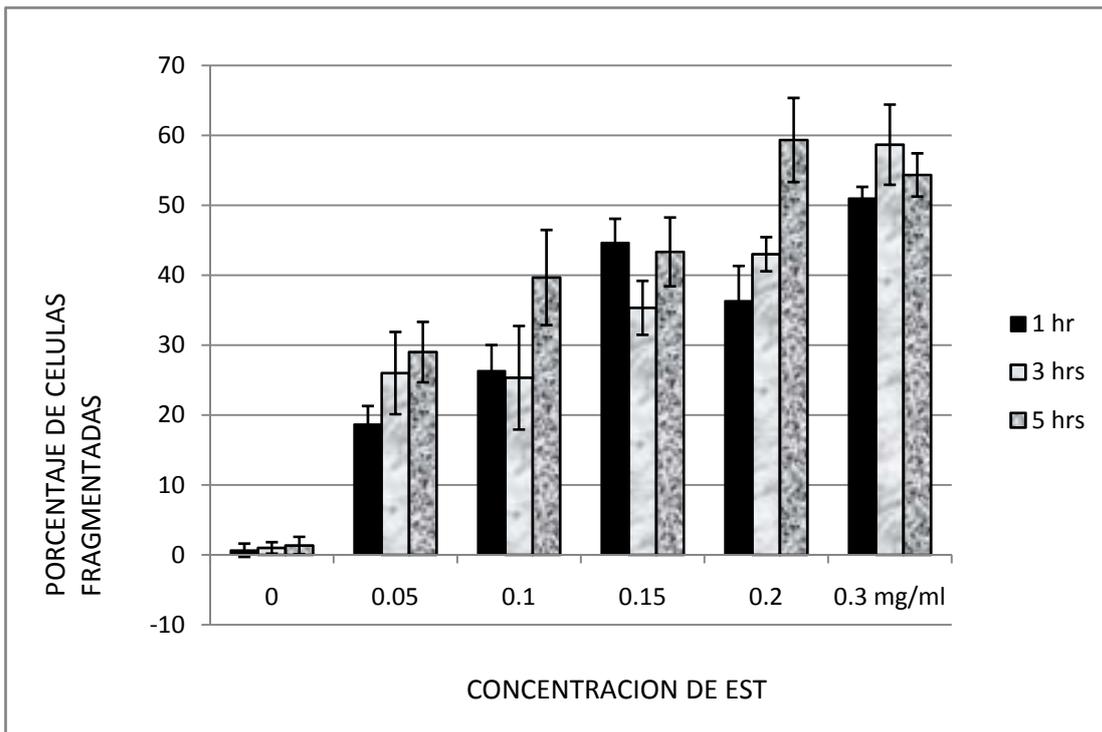
R, incubación con EST a 0.3 mg/mL; S, Control positivo con ácido acético (175 mM) 2 hrs y T, Control positivo con H₂O₂ (10 mM) 2 hrs. Las flechas en D, G, H, I, L, M, N, Q, R y S, indican fragmentación, en E, J, K y S indican colapso celular y en E, F, G y K indican cambio en la morfología celular.



A



B



C

Fig. 16. Porcentajes de daños morfológicos observados con tinción de Gram. En todas la figuras se observa una marcada tendencia en el incremento de daño sobre la morfología de la levadura con respecto a la concentración y el tiempo de exposición al EST. A, colapsamiento celular. B, cambio de morfología. C, fragmentación celular. En todos los casos hubo diferencias significativas (*) respecto al control, determinados por la prueba de “t” de Student con una $p < 0.05$.

13.4.2. Evaluación con tinción BrEt.

El BrEt tiñe con mayor intensidad a las células con alteraciones en su membrana celular. Las concentraciones de 0.05 y 0.1 mg/mL de EST causan un incremento en la fluorescencia producida por el BrEt en *C. albicans* con respecto al control cuando la levadura es puesta en contacto con el extracto por 1, 3 y 5 horas, encontrando que al menos el 50% de las células aumentan su fluorescencia con 0.05 mg/mL de EST desde la primera hora (Fig. 18). En este experimento se usaron controles positivos (H_2O_2 y ácido acético) los cuáles también presentaron un incremento en la fluorescencia. Los

controles negativos (sin EST) no incrementan su fluorescencia al transcurrir las horas (Fig. 17).

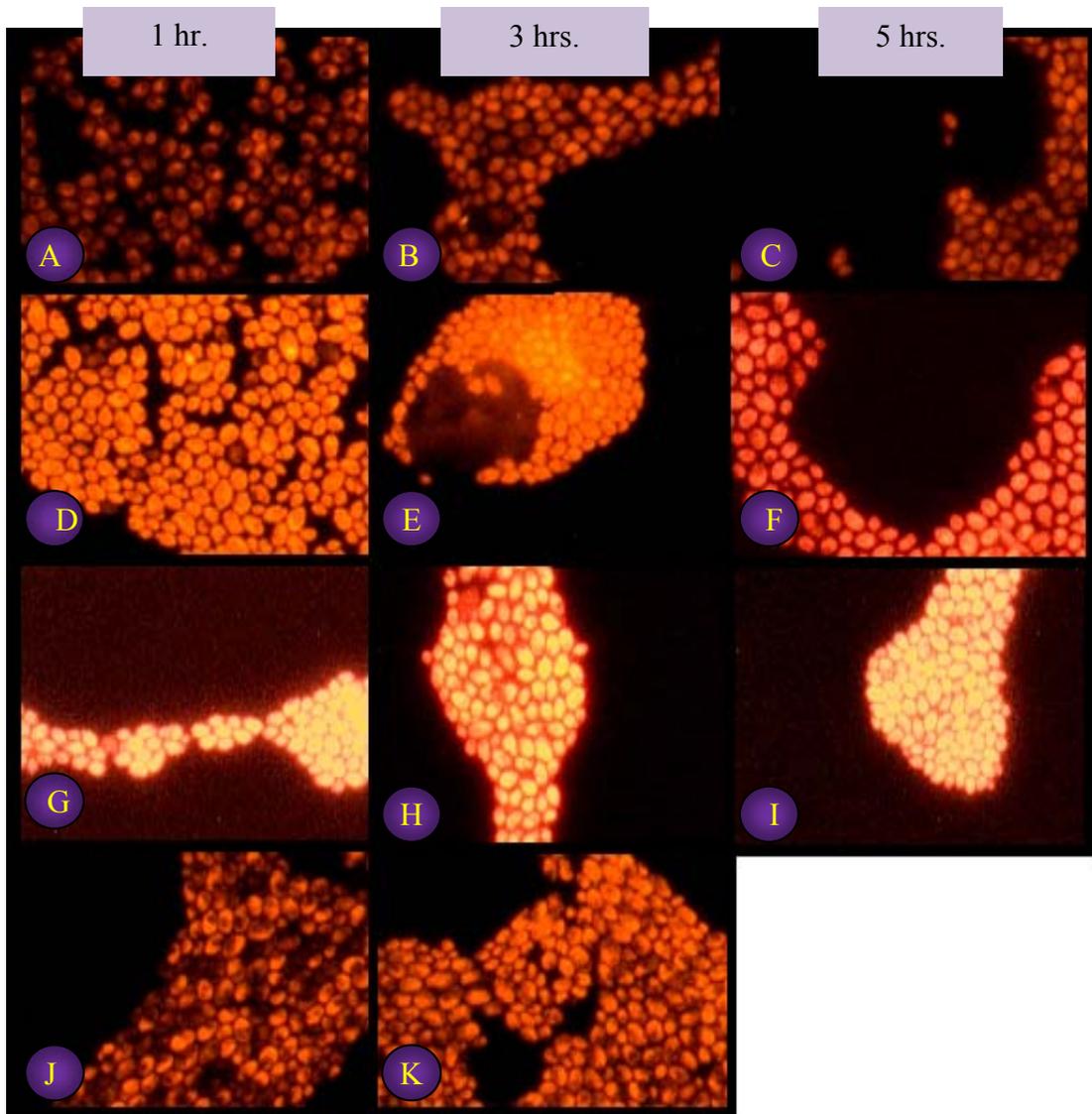


Fig.17. Tinción con BrEt. Alteraciones en la membrana celular de *C. albicans* provocados por el EST. A, B y C, Controles a las horas 1, 3 y 5 respectivamente (las demás muestras fueron tomadas a estas mismas horas excepto los controles positivos), D, E y F, incubación con EST a 0.05 mg/mL; G, H e I, incubación con 0.1 mg/mL de EST; J, Control positivo con ácido acético, 2 hrs (175 mM) y K, Control positivo con H₂O₂, 2 hrs (10 mM).

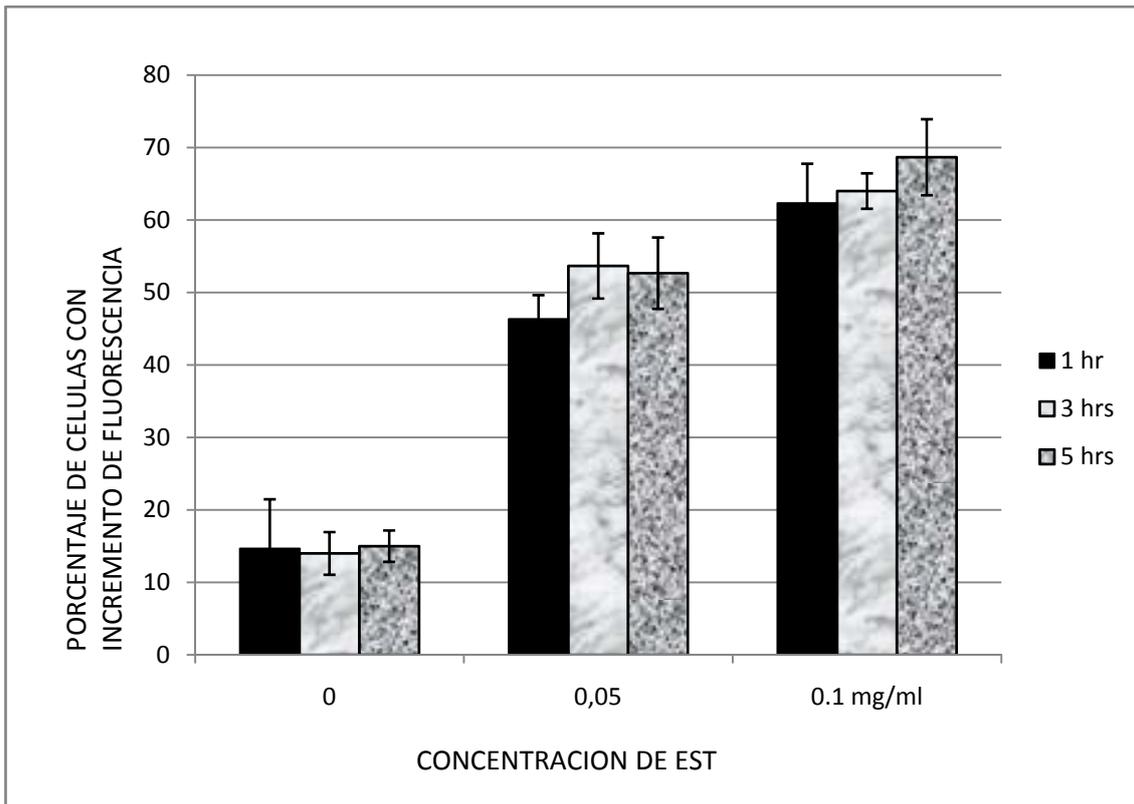


Fig. 18. Porcentaje de levaduras con incremento en la fluorescencia observado con BrEt. El incremento de fluorescencia depende de la concentración de EST y el tiempo de exposición. En todos los casos hubo diferencias significativas (*) respecto al control, determinados por la prueba de “t” de Student con una $p < 0.05$.

13.4.3. Evaluación con tinción de DAPI.

El daño a nivel de núcleo que produce el EST sobre la levadura *C. albicans* se evaluó con la tinción de DAPI a concentraciones de 0.05 y 0.1 mg/mL del extracto y a 1, 3 y 5 horas de contacto. Se observó un incremento en el tamaño del núcleo del 70% de las levaduras a partir de 0.05 mg/ml de EST observándose además parte del citoplasma teñido (Fig. 20). En el experimento además se tiñeron controles negativos sin EST en los que se observó una fluorescencia menor a la de las levaduras tratadas con EST. En los controles positivos tratados con peróxido de hidrógeno y ácido acético, expuestos por 180 minutos, se observó un resultado similar al obtenido en las levaduras tratadas

con EST a concentraciones de 0.1 mg/mL. Cuando se mantuvieron en contacto con peróxido de hidrogeno, por 120 minutos, se observó el mismo resultado, no así con las levaduras expuestas al ácido acético, a un tiempo similar, en las que se observó una ligera disminución en su fluorescencia (Fig. 19).

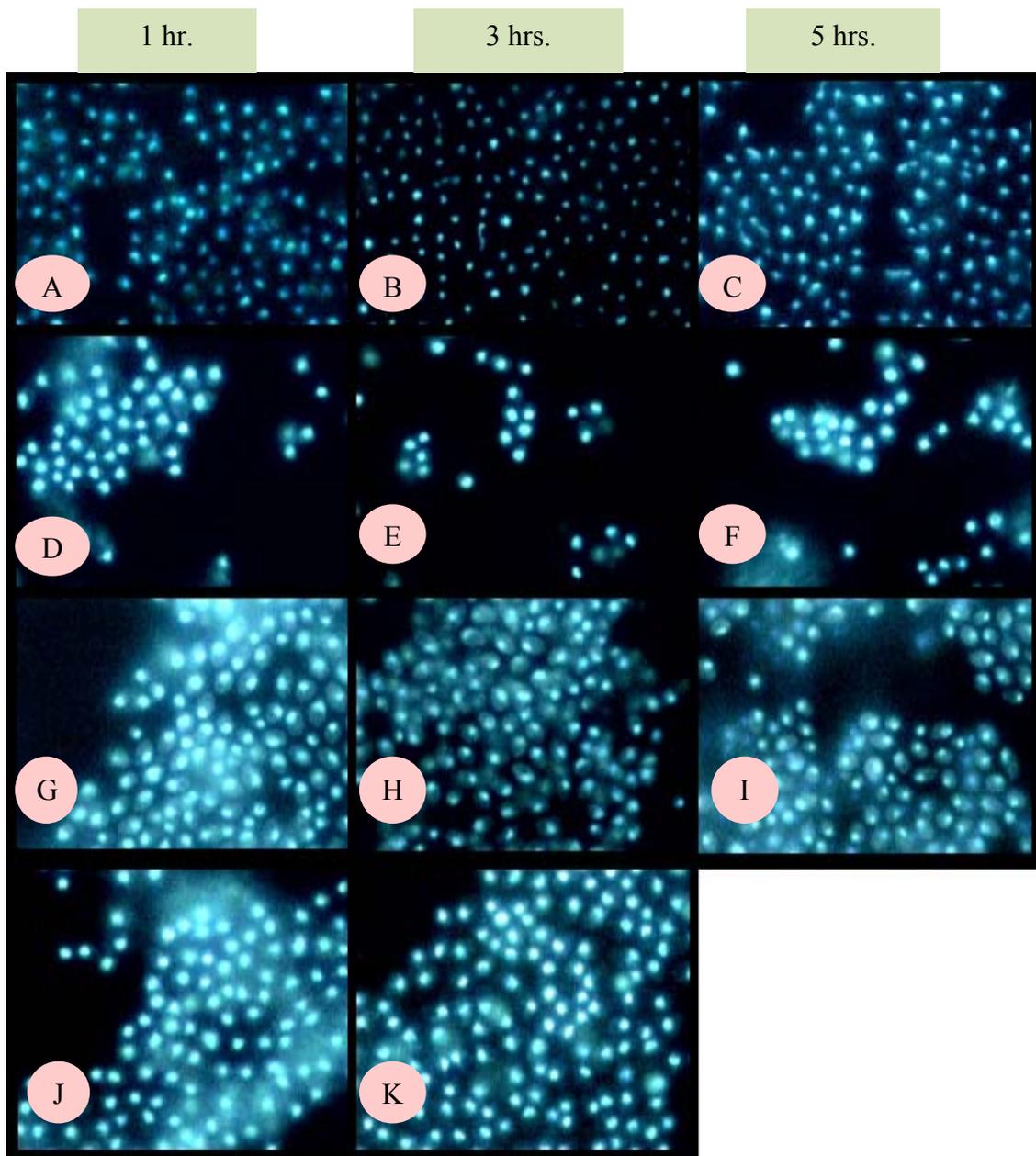


Fig. 19. Tinción con DAPI. Alteraciones a nivel nuclear de *C. albicans* provocados por el EST. A, B y C, control a las horas 1, 3 y 5 respectivamente (las demás muestras fueron tomadas a estas mismas horas excepto los controles positivos), D, E y F, tratamiento con EST a 0.05 mg/mL, G, H e I, tratamiento con 0.1 mg/mL de EST, J, Ctrl positivo con ácido acético, 2 hrs (175 mM) y K, Ctrl positivo con H₂O₂ ,2 hrs (10 mM).

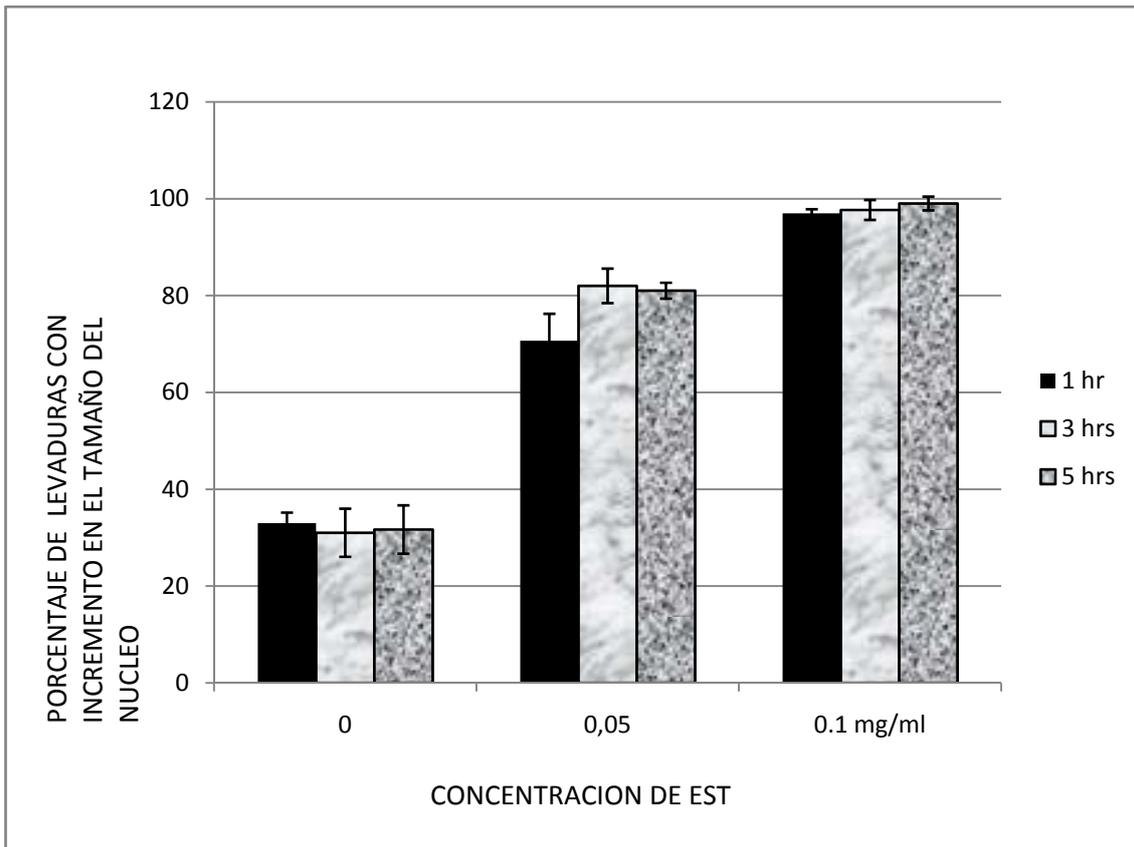


Fig. 20. Porcentaje de levaduras con incremento en el tamaño del núcleo observado con DAPI. Con esta tinción se pone de manifiesto un incremento aparente en el tamaño del núcleo de las levaduras tratadas con EST. Se observa también tinción a nivel de citoplasma. El número de levaduras afectadas se incrementa en forma proporcional a la concentración. En todos los casos hubo diferencias significativas (*) respecto al control, determinados por la prueba de “t” de Student con una $p < 0.05$.

14. DISCUSIÓN.

En los últimos años ha habido un incremento en el uso de productos de origen natural como parte de la medicina naturopática debido a que estos compuestos presentan características como baja toxicidad, amplio espectro de acción, no se ven afectados por el almacenamiento y la temperatura, no presentan efectos secundarios a la dosis terapéutica, no generan resistencia (Reagor 2002), además que debido a su origen es factible abatir costos al no requerir una manufactura cara y compleja. Es por esto que resulta de vital importancia conocer más acerca del mecanismo de acción, actividad biológica, composición y otras características de estos compuestos.

En países como Brasil, Inglaterra, Japón, E.U.A, Francia, etc. se han realizado diversos estudios con respecto al EST encontrando que presenta actividad biológica frente a parásitos (helminths), hongos, virus y bacterias (Heggors JP. 2002, Cvetnic Z, Vladimir-Knezevic S. 2004, von Woedtke T. 1999, Reagor L. 2002, López V.2002, Eleraky N.Z. 2002, Oyelami OA 2005). Se ha argumentado en contra de la eficacia del EST, el hecho de que algunos productos comerciales son adicionados con conservadores tales como: triclosan, cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio ($C_{27}H_{42}ClNO_2$), cetilpiridinio, etc., indicando que son estos componentes los que producen el efecto biológico (Stutervant 1997). Sin embargo, a favor se argumenta que tanto el pH como la presencia de flavonoides en el extracto (Cvetnic 2004) son los responsables de la actividad biológica, independientemente de que hayan o no sido adicionados conservadores. La composición del EST ha sido previamente reportada y determinada por métodos espectrofotométricos, cromatografía, TLC, encontrando que existen pequeñas diferencias en el contenido de polifenoles, especialmente de flavonoides que dependen

de las marcas (Cvetnic 2004). Se argumenta, además, que el cloruro de benzetonio se forma durante el proceso normal de extracción cloroformica del EST (Takeoka 2001). De acuerdo a los datos proporcionados por el proveedor y a los resultados del análisis químico efectuado por HPLC, el producto usado en este trabajo no refiere haber sido adicionado con ningún tipo de conservador (Reagor, 2002; <http://nutriteam.com>). Actualmente el EST es comercializado para su venta al público en general como NutriBiotic, GSE, Citribiotic, etc., sin embargo con mayor frecuencia es utilizado en restaurantes y en la industria alimenticia como desinfectante, conservador, germicida y antifúngico bajo el nombre de Citricida, también se usa como suplemento alimenticio.

Por medio de estudios de microscopía electrónica realizados en bacterias se ha descrito que su mecanismo de acción está dado por alteraciones de la membrana, que provocan rompimiento de la misma y liberación del contenido citoplasmático (Hegggers J.P.y Cottingham J.B.S. 2002)., sin embargo, no existe ningún trabajo previo respecto lo que sucede en *Candida albicans*, los estudios realizados en esta levadura se limitan a la evaluación de la actividad biológica (Krajewska-Kuřak E. 2001, Cvetnic Z, Vladimir-Knezevic S. 2004, Ignacio C y Thai D 2005).

Para abordar este tema y profundizar en él a nivel molecular primero fué necesario determinar la CMI tanto de una cepa de referencia como de cepas aisladas de muestras clínicas, evaluando así su actividad biológica y seleccionando cepas que presenten inhibición de su crecimiento a concentraciones mayores o por debajo de la CMI de la cepa de referencia..

Para llevar a cabo esta determinación en la literatura se han descrito muchas metodologías cada una con ventajas y desventajas. Las metodologías que se emplean con mayor éxito en la evaluación de la actividad biológica de extractos de origen natural se dividen básicamente en: a) Métodos de difusión en agar, son empleados debido a su bajo costo y a que son metodologías muy simples, sin embargo, la composición del medio influye en la actividad de muchos extractos dependiendo de su composición. En la actualidad el documento de la CLSI M44-A (Clinical and Laboratory Standards Institute, antes NCCLS National Committee for Clinical Laboratory Standards) recomienda el uso de medio RPMI 1640 con agar más glucosa o bien agar Mueller-Hinton. Esta prueba se limita a sustancias altamente solubles en agua; b) Métodos de bio-autografía, a pesar de su alta sensibilidad sólo se puede aplicar a microorganismos capaces de crecer en placas de cromatografía de capa fina. Otro problema es la necesidad de remover compuestos volátiles. Se desarrolló una variante para evaluar extractos de plantas en *Candida*, que permite distinguir la actividad de los diferentes compuestos que se encuentran en cantidades muy pequeñas en una mezcla compleja. Estas metodologías evitan la necesidad de una purificación previa de los compuestos lo que disminuye costos, sin embargo, sólo proporcionan resultados cualitativos que no permiten determinar la CMI; c) El uso de métodos estandarizados para susceptibilidad de antifúngicos ha permitido incrementar la reproducibilidad entre laboratorios. Los métodos propuestos son muy laboriosos, requieren de mucho tiempo y no son fáciles de usar para muchos de los laboratorios clínicos. Se han desarrollado alternativas que incluyen métodos colorimétricos o fluorescentes. Los métodos comerciales, así como los basados en citometría de flujo han demostrado ser herramientas excelentes para los estudios de susceptibilidad. Estas técnicas aún requieren de personal altamente calificado para obtener resultados óptimos; d) Métodos de dilución. Pueden llevarse a

cabo en medios líquidos o en medios sólidos y el crecimiento del microorganismo puede evaluarse de diversas formas. En el método de dilución en agar la CMI es definida como la concentración más baja capaz de inhibir el crecimiento del hongo. En medio líquido se emplean la turbidez y los indicadores redox como medida de crecimiento. La turbidez puede ser evaluada visualmente o por medio de un espectrofotómetro. Este último método permite también evaluar si un compuesto tiene actividad fungicida o fungistática. Los métodos basados en diluciones seriales son los que proporcionan los resultados de CMI con mayor reproducibilidad. Para evaluación de levaduras se recomienda el método M27A2 ó EUCAST y para hongos levaduriformes se recomienda el M38 A de la CLSI. Estas técnicas se han recomendado para compuestos lipofílicos obtenidos de productos naturales (Scorzoni L. 2007, Shams-Ghahfarokhi M. 2006).

La CLSI tiene documentos oficiales para las pruebas de sensibilidad a antifúngicos tanto para hongos filamentosos como levaduriformes, estas metodologías no siempre dan buenos resultados cuando se trata de evaluar compuestos de origen natural debido a la naturaleza química de los diferentes componentes del extracto. Existen diversos trabajos donde comparan el método de dilución en agar con el de microdilución evaluando la actividad de antimicóticos como los azoles y demostrando que hay una buena correlación entre ambos métodos. (Schmalreck AF. 1996, Therese KL. 2006). El método de dilución en agar tiene ventajas en cuanto a simplicidad y a que no se ve afectado por aquellos extractos que por su composición química provocan turbidez en el medio, lo que afecta las lecturas del método de microdilución (Sawaya AC, et. al. 2002). y ha sido empleado con éxito para la evaluación de diversos extractos de origen natural. En nuestro caso, además de lo antes mencionado, la metodología de dilución

en agar proporcionó la ventaja de que las condiciones de crecimiento son más cercanas a las que se emplean para las técnicas de extracción de RNA de *Candida albicans*, que se emplearán como un siguiente paso en nuestro estudio.

Con la finalidad de evaluar la actividad biológica que el EST presenta frente a *C. albicans* se enfrentaron a 36 cepas provenientes de aislados clínicos y una cepa de referencia (ATCC 10231). Nuestros resultados muestran una inhibición del crecimiento de un 94.60% a una CMI de 0.2 mg/mL, lo cual correlaciona con los resultados obtenidos por otros investigadores en los que se ha probado que el EST inhibe el crecimiento de *Candida* a concentraciones entre 0.1 y 0.4 mg/ml, con variaciones dependiendo del extracto empleado (Krajewska-Kuřak E. 2001, Cvetnic Z, Vladimir-Knezevic S. 2004, Ignacio C y Thai D 2005). En este trabajo se observó que solo el 5.40% de las muestras expuestas al EST no fueron inhibidas, aún a la máxima concentración empleada que fué 0.6 mg/ml, y corresponde a 2 cepas obtenidas de micosis de uñas. No se emplearon concentraciones mayores debido a que se ha reportado que a partir de 0.6 mg/ml hay un efecto citotóxico evaluado en fibroblastos de piel humana (Hegggers JP. 2002).

Se demostró que el EST inhibe el crecimiento de *C. albicans* en una concentración de 0.05 mg/ml, menor que la CMI (0.2 mg/mL), presentando un efecto fungistático. A concentraciones iguales o mayores a la CMI el efecto que se presenta es fungicida. Hasta el momento no hay referencias de investigaciones previas con respecto a esto.

Con estos resultados se obtuvieron las condiciones de crecimiento adecuadas para poder apreciar diferentes daños provocados por el EST, los cuales finalmente nos permitirán seleccionar algunos genes implicados en los mismos para su posterior evaluación.

Una característica importante de *C. albicans* es su capacidad de formar tubo germinativo en presencia de suero (Pontón 2002, G. Black 2002, Arenas 2003) *In vivo*, esta capacidad de filamentación está relacionada con su virulencia al permitir el proceso de penetración de las células y tejidos del hospedero y de adherencia a la superficie celular (Stephen 1999). Debido a que se ha demostrado que las cepas incapaces de formar hifas son avirulentas en un modelo murino (Iranzo M. 2003) , se ha sugerido la necesidad de desarrollar compuestos antifúngicos que puedan prevenir la formación de hifas y de destruir ambas formas de la levadura (Barodka VM 2006). Han sido pocos los estudios realizados para determinar si los antifúngicos actuales inhiben la capacidad de formación de tubo germinativo sin embargo, y debido a su importancia, se ha mencionado que es un estudio que debería incluirse para el análisis de cada antifúngico debido a que hay diferencias importantes entre ellos (Hawser S, Islam K. 1999), incluso se ha reportado que los compuestos fungicidas en concentraciones cercanas a la CMI (anfotericina B y equinocandinas) inhiben la transformación morfogénica a concentraciones inferiores a la CMI, a diferencia de aquellos que muestran un efecto fungicida en concentraciones superiores a la CMI y que inhiben esta transformación sólo a concentraciones muy superiores a la CMI (azoles y fluocitosina). Esta es información adicional debe ser considerada en la acción del agente antifúngico sobre las formas levaduriformes y de hifas de *C. albicans* y puede ser relacionada con su efecto fungicida, lo que es de gran utilidad para la evaluación de nuevos compuestos antifúngicos (Hawser S, Islam K. 1999, Kesavan 2005).

En este estudio se demostró que el EST inhibe la formación del tubo germinativo en *C. albicans* incluso a concentraciones muy por debajo de la CMI (0.05 mg/mL de extracto), y está de acuerdo a lo descrito por Hawser (1999) al haber una relación entre la baja concentración a la cual se inhibe la formación de la hifa y el hecho de que presenta una actividad fungicida en concentraciones muy cercanas a la CMI, dato que tiene implicaciones terapéuticas y que podría relacionar su forma de acción con la anfotericina B y las equinocandinas.

Debido a que se ha demostrado que el EST daña la membrana celular bacteriana liberando el contenido citoplasmático, decidimos buscar alteraciones en *C. albicans* a este nivel por medio de tinciones. Para ello, en primer lugar evaluamos el efecto del EST sobre la morfología celular; las levaduras fueron observadas al microscopio después de teñirlas con Gram observándose células fragmentadas, amorfas o con colapsamiento celular, este daño fue dosis dependiente. Estos resultados están de acuerdo con lo observado en las curvas de crecimiento y en las pruebas de dilución en agar demostrando que además de la inhibición del crecimiento, aún a dosis fungistáticas (0.05 y 0.1 mg/mL), hay alteraciones morfológicas. Este tipo de correlaciones entre alteraciones morfológicas e inhibición del crecimiento ya han sido descritas previamente (Kesavan C. 2005, Barodka VM 2006). Se sabe que los ácidos débiles como el ácido acético pueden producir alteraciones a nivel de membrana citoplasmática y a nivel de DNA conduciendo a las levaduras a apoptosis dependiendo de la dosis empleada y el tiempo de exposición (Ribeiro GF. 2006, Phillips AJ. 2003, Macpherson N. 2005, Stadler N. 2001), es por esta razón que se seleccionaron como controles positivos para nuestras tinciones.

Una forma sencilla y económica de evaluar si hay alteraciones a nivel de membrana celular es por medio de la tinción con BrEt. El bromuro de etidio es una molécula plana que se intercala entre los pares de bases del ADN y establece una interacción electrostática con los ácidos nucleicos emitiendo fluorescencia al hacer incidir luz ultravioleta (Marco Biggiogera 1989) con ayuda de un microscopio de fluorescencia se puede observar que el BrEt tiñe las levaduras en crecimiento a nivel de núcleo y citoplasma observándose el núcleo más brillante que el citoplasma, el cual es teñido de forma difusa y permite observar las vacuolas como zonas no teñidas, en algunos casos se observa un patrón granulado, lo que podría ser indicativo de una interacción con las mitocondrias al igual que sucede en las tinciones con DAPI (Corliss D. 1981). La tinción de las levaduras con el BrEt ha sido usada como un índice de daño en la membrana trayendo como consecuencia cambios en la permeabilidad en la misma, lo cual se puede apreciar por los niveles de incorporación del compuesto fluorescente: en las levaduras que presentan una membrana plasmática intacta el compuesto es excluido de la célula y la tinción es muy débil, en aquellas levaduras donde hay alteraciones en la integridad de la membrana la incorporación es mayor observándose células fluorescentes (Kesavan C. Raghunathan M. 2005, Coote PJ. 1998, Benito A. 1999, Chen H. 2007). Es posible contar el número de células con elevados niveles de fluorescencia en las imágenes obtenidas para finalmente calcular el porcentaje de células fluorescentes en una población. (Coote PJ. 1998). Al evaluar el efecto del EST sobre *C. albicans* observamos que las levaduras control (crecidas en ausencia de extracto) presentaron una intensidad de fluorescencia baja observándose más brillante el núcleo tal y como lo describen Corliss y White (1981). En las levaduras tratadas se observó un aumento en la intensidad de la fluorescencia de

forma proporcional a la concentración y al tiempo de exposición, de acuerdo a lo descrito anteriormente por otros investigadores es debido a la alteración en la integridad de la membrana. Este aumento en la intensidad de la fluorescencia se observó desde la concentración de 0.05 mg/mL, es decir, menor que la CMI, se encontró que al menos el 50% de las células aumentan su fluorescencia con 0.05 mg/mL de EST desde la primera hora. Estos resultados indican que el mecanismo de acción del EST sobre *C. albicans* podría ser muy parecido al descrito para las bacterias.

Finalmente se sabe que el 4'-6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI) forma complejos fluorescentes con la doble cadena de ADN tiñendo el núcleo. En nuestros experimentos se observó que a mayor concentración de EST había un incremento aparente en el tamaño del núcleo siendo más intensa la fluorescencia en el 70% de las levaduras a partir de 0.05 mg/ml de EST; además se observó tinción a nivel de citoplasma. Por lo anterior, se puede pensar en que posiblemente el EST daña la membrana nuclear permitiendo incluso la salida del material genético hacia el citoplasma. Para poder estudiar más a fondo éste y los daños estructurales mencionados con anterioridad se emplearán técnicas de microscopía electrónica que serán motivo de otro trabajo.

En este estudio se demostró que el EST inhibe la formación del tubo germinativo y de blastoconidias en *C. albicans*. En estudios previos se ha demostrado que genes tales como GlcNAc (N-acetilglucosamina), HXK1 (quinasas) y la expresión de algunas proteínas (Cdc42/Cdc24) están relacionados con la formación de la hifa en *C. albicans* (Care 1999), además que la inhibición en la formación del tubo germinativo se debe a que existe una desregulación del ciclo biológico de la levadura que presumiblemente queda arrestada en la fase G1 (G. Black 2002), por lo cual tampoco hay formación de

blastoconidias. Otros de los genes que se sabe que tienen gran importancia, tanto en la formación de las hifas como en la formación de blastoconidias, son los genes relacionados con la cascada de señalización de las MAP cinasas, por lo que todos ellos son buenos candidatos para analizar sus niveles de expresión en levaduras tratadas con EST.

Se demostró también que hay un daño a nivel de la membrana celular por lo que los genes implicados en el mantenimiento de la misma (GSH1, ERG26, ERG16, ERG11, ERG 13, que se sabe que son afectados en diferente medida por los antifúngicos actuales) también resultan buenos candidatos para continuar con el estudio (Liu T.T, 2005).

Los resultados obtenidos en este trabajo son la base para profundizar en el mecanismo de acción molecular del EST sobre la levadura *Candida albicans*.

15. CONCLUSIONES

- El EST es capaz de inhibir el crecimiento del 94.60% de cepas de *C. albicans* provenientes de diversas partes del cuerpo humano así como de la cepa de referencia *C. albicans*.
- El EST presenta una CMI de 0.2 mg/mL de extracto comercial empleado frente a cepas de *C. albicans* de diferentes orígenes, incluyendo la cepa de referencia.
- El EST tiene actividad fungistática a concentraciones menores a 0.2 mg/ml de extracto, a esta concentración o por encima de ella presenta un efecto fungicida de forma inmediata.
- A una concentración de 0.05 mg/mL de EST existe inhibición de la formación del tubo germinativo.
- El EST causa daños en la estructura de *C. albicans* como: disminución de tamaño, alteraciones morfológicas, fragmentación celular y daño en membrana en concentraciones de 0.05 mg/mL – 0.3 mg/mL.

16. ANEXO

TINCIÓN DE GRAM

CRISTAL VIOLETA AL 2%

Cristal violeta	2.0 g.	
Etanol de 95°	20.0 ml	Preparación: Disolver el
Oxalato de Amonio	0.8 g.	cristal violeta en etanol y
Agua destilada	80.0 ml	el oxalato en agua.
		Mezclar las dos
		soluciones.

SOLUCIÓN DE LUGOL.

Yoduro de potasio	2.0 g.	
Yodo metálico	1.0 g.	Preparación: Disolver el
Agua destilada	100.0 ml	yoduro en 20 ml. de agua,
		disolver el yodo, agregar
		el resto de agua.

SAFRANINA.

Safranina	0.5 g.
Agua destilada	100.0 ml

ALCOHOL-ÁCIDO

Ácido clorhídrico concentrado	30 ml
-------------------------------	-------

Etanol de 95°	970 ml
---------------	--------

SOLUCIÓN SALINA FISIOLÓGICA SSF

NaCl	8.5 g.
Agua destilada	1000 ml

YPD (DIBICO)

Extracto de levadura	1 g.
Peptona	2 g.
Dextrosa	2 g.
Agar	1.5 g.
Agua destilada	100 ml

SDA (DIBICO)

SDA	65 g.
Agua destilada	1000 ml

16. REFERENCIAS

A. Benito, et. al. (1999). Variation in Resistance of Natural Isolates of *Escherichia coli* O157 to High Hydrostatic Pressure, Mild Heat, and Other Stresses. *Appl Environ Microbiol.* **65**(4): 1564-1569.

Alcamo E. (2003). *Microbes and society an introduction to microbiology*. Jones and Bartlett Publishers. U.S.A. pp. 124-129, 202, 50, 51.

Arenas Guzmán Roberto. (2003). *Micología Médica Ilustrada*. Mc Graw Hill, 2ª Ed. Mé. pp. 189-211.

Arikan S. M., Lozano-Chiu V., Paetznick, S. Nangia J. H. Rex. (1999). Microdilution susceptibility testing of amphotericin B, itraconazole, and voriconazole against clinical isolates of *Aspergillus* and *Fusarium* species. *J Clin Microbiol.* **37**:3946-3951.

Barodka VM. (2006). Antimicrobial effects of liquid anesthetic isoflurane on *Candida albicans* *J Transl Med.* **4**: 46.

Barodka VM. (2006). Antimicrobial effects of liquid anesthetic isoflurane on *Candida albicans* *J Transl Med.***4**:46.

Bassilana M., Hopkins J., and Arkowitz R. (2005). Regulation of the Cdc42/Cdc24 GTPase module during *Candida albicans* Hyphal Growth. *Eukaryotic Cell* **4**(3):588-603.

Bauman W. R. (2004). *Microbiology*. Pearson Benjamin Cummings. San Francisco. U.S.A. pp. 4,624- 628, 633- 635-298, 301, 303.

Bentivegna SS, Whitney KM. (2002). Subchronic 3-month oral toxicity study of grape seed and grape skin extracts. *Food Chem Toxicol.* **40**(12):1731-43.

Biggiogera Marco and Francine Flach Biggiogera. (1989). Ethidium Bromide- and Propidium Iodide-PTA Staining of Nucleic Acids at the Electron Microscopic Level'. *The J of Histochemistry and Cytochemistry* Vol. **37**, No. 7, pp. 1161-1166.

Brozowski T., Konturek P., and Drozdowicz D. (2005). Grapefruit_seed extract attenuates ethanol- and stress-induced gastric lesions via activation of prostaglandin, nitric oxide and sensory nerve pathways. *World J. Gastroenterology.* **11**(41):6450-6458.

C. Ignacio y Thai D. (2005). Comparative analysis of antifungal activity of natural remedies versus miconazole nitrate salt against *Candida albicans*. *Biological Sciences Department College of Science and Mathematics California Polytechnic State University San Luis Obispo.* pp. 9-7.

Calderone R. (2002). *Candida* and candidosis. ASM Press Washington, D.C. U.S.A. pp. 3-10, 15-25, 67-82, 87-92, 145-155,159-171.

Caloridomingues M. A. and Fonseca H. (1995). Laboratory evaluation of chemical control of aflatoxin production in unshelled peanuts (*Arachis hypogalea* L.), *Food Addit. Contam.* **12**:347–350.

Care R.S., and Trevethick J. (1999). The MET3 promoter: a new tool for *Candida albicans* molecular genetics. *Molecular Microbiology* **39**(4):792-798.

Carlile J., Watkinson S., and Gooday G. (2001). *The fungi*. Second Edition, Academic press. California U.S.A. pp. 87- 92, 95-114, 153, 175-180, 432-440.

Casas Rincón, g. (1989): *micología general*. Caracas. Universidad central de venezuela. ediciones de la biblioteca, pp. 243-247.

Chattaway F.W., Holmes M.R., Barlow A.J. (1968): Cell wall composition of the mycelial and blastospore forms of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol.* **51**: 367-376.

C h e n H , e t . a l .
(2 0 0 7) . E a r t h w o r m
f i b r i n o l y t i c e n z y m e :
a n t i - t u m o r a c t i v i t y o n
h u m a n h e p a t o m a c e l l s

i n v i t r o a n d i n v i v o
C l i n M e d J ; 1 2 0 (1 0)
8 9 8 - 9 0 4 .

Coote PJ. (1998). Inhibitory action of a truncated derivative of the amphibian skin peptide dermaseptin s3 on *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother.* Sep;**42**(9):2160-70.

Corliss D , White. W. (1981) Fluorescence of Yeast Vitally Stained with Ethidium Bromide and Propidium Iodide. *The J of Histochemistry and Cytochemistry* Vol. 29. No. I,pp. 45-48.

Cossart P. Boquet P., Normark S., and Rappuoli R. (2005). *Cellular Microbiology*. 2nd ed. ASM Press. Washington. D.C. USA. pp. 31, 101-103, 87-95.

Cvetnic Z, Vladimir-Knezevic S. (2004). Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extract. *Acta Pharm.* **54**(3):243-5.

De Backer MD, Ilyina T, Ma XJ, Vandoninck S, Luyten WH, Vanden Bossche H.(2001). Genomic profiling of the response of *Candida albicans* to itraconazole treatment using a DNA microarray. *Antimicrob Agents Chemother.* Jun;**45**(6):1660-70.

Dembinski A. (2004). Extract of grapefruit-seed reduces acute pancreatitis induced by ischemia/reperfusion in rats: possible implication of tissue antioxidants. *J Physiol Pharmacol.* **55**(4):811-21.

Eleraky N.Z. (2002). Virucidal efficacy of four new disinfectants. *J Am Anim Hosp Assoc.* **38**(3):231-4.

Fernández-Torres, B., A. J. Carrillo, E. Martín, A. Del Palacio, M. K. Moore, A. Valverde, M. Serrano, J. Guarro. (2001). In vitro activities of 10 antifungal drugs against 508 dermatophyte strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2524-2528.

Fica C.A. (2004). Tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas. III parte: Anfotericina B, aspectos farmacoeconómicos y decisiones terapéuticas. *Rev. Chil. Infect.* **21**(4):317-326.

G. Black Jacquelyn. (2002). *Microbiology principles and explorations*. 5th ed. John Wiley Sons, Inc. U.S.A. pp. 534, 5326, 554, 354, 355, 360, 348, 300.

Galvá Beatriz y Mariscal Francisco. (2006). Epidemiología de la candidemia en CI. *Rev. Iberoam Micol* **23**:12-15.

Ganzera M, Aberham A., and Stuppner H. (2006). Development and validation of an HPLC/UV/MS method for simultaneous determination of 18 preservatives in grapefruit seed extract. *J. Agricultural Food Chem.* **54**:3768-3772.

García M.P. y García A.R. (2004). Identificación de levaduras de interés en el medio de cultivo CHRoMagar *Candida*. *Revista Iberoamericana de Micología* **17**:54-67.

Ghannoum, M. A., L. B. Rice. (1999). Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanism with bacterial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**:501-517.

Giamperi L, Fraternali D, Bucchini A, Ricci D. (2004). Antioxidant activity of Citrus paradisi seeds glyceric extract. *Fitoterapia*. Mar: **75**(2):221-4.

Gorinstein S. (2005). Changes in plasma lipid and antioxidant activity in rats as a result of naringin and red grapefruit supplementation. *J Agric Food Chem.* 20;**53**(8):3223-8.

Hawser S, Islam K. (1999). Spectrophotometric determination of the morphogenetic transformation by synchronous *Candida albicans*: effects of antifungal agents *J Antimicrob Chemother* **38**, 67-73.

Hazan I., and Sepulveda-Becerra M. (2002). Hyphal Elongation is regulated independently of cell cycle in *Candida albicans*. *Molecular Biology of the Cell.* **13**: 134-145.

He K. (1998). Inactivation of cytochrome P450 3A4 by bergamottin, a component of grapefruit juice. *Chem Res Toxicol.* **11**(4):252-9.

Heggens J.P. and Cottingham J.B.S. (2002). The effectiveness of processed grapefruit-seed extract as an antibacterial agent; II. Mechanism of action and *in vitro* toxicity. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* **8**(3):333-340.

Heggens JP. (2002). The effectiveness of processed grapefruit-seed extract as an antibacterial agent: II. Mechanism of action and *in vitro* toxicity. *J Altern Complement Med.* **8**(4):521.

<http://nutriteam.com>).

Ionescu G., Kiehl F.R., Wichmann-Kunz Ch., Bäuml Williams L. and Levine S. (1990). Oral citrus seed extract in atopic eczema; *in vitro* and *in vivo* studies on intestinal microflora, *J. Orth. Med.* **5**:155–157.

Iranzo M. (2003). Isolation and characterization of an *avirulent Candida albicans* yeast monomorphic mutant *Medical Mycology*, **41** (1), pp. 43-52(10).

J. U. Ha, Y. M. Kim and D. S. Lee. (2001). Multilayered antimicrobial polyethylene films applied to the packing of ground beef, *Packag. Technol. Sci.* **14**:55–62.

Kesavan C. (2005). 5-Fluorouracil Altered Morphology and Inhibited Growth of *Candida albicans* *J Clin Microbiol.* December; **43**(12): 6215–6216.

Kesavan C. and Raghunathan M. (2005). Morphological and growth altering effects of cistiplatin in *Candida albicans* using fluorescence microscopy. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* **4**:7. Bio Med Central pp. 1-4.

Krajewska K.E., Lukaszuk C, and Niczyporuk W. (2001). Effects of 33% grapefruit extract on the growth of the yeast like fungi, Dermatophytes and Moulds. *Wiad Parasytol* **47**(4):845-849.

Lepak A, Nett J., Lincoln L., Marchillo K, Andes D. (2006). Time course of microbiologic outcome and gene expression in *Candida albicans* during and following *in vitro* and *in vivo* exposure to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* Apr;**50**(4):1311-9.

Liu TT, Lee RE, Barker KS, Lee RE, Wei L, Homayouni R, Rogers PD. (2005). Genome-wide expression profiling of the response to azole, polyene, echinocandin, and pyrimidine antifungal agents in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* Jun;**49**(6):2226-36.

López Martínez Rubén, Mendez Tovar Luis Javier. (2004). *Micología Médica Ilustrada. Procedimientos para el diagnóstico del laboratorio.* Trillas. 2ª Ed. México.

Lopez L., Romero J. and Ureta F. (2001). Disinfection treatment for lettuces (*Lactuca sativa*) and strawberries (*Fragaria chiloensis*), *Arch. Latinoam. Nutr.* **51**:376–381.

López Martínez. (2004). *Micología Médica Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio, con algunas modificaciones.*

López V. Luis, Romero R. José y Ureta V. Fernando. (2002). Acción germicida *in vitro* de productos desinfectantes de uso en la industria de alimentos. *alan*, mar. vol.**52**, no.1, pp.74-76. issn 0004-0622.

Macpherson N, (2005). Plasma membrane H⁺ and K⁺ transporters are involved in the weak-acid preservative response of disparate food spoilage yeasts. *Microbiology*. Jun;**151**(Pt 6):1995-2003.

Mandigan T., Martinko M., and Brock J. (2006). *Biology of microorganisms*. 11th Eleven Ed. Pearson Prentice Hall. Washington D.C. USA. pp. 469, 692, 702, 710.

Oyelami OA . (2005). The effectiveness of grapefruit (*Citrus paradisi*) seeds in treating urinary tract infections. *J Altern Complement Med*. **11**(2):369-71.

Perry Jerome, Stanley J.T., and Lory S. (2002). *Microbial life*. Sinauer Associated Publisher. Massachusetts. USA. pp. 779, 613, 623, 688.

Phillips AJ, et. al. (2003). Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 25;**100**(24):14327-32.

Pontón J. (2002). Diagnóstico microbiológico de las micosis. *Revista Iberoamericana de Micología* **19**:25-29.

Ramos Amador José Tomas y Jesús Ruiz Contreras. Candidiasis. Infectologia. No. 6.

Ranzani M. R., and Fonesca H., (1995). Mycological evaluation of chemically-treated unshelled peanuts, *Food Addit. Contam.* **12**:343–346.

Reagor L. (2002). The effectiveness of processed grapefruit-seed extract as an antibacterial agent: I. An *in vitro* agar assay. *J Altern Complement Med.* **8**(3):325-32.

Ribeiro GF, et.al.(2006). Characterization of DNA damage in yeast apoptosis induced by hydrogen peroxide, acetic acid, and hyperosmotic shock. *Mol Biol Cell.* Oct;**17**(10):4584-91.

Ribeiro MA, Paula CR. (2007). Up-regulation of ERG11 gene among fluconazole-resistant *Candida albicans* generated *in vitro*: is there any clinical implication? *Diagn Microbiol Infect Dis.* Jan;**57**(1):71-5.

Rogers PD, Barker KS. (2002). Evaluation of differential gene expression in fluconazole-susceptible and -resistant isolates of *Candida albicans* by cDNA microarray analysis. *Antimicrob Agents Chemother.* Nov;**46**(11):3412-7.

Samson, j. (1990): candidosis bucales: epidemiologie, diagnostic et traitement. *rev mens suisse odontostomatol.* **100**: 548-559.

Sanchez-Vargas LO. (2005). Point prevalence, microbiology and antifungal susceptibility patterns of oral *Candida* isolates colonizing or infecting Mexican HIV/AIDS patients and healthy persons. *Rev Iberoam Micol.* Jun;**22**(2):83-92.

Sanglard D, Ischer F, Parkinson T, Falconer D, Bille J. (2003). *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother.* Aug;**47**(8):2404-12.

Sawaya AC, et. al. (2002), Microdilution. *Lett Appl Microbiol* **35**(3):203-7.

Schmalreck AF, et. Al. (1996). Susceptibility testing of yeasts against fluconazole: Comparison of the Etest method with microdilution and agar dilution *Mycoses.* **39** Suppl 2:31-8.

Scorzoni L, et.al. (2007). The use of standard methodology for determination of antifungal Activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology* **38**:391-397.

Shams-Ghahfarokhi M. (2006). *In vitro* antifungal activities of *Allium cepa*, *Allium sativum* and ketoconazole against some pathogenic yeasts and dermatophytes *Fitoterapia* **77**(4), 321-323.

Stadler N. (2001). Mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* PMA1 H⁺-ATPase inactivation by Fe²⁺, H₂O₂ and Fenton reagents. *Free Radic Res. Dec*;**35**(6):643-53.

Stutervant J. and Calderone R. (1997). *Candida albicans* adhesions biochemical aspects and virulence. *Rev. Iberoamericana de Micología* **14**:90-97.

Takeoka G., Land D., and Y. Wong R. (2001). Identification of benzethonium chloride in commercial grapefruit seed extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**: 3316-3320.

Takeoka G., Land D., and Y. Wong R. (2005). Identification of Benzalkonium Chloride in Commercial Grapefruit Seed Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53**: 7630-7636.

Therese KL, et.al. (2006). *In-vitro* susceptibility testing by agar dilution method to determine the minimum inhibitory concentrations of amphotericin B, fluconazole and ketoconazole against ocular fungal isolates. *Indian Journal of Medical Microbiology* **24**(4):273-9.

Tirillini B. (2000). Grapefruit: the last decade acquisitions, *Fitoterapia* **71**:29-37.

Wilfred Niels Arnold. (2000). *Yeast Cell Envelopes: Biochemistry, and Biophysics Ultrastructure*. Vol. I, II. CRC Pres, USA, Florida. pp. 65-111.

Woedtke T., Schluter, Pflugel P.B., Lindequist V., and Julich Wd. (1999). Aspects of the antimicrobial efficacy of grapefruit seed extract and its relation to preservative substances contained. *Pharmazie* **54**(6):452-456.