



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

EFFECTO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE PROPOLEO SOBRE
EL CRECIMIENTO Y EL DAÑO ESTRUCTURAL DE
Candida albicans.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
CAROL MARTINEZ URBAN

ASESORES:

Dra. María Leonor Quintero Mora

Dr. Carlos Gerardo García Tovar

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO DE MEX. 2008



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.

DEDICADA

A MIS PADRES POR DARME LA VIDA

A mi papá donde quiera que se encuentre, porque con su ejemplo me enseñó a luchar por mis metas y que la responsabilidad es el precio del éxito.

A mi mamá por su compañía y cuidado.

A mis hermanos Edgar, Jero, Juan y Corina

A Nancy mi hermana y amiga por preocuparse por mí, por cuidarme, por escucharme, por darme consejos, por brindarme aliento cuando pensé que ya no podía más y por estar conmigo en las buenas y en las malas.

A Castulo por permitirme entrar en su casa y apoyarme.

A Alfredo y Alejandro por compartir su casa y su tiempo conmigo.

A mis pequeñas Jennyfer y Angie, a mis pequeños Jesús, Axel, Ulises por alegrarme la vida.

GRACIAS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme ser parte de la máxima casa de estudios de Latinoamérica.

A la Dra. M. Leonor Quintero Mora por su paciencia, por compartir sus conocimientos conmigo y por su amistad.

A Angeles Marín por su ayuda en el laboratorio y por su amistad.

Al Dr. C. Gerardo García Tovar jefe del laboratorio de Investigación en Morfología Veterinaria y Biología Celular ubicado en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán donde hice la parte experimental de mi trabajo.

A los profesores: Crisóforo Mercado, Germán Garrido e Ignacio Soto que siempre me brindaron su ayuda en el laboratorio.

A Liborio Carrillo por proporcionarme el propóleo.

.

A Patricia López por creer en mí y por todo su apoyo brindado.

A Adriana, Beatriz, Celeste y Silvia gracias por brindarme su amistad, un hombro en que apoyarme y por sus palabras siempre de aliento que me dieron fuerzas para seguir y no caer a pesar de las adversidades. Por compartir momentos especiales.

A Ramón y Salvador con quienes pase momentos alegres que me hicieron reír y disfrutar de un partido de futbol o a tener una clase de Física divertida. Que me enseñaron que entre amigos no queda espacio para los complejos y que lo que realmente importa son los sentimientos.

Gracias a todos mis amigos que me enseñaron el valor real de la amistad.

A X porque si.

En lo más crudo del invierno aprendí al fin que había en mí un invencible verano.
Albert Camus

*Aunque sientas el cansancio,
Aunque el triunfo te abandone,
Aunque el error te lastime,
Aunque un negocio se quiebre,
Aunque una traición te hiera,
Aunque el dolor queme tus ojos,
Aunque una ilusión se apague,
Aunque ignoren tus esfuerzos,
Aunque la ingratitud sea la paga,
Aunque la incomprensión corte tu risa,
Aunque todo parezca nada...
¡Vuelve a empezar!*

Anónimo

ÍNDICE

	pág
I. ÍNDICE GENERAL	1
II. ÍNDICE DE FIGURAS	3
III. ÍNDICE DE TABLAS	4
IV. LISTA DE ABREVIATURAS	5
V. RESUMEN	6
VI. INTRODUCCIÓN	8
1. CARACTERÍSTICAS DE <i>Candida albicans</i> .	8
1.1 Enfermedades producidas por <i>C. albicans</i>	16
1.1.1 Candidiasis cutánea y mucosa	19
1.1.2 Candidiasis sistémica	20
1.1.3 Candidiasis crónica mucocutánea	20
1.2 Pruebas diagnósticas de laboratorio	21
1.2.1 Examen directo	21
1.2.2 Frotis	21
1.2.3 Cultivo	21
1.2.4 Serología	22
1.3 Pruebas especiales para la identificación de <i>C. albicans</i>	22
1.3.1 Producción de clamiconidios	22
1.3.2 Filamentación en suero	23
1.3.3 Chromoagar <i>Candida</i>	23
1.3.4 Auxonograma	23
1.3.5 Zimograma	24
1.4 Datos epidemiológicos	24
2. GENES QUE SE RELACIONAN CON LA PATOGENICIDAD Y LA MORFOLOGÍA DE <i>C. albicans</i> .	26
3. GENERALIDADES DE ANTIMICÓTICOS.	28
3.1 Concepto	28
3.2 Clasificación	28
3.3 Relación estructura-actividad	30
3.4 Mecanismo de acción	31
4. PRODUCTOS NATURALES CON ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA	34
5. PROPÓLEO	36
5.1 Origen botánico y composición	38
5.2 Propiedades y actividad biológica	40
5.3 Actividad antifúngica	42
5.4 Mecanismo de acción del propóleo	43
	33

VII. JUSTIFICACIÓN	46
VIII. HIPÓTESIS	47
IX. OBJETIVO GENERAL	47
X. OBJETIVOS PARTICULARES	47
XI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	48
XII. MATERIALES Y MÉTODOS	49
1. Cepas	49
2. Obtención el extracto etanólico de propóleo	49
3. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	49
4. Cinética de crecimiento	50
5. Determinación del efecto fungicida	50
6. Tubo germinativo	51
7. Tinciones	51
7.1 Tinción de Gram	52
7.2 Tinción con azul de toluidina	52
7.3 Tinción con bromuro de etidio	52
7.4 Tinción con DAPI	52
XIII. RESULTADOS	53
1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de la cepa de referencia y aislados clínicos	53
2. Cinética de crecimiento	54
3. Filamentación en suero	56
4. Tinciones	58
XIV. DISCUSIÓN	64
XV. CONCLUSIONES	71
ANEXO	72
BIBLIOGRAFÍA	73

II. ÍNDICE DE FIGURAS

	pág
Figura 1. Diagrama esquemático de la pared celular de <i>Candida albicans</i> . (Calderone y Braun 1991).	13
Figura 2. Diagrama esquemático la estructura de la pared celular de <i>C. albicans</i> . (Masuoka 2004).	14
Figura 3. Representación de las manoproteínas de la pared celular de <i>C. albicans</i> . (Calderone y Braun 1991).	15
Figura 4. Estructura de fármacos antifúngicos (Flórez 1997).	30
Figura 5. Mecanismos de acción de los diferentes antifúngicos (Bidart 2004).	34
Figura 6. <i>Apis mellifera</i> .	37
Figura 7. Aspecto físico del propóleo.	37
Figura 8. Árboles que sirven como fuente de sustancias resinosas para la producción del propóleo: Eucalipto, pino y ciprés.	39
Figura 9. Determinación de la CMI de la cepa de referencia ATCC 10231 por medio de la técnica de dilución en agar.	53
Figura 10. Efecto del EEP sobre la curva de crecimiento de <i>C. albicans</i> ATCC 10231.	54
Figura 11. Determinación del efecto fungicida del EEP sobre la cepa de <i>C. albicans</i> ATCC 10231.	55
Figura 12. Efecto del EEP en la formación de tubo germ inativo de la cepa ATCC 10231 de <i>C. albicans</i> .	57
Figura 13. Porcentaje de inhibición de formación de tubo germ inativo en la cepa ATCC 10231 de <i>C. albicans</i> .	57
Figura 14. Efecto del EEP sobre la morfología de <i>C. albicans</i> evaluado con la Tinción de Gram.	59
Figura 15. Porcentaje de daño morfológico causado por el EEP en la cepa ATCC 10231 de <i>C. albicans</i> .	59
Figura 16. Efecto del EEP sobre la morfología de <i>C. albicans</i> evaluado con la tinción con azul de toluidina.	60
Figura 17. Efecto del EEP sobre la integridad de la membrana de <i>C. albicans</i> evaluado con la tinción con bromuro de etidio.	61

Figura 18. Porcentaje de células dañadas teñidas con bromuro de etidio.	62
Figura 19. Efecto del EEP en el núcleo de <i>C. albicans</i> evaluado con la tinción con DAPI.	63
Figura 20. Porcentaje de levaduras con incremento en el tamaño del núcleo evaluado con la tinción de DAPI.	63

III. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los antifúngicos por su estructura (Gregorí 2005).	pág 29
Tabla 2. Clasificación de los antifúngicos por su sitio de acción en el hongo (Gregorí 2005).	29
Tabla 3. Compuestos responsables de la actividad biológica de diferentes tipos de propóleo (Bankova 2005).	40

IV. LISTA DE ABREVIATURAS

A: Absorbancia

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

DAPI: 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato

EEP: Extracto Etanólico de Propóleo

MET: Microscopía Electrónica de Transmisión

MP: Membrana Plasmática

SDA: Agar Dextrosa Sabouraud

YPD: Extracto de levadura-peptone-dextrosa (Yeast Extract-Peptone-Dextrose)

V. RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó el efecto del EEP (extracto etanólico de propóleo), procedente de los apiarios de la FESC, sobre el crecimiento y el daño estructural de *C. albicans*.

Las pruebas se realizaron con una cepa tipo de *C. albicans* ATCC 10231, con la que se obtuvo una CMI (concentración mínima inhibitoria) de 0.6 mg/mL. Se evaluó el efecto del EEP sobre la curva de crecimiento en la que se observó una inhibición del crecimiento en la concentración de 0.8mg/mL manteniéndose constante hasta la 24 h. En las concentraciones de 0.3mg/mL (menor a la CMI) y 0.6 mg/mL (CMI) si hubo crecimiento de forma exponencial en la curva, pero siempre por debajo del control. El efecto fue fungistático a concentraciones iguales y por debajo de la CMI y fue fungicida en la concentración de 0.8 a partir de la 5ª h.

Se determinó la inhibición de la formación de hifas encontrándose que en las concentraciones 0.6mg/mL y 0.8mg/mL es más notable el efecto del EEP, observándose una inhibición de la formación del tubo germinativo de 97% y 99% respectivamente.

Se realizaron diversas tinciones para evaluar el daño estructural que el EEP les ocasiona a las levaduras. Con las tinciones de Gram y con azul de toluidina, se observaron alteraciones en su morfología y tamaño además de que la tinción fue parcial, lo que sugiere que hay un daño a nivel de pared celular.

La tinción con bromuro de etidio pone en evidencia también un daño a nivel de membrana celular y con DAPI parece ser que este daño se extiende hasta la membrana nuclear debido a que se encuentra fluorescencia también a nivel citoplasmático.

Con estos resultados se sientan las bases para estudios posteriores a nivel molecular encaminados a estudiar el mecanismo de acción del propóleo sobre el crecimiento y el daño que provoca en *Candida albicans*.

VI. INTRODUCCIÓN

El ser humano ha tenido relación con los hongos desde épocas remotas de la historia, beneficiándose de ellos en unos casos y en otros sufriendo las consecuencias de su infección. El conocimiento de los hongos y de su acción patógena precede al nacimiento de la bacteriología. La micología médica da comienzo con Robert Remark en 1837; sin embargo, tuvieron mayor importancia los trabajos de David Gruby, que entre 1841 y 1844 estudió el *favus* y las tiñas microspóricas y tricofíticas; en 1842 F.G. Berg estudió la levadura *Candida albicans*. De esta forma, la micología se convirtió en la primera ciencia microbiológica, varios años antes del descubrimiento de la primera bacteria. La micología médica fue casi completamente olvidada hasta la última década del siglo XIX y comienzos del XX, volviendo a recuperar su protagonismo con Raymond Sabouraud, que estudió los hongos patógenos causales de las tiñas y logró su cultivo *in vitro* [66].

1. CARACTERÍSTICAS DE *Candida albicans*

Candida albicans ha recibido distintos nombres a lo largo de los años. Robin la denominó en 1853 *Oidium albicans*, esta especie estuvo incluida en 100 sinónimos y pasada a través de 18 géneros. De estos géneros, sólo 2 han prevalecido por largo tiempo para referirse a esta especie: el Género *Monilia*, en el cual estaba incluida la especie *Monilia candida* (Plaut, 1885), luego *Monilia albicans* (Zopt, 1890) que dominó la literatura hasta el trabajo de C.M. Berkhout, quien en 1923 propone el Género *Candida* y la especie *C. albicans*, aceptado por el 3^{er} Congreso Internacional de Microbiología en Nueva York en 1939. Desde entonces se pasaron al Género *Candida* todas aquellas levaduras que no encajaban en el Género *Monilia*, por lo cual todas las afecciones producidas por *Candida* se conocen con el nombre de candidiasis [83].

Su clasificación taxonómica es la siguiente [83]:

Reino: Fungi

Filo: *Ascomycota*

Clase: *Saccharomycetes*

Familia: *Saccharomycetaceae*

Género: *Candida*

Especie: *albicans*

Las levaduras o blastoconidias son microorganismos eucarióticos, las cuales se reproducen asexualmente por un proceso específico de división celular conocido como gemación. 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 [111]. También se ha descrito la forma sexual. A partir de la secuenciación del genoma de *Candida albicans*, se descubrieron muchos genes homólogos a los de *S. cerevisiae*, entre ellos los genes MAT, y se les denominó MTL (mating-type-like). Esta levadura oportunista, de gran importancia médica, fue considerada hasta entonces como asexual, pero posteriormente se describieron cruzamientos *in vitro* [67] en un hospedador mamífero [35]. Evidencias de la reproducción sexual en *C. albicans* las revisan más profundamente Bennet y Johnson [10]. Adicionalmente, se descubrió que muchos de los genes que en *S. cerevisiae* están involucrados en el proceso del apareamiento y reproducción, se encuentran en el genoma de *C. albicans* [112]. Estos incluyen los genes responsables de la respuesta a las feromonas y la producción y secreción de las mismas, además de otros involucrados en procesos meióticos. La posibilidad de reproducción sexual de *C. albicans* en la naturaleza fue estudiada por medio de análisis de haplotipos, encontrándose evidencia de recombinación [107]. Por lo tanto, la

reproducción sexual estaría ocurriendo de manera natural y sería suficiente para aumentar la variabilidad genética de estos patógenos, aunque la reproducción clonal es mucho más común. El caso de *C. albicans* es en particular interesante, ya que el tipo sexual está influenciado por factores ambientales: la expresión de los genes MTL depende de los niveles de expresión del gen Hbr1, que responde a la cantidad de hemoglobina del hospedero [45,84,109].

Al microscopio se observan como células redondeadas, ovals (3-6 μm de diámetro) o gemantes las cuales quedan unidas para formar pseudohifas cuando las yemas continúan su crecimiento, pero sin desprenderse, para generar cadenas de células alargadas, unidas en los tabiques entre las células. *Candida albicans* es dimórfica: además de las levaduras y de las pseudohifas, también pueden producir hifas verdaderas [34,86].

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 [83].

La apariencia microscópica de todas las especies de *Candida* es similar, pero en algunas ocasiones la forma de las blastoconidias puede variar de ovoide a elongada o esférica [79].

En medio agar dextrosa Sabouraud después de 24 hrs a 37° C o temperatura ambiente crecen formando colonias blancas, blandas, cremosas, lisas y tienen un olor característico. Las pseudohifas se manifiestan como crecimiento bajo la superficie del agar [34,86]. Las células de *C. albicans* crecidas en un medio deficiente de nutrientes

producen clamidiosporas grandes y esféricas. Las pseudohifas y las levaduras en gemación se tiñen como Gram positivas en exudados y tejidos [34,86,101].

Un tubo germinativo se define como una extensión filamentososa de una célula levaduriforme que mide alrededor de la mitad del ancho y tres a cuatro veces el largo de la célula. El tubo germinativo de *C. albicans* ha sido descrito como un tubo sin constricción en el punto de origen. Este puede formarse al inocular células de *C. albicans* en suero humano (inclusive si el suero ha sido congelado y almacenado), también en sueros de diversos animales como perro, bovino, conejo y caballo [66].

La fermentación y asimilación de hidratos de carbono permite su diferenciación de otras especies [15,28]. El metabolismo de *C. albicans* se ha relacionado de forma directa o indirecta con la patogenicidad, la morfología y con los efectos de los antimicóticos. El metabolismo de los carbohidratos juega un papel importante en la morfogénesis, en tanto que el metabolismo de aminoácidos y lípidos tiene poca importancia para el crecimiento de este microorganismo [7].

La composición química de *C. albicans* está representada por 20-40% de proteínas y 30-50% de polisacáridos, mientras que la proporción de lípidos es variable. La fracción lipídica va a depender de la cepa, edad del cultivo, condiciones ambientales y del origen de la fuente de carbono [16].

La pared celular de *C. albicans* está compuesta principalmente por los polisacáridos manano, glucano y quitina. Aunque la síntesis de los componentes de la pared celular está dinámicamente influenciada por las condiciones de crecimiento y por los estadios

metabólicos. El polisacárido manano 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 1,3- β -glucano y el 1,6- β -glucano constituyen entre 50% y 60% del peso seco de la pared celular. Componentes como proteínas, oscilan entre 6% y 25%, lípidos entre 1% y 7% y quitina entre 0.6% y 9% del peso de la pared celular. Junto con la quitina (cadenas de N-acetilglucosamina) que constituye entre el 0.6% y 3%, los glucanos forman un esqueleto rígido que da la forma y la fuerza física a la levadura. Componentes como las manoproteínas, oscilan entre 30% y 40%, determinan las propiedades de la superficie celular permitiéndole la adherencia a los tejidos del hospedero y modulando la respuesta inmune del mismo. Los lípidos constituyen entre el 1% y 7% del peso de la pared celular.

Las proporciones de los componentes que constituyen la pared celular de las levaduras y de los tubos germinativos es relativamente similar, aunque la cantidad de glucano alcali-soluble, alcali-insoluble y de quitina de *C. albicans* varía de acuerdo con la forma de crecimiento [16,49].

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 [83]. La mayoría de los investigadores han descrito cinco capas dentro de la pared

celular (fig. 1), 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 (del inglés proteins with internal repeats) se encuentran unidas por enlaces covalentes al 1,3- β -glucano (fig. 2). 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, a la quitina o simplemente se encuentran atrapadas en la matriz de glucano [16,70].

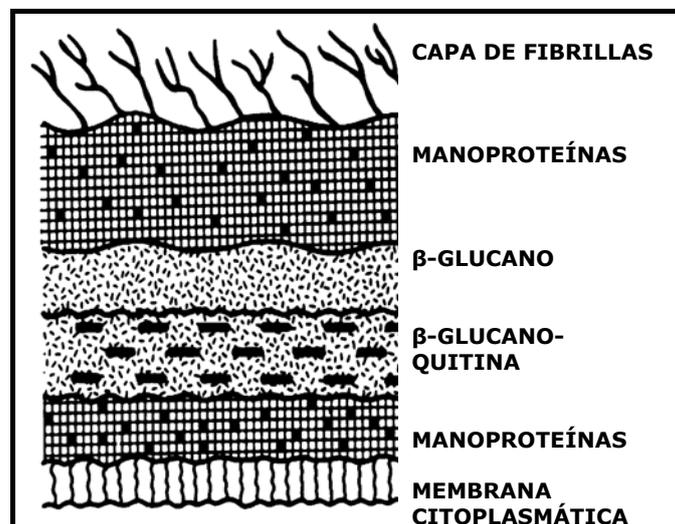


Figura 1. Diagrama esquemático de la pared celular de *C. albicans* Tomado de Calderone y Braun 1991[16].

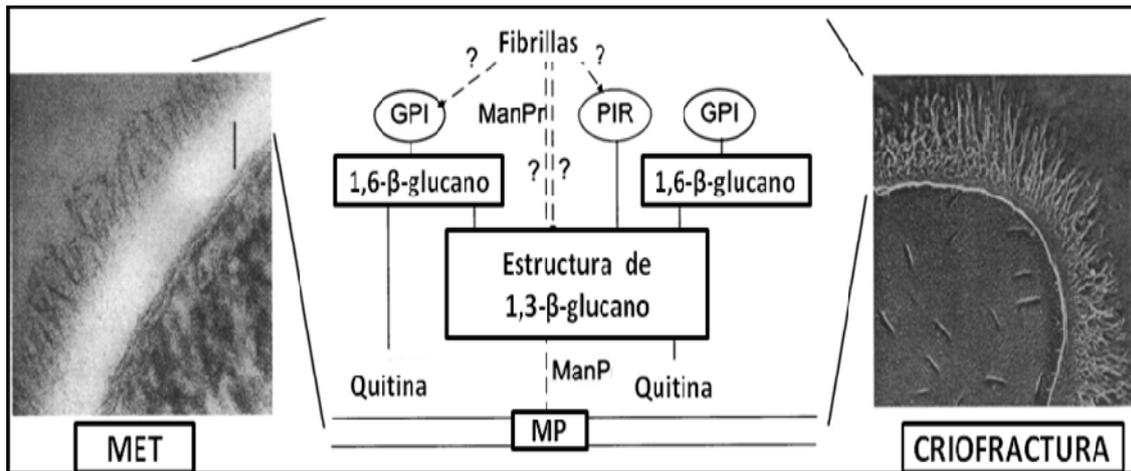


Figura 2. Diagrama esquemático la estructura de la pared celular de *C. albicans*. Tomado de Masuoka 2004 [70].

Los polisacáridos del tipo manano están localizados a lo largo de la pared celular y éstos predominan en las zonas de alta densidad electrónica. Las capas internas de la pared celular están compuestas mayoritariamente por quitina y glucano. Estos componentes le dan rigidez a la célula y son esenciales para la división celular. Están presentes tres tipos de glucano: 1) 1- β -glucano, 6 altamente ramificados, 2) 1- β -glucano, 3 altamente ramificados y 3) 1,6- β -1,3- β -glucano muy complejo mezclado con quitina. Las proporciones de ciertos tipos de glucano difieren entre las levaduras y los tubos germinativos de *C. albicans*. Durante las primeras etapas de la formación del tubo germinativo, se sintetiza casi exclusivamente 1- β -glucano. La quitina se encuentra en las células en forma de levadura, en las hifas y en los tubos germinativos, aunque la proporción es mayor en las hifas [83].

La capa externa de fibrillas de la pared celular de *C. albicans*, tanto en levaduras como en hifas está compuesta de manano o manoproteínas, aunque este componente también está localizado en varios lugares de la pared celular. Esta capa ha sido descrita en ocasiones como un revestimiento mucoso o capsular [83].

El manano ha sido identificado como el principal antígeno de la superficie celular de *C. albicans*. Estudios de adsorción y aglutinación agruparon a *C. albicans* en dos serotipos designados A y B [83].

Básicamente, la representación de las manoproteínas de la pared celular de *C. albicans* está constituida por residuos de manosa unidos entre sí por enlaces 1,6- α , los cuales se unen a la porción de proteína a través de dos residuos de N-acetil glucosamina (unidos entre sí por enlaces 1,4- β) y un residuo de asparagina y residuos de manosa que se unen a la proteína a través de residuos de los aminoácidos serina y treonina (fig.3) [83].

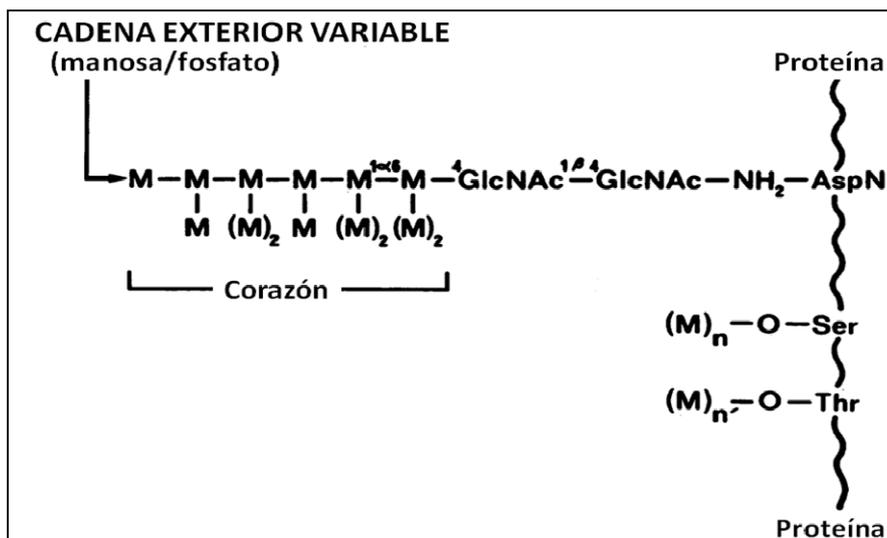


Figura 3. Representación de las manoproteínas de la pared celular de *C. albicans*. NAcGlc= N-Acetil D Glucosamina, M= Manosa, Ser= Serina, Thr= Treonina, Asn= Asparagina, (Tomado de Calderone y Braun, 1991) [16].

La membrana citoplasmática es una estructura que reviste gran importancia, ya que muchos antimicóticos actúan a nivel de la misma, además de contener las enzimas responsables de la síntesis de la pared celular que presenta una doble capa compuesta por lípidos. Además de los lípidos, la membrana citoplasmática está compuesta por grandes cantidades de proteínas y carbohidratos en menor proporción [83].

El citoplasma, al igual que 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 nucleolos, DNA, RNA y varios cromosomas [83].

La membrana celular de los humanos así como la de los hongos, desempeña una importante función en la división celular y en el metabolismo. Las complejas partículas lipídicas llamadas esterolatos, son aproximadamente el 25 % de la membrana celular. Sin embargo, el contenido de esterol de la célula fúngica y mamífera es diferente. En las células de los mamíferos el colesterol es el esterol que predomina y en las células fúngicas el primario es el ergosterol. La diferencia del contenido de esteroles ha sido explotada como blanco de acción en los medicamentos antifúngicos. Dentro de ellos se tiene a los polienos, azoles y alilaminas [39].

1.1 Enfermedades producidas por *C. albicans*.

El género *Candida* forma parte de la flora normal de la piel, de las mucosas, del tracto digestivo y genitourinario del ser humano, encontrándose así mismo en animales, plantas, objetos inanimados y en el medio [32]. La candidiasis es producida por varias especies de levaduras del género *Candida* como *albicans*, *parapsilosis*, *tropicalis* y *guilliermondii* [31], sin embargo, *C. albicans* es el agente etiológico de mayor importancia en el humano [59].

Los principales factores de virulencia asociados con *Candida* se relacionan con su dimorfismo o morfogénesis, secreción enzimática, cambio de fenotipo, expresión diferencial de genes en respuesta al ambiente, síntesis de adhesinas y su capacidad para formar biopelículas [20].

La morfogénesis se refiere a la transición entre las levaduras (unicelulares) y la forma de crecimiento filamentosa del microorganismo, que puede convertirse de forma reversible a células de levadura, con crecimiento de hifa o pseudohifa. La morfogénesis, por sí misma, está bajo múltiples controles y rutas de transducción de señales. La transición de levadura a hifa es un factor de virulencia que capacita a *Candida albicans* para invadir los tejidos. La hifa es la forma de adaptación para la adherencia y penetración de los epitelios y células endoteliales [20].

Las principales enzimas extracelulares relacionadas con la patogénesis de *Candida* son las proteasas, fosfolipasas y lipasas [20,93]. La secreción de la proteinasa ácida o carboxilproteinasa extracelular está asociada con la capacidad de adherirse y colonizar el tejido del huésped, habiéndose demostrado su papel en la invasión y destrucción del mismo [15, 20].

Otro factor de *Candida albicans* que se correlaciona con su patogenicidad son las adhesinas. Una adhesina se define como una biomolécula que promueve la adherencia de *C. albicans* a las células del huésped o a sus ligandos específicos. Se han descrito proteínas de *C. albicans* que se unen a varias proteínas de la matriz extracelular de las células de mamífero, como fibronectina, laminina, fibrinógeno y colágeno tipo I y IV [4,20].

La capacidad de *C. albicans* para formar biopelículas en las superficies es la razón por la que esta especie es más patógena. Esta capa la forman las células filamentosas en forma de hifa, rodeadas por una matriz extensiva exopolimérica. La formación de biopelículas de *C. albicans* se distingue por la adhesión inicial de las células de levadura, seguida por la germinación y formación de microcolonias, filamentación, desarrollo de monocapa, proliferación y maduración. Hay dos consecuencias importantes y con profundas implicaciones clínicas en la formación de biopelículas: el marcado aumento en la resistencia a los agentes antimicrobianos y la protección contra las defensas del hospedero [20,56].

La patogenicidad se debe a la interacción de determinantes epidemiológicos tanto del hospedero como del parásito [93] *C. albicans* puede producir enfermedades a nivel superficial y otras profundas. Las primeras se establecen a consecuencia de un incremento en la población local de *C. albicans* y del daño a la piel o el epitelio que permite la invasión local por la levadura y las pseudohifas. La candidiasis sistémica se presenta cuando *C. albicans* penetra al torrente sanguíneo y las defensas fagocíticas del hospedero son inadecuadas para contener su crecimiento y diseminación. Desde la circulación *C. albicans* puede infectar los riñones, fijarse a las prótesis valvulares cardíacas o producir infección candidiásica casi en cualquier parte (p. ej., artritis, meningitis, endoftalmitis). La histología local de las lesiones cutáneas o mucocutáneas se caracteriza por reacción inflamatoria que varía desde abscesos piógenos hasta granulomas crónicos. Las lesiones contienen abundantes yemas de levaduras y pseudohifas. Después de la administración de antimicrobianos por vía oral, con frecuencia tiene lugar un incremento de *Candida* en el intestino y puede penetrar a la circulación a través de la mucosa intestinal [34].

1.1.1 Candidiasis cutánea y mucosa.

El algodoncillo bucal puede presentarse sobre la lengua, labios, encías o paladar. Es una lesión en placas o confluyente de pseudomembranas blanquecinas compuestas de células epiteliales, levaduras y pseudohifas. El algodoncillo bucal se desarrolla en la mayoría de los pacientes con SIDA. Otros factores de riesgo incluyen el tratamiento con corticosteroides o antibióticos, el aumento de la glucosa y la inmunodeficiencia celular [34].

La invasión por levaduras en la mucosa vaginal produce vulvovaginitis, caracterizada por irritación, prurito y secreción vaginal. Este estado con frecuencia va precedido por factores como diabetes, embarazo, o por antibacterianos que alteran la flora microbiana, la acidez local o las secreciones [34].

Otras variantes de candidiasis cutáneas incluyen invasión de la piel. Esto ocurre cuando la piel se debilita por traumatismo, quemadura o maceración. La infección intertriginosa tiene lugar en las partes húmedas y tibias del cuerpo como la axila, la ingle y los pliegues interglúteo o inframamario, es más común en las personas obesas y en los diabéticos. Las partes infectadas se muestran rojas y húmedas, algunas presentan vesículas. La afección interdigital en dedos aparece después de inmersión prolongada y repetida en el agua; es más común en amas de casa, empleados de bares, cocineros, así como quienes manejan verduras y pescados. La invasión de las uñas y alrededor de la placa ungueal por *Candida* causa onicomycosis, una inflamación dolorosa y eritomatosa del pliegue ungueal, la cual con el tiempo, puede destruir la uña [34].

1.1.2 Candidiasis sistémica

Los catéteres permanentes, la intervención quirúrgica, el abuso de drogas intravenosas, en la aspiración o el daño a la piel o al aparato gastrointestinal pueden causar candidemia. En la mayoría de los pacientes con defensas normales las levaduras son eliminadas y la candidemia es transitoria. Sin embargo los pacientes con defensas fagocíticas comprometidas pueden desarrollar lesiones ocultas en cualquier parte, en especial riñón, piel /lesiones maculonodulares, ojos, corazón y meninges. La candidiasis sistémica casi siempre se correlaciona con la administración crónica de corticosteroides o de otros agentes inmunodepresores, con enfermedad hematológica como leucemia, linfoma y anemia aplásica o con enfermedad granulomatosa crónica, la endocarditis candidiásica suele acompañarse de depósito y crecimiento de levaduras y pseudohifas sobre una prótesis valvular. Las infecciones del riñón comúnmente son una manifestación sistémica, en tanto que las infecciones del aparato urinario en general se relacionan con una sonda de Foley, diabetes, embarazo o antibióticos antibacterianos [34].

1.1.3 Candidiasis crónica mucocutánea

Casi todas las variedades de esta enfermedad se inician en la infancia temprana, se relacionan con inmunodeficiencia celular y endocrinopatías, ocasionando como resultado infección superficial desfigurante de alguna o de todas partes de piel o mucosas [34].

1.2 Pruebas diagnósticas de laboratorio

1.2.1 Examen directo

Se recomienda para detectar levaduras, hifas y/o pseudohifas en muestras patológicas líquidas o semilíquidas, como orina, exudados, líquido cefalorraquídeo o esputo [61].

Se debe de proceder según sea el tipo de muestra. La orina y el líquido cefalorraquídeo se centrifugan y se toman unas gotas del sedimento. Las escamas se tratan con KOH al 15%. Al frasco con esputo se le agregan 10 o 15 mL de NaOH al 15% y calcoflúor blanco. Los exudados se procesan con solución fisiológica. Las células redondas u ovaladas con blastoconidios y en algunas ocasiones con pseudofilamentos o filamentos verdaderos son característicos de *Candida* [61].

1.2.2 Frotis

Con cualquiera de los especímenes se puede realizar un frotis y teñirse con la técnica de Gram o PAS con excepción de las escamas y uñas [61].

1.2.3 Cultivo

Los productos se siembran en SDA, tanto con cicloheximida y cloranfenicol, como sin antibióticos. Incubar de 25 a 37° C durante 5 días. En el medio de agar Biggy Nickerson, algunas especies de *Candida* reducen estas sales y crecen colonias color marrón brillante. Además de productos biológicos también pueden sembrarse catéteres, sondas o válvulas cardíacas, cortados en pequeños fragmentos [61].

1.2.4 Serología

Las pruebas disponibles en serología tienen especificidad o sensibilidad limitada. Los anticuerpos séricos y la inmunidad mediada por células son demostrables en la mayoría de las personas, como resultado de la exposición durante toda la vida a especies *Candida*. En la candidiasis sistémica se pueden elevar los títulos de anticuerpos contra varios antígenos de *Candida*, pero aún no existen criterios bien definidos para establecer el diagnóstico serológico. La detección de mananos circulantes derivados de la pared celular, utilizando una prueba de aglutinación en látex o un inmunoanálisis enzimático, es mucho más específica, aunque esta prueba carece de sensibilidad debido a que muchos pacientes resultan positivos sólo de manera transitoria o debido a que no desarrollan títulos de antígenos significativos o suficientemente detectables sino hasta etapas tardías de la enfermedad [34].

Las pruebas que se utilizan como diagnóstico inmunológico en casos de candidiasis granulomatosas y sistémicas son: doble inmunodifusión, contraelectroforesis, reacción de aglutinación de látex, ELISA e intradermoreacción [61].

1.3 Pruebas especiales para identificación de *Candida albicans*

1.3.1 Producción de clamidioconidios

Se siembra *C. albicans* por estría en medio de harina de maíz, en harina de arroz o en Clamidiospora agar. Incubar de 3 a 5 días a temperatura ambiente. *C. albicans* forma clamidioconidios únicos de pared gruesa, unidos a una célula.

1.3.2 Filamentación en suero

C. albicans forma más del 50% de tubos germinativos cuando se siembra una asada del cultivo en estudio en 0.5 mL de suero fresco. Incubar a 37° C de 2 a 4 horas [61].

1.3.3 CHROMagar *Candida*

Se trata de un medio comercial que contiene sustancias cromogénicas que confieren una coloración particular a las colonias de algunas especies de *Candida*. Para diferenciar a *C. albicans* que presentan un color verde claro [61].

1.3.4 Auxonograma (Asimilación de carbohidratos)

Se utilizan dos métodos, auxanograma en placa con papel filtro impregnado con los diferentes azúcares y auxanograma en tubo con soluciones de azúcares. El primer método se vierten 25 mL de medio base a 50° C, en una caja petri; a continuación se prepara una suspensión de levaduras proveniente de un cultivo puro de tres días de crecimiento a una concentración igual a la del tubo No. 1 de la escala de McFarland, se agrega 1 mL de la suspensión en la caja y esta se gira en círculo para distribuir homogéneamente el inóculo de levaduras: al solidificar el agar se depositan los discos impregnados con azúcares distribuidos a una distancia razonable. Incubar a 37° C por 3 días. Los halos de crecimiento alrededor del disco indican asimilación de azúcares [61].

En el método con tubo se agregan dos gotas de una suspensión de levaduras a cada uno de los tubos que contienen los azúcares, incubar a 37° C por 3 días. Ver turbidez de la fase líquida [61].

1.3.5 Zimograma (Fermentación de carbohidratos)

La propiedad fermentativa de cada especie de *Candida* son características y se demuestran por producción de ácido y gas. La acidez se demuestra por cambio de pH utilizando un indicador y cuando hay producción de gas, éste se acumula en la campana invertida de Durham. Los sistemas de zimograma se incuban a 37° C por siete días [61].

Además se pueden utilizar “kits” comerciales, como son: API-20 y API-C32 y el sistema automatizado Viteck, los cuales ponen de manifiesto la actividad de asimilación de los azúcares [61].

1.4 Datos epidemiológicos

Se realizó un estudio prospectivo en México para investigar la frecuencia de dermatofitos y *Candida* durante la década de los 90's hasta el 2002, en el que se encontró que en micosis relacionadas con pie de atleta el 22% era causado por *Candida*, con predominio en el sexo femenino. En las onicomicosis en diabético se encontraba en un 89%, en pacientes con SIDA en un 20% y en pacientes pediátricos con dermatitis atópica, en un 20% [3].

En el hospital siglo XXI de la ciudad de México, se observó que antes de 1998, el 66% de las especies correspondieron a *C. albicans* y 36% a no-*albicans*. Para febrero 2003 los porcentajes fueron 51% para no-*albicans* y 49% para *C. albicans*, mostrando un incremento significativo en la proporción de especies diferentes a *C. albicans* [94]. Sin embargo, el número de casos debido a *C. albicans* sigue siendo considerable.

En la década de los 80, la National Nosocomial Infections Surveillance System (NNIS) confirma el crecimiento significativo de la incidencia de infecciones producidas por hongos que pasan de 2.0 a 3.8 infecciones/1000 pacientes al final de dicha década. *Candida spp.* aparece en un 78% de las infecciones fúngicas nosocomiales. En este mismo periodo, en un estudio realizado en pacientes de 124 hospitales norteamericanos, se detecta un crecimiento significativo de la incidencia de las infecciones del torrente sanguíneo debidas principalmente a *Staphylococcus coagulasa* (-), *Staphylococcus aureus*, enterococo y *Candida spp.* Correspondiendo el mayor incremento a estafilococos coagulasa (-) seguido de *Candida spp.*, que pasa del 219% al 487%. En una serie de 294 episodios consecutivos de candidemia, obtenida entre los años 1989 y 2000, la tasa inicial fue de 0.21 por 10.000 pacientes/día y llegó a 0.56 por 10.000 pacientes/día, detectándose la incidencia más alta en 1993 y la más baja en 2000. En el estudio SENTRY (Estudio de sensibilidad antibiótica) realizado entre 1997 y 1999, en el que se valoraban 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. Igualmente vieron que *Candida spp.* ocupaba el 4º lugar de los agentes etiológicos más frecuentes [18,92].

2. GENES QUE SE RELACIONAN CON LA PATOGENICIDAD Y LA MORFOLOGÍA DE *Candida albicans*

Existe una relación importante entre los genes que intervienen en la patogenicidad y la morfología de *C. albicans*. El factor de virulencia más eficiente en la penetración de tejidos es la producción de hifas [93]. En estudios bioquímicos realizados se establecen las rutas de transducción de señales, que activan la filamentación de *Candida albicans*, concluyen que existen dos rutas principales, una es la cascada de las MAP cinasas y la segunda está representada por el factor transcripcional EFG1p. Las mutantes que carecen de estas rutas no son filamentosas y son avirulentas [20]. Para el estudio de la filamentación se propone el tratamiento de las levaduras con doxiciclina ya que inhibe la formación del tubo germinativo, es decir, actúa como modulador de esta [96].

Las cascadas de señalización donde participa la proteína RAS1 intervienen en la regulación de la formación hifa. Activa a factores involucrados en la señalización de la formación de la hifa como EFG1 y CPH1. La expresión de CPH1 es un componente de la cascada de las MAP cinasas y EFG1 es componente del cAMP, estas se incrementan durante la formación de la hifa. Por lo tanto, se estudia la expresión de los RNA mensajeros (mRNAs) correspondientes (CPH1, EFG, y RAS1); en cultivos con antifúngicos se inhiben estos causados por la interrupción de la vía de señalización de RAS1 [71]. La proteína CHS7, involucrada en la síntesis de quitina, no participa en el crecimiento o morfogénesis de la levadura, pero parece ser esencial en ciertos procesos morfogenéticos, como en la extensión de la hifa [95].

Además se ha visto la participación de la MAP cinasa Hog1p, que puede ser una de las primeras en participar en la formación de las pseudohifas activando a RBF1, TUP1, que son genes involucrados en la formación y crecimiento de las hifas [2].

Una característica en hongos patógenos como *C. albicans* es el papel fisiológico de las MAP cinasas y el de las MKC1 en la biogénesis de las células. En mutantes de *C. albicans* en el gene MKC1 se observó que las cepas mostraron alteraciones en la superficie de las células y un aumento en los epitopes en células específicas en las mutantes además del aumento en la sensibilidad de antifúngicos los cuales inhiben la 1,3- β glucano y la síntesis de quitinas. La transición morfológica de *C. albicans* se basa en el daño de la formación de pseudohifas. También se ha visto que las MAP cinasas juegan un papel importante en la construcción de la pared celular de *C. albicans* ya que interviene en la síntesis de 1,3- β -glucano y en la síntesis de quitinas [78].

Los genes que se relacionan con el metabolismo en la asimilación de carbohidratos como el ciclo del glicoxilato y en la gluconeogénesis son de gran importancia para el desarrollo de blastoconidias y del tubo germinativo. Además para la construcción de la pared celular [91].

El tratamiento de las infecciones micóticas invasivas es particularmente problemático e infortunadamente, no tiene éxito en un porcentaje alto de casos, haciendo crucial el inicio temprano del tratamiento y a su vez, un diagnóstico prematuro [91].

3. GENERALIDADES DE ANTIMICÓTICOS

3.1 Concepto

El concepto de agente antifúngico o antimicótico engloba cualquier sustancia capaz de producir una alteración tal de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, bien directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del hospedero [39].

Las reacciones adversas de los antimicóticos son casi universales y consisten en fiebre, escalofríos, espasmos musculares, vómito, cefalea e hipotensión, principalmente. Para la anfotericina B el daño renal es el más importante [13,31,51].

En el caso de los hongos no puede hablarse ni de cura ni de cronicidad, debido a que *C. albicans* es un habitante del organismo se refiere a reactivaciones de la enfermedad y períodos asintomáticos [48].

3.2 Clasificación

Los antimicóticos incluyen una amplia variedad de sustancias con diferentes estructuras químicas y mecanismos de acción. La clasificación se realiza según criterios convencionales que atienden a su estructura en: polienos, azoles y alilaminas, entre

otros (tabla 1); de acuerdo con su origen en sustancias producidas por organismos vivos o derivados de síntesis química; de acuerdo con su espectro de acción en: amplio o restringido y de acuerdo con el sitio de acción en: (tabla 2) [39]. Así mismo se pueden dividir en fármacos sistémicos (orales o parenterales) para infecciones sistémicas, fármacos por vía oral o tópicos para infecciones mucocutáneas [13,51].

TABLA 1. Clasificación de los antifúngicos por su estructura (Gregori, 2005) [49].

Polienos	Nistatina, natamicina, amfotericina B
Azoles	Imidazol: miconazol, clotrimazol Triazoles: fluconazol, itraconazol, ketoconazol Triazoles de segunda generación: voriconazol, ravuconazol, posaconazol
Alilaminas	Terbinafina, naftifina.
Lipopéptidos	Papulacandinas. Triterpenos glicosilados. Equinocandinas: caspofungina, anidulofungina, micafungina
Pirimidinas fluoradas	Flucitosina
Otros	Yoduro de potasio, ciclopirox, tolnaftato, griseofulvin

TABLA 2. Clasificación de los antifúngicos por su sitio de acción en el hongo (Gregori, 2005) [39].

Antifúngicos interactuando en pared celular	Lipopéptidos
Antifúngicos interactuando en membrana celular	Polienos, azoles, alilaminas
Antifúngicos interactuando en núcleo	Pirimidinas fluoradas

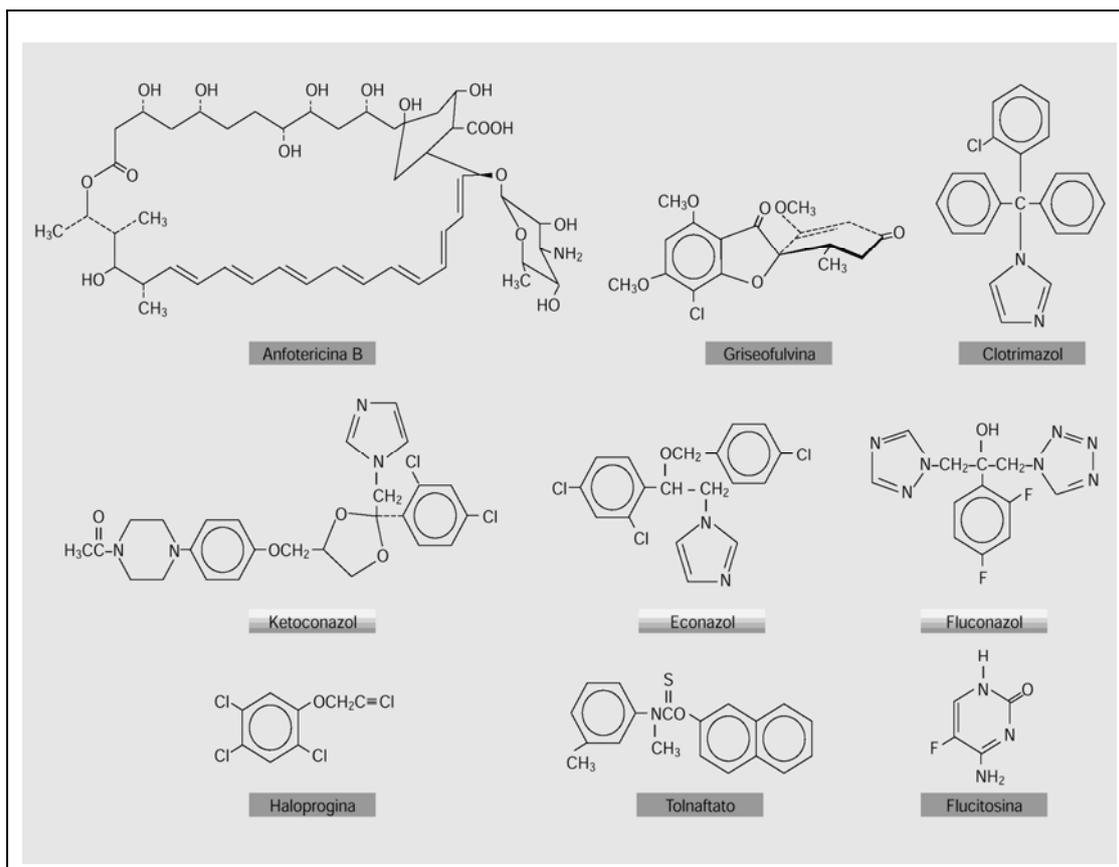


Figura 4. Estructura de fármacos antifúngicos. Tomado de Flórez 1997 [31].

3.3 Relación estructura-función de los antifúngicos

Las estructuras de los antifúngicos (fig. 4) tienen gran variedad pero la presencia de ciclos de 5 átomos en los cuales el nitrógeno o azufre forman parte del ciclo, pudiera considerarse un grupo farmacóforo, (grupo de átomos de una molécula de medicamento, responsable de la actividad del mismo) pues en ausencia de este las moléculas se pierden su actividad biológica contra los hongos [28,39]. En muchos casos la aparición de anillos bencénicos con sustituyentes halogenados como cloro o flúor, cercanos al anillo de imidazol o triazol, ayudan a aumentar la respuesta biológica de la molécula, pues le confieren la característica de ser más lipofílica con mayor eficiencia frente a infecciones fúngicas, ejemplo que se aprecia en los azoles [28,39].

Las pirimidinas constituyen otro grupo con actividad antifúngica a partir del cual se pudieran diseñar muchos fármacos de igual actividad farmacológica. Las estructuras que forman ciclos en los cuales se repite el grupo amida también le confieren a la molécula actividad antifúngica, tal es el caso de los lipopéptidos. Otra estructura que ha servido para el diseño de moléculas antifúngicas es aquella que contiene planos ortogonales, llamadas espirocompuestos, y un ejemplo de ello es la griseofulvina [28,39].

3.4 Mecanismo de acción

POLIENOS. La anfotericina B y la nistatina son macrólidos poliénicos anfotéricos, se unen al ergosterol y alteran la permeabilidad celular, formando poros en la membrana celular. Se combinan ávidamente con los lípidos (ergosterol), debido a que contienen muchos dobles enlaces, y se asocian con moléculas de agua que interactúan con los grupos hidróxilo. Esta característica anfipática facilita la formación de los poros por múltiples moléculas de anfotericina y nistatina, con las porciones lipofílicas por el exterior del poro y las regiones hidrofílicas revistiendo el interior. El poro permite la salida de iones intracelulares y macromoléculas, lo que conlleva a la muerte celular. Algunos esteroides se unen a la membrana celular humana, de donde resulta su toxicidad prominente. Las anomalías de la función hepática se ven como un grado de anemia debida a la producción disminuida de eritropoyetina por daño renal de las células tubulares. Además se pueden desarrollar convulsiones a menudo con grandes secuelas neurológicas [13,51,72].

FLUCITOSINA. La flucitosina es un análogo de la pirimidina hidrosoluble, relacionado con el fluorouracilo (5-FU). La flucitosina es captada por las células micóticas mediante las enzimas permeasas de citosina (citosina permeasa) y convertida, intracelularmente, primero a 5-FU y después a monofosfato de 5-fluorodeoxiuridina (F-dUMP) y trifosfato de fluororidina (FUTP), los cuales inhiben la timidilato sintetasa por lo tanto también la del DNA y del RNA, respectivamente. Además inhibe la síntesis de la proteína fúngica, reemplazando el uracil con 5-FU en el RNA [28]. Las células humanas no pueden convertir al fármaco en metabolitos activos. Los efectos adversos de la flucitosina resultan del metabolismo (probablemente por la flora intestinal), dando lugar a un metabolito tóxico antineoplásico, el fluorouracilo. La toxicidad a médula ósea con anemia, leucopenia y trombocitopenia son los efectos adversos más comunes, y el trastorno de las enzimas hepáticas con menor frecuencia. También se han informado agranulocitosis y anemia aplásica [13,51].

AZOLES. La actividad antimicótica de los azoles resulta de la disminución de la síntesis del ergosterol por inhibición de las enzimas del sistema citocromo P450. Se bloquea la síntesis del ergosterol por la acumulación de diferentes 1,4- α -metil-esteroles a nivel celular. Esto sugería que los azoles inhibían la 1,4-demetilación en la cadena de los esteroides celulares. Esta inhibición no tiene selectividad a nivel de célula fúngica, sino que también afecta a la síntesis de colesterol de las células animales, aunque para ello se requieren dosis de azoles mucho más elevadas. La auténtica diana que utilizan los azoles para inhibir la 1,4- α -demetilación del lanosterol es una proteína hemo del citocromo P450, bloqueando el lugar reservado para el oxígeno. Las reacciones adversas más comunes son trastornos gastrointestinales menores. Se ha reportado que

todos los azoles producen anomalías en las enzimas hepáticas y, de manera más rara, hepatitis clínica [1,13,51].

EQUINOCANDINAS. Son una nueva clase de medicamentos antimicóticos en desarrollo, un ejemplo es la caspofungina que actúa a nivel de la pared celular del hongo a través de la inhibición de la síntesis del β -1,3-glucano al alterar la función de la glucano sintetasa, ocasionando ruptura de la pared celular del hongo y la muerte celular [11,13,18].

ALILAMINAS. La terbinafina es una alilamina sintética que interfiere con la biosíntesis del ergosterol, pero más que interactuar con el sistema del citocromo P450, la terbinafina inhibe la escualeno epoxidasa del hongo, lo cual permite la acumulación del esterol escualeno, que es tóxico al microorganismo. Los efectos adversos principalmente son trastornos gastrointestinales y cefalea [13,51].

GRISEOFULVINA. Se ha propuesto que la griseofulvina ejerce su actividad antifúngica al inhibir la producción del DNA micótico. La griseofulvina también se une a proteína microtubular e inhibe la mitosis. Además es tóxica para células de mamífero y la base de su toxicidad selectiva útil parece implicar la distribución selectiva del fármaco a células queratinizadas, en especial las que se encuentran enfermas [13,51]. Una manifestación prominente de la acción de la griseofulvina es la producción de células multinucleadas conforme el fármaco inhibe la mitosis del hongo. En las células de mamífero tratadas con concentraciones altas provoca desorganización del huso mitótico al interactuar con los microtúbulos polimerizados [13].

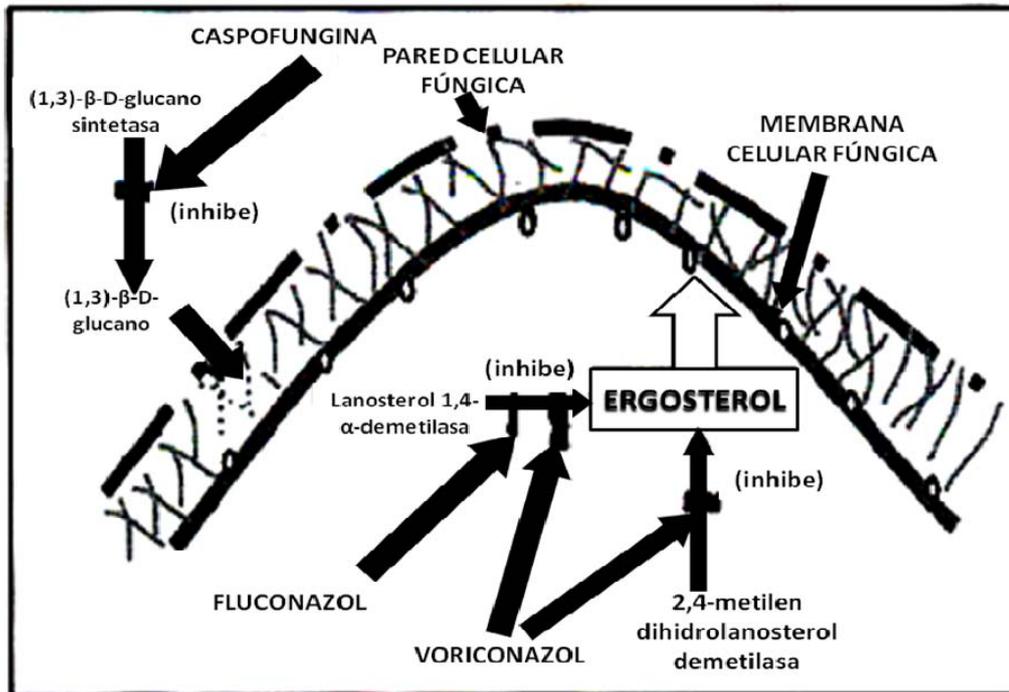


Figura 5. Mecanismos de acción de los diferentes antifúngicos. Tomada de Bidart 2004 [11].

NUEVAS FORMAS DE TRATAMIENTO. Puesto que muchas infecciones por hongos, sobre todo las más graves, se producen en pacientes inmunodeprimidos, parece razonable utilizar tratamientos en los que los fármacos antifúngicos se asocian a agentes que mejoren los mecanismos de defensa del organismo. Esto es lo que se intenta con la administración de factores estimulantes de colonias (G-CSF y GM-CSF). Estos factores no sólo aumentan el número de células fagocíticas circulantes, sino que potencian su actividad fagocítica, algunos ejemplos son: citoquinas e interferón γ , aunque su eficacia y seguridad todavía está en investigación [31].

4. PRODUCTOS NATURALES CON ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA

En el mundo se ha venido explorando y valorando el uso de los productos naturales como fuente de nuevos y variados productos naturales con fines medicinales. Así mismo la FDA aprobó, entre 1983 y 1994, 520 nuevos fármacos, de los cuales el 39%

eran de origen natural o sus derivados. En la actualidad se dispone de variados agentes antimicóticos obtenidos de plantas que se han probado tanto *in vitro* como *in vivo* con buenos resultados. De la destilación de las hojas de la planta australiana *Melaleuca alternifolia* se obtiene el aceite esencial del árbol del té (*Tea Tree Oil*), un fitofármaco que ha demostrado actividad antimicótica por la acción directa de los componentes activos terpinen-4-ol y 1,8-cineol, contra las estructuras de las membranas celulares, de hongos de los géneros *Candida* y *Malassezia* además de dermatofitos. Los extractos alcohólicos, los aceites esenciales y los compuestos de naturaleza sulfúrica aislados de los bulbos del ajo (*Allium sativum*) se ha demostrado un importante efecto antimicótico, atribuido a los componentes activos alicina y ajoeno, sobre especies de los géneros *Candida*, *Malassezia*, *Cryptococcus* y *Aspergillus*, así como dermatofitos y el hongo *Paracoccidioides brasiliensis*. Así mismo, de la planta *Eucalyptus globulus* se obtienen aceites esenciales, extractos e infusiones con actividad antimicótica. Las plantas *Thymus vulgaris* y *Thymus zygis* son fuente de moléculas de timol y carvacrol, ambas con efecto desinfectante en heridas y componentes de enjuagues bucales. Su actividad es reconocida contra *Cryptococcus neoformans* y especies de *Candida* y *Aspergillus*. En las semillas de la planta *Zea mays* se encuentra la proteína zeamatina, que tiene como función proteger a la planta de hongos patógenos humano *Candida albicans* [73].

A partir de una molécula de origen natural, el quitosano, (1-4) 2 amino 2 deoxi Dglucopiranososa, se sintetizó el compuesto quitosano carbamato de etilo, el cual en ensayos previos mostró actividad antifúngica para *C. albicans*. El quitosano es un biopolímero derivado de la desacetilación de la quitina, esta última molécula forma parte del exoesqueleto de crustáceos e insectos y de la pared celular de muchos hongos,

por su parte, los carbamatos son componentes de gran parte de los plaguicidas e insecticidas en actual uso [110].

Han sido numerosos organismos marinos de los cuales se han aislado compuestos biológicamente activos, las esponjas son la principal fuente de productos naturales bioactivos. Estos animales producen metabolitos secundarios como terpenoides y esteroides. Algunos insectos como en la polilla gigante de la seda *Hyalopora cecropia* se identificaron los péptidos cecropina A y B, con actividad antifúngica contra especies *Candida*, *Fusarium* y *Aspergillus* [73].

5. PROPÓLEO

Se da el nombre de propóleo a una resina cerosa, de composición compleja y consistencia viscosa, que las abejas elaboran y utilizan en la construcción, reparación, aislamiento y protección de la colmena. Su nombre proviene del griego y significa defensor de la ciudad, entendida ésta como sinónimo de colmena [29,30,62].

Las abejas, recogen con sus mandíbulas, partículas resinosas de las yemas, brotes y pecíolos de las hojas de diferentes vegetales (olmo, álamo, sauce, abedul, castaño de Indias, pino, abeto, roble y algunas herbáceas) que, una vez en la colmena, mezclan con cera y secreciones salivares para obtener el propóleo, se desconoce cuál puede ser la producción potencial de la zona, pero se tiene la referencia que la producción anual es de 10-300 g/colmena, difiere en función de la variedad de abejas, ejemplo, *Apis mellifera* (figura 6), *Melipona colimana*, el clima y el dispositivo de recolección [62].



Figura 6. *Apis mellifera*. Aunque existen diferentes especies de abeja que tienen la capacidad de producir propóleo, la más común es *Apis mellifera*. La abeja, para recoger el propóleo, lo desprende del árbol y lo lleva a la corbícula.

Gracias a su contenido en aceites esenciales, el propóleo suele ser aromático y en función de su origen botánico y de la época de recolección, difiere en color (de amarillo claro a castaño oscuro), sabor (amargo, ligeramente picante o insípido) y consistencia [29].



Figura 7. Aspecto físico del propóleo. El propóleo es una sustancia resinosa, de color amarillo verdoso a pardo rojizo, que tiende a oscurecerse

Al igual que la miel, el propóleo se conoce desde la más remota antigüedad y ha sido ampliamente utilizado por diferentes culturas con diversas finalidades, entre ellas en la medicina [6]. Se conoce del empleo del propóleo para curar heridas; entre los años 1899 y 1902, en la guerra Anglo-Boer en el cono sur africano, se reportó que esta sustancia salvó de la muerte a numerosos soldados, ya que en aquel entonces se desconocían los

antibióticos y sin el empleo del propóleo colocado directamente sobre las heridas muchos pacientes habrían muerto de gangrena [88].

Con el posterior desarrollo de la química farmacéutica, y al igual que ocurrió con los tratamientos fitoterapéuticos, el propóleo dejó prácticamente de utilizarse. Recientemente, se observa un resurgir en su uso y actualmente se investigan sus acciones, efectos y posibles usos en biología y medicina, entre los que destacan su aplicación como suplemento dietético y en la industria farmacéutica [6,29].

Actualmente existen muchos productos que contienen propóleo en el mercado incluyendo extractos etanólicos, jarabes, sprays, tabletas y cápsulas [54].

5.1 Origen botánico y composición

En las zonas templadas la mayor parte del propóleo procede del exudado de brotes de chopos o álamos pertenecientes al género *Populus spp*; en Rusia, de los brotes de abedul y de *P. tremula*; en las regiones mediterráneas, de las choperas y de las hojas de *Cistus spp*; en Brasil de las hojas de especies de *Baccharis dracunculifolia*; en Venezuela y Cuba de la resina floral del género *Clusia* y en zonas más tropicales se obtienen de otros vegetales [5]. En Zapotlán el Grande Jalisco, se ha demostrado que el propóleo es obtenido a partir de especies como la rosa morada, granadilla, pino, encino, cedro, caoba, roble, hozote, guásima, mezquite y huisache [62].



Figura 8. Árboles que sirven como fuente de sustancias resinosas para la producción del propóleo: a) Eucalipto, b) pino y c) ciprés. Las abejas obtienen de los exudados de las yemas y brotes de los árboles partículas resinosas que utilizan posteriormente para mezclar con secreciones salivares dando origen al propóleo. Se muestran aquí las fotografías de tres de los árboles mencionados con mayor frecuencia en la literatura.

El propóleo se puede clasificar en función de su origen geográfico y, aunque los datos relativos a los contenidos de flavonoides y ésteres fenólicos de los propóleos europeos y de América del norte son incompletos, se sabe que el propóleo se obtiene a partir de árboles del género *Populus spp.*, contiene una mezcla de agliconas flavónicas, ácidos hidroxicinámicos y sus ésteres; que la variedad rusa contiene básicamente agliconas favónicas y la brasileña derivados carbono-prenilados del ácido *p*-cumárico. De hecho la composición del propóleo es muy compleja y variada en función de la diversidad fitogeográfica de las zonas de recolección, origen botánico y localización geográfica [6,50,62,108].

En el propóleo se han aislado más de 180 compuestos. En el propóleo europeo, más de los 160 compuestos diferentes identificados en él corresponden a fenoles, principales responsables de la mayoría de sus propiedades farmacológicas. El mayor contenido corresponde a resinas y bálsamos que contienen flavonoides y ácidos fenólicos o sus ésteres (50%), contenidos muy variables de ceras (7.5-35%) que afectarán a los correspondientes restantes componentes; aceites volátiles (10%); polen (5%) e impurezas (4.4-19.5%). Además contiene pequeñas cantidades de terpenos, taninos,

restos de las secreciones de las glándulas salivares de las abejas y posibles contaminantes. Los compuestos activos son los flavonoles, flavononas y flavonoles [5,6,29,50].

En el propóleo rojo de Brasil se encuentran 14 componentes fenólicos, triterpenoides, isoflavonoides, benzofenonas y naftoquinonas, que mostraron actividad contra *C. albicans*, *S. aureus*, y que también tienen propiedades antioxidantes debido a sus flavonoides [68,108]. En la tabla 3 se muestra un resumen de la actividad biológica de propóleos obtenidos de distintas regiones geográficas [6].

Tipo de Propóleo	Actividad antibacterial	Actividad Antiinflamatoria	Actividad Antitumoral	Actividad Hepatoprotectora	Actividad Antioxidante	Acción Alergenica
Europeo (tipo poplar)	Flavanonas, flavones, ácidos fenólicos y sus ésteres.	Flavanonas, flavones, ácidos fenólicos y sus ésteres.	Ácido cafeico éster de fenilo.	Ácido cafeico, ésteres de fenilo.	Ácido cafeico y sus ésteres.	3,3-Dimetil alil cafeato.
Brasiliense (tipo <i>Baccharis acis</i>)	Ácido <i>p</i> -coumarico prenilado, labdano diterpenos.	No identificado	Ácidos <i>p</i> -coumarico prenilados, clerodano diterpenos, benzofuranos.	Ácido <i>p</i> -coumarico prenilado, Flavonoides, lignans, ácidos cafeoil quínico.	Ácido <i>p</i> -coumarico prenilados, flavonoides.	No identificado
Cubano	Benzofenonas preniladas.	No identificado	Benzofenonas preniladas.	No identificado	Benzofenonas preniladas.	No identificado
Taiwanés	No identificado	No identificado	Flavanones prenilados.	No identificado	Flavanonas preniladas.	No identificado

Tabla 3. Compuestos responsables de la actividad biológica de diferentes tipos de propóleo. Tomada de Bankova 2005 [6].

5.2 Propiedades y actividad biológica

La actividad biológica del propóleo depende de muchos factores y está asociada a la región geográfica, la temporada de recolección, el tipo de vegetación, la especie de abeja y se ha demostrado también que depende del solvente usado para su extracción [5,14].

El propóleo tiene propiedades como antioxidante, antiinflamatorio, antimicrobiano, inmunoestimulante, hepatoprotector, carcinoestático, antiviral, antifúngico, antiprotozoario, anestésico y de regeneración tisular [29,30,42]. También se ha recomendado como tratamiento en diversas afecciones estomatológicas por ejemplo, en pacientes con heridas causadas por cirugía maxilofacial, en las que muestra una gran efectividad en la cura de las heridas [82,88]. Como antihelmíntico en animales tiene gran eficacia en la disminución de huevos estrogilideos en ovinos infestados de forma natural [87].

Se ha demostrado que el propóleo tiene sinergismo con antifúngicos (Cloranfenicol, gentamicina, netilmicina, tetraciclina, clindamicina) que inhiben la síntesis de proteínas [30]. Como antitumoral inhibe el crecimiento del sarcoma e induce apoptosis en líneas celulares [76]. Su actividad antiinflamatoria se debe a que inhibe la síntesis de prostaglandinas, además estimula la inmunidad celular [54].

La actividad antimicrobiana varía dependiendo la concentración de los flavonoides. [54]. Los flavonoides (quercetina, apigenina, galangina, etc.) y los ácidos fenólicos (cafeico, isoferúlico, cinámico y benzoico), además de ser tóxicos para las levaduras, inhiben la actividad enzimática de la hialuronidasa y el ácido cafeico; la actividad de la dihidrofolato reductasa podría explicar la similitud entre algunos de sus efectos y los de algunos antiinflamatorios no esteroideos. Al estudiar la actividad antifúngica y antimicrobiana de propóleos de diferentes orígenes geográficos se comprueba que todos son activos frente a hongos y cepas bacterianas Gram(+) ya sea en menor o mayor proporción [29,57].

5.3 Actividad antifúngica

El propóleo centroeuropeo (Alemania, Francia y Austria), con composiciones cualitativas similares y predominio del ácido trans-*p*-cumárico, muestran actividad frente a *C. albicans*, mientras que los mediterráneos (Bulgaria, Turquía, Grecia y Argelia) que contienen flavonoides, ésteres del ácido cafeico y ácidos ferúlicos, presentan menor actividad antifúngica. Por su parte el propóleo egipcio de Dakahlia, con dos ésteres de cafeato y dos triterpenoides, es más activo frente a *Candida albicans* que el de Ismailia que no contiene ácidos aromáticos, ni ésteres, ni flavonoides. Estudios sobre la incidencia de la paracoccidiomicosis en América latina, sugieren que, independientemente de su origen geográfico, los macrófagos estimulados con propóleo aumentan su actividad fungicida [29,77].

El propóleo muestra, en distintos grados, efectos fungicidas frente a numerosas especies además de *C. albicans*, como *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Ascosphaera apis* y *Plasmopara viticola*. La mayor inhibición observada, 50% en todas las especies estudiadas, corresponden a una concentración del 4 % y los microorganismos más afectados son la *Alternaria* y el *Penicillium digitatum* [81].

La mayor inhibición sobre hongos patógenos se observa en *Trichophyton metagrophytes*, *Candida albicans* y *Malassezia pachydermatis*. En el género *Candida* el efecto del propóleo depende de las especies, siendo de mayor a menor en *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. Krusei* y *C. guilliermondii* [80].

Al comparar la actividad antifúngica de los extractos etanólicos del propóleo al 20% frente a *C. albicans*, en mucosa oral, se muestra tan efectivo como la nistatina y supera

a otros antifúngicos (clotrimazol, econazol y fluconazol) que presentan resistencia [29,54].

A pesar de que en México el propóleo es empleado desde hace muchos años como parte de la medicina tradicional y de que existe una gran variedad de productos comerciales, que se han realizado respecto a su actividad biológica. En un estudio previo llevado a cabo por nuestro equipo de trabajo se evaluó la actividad antifúngica de 4 extractos etanólicos de propóleo (EEP) de diferentes estados de la República Mexicana y 4 comerciales sobre *Candida albicans*. Siete de los ocho extractos inhibieron el crecimiento de *C. albicans*, cuyo rango de CMI's fue de 0.6 mg/mL a 7 mg/mL. El extracto obtenido en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (Cuautitlán Izcalli, Estado de México) inhibió mayor cantidad de cepas a concentraciones más bajas que los demás, inhibiendo la cepa de referencia a una concentración de 0.6 mg/mL [89].

5.4 Mecanismo de acción del propóleo

A pesar de que se ha demostrado la actividad antibacteriana del propóleo sobre una gran cantidad de microorganismos son muy pocos los estudios encaminados a esclarecer su mecanismo de acción y se han llevado a cabo a nivel de bacterias pero hay muy poca información en hongos.

El mecanismo de la actividad antimicrobiana del propóleo es complejo y puede ser atribuido al efecto sinérgico entre los compuestos fenólicos y los diferentes compuestos que lo conforman [55], principalmente los flavonoides pinocembrina, galangina y pinobanksina [19].

En ensayos realizados con *B. subtilis*, *E. coli* y *R. sphaeroides* se demostró que tanto el ácido cinámico como algunos flavonoides son responsables de desacoplar la transducción de energía de la membrana plasmática inhibiendo la motilidad, y mencionan que estos efectos podrían contribuir a la acción antimicrobiana del propóleo [75].

Por medio de microscopía electrónica y ensayos microcalorimétricos se realizaron estudios encaminados a determinar el posible mecanismo de acción del propóleo en *Streptococcus agalactiae*, donde inhibe su crecimiento previniendo la división celular y dando origen a estreptococos pseudo-multicelulares. Se determinó que el propóleo desorganiza el citoplasma, la membrana citoplasmática y la pared celular provocando una bacteriolisis parcial acompañado de inhibición en la síntesis de proteínas. Debido a lo complejo que resulta este mecanismo de acción no se puede comparar con ninguno de los que presentan los antibióticos actuales [106].

En *Staphylococcus aureus* se llevaron a cabo estudios del daño producido por la galangina, uno de los principios activos antimicrobianos del propóleo. Se demostró que provoca un incremento considerable en la pérdida de potasio lo cual se atribuye al daño causado directamente en la membrana citoplasmática o bien, podría llevarse a cabo un daño indirecto de un debilitamiento de la pared celular y una lisis como consecuencia de un choque osmótico [25].

Evaluando el efecto del propóleo en los factores de virulencia de *C. albicans* se encontró que los extractos empleados tienen un efecto citocida presente entre los 30 seg y 15 min, se observó inhibición de la conversión Y-M aún a bajas concentraciones del

extracto, provoca una inhibición de la actividad de fosfolipasa dependiente de la dosis y el tiempo. Por otro lado, no hubo un efecto claro en lo que corresponde a la adherencia a células epiteliales, así como en la hidrofobicidad de su estructura, pero se demostró con yoduro de propidio que había daño en la membrana [26].

VII. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones micóticas humanas se han incrementado en años recientes de manera drástica, en frecuencia y gravedad. La aparición de microorganismos resistentes a los antifúngicos actuales y los problemas de seguridad y toxicidad de dichos fármacos (principalmente de los polienos anfotericina B y nistatina), hace imprescindible el desarrollo de nuevos antifúngicos que aporten ventajas apreciables respecto a los ya existentes. Esta situación ha llevado a la búsqueda de nuevos antifúngicos de origen natural.

El propóleo presenta propiedades medicinales (antifúngicas, antibacterianas, antivirales y antiparasitarias) que han mantenido su popularidad a través de los años. Se ha demostrado su efectividad antifúngica ante *Candida albicans*, sin embargo, son pocos los estudios enfocados a conocer el mecanismo de acción en levaduras.

Se sabe que existen diferentes factores que afectan la actividad biológica del propóleo como son el origen geográfico, el tipo de abeja, la vegetación circundante, etc. A pesar de que en un estudio realizado en Brasil demostraron que no había efecto en la actividad biológica dependiendo de la época de recolección del propóleo, en otros trabajos realizados se ha demostrado que hay variaciones. Debido a que en este estudio se empleó un nuevo lote de este producto consideramos que era necesario evaluar nuevamente las condiciones de crecimiento de *Candida albicans* y concentraciones de EEP a usar aún cuando se habían reportado con anterioridad. Además, la prueba de filamentación en suero y las tinciones nos darán un panorama general del daño estructural que provoca en la levadura.

VIII. HIPÓTESIS

El extracto etanólico de propóleo inhibe el crecimiento de *Candida albicans* y provoca daño estructural a nivel de membrana, de pared celular e inhibe la formación de tubo germinativo.

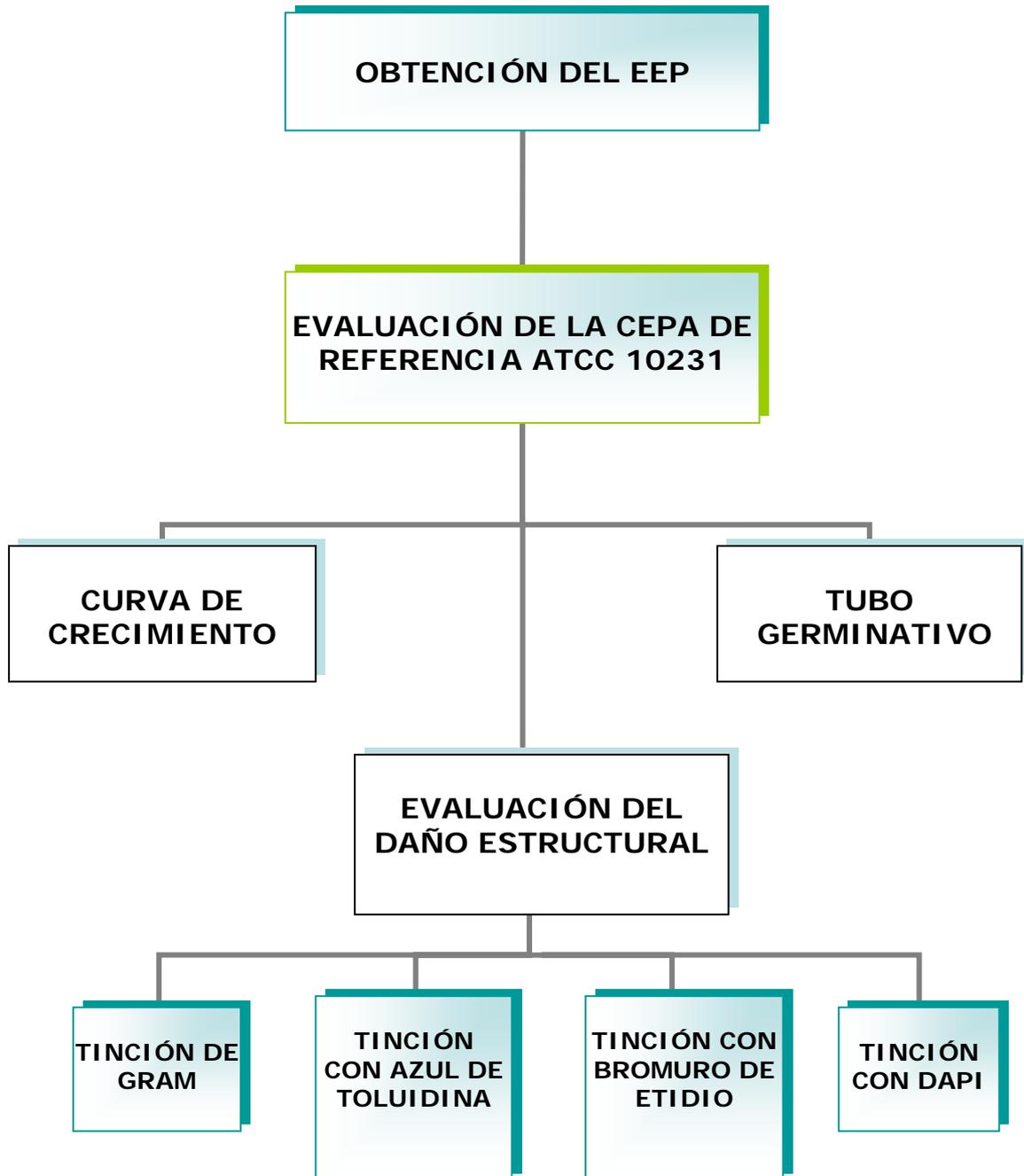
IX. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del extracto etanólico de propóleo sobre el crecimiento y el daño estructural de *C. albicans*.

X. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinación de la concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de propóleo sobre una cepa de referencia de *Candida albicans* (ATCC 10231).
- Evaluar el efecto del extracto etanólico de propóleo sobre la curva de crecimiento de *Candida albicans*.
- Evaluar el efecto fungicida del extracto etanólico de propóleo sobre *Candida albicans*.
- Evaluación de la inhibición de la formación del tubo germinativo.
- Evaluación del daño estructural producido con el extracto etanólico de propóleo sobre *Candida albicans* por medio de tinciones.

XI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



XII. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepa

Se empleó una cepa de referencia de *C. albicans* (ATCC 10231)

2. Obtención del extracto etanólico de propóleo

Para el procesamiento del propóleo se adoptó la técnica empleada por la Organización Nacional de Apicultores [36], el propóleo fue recolectado manualmente de la colmena y se limpió eliminando restos de animales, basura, ceras, restos de plantas y de la misma colmena. Posteriormente se congeló toda la noche, se trituró hasta formar un polvo fino y se maceró en alcohol al 70% en una proporción al 15% peso/volumen; esta mezcla se mantuvo a temperatura ambiente y en oscuridad durante siete días, homogenizando tres veces al día. Se filtró primero con papel filtro de poro mediano tres veces. Después se filtró con papel Whatmann de 0.45 μm . Finalmente se guardó en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

3. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Para determinar la CMI, se preparó el agar YPD, cuando alcanzó una temperatura de 40° C, se adicionó con concentraciones de 0.1-15 mg de EEP/mL de agar. Fue homogenizado y vertido en cajas de Petri estériles. Los medios de cultivo control fueron adicionados de etanol al 70% en un volumen igual al empleado en la máxima concentración del EEP; además se prepararon medios de cultivo control sin alcohol y sin EEP. A partir de un cultivo de *C.albicans* ATCC 10231 de toda la noche, el cual fue diluido e igualado al tubo 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland (1×10^6 UFC/mL) en

solución salina fisiológica estéril. Las placas fueron inoculadas de forma masiva utilizando hisopos estériles embebidos en la suspensión anterior. Todas las placas fueron incubadas a 37° C durante 48 h y se extendió su observación hasta 5 días. La CMI se determinó como la concentración más baja capaz de inhibir el crecimiento visible [98].

4. Cinética de crecimiento.

Se prepararon suspensiones con la cepa tipo ATCC 10231 en 10 mL de medio líquido YPD y fueron igualadas al tubo 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland (1×10^6 UFC/mL). Para esta prueba se utilizaron tres concentraciones de EEP, una equivalente a la CMI, la mitad de la CMI y por arriba de ella (0.3, 0.6, 0.8 mg/mL) y se consideró un control sin EEP. Se incubaron a 37° C en agitación a 250 rpm. Se leyó la absorbancia inicial y después cada hora hasta tener un total de 24 h.

5. Determinación del efecto fungicida.

Se tomó una muestra cada hora a partir del cultivo de la curva de crecimiento y se sembró por extendido en cajas de YPD. Se incubaron a 37° C durante 24 h. La ausencia de crecimiento fue indicativo de un efecto fungicida, en tanto que se consideró un efecto fungistático si se presentaba crecimiento [99].

6. Tubo germinativo

Se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por López, 2004 modificando los volúmenes para llevarlo a cabo en microplaca. A partir de cultivos de *C. albicans* de toda la noche, se prepararon cuatro tubos de una suspensión de levaduras igualados al tubo 0.5 de Mac Farland (1×10^6 UFC/ml) en medio líquido YPD, se adicionó EEP con diferentes concentraciones (0.3, 0.6, y 0.8 mg/mL) y un control sin extracto. Se incubaron durante 4 h a 37° C y se tomaron muestras cada hora. Se tomaron 30 µL y fueron incubadas en 100µL de suero humano recién obtenido a 37° C por 2 h. Se realizaron los ensayos por triplicado en días independientes, y en cada uno se analizaron diferentes campos bajo el microscopio contando un total de 100 células y obteniendo el porcentaje de las que presentaron inhibición en la formación de tubo germinativo.

7. Tinciones

Las levaduras se pusieron en contacto con concentraciones del EEP de 0.3, 0.6 y 0.8 mg/mL y se consideraron como los positivos, tratados con ácido acético al 175 mM durante 3 h y negativos sin tratamiento. Con la finalidad de hacerlo cuantitativo se analizaron diferentes campos bajo el microscopio y se contaron 100 células en total para cada una de las condiciones, obteniendo el porcentaje de las que presentaban alteración. Estos ensayos se realizaron por triplicado en experimentos independientes.

7.1 Tinción de Gram

Los reactivos se adicionaron en el siguiente orden: cristal violeta (1min), lugol (30 seg), alcohol acetona (5-6 seg) y safranina (1 min). Entre cada uno de los pasos se enjuagó con abundante agua.

7.2 Tinción con azul de toluidina

Se cubrió el portaobjetos con el colorante de 5-10 min y se enjuagó con abundante agua para eliminar el colorante [33].

7.3 Tinción con bromuro de etidio

En un portaobjetos se colocó una asada de cultivos de *C. albicans*, control y con tratamiento con EEP a tiempos y concentraciones establecidos. Se fijaron a 37° C por 5 min, y se sumergieron en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 50 µL/100mL durante 30-40 seg y se retiró el exceso sumergiéndolo en agua por 15-20 seg [52]. Para el análisis cuantitativo se consideraron como levaduras dañadas aquellas que presentaron una intensidad de fluorescencia menor que el control.

7.4 Tinción con DAPI

Se hizo el frotis y se fijó de la misma forma que para la tinción con bromuro de etidio, después se colocó una pequeña gota del reactivo de montaje con DAPI (Santa Cruz Biotechnology), de acuerdo a las indicaciones del proveedor, se colocó un cubreobjetos. Las preparaciones se observaron a 100X en el microscopio de fluorescencia. Para el análisis cuantitativo se consideraron como levaduras dañadas aquellas que presentaron un aumento de tamaño del núcleo y con intensidad de fluorescencia mayor que el control.

X111. RESULTADOS

1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la cepa de referencia.

Para determinar la CMI del EEP sobre el crecimiento de la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, se partió de concentraciones que iban desde 0.1 mg/mL hasta 1 mg/mL de EEP (valores reportados en la bibliografía por otros grupos de trabajo) [89]. En la figura 9 puede apreciarse que la última dilución en la que se observa crecimiento es la de 0.4 mg/mL por lo que el resultado obtenido para la CMI fue de 0.6 mg/mL.

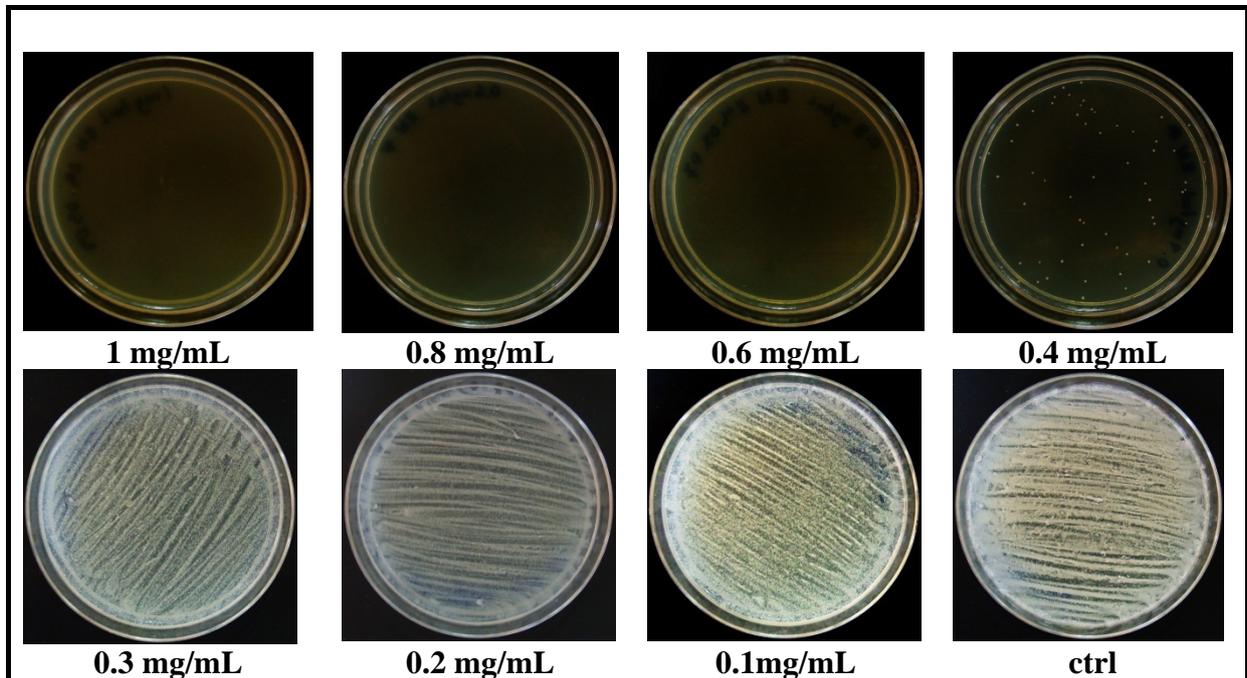


Figura 9. Determinación de la CMI de la cepa de referencia ATCC 10231 por medio de la técnica de dilución en agar. La CMI se determinó como la concentración más baja capaz de inhibir el crecimiento visible, que para el caso de la cepa de referencia fue de 0.6 mg/mL. El ensayo se llevó a cabo por triplicado en experimentos independientes.

2. CINÉTICA DE CRECIMIENTO

Con la finalidad de establecer las condiciones de crecimiento en las cuales se podía evaluar el daño que el EEP produce sobre la cepa de *C. albicans* ATCC 10231, se realizaron curvas de crecimiento (A_{600} vs. tiempo) empleando las concentraciones de 0.3 mg/mL, 0.6 mg/mL y 0.8 mg/mL, es decir, $\frac{1}{2}$ CMI, igual a la CMI y por arriba de la CMI. Como se observa en la figura 10, no hubo aumento considerable en la A en las concentraciones de 0.8 mg/mL y el comportamiento fue prácticamente lineal, incluso hasta la 24ª h en que se llevaron a cabo los ensayos. Sin embargo, en las concentraciones de 0.6 mg/mL y 0.3 mg/mL si hubo aumento de la A de forma exponencial, pero los valores en todo momento se encontraron por debajo de los del control.

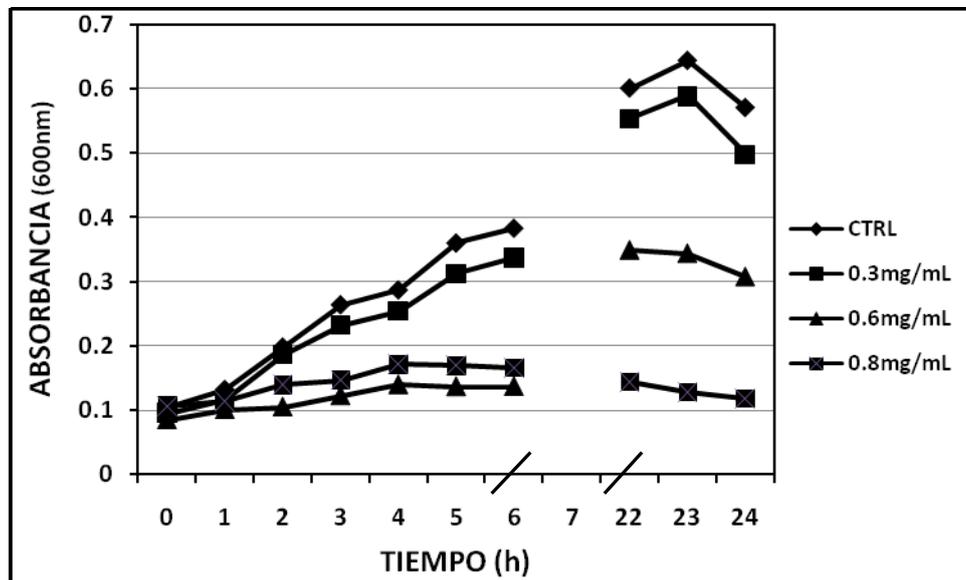


Figura 10. Efecto del EEP sobre la curva de crecimiento de *C. albicans* ATCC 10231. Las concentraciones 0.8 y 0.6 mg/mL inhiben el crecimiento de la levadura durante las 24 h. La concentración de 0.3 inhibe el crecimiento durante las primeras 6 horas y posteriormente se observa un incremento en la A . Resultados promedio de tres experimentos independientes

Se determinó además, si el efecto de inhibición del crecimiento del EEP sobre la cepa ATCC 10231 era fungicida o fungistático. Para ello cada vez que se realizó una lectura en la curva de crecimiento se inoculó una asada en agar. El crecimiento fue indicativo de un efecto fungistático, la ausencia del mismo indicó efecto fungicida. En la concentración de 0.8 mg/mL se observó que había un efecto fungicida a partir de la 5ª h de contacto con el EEP (fig. 11b). En la concentración de 0.6 mg/mL no se observó crecimiento a las horas 4, 5 y 6, a partir de la 24ª nuevamente se observó crecimiento en el agar extendiéndose la lectura hasta la 27ª h, siendo indicativo de un efecto fungistático. Finalmente, a la concentración de 0.3 mg/mL no hubo inhibición de crecimiento corroborando lo observado en las pruebas de dilución en agar, donde se determinó la CMI y en la curva de crecimiento.

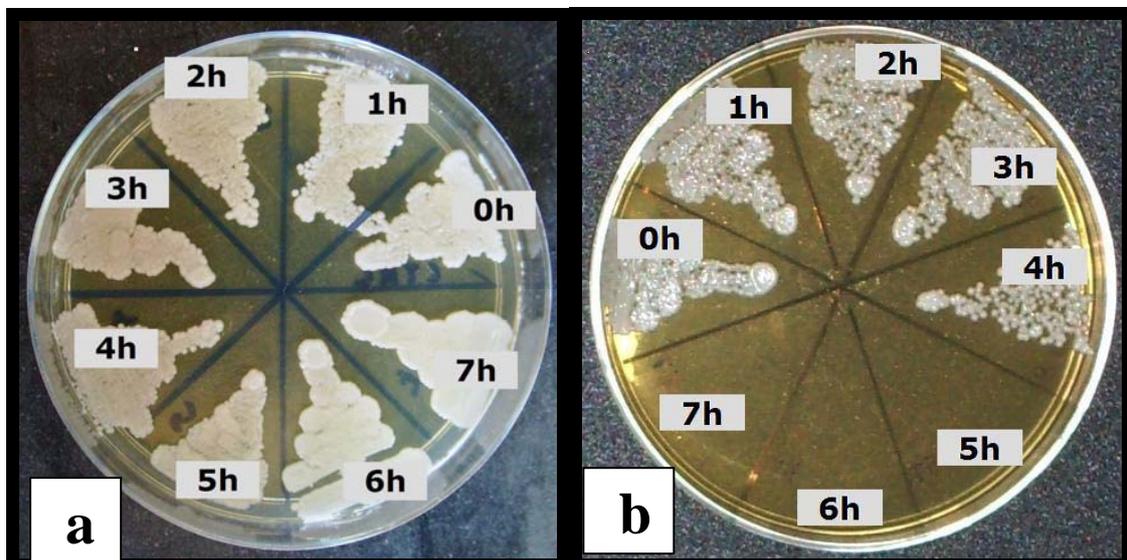


Figura 11. Determinación del efecto fungicida del EEP sobre la cepa de *C. albicans* ATCC 10231. a) Placa correspondiente al control, en la que se observó crecimiento en todos los tiempos de exposición. b) Placa correspondiente a la concentración 0.8mg/mL donde se aprecia que no hubo crecimiento a partir de la 5ª h indicando un efecto fungicida. Experimentos realizados por triplicado en días independientes.

3. FILAMENTACIÓN EN SUERO

Para evaluar si había alguna alteración en el cambio morfogenético se empleó la técnica de filamentación en suero sobre las células tratadas con EEP bajo condiciones que inhibían el crecimiento pero no provocaban la muerte de la levadura (menor tiempo de contacto con EEP). El porcentaje de inhibición de la formación de tubo germinativo fue dependiente de la concentración de EEP empleada (fig. 12). Mientras que en el control se observó hasta un 99 % de formación de hifas después de 2 h de incubación, en las células tratadas con una concentración de 0.3 mg/mL sólo el 86 % de las levaduras fueron capaces de formar tubo germinativo, es decir, hubo inhibición del 14 %. En la concentración de 0.6 mg/mL se ve notablemente el efecto del EEP ya que el porcentaje de inhibición fue de 97 % y un 3 % de las levaduras fueron capaces de formar tubo germinativo. En cuanto a la concentración de 0.8 mg/mL se observó una inhibición del 99 % y tan sólo un 1 % de formación del tubo germinativo, cuando fueron sometidas previamente a cuatro horas de contacto con el EEP (fig. 13).

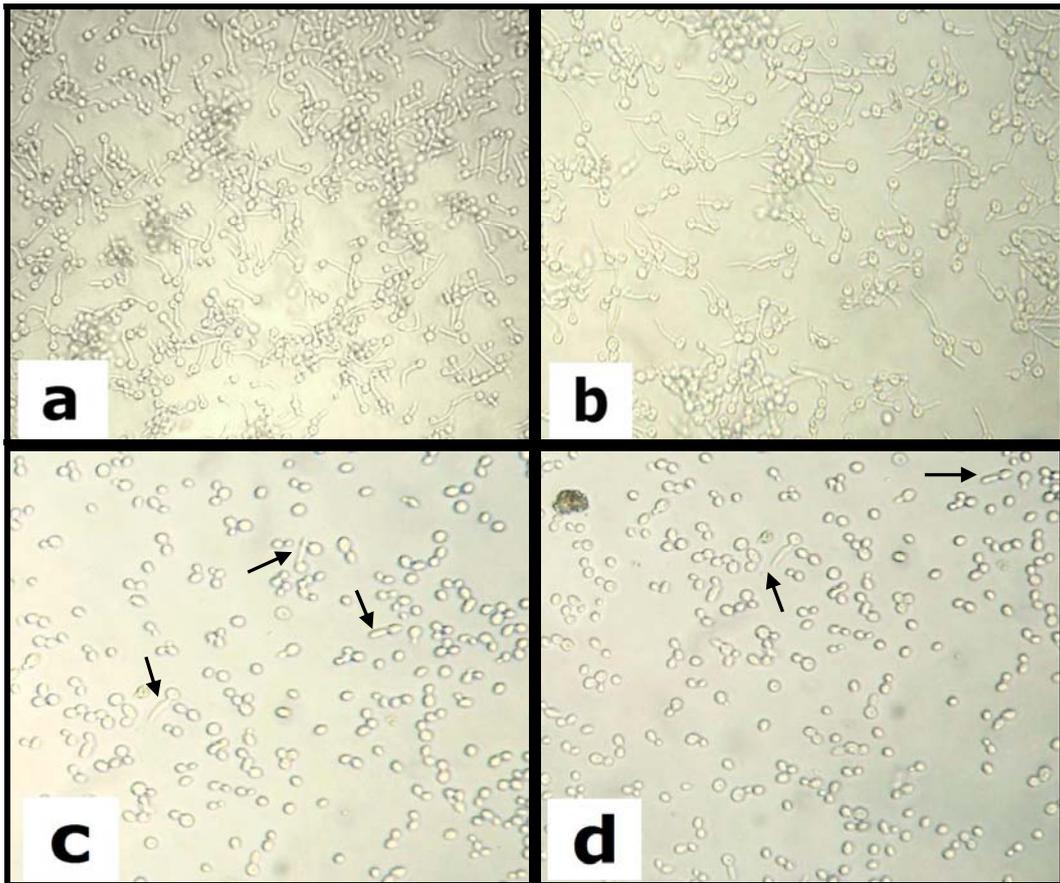


Figura 12. Efecto del EEP en la formación de tubo germinativo de la cepa ATCC 10231 de *C. albicans*. a) Control, levaduras sin tratamiento con EEP. En las levaduras con tratamiento se emplearon concentraciones de b)0.3, c)0.6 y d)0.8 mg/mL de EEP durante 4 h de contacto. Las flechas indican levaduras con tubo germinativo en el control y en las tratadas se incrementa el número de levaduras con tubo germinativo de menor longitud o sin presencia del mismo. El efecto es dependiente de la concentración de EEP.

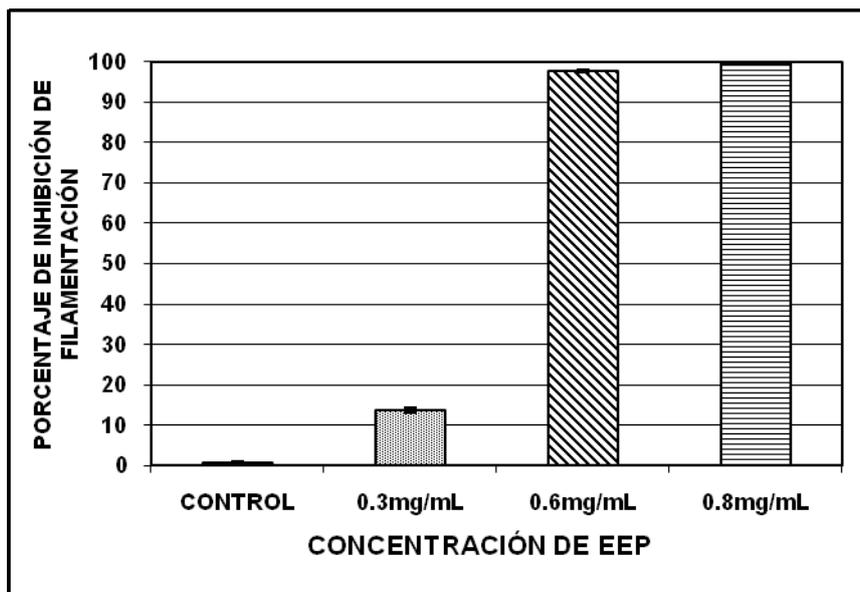


Figura 13. Porcentaje de inhibición de filamentos en la cepa ATCC 10231 de *C. albicans*. En el control, las levaduras se observan con filamentos en la mayoría de las células. Las levaduras tratadas con EEP se utilizaron concentraciones de 0.3 mg/mL que mostró una inhibición del 13%, 0.6 mg/mL del 97% de inhibición de la filamentos y 0.8 mg/mL con 99%, en la que se observa una inhibición casi total de la filamentos. Durante 4 h de contacto con el EEP además fueron incubadas en suero de durante 2 h a 37° C. Se observa una inhibición en la formación de tubo germinativo dependiente de la concentración de EEP.

4. TINCIONES

Para evaluar el daño estructural que provocó el EEP sobre *C. albicans* se emplearon diversas tinciones. El daño morfológico se evaluó empleando la tinción de Gram. Las levaduras control se observaron perfectamente teñidas y con su morfología característica, mientras que las levaduras tratadas con el EEP se tiñeron débil y parcialmente. Respecto a su morfología, en vez de ser redonda u oval se presentaron formas irregulares y una reducción en su tamaño (colapsamiento) respecto al control. Este efecto se pudo observar a partir de la concentración de 0.6 mg/mL y después de 4 h de haber estado en contacto con el EEP. En la concentración correspondiente a 0.3 mg/mL aún después de 24 h no se observaron alteraciones (fig. 14).

En la figura 15 se puede observar que el porcentaje del daño morfológico es proporcional a la concentración del EEP.

Otro efecto del EEP sobre *C. albicans* fue la inhibición de formación de blastoconidias (gemaciones). En la concentración de 0.6 mg/mL de EEP dicha inhibición se observó después de la 5ª h de incubación y en la concentración de 0.8 mg/mL se observó desde los primeros minutos de exposición. La concentración de 0.3 mg/mL no inhibió la formación de las blastoconidias.

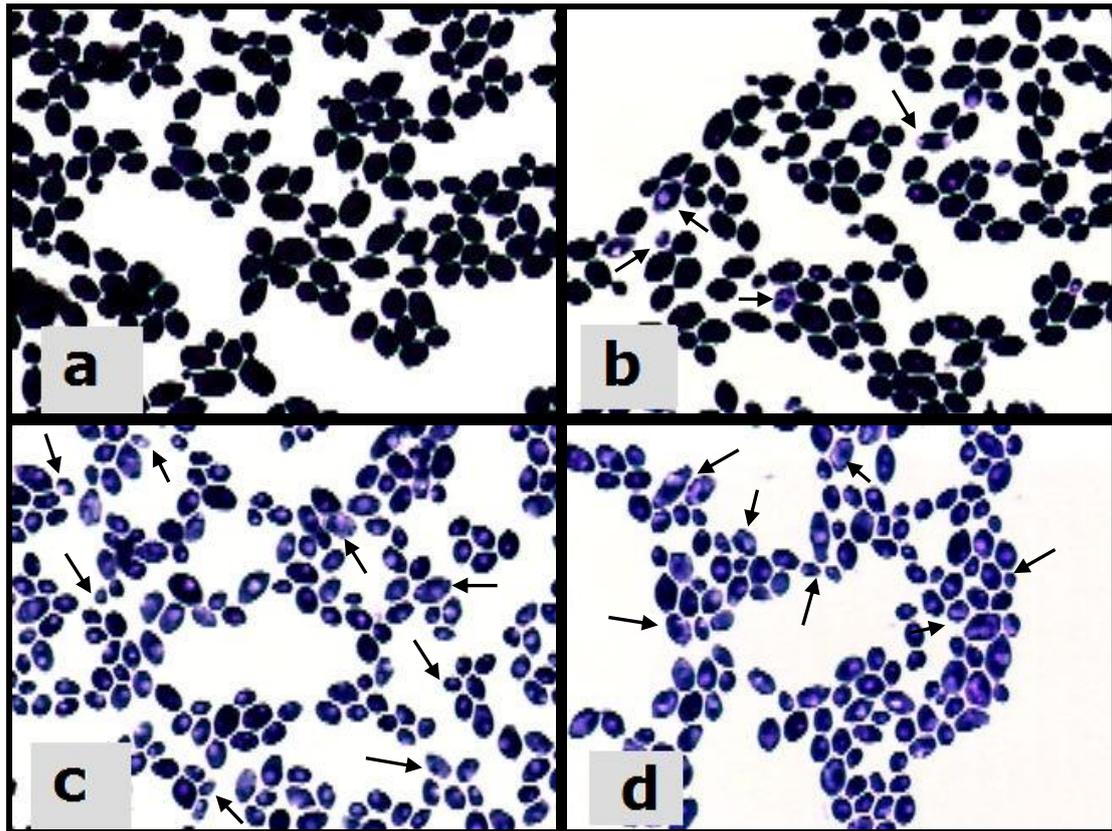


Figura 14. Efecto del EEP sobre la morfología de *C. albicans* evaluado con la Tinción de Gram. Fotografías tomadas a las 5 h de contacto con el EEP. a) Control, b) 0.3 mg/mL, c) 0.6 mg/mL y d) 0.8 mg/mL. En el control se observan células totalmente teñidas y algunas en gemación. Se observaron alteraciones morfológicas así como colapsamiento (marcadas con flechas). Las células con tratamiento muestran una tinción poco homogénea y no se observan levaduras en gemación.

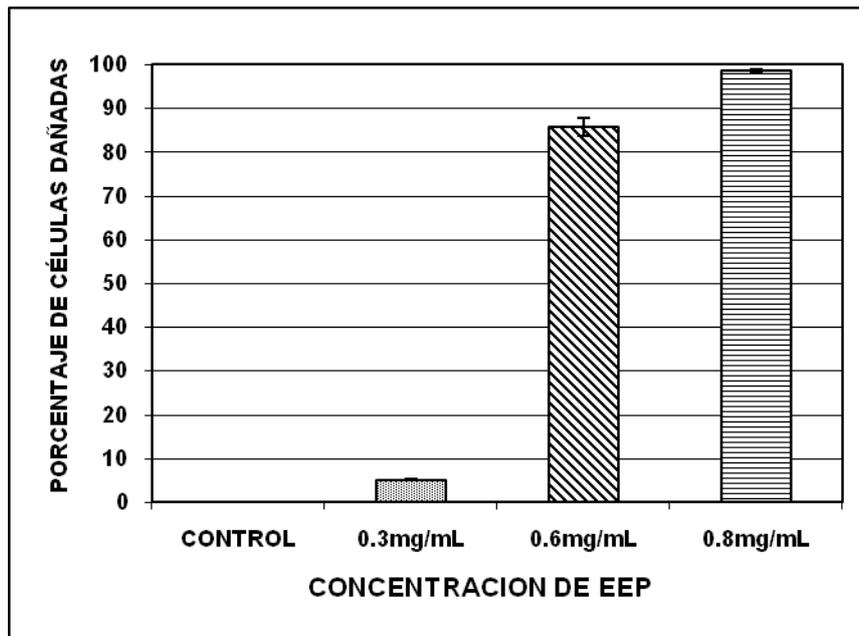


Figura 15. Porcentaje de daño morfológico causado por el EEP en la cepa ATCC 10231 de *C. albicans* evaluado con la tinción de Gram. Control, levaduras sin tratamiento con EEP. En las levaduras con tratamiento se emplearon concentraciones de 0.3, 0.6 y 0.8 mg/mL. Se consideró como daño a las alteraciones morfológicas, incluido el colapsamiento.

En la tinción con azul de toluidina las levaduras control negativo, se observaron teñidas uniformemente y con la morfología característica de *C. albicans*; sin embargo las tratadas con EEP presentaron alteraciones morfológicas y se observaron débilmente teñidas (fig. 16).

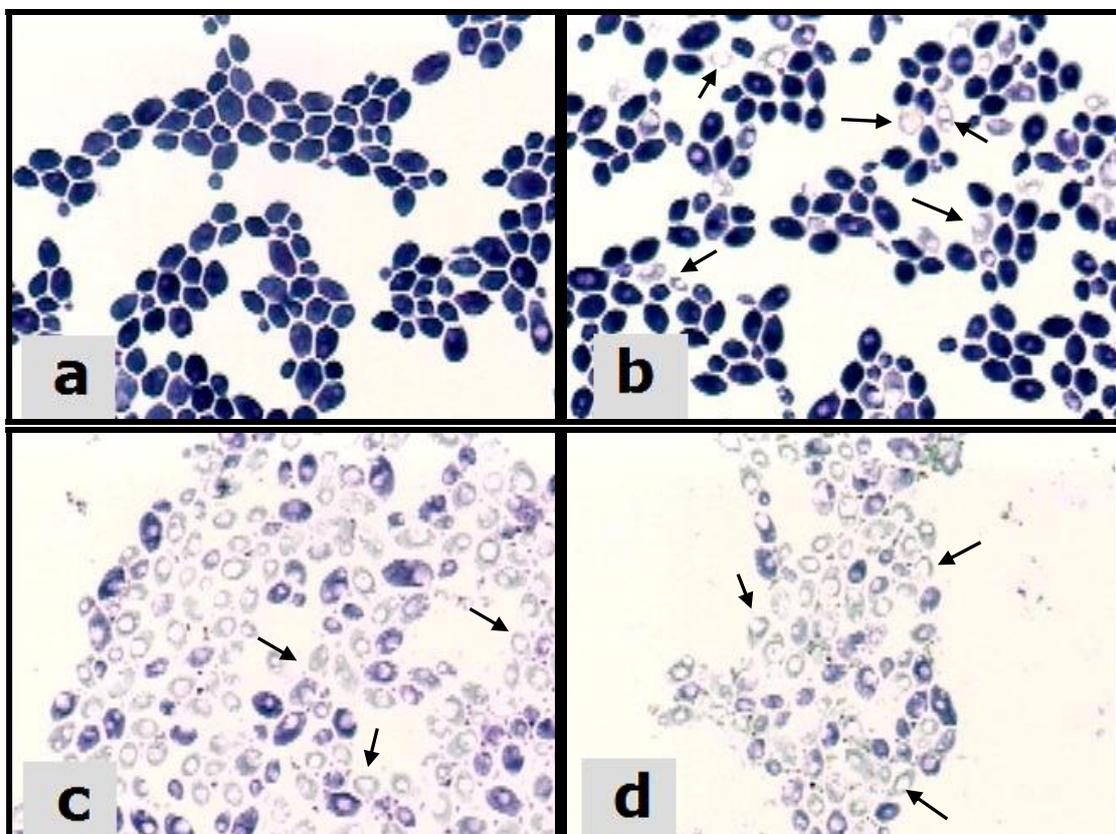


Figura 16. Efecto del EEP sobre la morfología de *C. albicans* evaluado con la tinción con azul de toluidina. Fotografías tomadas a las cinco horas de contacto con el EEP. a)Control, b)0.3 mg/mL, c)0.6 mg/mL y d)0.8 mg/mL. En esta tinción es evidente el daño, las flechas muestran algunas células dañadas. Las células tratadas se observaron teñidas débilmente y de forma parcial en comparación con el control negativo.

Para evaluar si el EEP tenía efecto sobre la integridad de la membrana celular se empleó la tinción con bromuro de etidio, poniendo en evidencia estas alteraciones al permitir la incorporación del bromuro e incrementar la intensidad de la fluorescencia (fig. 17). Las levaduras tratadas con EEP se observaron con menor fluorescencia dependiente de la concentración, en 0.3 mg/ mL 11% de células que disminuyeron la intensidad de fluorescencia, sin embargo, en las concentraciones de 0.6 mg/mL y 0.8 mg/mL se observó un porcentaje mayor de levaduras donde el núcleo fue teñido con mayor intensidad y el resto de la célula teñido más débilmente que el control 19.3 % y 88.6 % respectivamente (fig. 18).

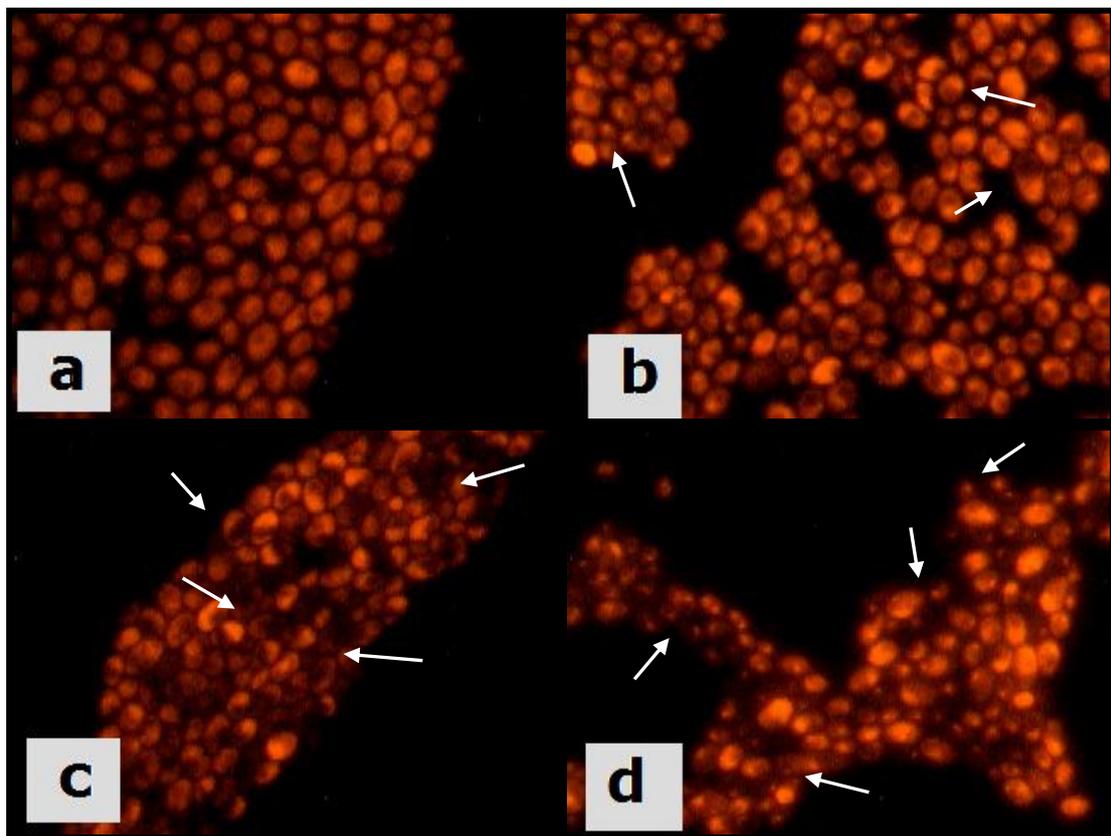


Figura 17. Efecto del EEP sobre la integridad de la membrana de *C. albicans* evaluado con la tinción con bromuro de etidio. Fotografías tomadas a las cinco horas de contacto con el EEP. a)Control, b)0.3 mg/mL, c)0.6 mg/mL y d)0.8 mg/mL. En las levaduras tratadas se observó un porcentaje de levaduras con aumento en la intensidad de la fluorescencia y un porcentaje mayor de células donde únicamente el núcleo se observó con fluorescencia y el resto de la célula débilmente teñido.

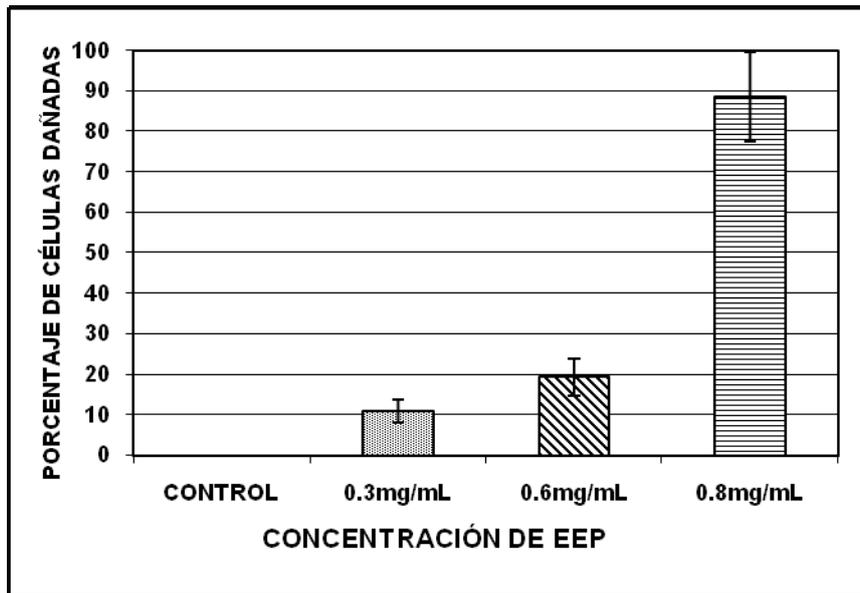


Figura 18. Porcentaje de células dañadas teñidas con bromuro de etidio. El control se observó normal y las células tratadas con EEP se observaron teñidas con menor intensidad. Efecto del EEP sobre la integridad de la membrana de *C. albicans* se observó con esta tinción. Este efecto es dependiente de la concentración a mayor concentración de EEP mayor porcentaje de células débilmente teñida.

Para evaluar si había alteraciones a nivel nuclear se empleó la tinción de DAPI. Las levaduras del control negativo mostraron el núcleo bien definido en tanto que las tratadas con EEP, presentaron un núcleo de mayor tamaño y más fluorescente (fig. 19). Esta alteración se observó en un mayor porcentaje de células a mayor concentración (fig. 20).

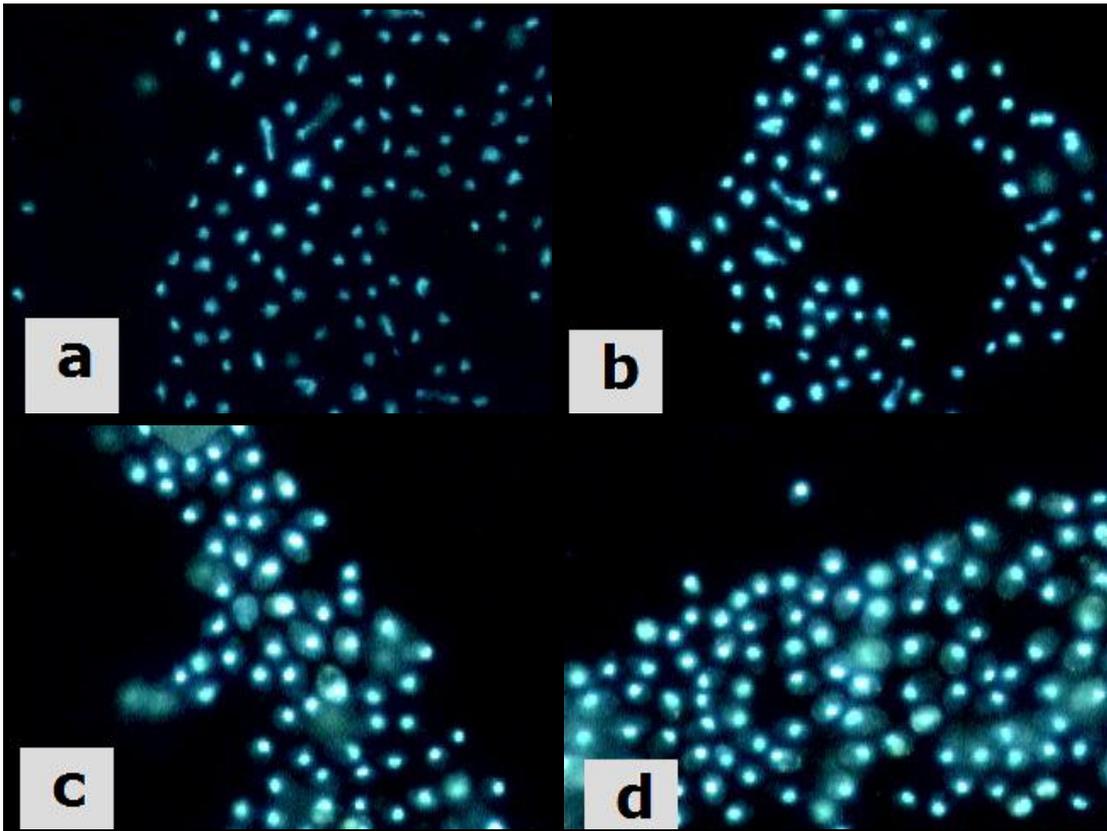


Figura 19. Efecto del EEP en el núcleo de *C. albicans* evaluado con la tinción con DAPI. Fotografías tomadas a las cinco horas de contacto con el EEP. a)control, b)0.3 mg/mL, c)0.6 mg/mL y d)0.8 mg/mL. En las levaduras tratadas se observó un porcentaje de levaduras en las que el núcleo se veía más brillante y un aumento de tamaño del mismo respecto al control.

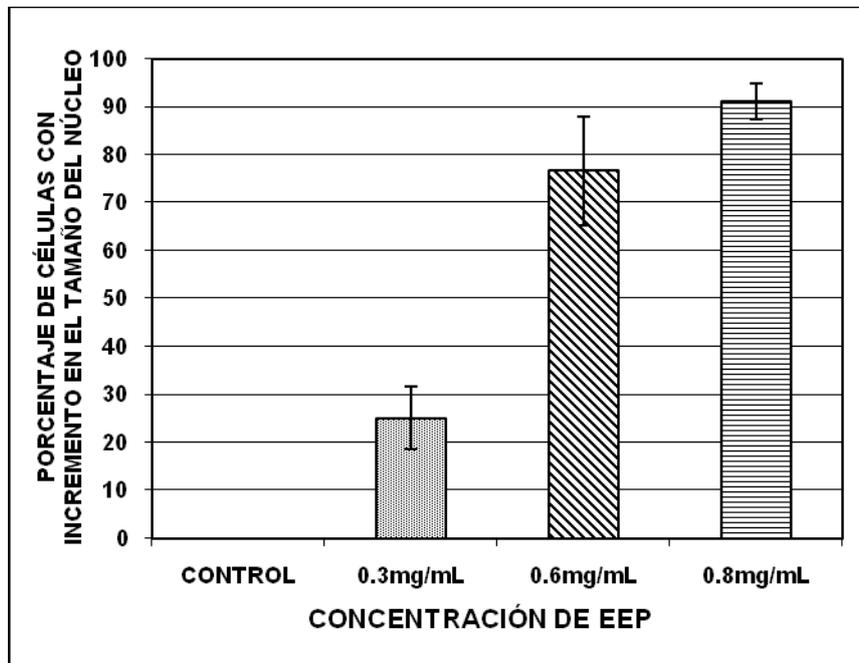


Figura 20. Porcentaje de levaduras con incremento en el tamaño del núcleo con la tinción de DAPI. Control, levaduras sin tratamiento con EEP. En las levaduras con tratamiento se emplearon concentraciones de 0.3, 0.6 y 0.8 mg/mL y un control. Se consideró como daño a las levaduras que brillaban más intensamente, dependientes de la concentración de EEP.

XIV. DISCUSIÓN

Algunos autores han recomendado la utilización del propóleo como un antiséptico para la prevención y tratamiento de la candidosis oral [5,17,18], incluso, se ha reportado que el EEP podría ser usado como una medicina alternativa en el tratamiento de las candidosis en pacientes VIH positivos siendo tan efectivo como la nistatina y superando a otros antifúngicos como clotrimazol, econazol y fluconazol [16]. El propóleo también ha sido empleado para el tratamiento de infecciones vaginales crónicas demostrando que el 61.1% de las pacientes mostraron mejoría después de 6 meses sin necesidad de algún otro tratamiento [8,27,46,69,80,82].

A pesar de que existen reportes previos [29,30,44,54,80,82,87,88] donde se evaluó la actividad biológica del extracto de propóleo sobre *Candida albicans* esta actividad depende del origen del mismo. En México también se demostró que existen diferencias de la actividad biológica cuando se compararon extractos de diferentes orígenes geográficos [89].

En este trabajo se evaluó la actividad antifúngica del EEP de los apiarios de la FES Cuautitlán en la cepa de *C. albicans* ATCC 10231. Para este fin se empleó la técnica de dilución en agar, debido a que, a pesar de que existen una gran variedad de metodologías encaminadas a evaluar la actividad antifúngica, esta ha sido considerada como la más adecuada para la evaluación del propóleo sobre *Candida albicans*, mostrando ventajas sobre las demás (diluciones en serie en tubo, difusión en agar e inoculación en superficie y microdilución en placa) al ser sensible a diferencias en la composición del extracto y permitiendo obtener diferentes valores de CMI, además de

que no se ve afectada por la baja solubilidad de los componentes del propóleo. Por otro lado, esta baja solubilidad puede interferir en las pruebas que miden turbidez como las de microdilución [98,99], sin embargo, también se ha demostrado que hay una buena correlación entre ambas técnicas [103].

Los resultados obtenidos muestran que el EEP obtenido en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (Cuautitlán Izcalli, Estado de México) inhibe a la cepa de referencia ATCC 10231 a una concentración de 0.6 mg/mL (diferente lote al utilizado anteriormente [89]). Los valores reportados en la literatura para extractos de otros países muestran que su actividad biológica es muy diferente entre sí, presentando CMI's que van de 0.2 a 12 mg/ml [40,42]. Los resultados de este trabajo se encuentran dentro de estos límites.

El siguiente punto que se abordó fue el correspondiente a las condiciones de crecimiento debido a que era necesario establecer concentraciones y tiempos de interacción con el extracto para poder evaluar los daños. Una vez que se determinó la CMI en la prueba de dilución en agar, se empleó esta concentración como base para realizar las cinéticas de crecimiento, evaluando concentraciones iguales, por arriba y por debajo de la CMI. Se llevaron a la par pruebas para determinar si el efecto era fungicida o fungistático en las mismas concentraciones y tiempos empleados. La única concentración que mostró ser fungicida fue la de 0.8 mg/mL a partir de la 5ª h de exposición. La concentración de 0.6 mg/mL mostró aumento en la A aún a la 24ª h de contacto con el EEP, pero no como el control, mostrando un efecto fungistático. En la concentración de 0.3 mg/mL sólo se observó un retraso en el crecimiento, estando

siempre por debajo de los valores de A del control. Esto no ha sido reportado con anterioridad, pero valdría la pena profundizar en ello, sobre todo para fines terapéuticos.

Tal y como se había mencionado por otros investigadores [26], el EEP que empleamos también inhibe la formación del tubo germinativo, lo cual es de gran importancia ya que es un factor de virulencia que le permite invadir y colonizar al hospedero, demostrado tanto en sistemas *in vivo* como *in vitro* [26,37,38,44,47,96,105,113]. El hecho de que no pueda sufrir este cambio morfogénico hace más susceptible a *C. albicans* para que sea eliminada por el sistema inmunológico del hospedero [20], incluso, se ha sugerido la necesidad de desarrollar compuestos antifúngicos que puedan prevenir la formación de hifas y de destruir ambas formas de la levadura [8]. Se ha reportado que existe una relación entre la concentración a la que un antifúngico dado inhibe el cambio morfogénico y la concentración a la que actúa como fungicida o fungistático: los compuestos fungicidas en concentraciones menores o 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). Se ha mencionado que esta información adicional debe ser considerada en la evaluación de los agentes antifúngicos sobre las formas levaduriformes y de hifas de *C. albicans* y puede ser de gran utilidad para el desarrollo de nuevos compuestos antifúngicos [40,52]. En el caso del propóleo, el efecto sobre la formación del tubo germinativo se observó a partir de la concentración equivalente a la CMI (0.6 mg/mL) con un 97% de inhibición, y alcanzando el 99% a la concentración de 0.8 mg/mL. Esto sin duda lo hace atractivo como nuevo antifúngico.

Se emplearon tinciones con la finalidad de evaluar algunos daños provocados por el EEP sobre *C. albicans*. En las tinciones de Gram y de azul de toluidina se observó que a mayor concentración del extracto había una inhibición en la formación de blastoconidias, a diferencia de los controles donde se aprecian levaduras en gemación. Lo anterior corrobora lo observado en las curvas de crecimiento y podría ser indicativo de que el propóleo inhibe la división celular al igual que lo hace en bacterias [106], aunque se deberán realizar pruebas encaminadas a esclarecer o confirmar este punto como marcadores de la división celular.

Las correlaciones entre alteraciones morfológicas e inhibición del crecimiento ya han sido descritas previamente [52,52]. En este trabajo se observaron alteraciones semejantes a las encontradas en bacterias, donde se determinó que el propóleo desorganiza el citoplasma, la membrana citoplasmática y la pared celular provocando una bacteriolisis parcial acompañada de inhibición en la síntesis de proteínas [106].

Las tinciones de Gram, azul de toluidina y bromuro de etidio indican que el EEP produce daño en las capas externas de la levadura incluyendo membrana y pared celular. De acuerdo a lo observado con las dos primeras tinciones, el daño podría estarse llevando a nivel de la pared celular debido a que las levaduras se observaron amorfas y colapsadas, lo que de acuerdo con otros autores ocurre cuando el daño es a este nivel [58,102].

En la tinción con Azul de toluidina se observaron cambios en la morfología y tamaño de las levaduras tratadas con EEP, las células se tiñeron de un color pálido y poco uniforme, debido probablemente a la salida de componentes celulares provocados por

una lisis, al igual que ocurre en las bacterias y confirmando lo observado en la tinción de Gram [25,58,102,104].

Una forma sencilla y económica de evaluar si hay alteraciones a nivel de membrana celular es por medio de la tinción con bromuro de etidio. Con ayuda de un microscopio de fluorescencia se puede observar que este compuesto 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 granuloso, lo que podría ser indicativo de una interacción con las mitocondrias [24], al igual que sucede en las tinciones con DAPI. La tinción de las levaduras con el bromuro de etidio 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 [24,52]. 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 [24].

Sin embargo en el caso de las levaduras tratadas con propóleo, se observaron células con una intensidad menor a la que se presentó el control y cuyos porcentajes se incrementaron al aumentar la concentración del extracto. Lo anterior podría ser indicativo también de una lisis de la levadura permitiendo la salida de los componentes celulares, ya que el colorante no fue retenido por las células y por tanto disminuyó la

intensidad de la fluorescencia. Cuando el daño fue en menor grado se observó un aumento en la fluorescencia, cuando el daño fue más severo hubo disminución de la misma. Esto último está de acuerdo con lo observado en las tinciones de Gram y azul de toluidina.

Se sabe que los ácidos débiles como el ácido acético puede 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 [90,104], es por esta razón que se seleccionó como control positivo para nuestras tinciones.

El DAPI es un colorante que tiñe el núcleo de la célula al tener afinidad por el DNA y en un grado menor el RNA. Comparado con el control, las células tratadas presentaron un núcleo de mayor tamaño, teñido más intensamente y se observó fluorescencia a nivel de citoplasma, lo que no ocurrió en las levaduras control. Probablemente esto se deba a que también sufrió daño la membrana nuclear permitiendo la salida del material nuclear.

Desafortunadamente, la información que proporcionan estas tinciones es limitada y únicamente se emplearon con la finalidad de orientar trabajos posteriores, sin embargo, con la finalidad de profundizar en el estudio de estos daños se tendrá que hacer uso de microscopía electrónica.

El efecto del EEP en el crecimiento y daño estructural sobre *Candida albicans* en los resultados obtenidos en este trabajo, nos permitirán seleccionar algunos genes para continuar con el estudio: debido a que hay un efecto a nivel de morfogénesis y de formación de blastoconidias podría haber genes afectados como los que codifican para

las MAP cinasas, los MKC1 o CHS7, que intervienen en ambos procesos; otros genes que podrían verse afectados son los relacionados con el daño estructural como los que intervienen en la formación de la pared celular o de la membrana plasmática [2,26,75,106]. Además de genes involucrados en el metabolismo de los carbohidratos involucrados en el ciclo del glicoxilato y la gluconeogenesis[7,91].

El propóleo es un producto de origen natural, el cual contiene una mezcla de metabolitos secundarios y al cual se le atribuyen diversas propiedades medicinales; sin embargo, existen muchos factores que afectan su actividad biológica [29]. Ésta, sin lugar a duda, es una de las grandes desventajas de un producto de origen natural debido a que es una mezcla compleja de productos naturales en la que hay dificultades para la extracción del principio activo, el cual pueda ser utilizado como una alternativa de algún medicamento sintético. Se ha demostrado que sus efectos biológicos no se pueden atribuir solamente a los compuestos que se encuentran en mayor porcentaje, sino que existe un sinergismo entre todos sus componentes, aún entre los que se encuentran en menor proporción, por lo que en estudios donde se analiza la actividad biológica de compuestos aislados y purificados muestran que hay una disminución considerable en dicha actividad [30,42,50]. En el caso del propóleo, aunado a esto, sus propiedades cambian o se ven afectadas por diversos factores como: el lugar donde se encuentre la colmena por el tipo de flora que la rodea, las abejas, la época y el tipo de extracción y el solvente empleado [6,29].

En este trabajo de tesis, principalmente se han estandarizado condiciones de crecimiento y se han evaluado diferentes daños provocados por el EEP para continuar posteriormente con el estudio de su mecanismo de acción.

XV. CONCLUSIONES

- Se determinó la concentración mínima inhibitoria del EEP proveniente de los apiarios de la FESC, siendo de 0.6mg/mL para la cepa de referencia ATCC1023.
- El EEP inhibe el crecimiento de la cepa de *C. albicans* ATCC 10231 de forma dependiente de la concentración y presentando un efecto fungicida después de 5 h de contacto a una concentración de 0.8 mg/mL (superior a la CMI).
- El EEP inhibe la formación de blastoconidias de forma dependiente a la concentración y a partir de 0.6 mg/mL (concentración de CMI).
- La formación del tubo germinativo también se ve inhibido en las levaduras tratadas con EEP a partir de la concentración equivalente a la CMI (0.6 mg/mL) con un 97% de inhibición, y alcanzando el 99% a la concentración de 0.8 mg/mL.
- En base a las alteraciones morfológicas observadas el EEP produce daño a nivel de pared celular y provoca alteraciones a nivel de membrana plasmática.

ANEXO

CRISTAL VIOLETA AL 2%

Cristal violeta	2.0 g
Etanol de 95°	20.0 mL
Oxalato de amonio	0.8 g
Agua destilada	80.0 mL

Preparación: disolver el cristal violeta en etanol y el oxalato en agua. Mezclar las dos soluciones.

FUCSINA FENICADA

Fucsina básica	5.0 g
Fenol	25.0 g
Etanol de 95°	50.0 mL
Agua destilada	500.0 mL

Preparación: Disolver el fenol en 100 mL de agua, calentar a ebullición en baño maría. Añadir la fucsina y el etanol, disolver y agregar el resto de agua.

SOLUCIÓN DE LUGOL

Yoduro de potasio	2.0 g
Yodo metálico	1.0 g
Agua destilada	100.0 mL

ALCOHOL ACETONA

Acetona	100.0 mL
Etanol de 95°	200.0 mL

AZUL DE TOLUIDINA

Azul de toluidina	1 %
Bórax 1	%

MEDIO YPD

Extracto de levadura	1.0 g
Peptone de caseína	2.0 g
Dextrosa	2.0 g
Agua	100.0 mL

BIBLIOGRAFÍA

1. Abete J. 1998. Antifúngicos: azoles, imidazoles, triazoles. *Medicine*; 7(91): 4231-4241.
2. Alonso R., Navarro F., Molero G., Diez R., Gustin M., Pla J., Sánchez M., Nombela C. 1999. Role of the Mitogen-Activated Protein Kinase Hog1p in Morphogenesis and Virulence of *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology*; 181(10): 3058-3068.
3. Arenas Roberto. 2002. Dermatofitosis en México. *Rev Iberoam Micol*; 19: 63-67.
4. Azcurra A.I., Barembaum S.R., Bojanich M.A., Calamari S.E., Aguilar J., Battellino L.J., Dorronsoro S. 2006. Effect of the high molecular weight chitosan and sodium alginate on *Candida albicans* hydrophobicity and adhesion to cells. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*; 11: E120-5.
5. Bankova V., Popova M., Bogdanov S., Sabatini A.G. 2002. Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. *Z Naturforsch*; 57: 530-3.
6. Bankova V. 2005. Recent trends and important developments in propolis research. *eCAM*; 2(1):29-32.
7. Barelle C.J., Priest C.L., MacCallum D.M., Gow A.R., Odds F. and Brown J.P. 2006. Niche-specific regulation of central metabolic pathways in a fungal pathogen. *Cellular Microbiology*; 8(6): 961-971.
8. Barodka V.M. 2006. Antimicrobial effects of liquid anesthetic isoflurane on *Candida albicans*. *J Transl Med*; 4: 46.
9. Benito A., Ventoura G., Casadei M., Robinson T., Mackey B. 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.
10. Bennet R.J., Johnson A.D. 2005. Mating in *Candida albicans* and the search for a sexual cycle. *Annu Rev Microbiol*; 59: 233-255.
11. Bidart H. T. 2004. Rol de voriconazol y caspofungina en terapia antifúngica. *Rev Chil Infect*; 21 (1): S13-S19.
12. Biggiogera M, Biggiogera F.F. 1989. Ethidium Bromide- and Propidium Iodide-PTA Staining of Nucleic Acids at the Electron Microscopic Level. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*; 37(7): 1161-1166.
13. Brunton L., Lazo J.S., Parker P. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Goodman & Gilman. 11ª edición. Mc Graw-Hill Interamericana. Colombia, 2006.

14. Cafarchia C., De Laurentis N., Milillo M.A., Losacco V, Puccini V. 1999. Antifungal activity of Apulia region propolis. *Parasitologia*; 41 (4):587-90.
15. Calamari S., Bojanich A., Barembaum S., Azcurra A., Virga C. y Dorronsoro S. 2004. Efecto del quitosán de alto peso molecular y del alginato de sodio sobre la proteinasa ácida secretoria de *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol*; 21: 206-208.
16. Calderone R., Braune P. 1991. Adherence and Receptor Relationships of *Candida albicans*. *Microbiol Rev*; 55(1): 1-20.
17. Cantón E., Pemán J. 1999. Curvas de letalidad en antifúngicos. *Rev Iberoam Micol*; 16: 82-85.
18. Carrillo A.J., Brió S., Quindós G. 2001. Una nueva generación de fármacos Antifúngicos. *Rev Iberoam Micol*; 18: 2-5.
19. Castaldo. S., Capasso F. 2002. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*; 73 (1):1-6.
20. Castrillón L. E, Palma A., Padilla C. 2005. Factores de virulencia en *Candida sp.*, *Dermatología Rev Mex*; 49:12-27.
21. Chandrasekhar K., Malathi R., Natarajan G. 2005. Morphological and growth altering effects of Cisplatin in *C. albicans* using fluorescence microscopy". *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*; 4:7.
22. Chen H., Shoichi Takahashi, Michio I., Eiko O., Zhang Z., Kazuaki C., Chen B. 2007. Earthworm fibrinolytic enzyme: anti-tumor activity on human hepatoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Clin Med J*; 120(10): 898-904.
23. Coote P.J. 1998. Inhibitory action of a truncated derivative of the amphibian skin peptide dermaseptin s3 on *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother*; 42(9):2160-70.
24. Corliss D., White W. 1981. Fluorescence of Yeast Vially Stained with Ethidium Bromide and Propidium Iodide. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*; 29(1): 45-48.
25. Cushnie, T. P., Lamb, A. J. (2005). Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. *J. Ethnopharmacol*; 101: 243-248.
26. D'Auria F.D., Tecca M., Scazzocchio F., Renzini V., Strippoli V. 2003. Effect of propolis on virulence factors of *Candida albicans*. *J. Chemother* 15(5): 454-460.
27. Da Silva G.P., Cristina F., Ribeiro L. 2006. Antimicrobial activity of two commercial propolis extracts. *Braz J Oral Sci*; 5: 967-970.

28. Escobar C.M., Zuluaga Á. 2004. Nuevos antimicóticos y su uso en dermatología. *Med Cutan Iber Am*; 32(6): 231-242.
29. Farre R., Frasqueti., Sánchez A. 2004. El própolis y la salud. *Ars Pharmaceutica*. 45(1); 21-43.
30. Fernandes A., Cristina E., Cristina J.E., de Oliveira R., Ribeiro de Souza da Cunha M. de L., Cezar A. 2005. Propolis: anti-*Staphylococcus aureus* activity and synergism with antimicrobial drugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*; 100(5): 563-566.
31. Floréz J. *Farmacología humana*. 4ª edición. Ed Masson. España, 2004.
32. Galván B. y Mariscal F. 2006. Epidemiología de la candidemia en UCI. *Rev Iberoam Micol*; 23: 12-15.
33. Garrido G.I., Cornejo M.A., Salinas E. *Manual de colorantes para laboratorios de ciencias biológicas*. UNAM, Mexico, 2003.
34. Geof B., Botel J.S., Morse S.A. *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. 18ª edición. El manual moderno. México, 2005.
35. Glass N.L., Vollmer C., Staben C., Grotelueschen J., Metzenberg R.L., Yanofsky C. 1988. DNAs of the two mating types alleles of *Neurospora crassa* are highly dissimilar. *Science*; 241: 570-573.
36. González G. Ana R. *Curso de Industrialización de Productos Apícolas Fórmulas apiterapéuticas. Cosméticos, apifármacos y suplementos nutricionales*. Organización Nacional de Apicultores. Veracruz México. 2000.
37. Gow, N. A. R., Brown A. J. P., Odds F. C. 2002. Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr. Opin. Microbiol*; 5:366-371.
38. Gow, N. A. R., Y. Knox, C. A. Munro, and W. D. Thompson. 2003. Infection of chick chorioallantoic membrane (CAM) as a model for invasive hyphal growth and pathogenesis of *Candida albicans*. *Med. Mycol*; 41:331-338.
39. Gregorí B.S. 2005. Estructura y actividad de los antifúngicos. *Rev Cubana Farm*; 39 (2).
40. Hawser S, Islam K. 1999. Comparisons of the effects of fungicidal and fungistatic antifungal agents on the morphogenetic transformation of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother*; 43: 411-413.
41. Hegazi A.G., El Hady F.K. 2001. Egyptian propolis:1-antimicrobial activity and chemical composition of Upper Egypty propolis. *Z Naturforsch*; 56: 82-88.

42. Hegazi A.G., and Abd El Hadyb F. K., 2002. Egyptian Propolis: 3. Antioxidant, Antimicrobial Activities and Chemical Composition of Propolis from Reclaimed Lands. *Z. Naturforsch*; 57: 395-402
43. <http://en.wikipedia.org/wiki/DAPI>
44. Hube B. 2004. From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*; 7:336-341.
45. Hull C.M., Raisner, R.M., Johnson, A.D. 2000. Evidence for mating of the asexual yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science*; 289:307-310.
46. Imhof M., Lipovac M., Kurz C., Barta J., Verhoeven H.C., Huber J.C. 2005. Propolis solution for the treatment of chronic vaginitis. *Int J Gynaecol Obstet*; 89: 127-132.
47. Iranzo M. 2003. Isolation and characterization of an avirulent *Candida albicans* yeast monomorphic mutant. *Medical Mycology*; 41(1): 43-52.
48. Kalant H., Roshlau H. E. Principios de farmacología médica. 6ª edición. Ed Oxford university press.México, D.F., 2002.
49. Kapteyn J.C., Hoyer L.L., Hecht J.E., Müller W.H., Andel A., Verkleij A. J., Makarow M., Van Den Ende H., Klis F.M. 2000. The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Molec Microb*; 35(3): 601-611.
50. Katircioglu H., Mercan N. 2006. Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different regions. *African Journal of Biotechnology*; 5(11): 1151-1153.
51. Katzung G. Farmacología clínica y básica. 9ª edición. El manual moderno. México, 2005.
52. Kesavan C., Raghunathan M, Ganesan N. 2005. Morphological and growth altering effects of Cisplatin in *C. albicans* using fluorescence microscopy. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*; 4: 7.
53. Kesavan C. 2005. 5-Fluorouracil Altered Morphology and Inhibited Growth of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*; 43(12): 6215-6216.
54. Krol W., Scheller S., Shani J. Pietsz G. Czuba Z. 1993. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Arzneimittelforschung*; 43: 607-609.
55. Kosalec I., Pepeljnjak S., Bakmaz M., Vladimir S. 2005. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. *Acta Pharm*; 55: 423-430.

56. Kuhn D. M., George T., Chandra J., Mukherjee P. K., and M. Ghannoum A. 2002. Antifungal Susceptibility of *Candida* Biofilms: Unique Efficacy of Amphotericin B Lipid Formulations and Echinocandins. *Antimicrobial agents and chemotherapy*; 46(6):1773-1780.
57. Kujumgiev A., Tsvetkova I., Serkedjieva Y., Bankova V., Christov R., Popov S. 1999. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol*; 64(3):235-240.
58. Lemar K.M., Turner M.P., Lloyd D. 2002. Garlic (*Allium sativum*) as an anti *Candida* agent: a comparison of the efficacy of fresh garlic and freeze-dried extracts. *Journal of Applied Microbiology*; 93(3): 398-405.
59. Levinson W. *Microbiología e inmunología médicas*. 8ª edición. Mc Graw-Hill Interamericana. España, 2004.
60. Lillie R. D., A. B. *Histopathologic technic and practical histochemistry*. The blakiston Companyinc. New York. 1954.
61. López R., Méndez L.J., Hernández F., Castaño R. *Micología Médica Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio*. Trillas. México, 2004.
62. López V. A., Tapia G. J. M, Macias M. J., Chavoya M. F, Blanco D. R., Mercado A. J. 2006. Utilización del Geopropóleo de *Melipona Colimana* (Hymenoptera: Meliponini) bajo dos tratamientos (térmico y natural) sobre cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. www.apitec.net, publicación bimestral; 59: 3-6.
63. Lynch M., Raphael S., Mellor L., Spare P. *Métodos de laboratorio*. Vol 2. 2ª edición. Nueva editorial Interamericana. México, 1977.
64. Mackenzie, D.W.R. 1962. Serum tube identification of *Candida albicans*. *J Clin Pathol*; 15: 563-565.
65. Macpherson N. 2005. Plasma membrane H⁺ and K⁺ transporters are involved in the weak-acid preservative response of disparate food spoilage yeasts. *Microbiology*; 151(6).
66. Maestre J.R. y Alou L. 2001. Ventajas y desventajas de los antifúngicos de uso tópico. *Revista Española de Quimioterapia*; 14 (3).
67. Magee B.B., Magee P.T. 2000. Induction of Mating in *Candida albicans* by construction of MTL_a and MTL strains. *Science*; 289: 310-313.
68. Martínez S., González J., Culebras J. M. y Tuñón M. J., 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp. XVII*; (6): 271-278.
69. Martins R.S., Pereira E.S., Lima S.M., Senna M.I., Mesquita R.A. Effect of commercial ethanol propolis extract on the *in vivo* growth of *Candida albicans*

collected from HIV-seropositive and HIV-seronegative Brazilian patients with oral candidiasis. *J Oral Sci* 2002; 44: 41-48.

70. Masuoka J. 2004. Surface Glycans of *Candida albicans* and Other Pathogenic Fungi: Physiological Roles, Clinical Uses, and Experimental Challenges. *Clin Microbiol Rev*; 17(2): 281-310.
71. Matsuki M., Kanatsu H., Watanabe T., Ogasawara A., Mikami T., and Matsumoto T. 2006. Effects of Antifungal Drugs on Proliferation Signals in *Candida albicans*. *Biol Pharm Bull*; 29(5): 919-922.
72. Mellado E., Cuenca M. y Rodríguez J.L. 2002. Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 20(10): 523-30.
73. Mesa A.C., Bueno J.G., Betancur G. 2004. Productos naturales con actividad antimicótica. *Rev Esp Quimioterap*; 17(No 4): 325-331.
74. Mesa L.M., Arcaya N., Cañas O., Machado Y., Calvo B. 2004. Evaluación de los caracteres fenotípicos para diferenciar *Candida albicans* de *Candida dubliniensis*. *Rev Iberoam Micol*; 21: 135-138.
75. Mirzoeva O.K., Grishanin R.N., Calderc P.C. 1997. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol Res*; 152(3): 239-46.
76. Mishima S., Ono Y., Araki Y., Akao Y., and Nozawa Y. 2005. Two Related Cinnamic Acid Derivatives from Brazilian Honey Bee Propolis, Baccharin and Drupanin, Induce Growth Inhibition in Allografted Sarcoma S-180 in Mice. *Biol. Pharm Bull*; 28(6): 1025-1030.
77. Murad J.M., Calvi S.A., Soares A.M., Bankova V., Sforcin J.M. 2002. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Ethnopharmacol*; 79(3):331-4.
78. Navarro F., Alonso R., Rico H., Pla J., Sentandreu R. and Nombela C. 1998. A role for the MAP kinase gene MKC1 in cell wall construction and morphological transitions in *Candida albicans*. *Microbiology*; 144:411-424.
79. Odds, F.C. 1994. Pathogenesis of *Candida* infections. *J Am Acad Dermatol*; 31: 2-5.
80. Ota C, Unterkircher C, Fantinato V, Shimizu MT. 2001. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses*; 44: 375-378.
81. Ozcan M. 1999. Antifungal properties of propolis. *Grasas y Aceites*; 50(5):395-398.

82. Palamin R.V., Chinalli M., Celia R., Salvetti C., Caetano F.H. 1999. *Candida sp* in the oral cavity with and without lesions: maximal inhibitory dilution of propolis and periogard. *Revista de Microbiologia*; 30:335-341.
83. Pardi G., Cardozo E.I. 2002. Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal. *Home ediciones*; 40(1).
84. Pendrak M.L., Yan S.S., Roberts D.D. 2003. Haemoglobin regulates expression of mating-type-like locus genes in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*; 3: 764-775.
85. Phillips A.J., Sudbery I., Ramsdale M. 2003. Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA*; 100(24):14327-32.
86. Prats G. *Microbiología clínica*. Editorial médica panamericana. España, 2006.
87. Principal J., Hernández I., D' Aubeterre R., Rodriguez J.G. 2002. Eficacia del propóleo en el control de las helmintiasis de ovinos naturalmente infestados. *Revista Científica*; 12(2): 604-607.
88. Quintana J.C., Alonso O., Díaz M. y López M. 1997. Empleo de la tintura de propóleo al 5 % en la cura de heridas sépticas faciales. *Rev Cubana Estomatol*; 34(1).
89. Quintero M.L., Londoño O. A., Hernández H. F., Manzano G. P., López M. R., Soto C.I., Carrillo M.L., Penieres C.G., García C.G, Cruz Sánchez T.A. 2008. Effect of Mexican propolis extracts from *Apis mellifera* on *Candida albicans in vitro* growth. *Rev Iberoam Micol*: 25(1).
90. Ribeiro G.F., Côte M., Johansson B. 2006. Characterization of DNA damage in yeast apoptosis induced by hydrogen peroxide, acetic acid, and hyperosmotic shock. *Mol Biol Cell*; 17(10):4584-91.
91. Rivas P., Paredes M.C., Cortés J.A. 2006. Infecciones fúngicas invasivas y cáncer. *Rev Colomb Cancerol*; 10(1):67-70.
92. Rodero L., Davel G., Soria M., Vivot W., Córdoba S., Canteros C. E., Saporiti A. y participantes del grupo EMIFN. 2005. Estudio multicéntrico de fungemias por levaduras en la República Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*; 37: 189-195.
93. Salas I., García J., Miranda K. 2000. Factores de virulencia en cepas *Candida albicans*. *Rev. Costarric. Cienc. Méd*; 21 (1-2).
94. Sánchez G., Díaz H., Díaz R.D., Jiménez C., Solórzano F., Miranda M. G. 2004. Epidemiología de las infecciones sistémicas por *Candida* en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI. *Bol Med Hosp Infant*; 61(4): 289-296.

95. Sanz M., Carrano L., Jiménez C., Candiani G., Trilla J.A., Durán A. and Roncero C. 2005. *Candida albicans* strains deficient in CHS7, a key regulator of chitin synthase III, exhibit morphogenetic alterations and attenuated virulence. *Microbiology*; 151, 2623-2636.
96. Saville, S. P., A. L. Lazzell, C. Monteagudo, Lopez J. L. 2003. Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot. Cell*; 2:1053-1060.
97. Saville S.P., Lazzell A.L., Bryant A.P., Fretzen A., Monreal A., Solberg E.O., Monteagudo C., Lopez J.L., and G. Todd M. 2006. Inhibition of Filamentation Can Be Used To Treat Disseminated Candidiasis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*; p. 3312–3316 Vol. 50, No. 10.
98. Sawaya A.C, Palma A.M., Caetano F.M., Marcucci M.C., da Silva Cunha I.B., Araujo C.E., Shimizu M.T. 2002. Comparative study of *in vitro* methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of *Candida*. *Lett Appl Microbiol*; 35(3):203-7.
99. Scorzoni L., Benaducci T, Fusco A.M., Siqueira D.H., da Silva Bolzani V., Mendes M.J.S. 2007. The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida sp* and *Cryptococcus sp*. *Braz J Microbiol* 38:391-397.
100. Sforzin J.M. et al., 2000. Seasonal effect on the immunomodulatory and antibacterial properties. *Venom. Anim. Toxins*, 2001, vol.7, no.1, p.146-147.
101. Shepherd, M.G. 1992. Fungi and parasites in the oral cavity. TAUBMAN, M.A. *Contemporary Oral Microbiology and Immunology*. St. Louis-U.S.A. Mosby - Year Book, Inc. 1 ed. pp. 373-376.
102. Shraideh Z.A, Abu K.H., Sallal A.K. 1998. Ultrastructural effects of date extract on *Candida albicans*. *Mycopathologia*. 142 (3):119-23
103. Silici S, Koc A. N. 2006. Comparative study of *in vitro* methods to analyse the antifungal activity of propolis against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. *Lett Appl Microb* 43(3) 318-324.
104. Stadler N. 2001. Mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* PMA1 H⁺-ATPase inactivation by Fe²⁺, H₂O₂ and Fenton reagents. *Free Radic Res*; 35(6):643-53.
105. Sundstrom, P. 2006. *Candida albicans* hyphal formation and virulence, p. 45-47. *In* J. Heitman, S. G. Filler, J. E. Edwards, Jr., and A. P. Mitchell (ed.), *Molecular principles of fungal pathogenesis*. ASM Press, Washington, DC.
106. Takaisi N.B., Schilcher H. 1994. Electron Microscopic and Microcalorimetric Investigations of the Possible Mechanism of the Antibacterial Action of a Defined Propolis Provenance. *Planta Med*; 60(3):222-227.

107. Tavanti A., Gow A.R., Maiden C.J., Odds F.C., Shaw D.J. 2004. Genetic evidence for recombination in *Candida albicans* based on haplotype analysis. *Fungal Genet Biol*; 41: 553-562.
108. Trusheva B., Popova M., Bankova V., Simova S., Marcucci M.C., Laguna P., da Rocha F. and Tsvetkova I. 2006. Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis. *eCAM (Evidence-based Complementary and Alternative Medicine)*; 3(2): 249-254.
109. Tzung K.W. et al. 2001. Genomic evidence for a complete sexual cycle in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA*; 98: 3249-3253.
110. Valenzuela E., Maldonado C., Paredes J. C. 2003. Actividad antifúngica de quitosano carbamato de etilo en *Candida albicans*. *Boletín Micológico*; 18: 105-110.
111. Webb B.C., Thomas C.J. Willcox D.P., Harry D.W.S., Knox K.W. 1998. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management. A review. Part 1. Factors influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity. *Aust Dent J*; 43: 45-50.
112. Wong S., Fares M.A., Zimmermann W., Butler G., Wolfe K.H. 2003. Evidence from comparative genomics for a complete sexual cycle in the asexual pathogenic yeast *Candida glabrata*. *Genome Biol*; 4(10).
113. Zheng, X., Wang Y., Wang Y. 2004. Hgc1, a novel hypha-specific G1cyclin-related protein regulates *Candida albicans* hyphal morphogenesis. *EMBO J*; 23:1845-1856.