



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**



**UNAM
CUAUTITLÁN**

**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE RT-PCR
PARA EVALUAR LA EXPRESIÓN DEL GEN PIK1
DE *Candida albicans* EN PRESENCIA DEL
EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO**

**TESIS
QUE PRESENTA**

**Rodríguez Rodríguez Juan
Israel**

Para obtener el título de:

Químico Farmacéutico Biólogo

Asesores

**Dra. María Leonor Quintero Mora
Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez
Dr. Carlos Gerardo García Tovar**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



INDICE

ABREVIATURAS	3
INDICE DE FIGURAS	5
INDICE DE TABLAS	6
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	
A. <i>Candida albicans</i>	9
1. Características generales de <i>C. albicans</i>	9
2. Factores de virulencia	11
2.1 Adhesinas	11
2.2 Actividad enzimática extracelular	12
2.3 Proteasas	12
2.4 Fosfolipasas	13
2.5 Cambio morfogenético	13
3. Infecciones causadas por <i>C. albicans</i>	15
B. Antimicóticos	17
1. Clasificación de los antimicóticos	18
2. Productos naturales con actividad antimicótica	20
3. Propóleo	21
3.1 Características generales y composición química	22
3.2 Efecto antimicrobiano	23
Actividad antibacterial	
Actividad antiviral	
Actividad antimicótica	
C. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	26
1. Descripción de la técnica	26
2. RT-PCR	30
D. Antecedentes del trabajo	33
1. Efecto del extracto etanólico de propóleo (EEP) sobre el crecimiento de <i>C. albicans</i> y daños morfológicos	33
2. Efecto del EEP en la expresión genética de <i>C. albicans</i> evaluada por despliegue diferencial	34
3. Gen PIK1	35
HIPÓTESIS	38





OBJETIVOS	39
MATERIALES Y MÉTODOS	40
1. Estrategia experimental	40
2. Cepa de <i>Candida albicans</i>	42
3. Extracto etanólico de propóleo (EEP)	42
4. Determinación del efecto fungicida del EEP	42
5. Crecimiento de <i>C. albicans</i> en presencia de EEP	43
6. Extracción de ARN	43
7. Obtención de ADNc	44
8. Diseño de iniciadores específicos para el gen PIK1 de <i>C. albicans</i>	45
9. Amplificación por PCR	45
RESULTADOS	47
DISCUSIÓN	57
CONCLUSIONES	63
BIBLIOGRAFIA	64
ANEXO	68

ABREVIATURAS





A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
C	Citosina
°C	Grados centígrados
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DEPC	Dietil pirocarbonato
dNTP	Los 4 desoxirribonucleósidos-trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EEP	Extracto etanólico de propóleo
ETOH	Etanol
G	Guanina
g	Gramos
hrs	Horas
Min	Minutos
mL	Mililitro
M-MLVRT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase Recombinant
NCBI	Centro Nacional para Información Biotecnológica
Pb	Pares de bases
PBS	Buffer de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa





PIK1	fosfatidil inositol cinasa 1
PtdIns	fosfatidil inositol
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa
SDA	Agar dextrosa Saboraud
SDS	Dodecil sulfato de sodio
seg	Segundos
T	Timina
TBE	Tris/Borato/EDTA
U	Uracilo
μL	Microlitros
UFC	Unidad formadora de colonias
YPD	extracto de levadura, peptona, glucosa y agar



**INDICE DE FIGURAS**

FIGURA 1	Esquema de la pared celular de <i>C. albicans</i>	10
FIGURA 2	Distintas morfologías de <i>C. albicans</i>	14
FIGURA 3	Sitios de acción de los antimicóticos	20
FIGURA 4	Esquema de PCR	29
FIGURA 5	Esquema de la reacción de RT-PCR	31
FIGURA 6	Determinación del efecto del EEP sobre la cepa de <i>C. albicans</i>	48
FIGURA 7	Alteraciones morfológicas de <i>C. albicans</i>	49
FIGURA 8	Visualización del ARN	52
FIGURA 9	Efecto del número de ciclos en la reacción de PCR	53
FIGURA 10	Efecto del EEP sobre la expresión del gen PIK1 de <i>C. albicans</i>	54
FIGURA 11	Expresión del gen de actina de <i>C. albicans</i>	55
FIGURA 12	Subexpresión del gen PIK1 de <i>C. albicans</i> por efecto del extracto etanólico de propóleo	56



**INDICE DE TABLAS**

TABLA 1	Diferentes formas clínicas de las infecciones causadas por <i>C. albicans</i>	16
TABLA 2	Clasificación de los antifúngicos por su estructura	18
TABLA 3	Clasificación de los antifúngicos por su sitio de acción en el hongo	18
TABLA 4	Amplificación exponencial de los fragmentos de ADN	27
TABLA 5	Preparación de muestras de <i>C. albicans</i> con ETOH Y EEP, para extracción de RNA	43
TABLA 6	Características de los iniciadores PIK11F y PIK11R.	51
TABLA 7	Pureza y concentración del RNA obtenido	51

ANEXO

Preparación de YPD	69
Preparación de YPD (liquido)	69
Preparación de SDA	69
Preparación de alcohol al 70%	69
Tinción de Gram	70
Cristal violeta	70
Lugol	70
Safranina	71
Preparación de TBE	71
Preparación de PBS	71
Preparación de buffer de lisis	71
Buffer de carga	72
Gel de agarosa al 2%	72
Características del “primer” PIK1 1F	72
Características del “primer” PIK1 1R	73





RESUMEN

Uno de los mejores indicadores de la importancia que están adquiriendo las micosis, principalmente las infecciones invasoras, es la alta incidencia con que estas se presentan (Quindós. 2002). El aumento de las infecciones por hongos, unido a la resistencia que han empezado a tener estos agentes a los antimicóticos, han llevado a una constante búsqueda de alternativas terapéuticas eficaces que puedan brindar más y mejores opciones.

Una de estas alternativas es el propóleo, el cual es una sustancia resinosa, gomosa y balsámica, de consistencia viscosa, recogida por las abejas (*Apis mellífera L.*). Su composición química depende básicamente de las fuentes vegetales donde se originaron y de la función específica dentro de la colonia. (Maldonado. 2000) Se ha reportado que el propóleo tiene actividad sobre el crecimiento de la levadura *Candida albicans*, ya sea en combinación con los antifúngicos actuales aumentando su efecto, o bien cuando se administra sólo. (Carrillo, Brió, Quindós. 2001).

Respecto a su mecanismo de acción es poco lo que se conoce hasta el momento y los estudios se han realizado en bacterias, donde se ha demostrado que el propóleo desorganiza el citoplasma, la membrana citoplasmática y la pared celular provocando una bacteriolisis parcial acompañada de la inhibición de la síntesis de proteínas. (Holderna, Kedzia. 1987)

Los resultados que hemos obtenido previamente en el laboratorio indican que el extracto etanólico de propóleo (EEP) aislado en la FES Cuautitlán inhibe el crecimiento, la formación de blastoconidias y la formación de tubo germinativo (importante factor de virulencia de *C. albicans*), además de que provoca un daño a nivel de membrana y pared celular. Estos daños han sido reportados también con propóleos de diferentes orígenes geográficos. (Holderna, Kedzia. 1987)

Con la finalidad de profundizar en el mecanismo de acción molecular del propóleo sobre la levadura *C. albicans*, anteriormente se realizaron estudios para evaluar el efecto sobre la





expresión diferencial de genes encontrando alteraciones importantes. Uno de los genes que presentó una disminución en su expresión fue el gen PIK1 (fosfatidil inositol cinasa 1), del cual se conoce poco acerca de su función en *C. albicans*, sin embargo, en *Sacharomyces cerevisiae* se ha demostrado que es esencial para la viabilidad de la levadura participando en las funciones de secreción, formación de vacuolas a nivel de aparato Golgi y membrana y en la endocitosis.

Debido a que los resultados que se obtuvieron anteriormente, estuvieron basados en la técnica de despliegue diferencial, la cual nos permite analizar un gran número de genes al mismo tiempo, estos deben ser verificados por otras metodologías. Con la finalidad de corroborar estos resultados, en este trabajo se evaluó el efecto del EEP sobre la expresión del gen PIK1 de *C. albicans*, por medio de la técnica de RT-PCR.

Para lo anterior fue necesario evaluar la actividad antimicótica del EEP debido a las posibles variaciones que se presentan entre diferentes lotes del mismo, por otra parte se diseñaron iniciadores específicos para la amplificación del gen y finalmente se estandarizaron las condiciones de RT-PCR que nos permitieron evaluar su expresión diferencial bajo la exposición a diferentes tiempos y concentraciones del extracto. Empleándose como control interno la expresión del gen de actina.

Los resultados obtenidos corroboraron los obtenidos en la técnica de despliegue diferencial, es decir, una subexpresión del gen PIK1 de *C. albicans* dependiente de la concentración y tiempo de exposición al EEP.

Con estos resultados podemos explicar en parte, el mecanismo de acción del extracto etanólico de propóleo en la levadura y entender los daños observados como la inhibición del crecimiento, de la formación de blastoconidias y de las alteraciones a nivel de pared y membrana celular.





INTRODUCCIÓN

A. *Candida albicans*

1. Características generales de *C. albicans*

El género *Candida* está integrado por una colección heterogénea de levaduras pleomórficas. La nomenclatura de este grupo ha cambiado a través del tiempo, ha recibido aproximadamente 100 sinónimos. Berkhout, en 1923 separa el grupo *Monilia* en 2 géneros uno en el que se incluyen mohos asociados a plantas (*Monilia*), otro de levaduras asociadas a animales de sangre caliente (*Candida*). En 1959 en el International Botanical Congress, en Montreal se reconoce oficialmente como género *Candida* (JL, LR, HF. 2006).

Las levaduras de este género son miembros de la flora normal de la piel, las mucosas y el aparato gastrointestinal. Las especies de *Candida* colonizan las superficies mucosas de todos los humanos durante o poco después del nacimiento, y el riesgo de infección endógena siempre está presente. Varias especies del género *Candida* pueden producir candidiasis, la cual, es la micosis sistémica más común, y los agentes más comunes son *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. dubliensis*, *C. krusei*. Siendo la de mayor prevalencia *C. albicans*. (Brooks, et-al. 2008)

La clasificación taxonómica es la siguiente (JL, LR, HF. 2006).

Phylum: Deuteromycota

Clase: Blastomycetes

Orden: Cryptococcales

Familia: Cryptococcaceae

Género: *Candida*

Especie: *albicans*

C. albicans suele presentarse como una célula oval levaduriforme de 2 a 4 micras, con paredes finas (Pardi, Cardozo. 2002), son organismos unicelulares que se reproducen por gemación. Si las yemas (blastoconidias) se elongan y permanecen unidas a la célula madre, forman cadenas denominadas pseudohifas (pseudomicelios), algunas especies también pueden producir auténticas hifas y/o clamidiosporas (Pardi, Cardozo. 2002),).





Son organismos poco exigentes, que crecen de 24 a 48 hrs. en los medios de cultivo habituales. (Del Palacio, Cuétara. 2009)

La pared celular de *C. albicans* está compuesta principalmente por los polisacáridos mananos, glucanos y quitina. Aunque la síntesis de los componentes de la pared celular está dinámicamente influenciada por las condiciones de crecimiento y estados metabólicos, en la literatura encontramos datos con respecto a la composición química. Los mananos representan alrededor del 15.2 al 22.9% de la pared celular de la levadura (peso seco), o aproximadamente el 40% del total de polisacáridos de la pared celular. Los 1,3-β-D-glucanos y 1,6-β-D-glucanos abarcan del 47 al 60% del peso de la pared celular. Las proteínas abarcan del 6 a 25%, los lípidos del 1 a 7%, y la quitina del 0,6 al 9% del peso de la pared celular. Las composiciones químicas de la pared celular de la levadura y los tubos germinativos son relativamente similares, aunque las cantidades de los glucanos solubles en álcali, los glucanos álcali insolubles y la quitina de *C. albicans* varían de acuerdo con la forma de crecimiento (Fig. 1.) (Calderone, Braun. 1991)

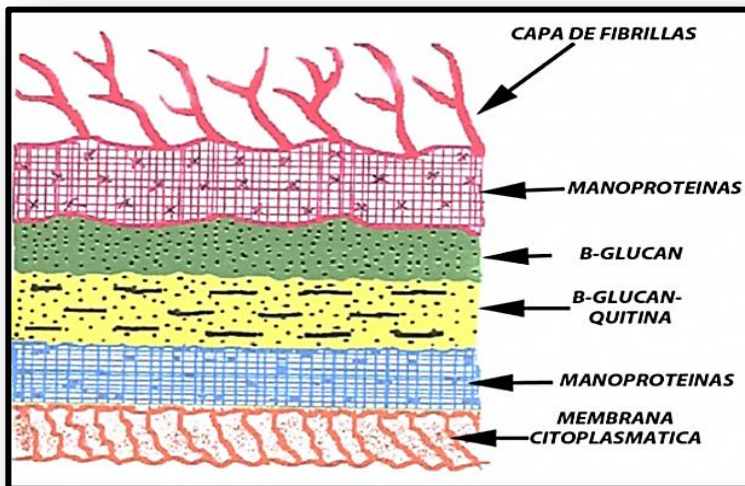


Figura 1.- Esquema de la pared celular de *C. albicans*. Se muestran sus principales componentes y su posible distribución (Calderone, Braun. 1991)

Durante las primeras etapas de formación del tubo germinal, se sintetizan casi exclusivamente 1,3-β glucanos; la quitina se encuentra en las levaduras, en las hifas y los tubos germinales, aunque la proporción es mayor en las hifas. (Pardi , Cardozo. 2002)





2. Factores de virulencia

Existe una compleja interacción de *C. albicans* con su huésped ya que lo invade en una amplia variedad de condiciones predisponentes que van desde defectos inmunes específicos, hasta el uso de prótesis dentales mal ajustadas (Calderone, Fonzi. 2001).

Son muchos los factores que contribuyen a la virulencia de *C. albicans*. Las adhesinas que se localizan en la superficie celular promueven la unión y posiblemente la penetración al tejido del huésped. Las proteinasas, lipasas y fosfolipasas secretadas proporcionan los nutrientes que la célula necesita y promueven la invasión. Las transiciones morfológicas entre levaduras y pseudohifas o hifas promueven la diseminación y penetración de las células de *C. albicans*. La expresión de algunas adhesinas y proteinasas secretadas están coordinadas con el cambio morfogenético. El cambio fenotípico, asociado a la expresión de diferentes propiedades morfológicas, metabólicas y proteínas de superficie responde a distintos estados epigenéticos y está asociado con cambios en la virulencia ayudando al hongo a evadir el sistema inmune. Un factor más es la capacidad para formar biopelículas. Existen además otras características que no corresponden a factores de virulencia pero que permiten la interacción con el huésped y contribuyen a la patogénesis. Estos incluyen la flexibilidad del hongo a adaptarse a diferentes nichos en el organismo y respuestas a estrés que permiten que el hongo sobreviva después de un ataque por el sistema inmune del huésped.

2.1 Adhesinas

Las adhesinas son biomoléculas que promueven la adhesión de *C. albicans* a las células del huésped o a superficies inertes. Los estudios en esta área se han realizado gracias a la obtención de mutantes no adhesivos de *C. albicans* que se vuelven avirulentos, así como la identificación de proteínas de la levadura que se unen a proteínas de la matriz extracelular (ECM) de células de mamíferos, tales como fibronectina (FN), laminina, fibrinógeno y colágeno tipo I y IV. Estos estudios sin duda son cruciales para la comprensión de la interacción de *C. albicans* con el hospedero. Existen diferentes tipos de





adhesinas en *Candida*, como Als, Hwp1p, Int1p y Mnt1p, las cuales son glucoproteínas que se encuentran en la superficie celular. Als1 comparte una secuencia con la glucoproteína de adhesión a superficies celulares llamada α -aglutinina, indispensable para el reconocimiento célula-célula. Int1 juega un papel importante en la adherencia y filamentación de *C.albicans* (Calderone, Fonzi. 2001).

2.2 Actividad enzimática extracelular

Candida albicans puede producir varias enzimas extracelulares, principalmente proteasas, fosfolipasas y lisofosfolipasas. Estas enzimas hidrolíticas pueden modificar los componentes de la membrana, provocando un mal funcionamiento, tienen la capacidad de romper polímeros que proporcionan nutrientes accesibles para el crecimiento de los hongos e inactivan moléculas útiles en la defensa del organismo. Otras especies no patógenas de *Candida*, con una estructura similar no producen estas fosfolipasas, lo que indica su importancia en la patogenicidad (Calderone, Fonzi. 2001).

2.3 Proteasas

Las llamadas aspartato protein cinasas (SAP's), son características de las especies patógenas de *Candida*, proporcionan al hongo un sistema proteolítico ayudando a la digestión de moléculas proteínicas para adquirir nutrientes, digerir las membranas del huésped y facilitar la adhesión, la invasión a tejidos. Se ha visto incluso que digieren moléculas del sistema inmune del huésped. La producción de proteasas se ha detectado en cepas analizadas de la especie de *Candida*, pero la presencia de fosfolipasas sólo se ha detectado en *Candida albicans* (Calderone, Fonzi. 2001).





2.4 Fosfolipasas

Se han identificado cuatro fosfolipasas (PLA, PLB, PLC y PLD), de las cuales sólo la PLB1 ha demostrado ser necesaria para la virulencia en un modelo animal de candidiasis. La PLB1A es una glucoproteína de 84 kDa, se secreta y detecta en la punta de las hifas durante la invasión a los tejidos. Estas enzimas son importantes para el crecimiento de levaduras y la remodelación de la membrana de la célula parasitaria. También están implicadas en el mecanismo de la invasión de los tejidos del huésped (Calderone, Fonzi. 2001).

2.5 Cambio morfogénético

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 (Figura 2). 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 (Castrillón 2005). Los diferentes estados morfológicos de la levadura se pueden inducir mediante factores como: pH, concentración de nutrientes, temperatura, disponibilidad de fosfato, etc.; cuando *Candida* va a formar el tubo germinativo, una pequeña porción de su superficie se restringe, esta es la zona donde tendrá lugar el crecimiento apical del tubo germinativo que sufre progresivas elongaciones, la formación de éste requiere de la polarización apical de la actina del citoesqueleto la cual forma un anillo, el mecanismo completo de esta polarización no se conoce en *C. albicans* sin embargo estudios en *Saccharomyces cerevisiae* indican que tiene lugar mediante la regulación de ciclinas dependientes de cinasas.



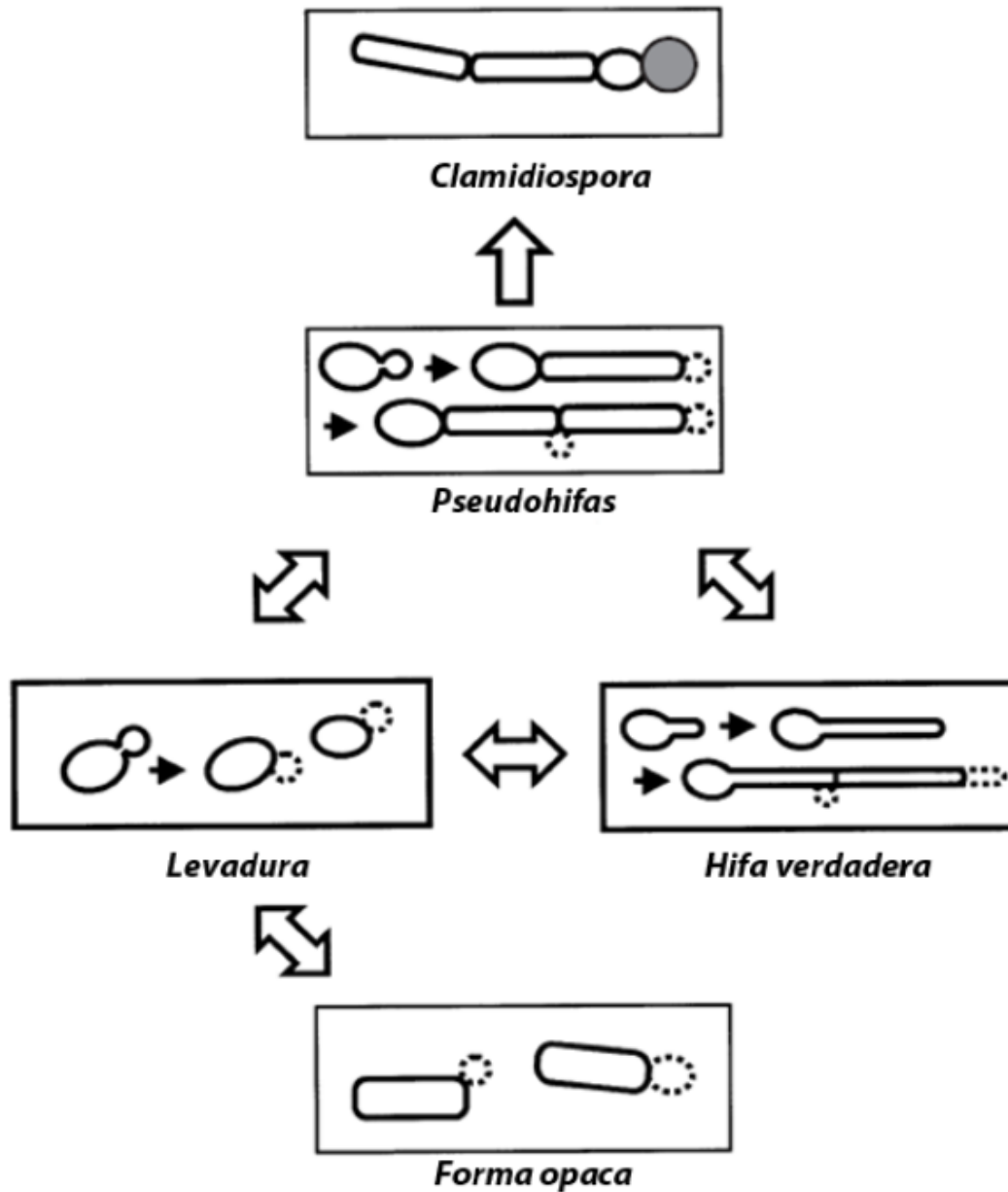


Figura 2. Distintas morfologías de *Candida albicans*. Las formas de levadura y el crecimiento de hifas son predominantes durante la infección del huésped humano. Las clamidiosporas son células esféricas de pared gruesa que se presentan en situaciones adversas como baja concentración de nutrientes. Las células hijas y las regiones de la expansión celular se indican con líneas de puntos (Calderone, Fonzi. 2001)..





Finalmente se ha propuesto que el fenómeno de cambio fenotípico (phenotypic switching) contribuye a la plasticidad de la levadura. Algunos de los estudios se han centrado en un sistema de comunicación, en particular, en el interruptor blanco-opaco, lo que se refiere al color de las colonias y la morfología de cada fenotipo, este interruptor se encuentra en la cepa (WO-1), pero el cambio fenotípico es también observado en aislados clínicos.

Las diferencias en el fenotipo de la colonia están acompañadas por cambios en las propiedades de adherencia, expresión antigénica y afinidades por el tejido (Calderone, Fonzi. 2001)..

La capacidad de presentar una variedad de transiciones fenotípicas con alta frecuencia, que van desde diferencias en la morfología de las colonias a diferencias en la forma celular, superficie, y la permeabilidad, confiere propiedades importantes en la patogénesis y son de gran interés intrínseco como procesos biológicos.

3. Infecciones causadas por *C. albicans*

Candida albicans puede producir infecciones superficiales que afectan a piel, uñas y mucosas. La piel húmeda y las mucosas oral y vaginal son lugares donde la infección candidiásica es frecuente. Sin embargo, las candidiasis más graves (candidiasis diseminadas) se observan en personas inmunosuprimidas o con enfermedades subyacentes que predisponen a sufrir esta infección. En la tabla 1 se muestran las principales características





Tabla 1 . Diferentes formas clínicas de las infecciones causadas por *C. albicans* (MURRAY 2006, ARENAS 2003, BONIFAZ 2000)

FORMA CLÍNICA	CUADRO CLÍNICO	DESCRIPCIÓN
Genital	Leucorrea blanco, espumoso, grumoso, de aspecto viscoso muy pruriginoso, que recubre la pared de la vagina y el endocervix	Infección más frecuente en el aparato genital de la mujer. Halladas también en niñas recién nacidas y en mujeres con diabetes por el incremento de glucosa en los tejidos, así como el paciente con tratamientos prolongados de antibióticos. En caso de los hombres, se presenta como balanopostitis; es una lesión en el pene y en el surco balanoprepusial con eritema y placas blanquecinas.
Oral	También conocida como algodóncillo, cepillo o moguet. Es una placa pseudomembranosa blanquecina cremosas, que pueden cubrir la lengua, mucosa oral y la comisura labial	Se ve en recién nacidos de madres con infecciones vaginales, pacientes con enfermedades terminales como el carcinoma.
Onicomycosis	La uña incrementa de grosor, opaciéndose, se oscurece y en ocasiones aparecen estrías En el borde la uña hay inflamación, edema, dolor y puede producir expulsión de pus	La lesión es en la uña y en el borde de la misma (paroniquia), debido a la excesiva humedad.
Granulomas	Lesiones verrugosas vegetantes.	Se observa en niños inmunosuprimidos, o en pacientes con diabetes mellitus y VIH.
Mucocutánea crónica	Las lesiones abarcan todo el cuerpo, las mucosas y la piel son granulomatosas, produciendo invasión en todos los órganos.	Es casi exclusivo en niños con defectos genéticos o en la función del timo, que los llevan a alteraciones en la inmunidad celular.
Urinaria	Afecta al riñón produciendo pielonefritis, en la vejiga y uretra como poloquiuria, manifestaciones uretritis y dolor vesicular.	Se observa en pacientes diabéticos con catéteres y trastornos en las corticoides.
Sistémica profunda	Están asociadas por candidiasis broncopulmonar, endocarditis, meningoencefalitis.	Ocurre en pacientes con inmunosupresión humoral y celular como aquellos con VIH, debido a la invasión sanguínea que éstos presentan.



**B. Antimicóticos**

El concepto de antifúngico o antimicótico engloba cualquier sustancia capaz de producir una alteración de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia ya sea directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del hospedero. (Arenas 2008).

Hasta 1940 se disponía de muy pocos agentes para el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas. El desarrollo de los polienos fue el mayor avance en la micología clínica. La anfotericina B mostró efectividad y durante mucho tiempo fue la única droga disponible para la terapia de las micosis sistémicas, pero sus efectos secundarios principalmente la nefrotoxicidad limitó su uso. Varias décadas después comenzó el desarrollo de los azoles. De este grupo, el ketoconazol descubierto en 1980, fue el primer antimicótico oral para infecciones sistémicas. Posteriormente vendrían los triazoles de primera generación: fluconazol e itraconazol, que representaron el segundo gran avance en el tratamiento de las infecciones micóticas, con un mejor perfil de seguridad que la anfotericina B y el ketoconazol. Sin embargo, el desarrollo de resistencia, la toxicidad, las interacciones medicamentosas y su espectro sub-óptimo para las micosis emergentes, hicieron necesarias nuevas investigaciones. Lo anterior llevó al desarrollo de los triazoles de segunda generación: voriconazol, posaconazol, ravuconazol y albaconazol (Escobar, Zuluaga. 2004).

Paralelo a la evolución de los azoles, en 1970 fueron descubiertas las equinocandinas al hacer estudios de los productos de fermentación de los hongos, pero los estudios de fase II mostraron problemas de toxicidad en los pacientes por lo que fueron abandonadas. Posteriormente se estudiaron los nuevos derivados semi-sintéticos: caspofungina, anidulafungina y micafungina, los cuales presentan un novedoso mecanismo de acción inhibiendo de manera específica y no competitiva el complejo enzimático B [1,3]- D-glucan sintetasa, lo que impide la formación de polímeros de glucan que es el mayor componente de la pared celular en los hongos, lo anterior al unirse directamente a una proteína FKS1P. (Escobar, Zuluaga. 2004).





1. Clasificación de los antimicóticos

Los antimicóticos pueden clasificarse de acuerdo a su estructura química (Tabla 2) o a su sitio de acción (tabla 3).

Tabla 2 Clasificación de los antifúngicos por su estructura (Gregorí Valdés 2005)

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 3 Clasificación de los antifúngicos por su sitio de acción en el hongo (Gregorí Valdés . 2005)

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

Los modos de acción de la mayoría de estas drogas son bien conocidos (Groll, et.al., 1998) y su sitio de acción se muestra en la figura 3. Los imidazoles y triazoles como clotrimazol, ketoconazol, itraconazol, miconazol y fluconazol entre otros actúan inhibiendo la 14- α -desmetilasa, una enzima involucrada en la conversión del lanosterol a ergosterol dentro de la síntesis de este último. De esta forma la cantidad de ergosterol, componente





esencial de la membrana celular de los hongos, se ve disminuida provocando su desestabilización y permitiendo la salida de los componentes celulares (Gupta, et. al. ,1994).

La anfotericina B, nistatina y natamicina pertenecen al grupo de los antimicóticos polienicos. Ellos forman un complejo con el ergosterol en la membrana celular desestabilizándola y provocando cambios en su permeabilidad perdiendo así proteínas, carbohidratos y nucleótidos (Groll, et. al. 1998). Se ha demostrado además que la anfotericina B es capaz de inducir apoptosis a *Candida albicans* (Phillips, et. al., 2003)

El antimicótico fluorocitosina es un precursor de la citosina. Una vez que ha penetrado a la célula por medio de la enzima citosina permeasa, este es transformado a 5- fluorouracilo, que es un compuesto tóxico (Diasio, et. al., 1978).

El mecanismo de acción de la griseofulvina se basa en que tiene afinidad importante para determinadas proteínas como la tubulina. Esta proteína forma parte de los microtúbulos e interfiere en la mitosis por determinadas funciones de transporte. Además tiene afinidad para unirse al DNA.



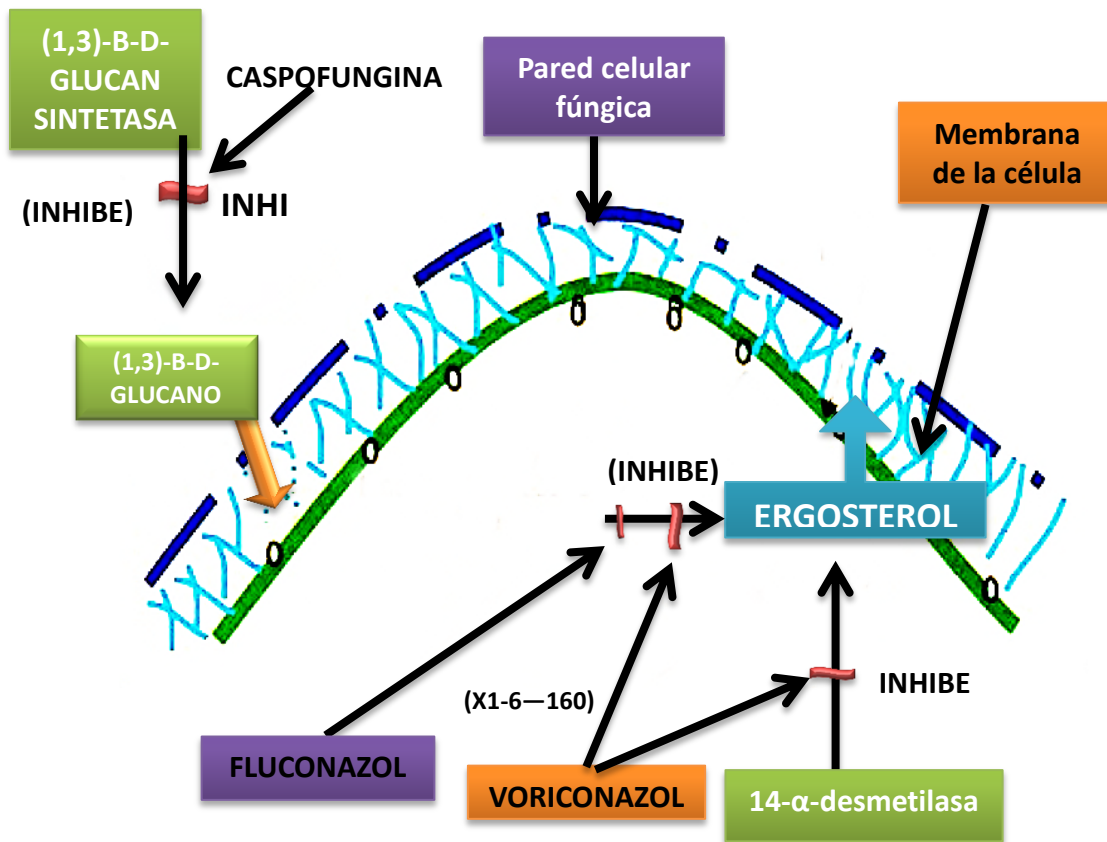


Figura 3. Sitios de acción de los antimicóticos (Bidart H. Teresa 2004)

2. Productos naturales con actividad antimicótica

Según la OMS en el 2004, aproximadamente el 80% de la población mundial utiliza productos naturales con fines medicinales. Además, se ha informado de que un gran número de los medicamentos antibacterianos y antitumorales provienen de fuentes naturales. Así mismo la FDA aprobó, entre 1983 y 1994, 520 nuevos fármacos, de los cuales el 39% eran de origen natural o sus derivados. Los vegetales sintetizan metabolitos secundarios, como las fitoanticipinas y las fitoalexinas, que utilizan para defenderse de infecciones por agentes fitopatógenos, entre ellos los hongos. Por esta razón, dichas moléculas pueden ser candidatas para estudios in vitro contra agentes micóticos implicados en infecciones humanas (Mesa, Bueno. 2004).





3. Propóleo

La palabra propóleo o propolis se deriva del griego pro, a favor o en defensa, y polis, ciudad, es decir, defensa de la ciudad (o de la colmena) (Ghisalberti, E. L. 1979).

El propóleo es una sustancia resinosa recogida por las abejas a partir de partes de plantas, yemas y exudados. Las abejas lo utilizan como un sellador para sus colmenas y más importante, para evitar la descomposición de las criaturas que han sido asesinados por las abejas después de una invasión de la colmena.

El propóleo es un remedio natural que se ha empleado ampliamente desde tiempos antiguos. Los egipcios conocían muy bien las propiedades anti-putrefacción y lo utilizaron para embalsamar cadáveres. El propóleo fue reconocido por sus propiedades medicinales por los médicos Griegos y Romanos, siendo los más conocidos; Aristóteles, Dioscórides, Plinio y Galeno. El propóleo se empleó como antiséptico y cicatrizante en el tratamiento de heridas y como desinfectante bucal. También fue reconocido por otros pueblos no relacionados con las civilizaciones del Viejo Mundo: los Incas emplearon el propóleo como agente antipirético, y en Londres aparece en las farmacopeas del siglo XVII como una droga oficial. Entre los siglos XVII y XX, se hizo muy popular en Europa por su actividad anti-bacteriana

Los herbolarios modernos recomiendan el propóleo por su actividad antibacteriana, antimicótica, antiviral, por sus propiedades hepatoprotectoras y anti-inflamatorias. Aplicado externamente, el propóleo alivia los diversos tipos de dermatitis causadas por bacterias y hongos. Actualmente es utilizado como un remedio popular y está disponible en forma de cápsulas (ya sea en forma pura o en combinación con el gel de aloe y rosa canina o polen), como un extracto (alcohólico o acuoso), como enjuague bucal (en combinación con melisa, salvia, romero y malva), en pastillas para la garganta, cremas, y en forma de polvo (para ser usado en gargarismos o para uso interno, una vez soluble en agua) (Castaldo, Capasso. 2002).





3.1 Características y composición química

El propóleo es un material lipófilo, duro y frágil en frío, pero suave, flexible, y muy pegajoso cuando está caliente, por eso también recibe el nombre de beeglue. Posee un agradable olor aromático y varía en color, dependiendo de su origen y tiempo de recolección. Entre los tipos de sustancias químicas que se encuentran en el propóleo son ceras, resinas, bálsamos, aceites etéreos y polen, entre otros. La proporción de este tipo de sustancias es variable y depende del lugar y el momento de la recolección. Los compuestos identificados en la resina del propóleo vienen de 3 fuentes: exudados de plantas recogidas por las abejas; sustancias secretadas por el metabolismo de las mismas, y los materiales que se introducen durante la elaboración de propóleo (Marcucci. 2002).

Algunos datos interesantes surgen del limitado trabajo que se ha llevado a cabo acerca de los componentes del propóleo. El mayor grupo de compuestos aislados son los flavonoides, que se encuentran en el reino vegetal. No es de extrañar, por tanto, que los mismos flavonoides que se han aislado de diferentes muestras de propóleos y se correlacionen los presentes en las plantas de donde las abejas recogen el propóleo. Se ha sugerido que algunos de ellos son modificados por una enzima presente en la miel de la abeja. En base a lo anterior se puede pensar que cualquier transformación de los diversos componentes del propóleo debe tener lugar en presencia de las enzimas en la saliva de las abejas durante la recolección. Además, los compuestos aromáticos simples que se encuentran en el propóleo también se producen comúnmente en las plantas (Burdock.1998).





3.2 Efecto antimicrobiano

Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana del propóleo es en gran medida debida a los flavonoides, ácidos aromáticos y ésteres de ácidos presentes en la resina. La galangina, pinocembrina y pinostrobrina han sido reconocidos como los agentes más eficaces contra las bacterias. El ácido caféico contribuye también a la acción bactericida del propóleo. Kedzia y colaboradores (1990) informaron que el mecanismo de la actividad antimicrobiana podría ser atribuido a un sinergismo entre los flavonoides, hidroxiácidos y sesquiterpenos. Scheller (1977b) y Krol (1993) también observaron este efecto.

Se ha reportado que organismos como *Staphylococcus spp* and *Streptococcus spp*. tienen alta sensibilidad frente al propóleo, en otros estudios se obtuvo una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 10 mg/ml y una concentración bactericida mínima (CMB) de 120 mg/ml al enfrentar al propóleo contra la cepa de *S. aureus* 209P. Así mismo se ha reportado que el EEP inhibe el crecimiento de otras bacterias, dentro de las que se incluyen los géneros *Streptococcus* y *Bacillus*. También se reporta que el EEP a una concentración de 3 mg/ml inhibe en su totalidad el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* (Marcucci. 2002).

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 (Mirzoeva O.K., 1997).

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 *Streptococcus* 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 (Takaisi N.B., Schilcher H. 1994).

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 debido al debilitamiento de la pared celular y una lisis debido a un choque osmótico (Cushnie T.P, 2005).

Actividad antiviral

Los estudios realizados respecto a su efecto en virus son escasos, pero se reporta que diferentes extractos de propóleo inhiben la reproducción del virus de la influenza A y B y el virus de Newcastle.

Se ha investigado el efecto *in vitro* del propóleo sobre diferentes virus de DNA Y RNA, entre los cuales se incluyen el virus del herpes simple tipo 1 una cepa mutante resistente al aciclovir, herpes simple tipo 2, adenovirus tipo 2 y poliovirus tipo 2. En el caso del poliovirus se observó claramente una inhibición de la propagación, por otro lado a una concentración de 30 µg/ml el propóleo redujo el título del virus del herpes simple a 1000. Por último se observó que el adenovirus fue menos susceptible al propóleo. Se sabe que los flavonoides y derivados de ácidos aromáticos presentes en el propóleo presentan actividad antiviral, un ejemplo es el ácido cafeico el cual se encontró que tiene una débil actividad frente a la influenza, asimismo la vaccinia y adenovirus resultaron ser más sensible que otros virus como el polio y el virus de la parainfluenza (Marcucci. 2002).

Actividad antimicótica

Los reportes indican que el propóleo tiene actividad contra diversos hongos, entre los que se encuentran *Trichophyton* y *Mycrosporium* (Marcucci. 2002).





En el caso particular de *C. albicans* se ha demostrado la actividad biológica del extracto de propóleo con extractos de diferentes orígenes geográficos, principalmente de Egipto, Turquía, Brasil, Bulgaria, El Salvador y Cuba (2,7,11,19,22,25). Sin embargo, los estudios efectuados con propóleos de origen egipcio mostraron que la actividad variaba dependiendo de la zona geográfica de donde se obtuvo el propóleo y esto se atribuye a la presencia de compuestos alifáticos, ácidos aromáticos y ester de cafeato diferentes a los de otras muestras (Faten, El Hady, Hegazi. 2002.).

Desde 1988 se ha comparado la actividad del extracto etanólico de propóleo en diferentes cepas del género *Candida* aisladas de diferentes partes del cuerpo humano encontrando un efecto fungistático a una concentración de 0.55 mg/ml (21). Otros autores encontraron actividad fungicida en el EEP estudiado con una concentración de 3 a 7 mg/ml, siendo *C. albicans* más sensible que otras especies de su género como *C. tropicalis*, *C. krusei* o *C. guilliermondii* (Faten, El Hady, Hegazi. 2002.).

Algunos autores han recomendado la utilización del propóleo como antiséptico para la prevención y tratamiento de la candidiasis oral (JL, LR, HF. 2006. F K., El Hady ., G. 2002). Se ha mencionado, incluso, que el EEP podría ser usado como medicina alternativa en el tratamiento de la candidiasis en pacientes VIH positivos, siendo tan efectivo como la nistatina y superando a otros antifúngicos como el clotrimazol, eleconazol y el fluconazol (Burdock.1998). El propóleo también ha sido empleado para el tratamiento de infecciones vaginales crónicas, con el 61.1% de las pacientes mostrando mejoría después de seis meses sin necesidad de otro tratamiento (Calderone, Fonzi 2001).

Aún cuando existen una gran cantidad de reportes donde se evalúa el efecto fungicida del extracto etanólico de propóleo en *Candida albicans*, la mayoría de ellos no abordan el mecanismo de acción. D'Auria y colaboradores (2003) encontraron que los extractos etanólicos de propóleo empleados tenían un efecto citocida presente entre los 30 seg y 15 min, observaron además inhibición de la conversión levadura-hifa aún a bajas concentraciones del extracto, y una inhibición de la actividad de fosfolipasa dependiente de la dosis y el tiempo. Por otro lado, no encontraron un efecto claro en lo que





corresponde a la adherencia a células epiteliales, así como en la hidrofobicidad de su estructura, pero demostraron que había daño en la membrana.

En otro artículo Mello y colaboradores (2006) emplearon el propóleo verde de Brazil y evaluaron su efecto sobre la formación de tubo germinativo de *C. albicans*, observando una inhibición del mismo a partir de 0.33 $\mu\text{g/ml}$. Describieron además el daño ultraestructural con microscopía electrónica de transmisión encontrando hiperplasia y cambios en la superficie celular a 0.43 $\mu\text{g/ml}$. Lo anterior sugiere que el efecto antifúngico del propóleo es debido a cambios en la pared celular conduciendo a un incremento de tamaño y ruptura de la membrana.

C. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la técnica más importante y de mayor utilidad en los laboratorios de biología molecular.

1. Descripción de la técnica de PCR

El fundamento de la técnica de PCR involucra los siguientes pasos:

- 1) Desnaturalización del ADN bicatenario presente en la muestra para separar las dos cadenas, mediante temperaturas superiores a 90°C.
- 2) Unión específica de los iniciadores (oligonucleótidos sintéticos también conocidos como iniciadores, oligos, cebadores) a las cadenas sencillas mediante complementariedad de bases. La temperatura a la que se realiza esta unión (T_m , temperatura de fusión o T_a , temperatura de alineamiento) es muy importante para controlar la especificidad de la reacción y depende de la composición de bases y del tamaño de los iniciadores. Cada uno se une a una cadena diferente delimitando la secuencia de nucleótidos que se pretende amplificar. La selección de ellos constituye uno de los puntos más críticos del ensayo de PCR.
- 3) Extensión de la cadena de ADN que se refiere a la copia de la cadena molde a partir de los iniciadores utilizando los nucleótidos presentes en la solución. Dicha extensión la lleva a cabo la enzima ADN polimerasa, que inicia su actividad tras





reconocer la unión de los mismos a las cadenas de la muestra (Pérez, Baridón, Henen, Venegoni. 2006).

Cabe aclarar que en cada paso de desnaturalización, hibridación y síntesis, se replica no solo el molde original, sino las copias que se hayan hecho en ciclos anteriores. Así la cantidad de ADN molde o diana se duplica en cada ciclo; por lo tanto 20 ciclos de PCR serán suficientes para amplificar la secuencia diana un millón de veces (Tabla 4).

Tabla 4. Amplificación exponencial de los fragmentos de ADN. Imaginemos que empezamos con una molécula de doble cadena de DNA. Tras los primeros ciclos, casi todo el producto consiste solo en una secuencia entre los extremos exteriores de los cebadores. La cantidad son el número de cadenas sencillas que hay cuando todo el DNA es desnaturalizado (*Salas. Arenas. 2001*) Read A., Donnai D.

	ADN de partida	Producto A. El molde es el ADN de partida; 1 extremo definido		Producto B. El molde puede ser el producto A o el producto B; 2 extremos definidos		
	Cadenas sencillas	Fabricado en este ciclo	Total acumulado	Fabricado en este ciclo utilizando A como molde	Fabricado en este ciclo utilizando B como molde.	Total acumulado
Después de 1 ciclo	2	2	2			
Después de 2 ciclos	2	2	4	2	-	2
Después de 3 ciclos	2	2	6	4	2	8
Después de 4 ciclos	2	2	8	6	8	22
Después de 5 ciclos	2	2	10	8	22	52





La especificidad de la PCR está siempre ligada a los iniciadores que se unen solo al ADN diana deseado y no a cualquier secuencia. La especificidad necesaria se alcanza utilizando secuencias cortas (18-20 nt) y escogiendo muy bien la temperatura de alineamiento. Si la temperatura es demasiado baja, los iniciadores serán capaces de hibridar en lugares que no les corresponda, mientras que si es demasiado elevada no será capaz de hibridar. La temperatura se encuentra en un rango de 55-60 °C y favorece una hibridación específica.

La enzima encargada de llevar a cabo la extensión, es decir, la síntesis de los nuevos fragmentos de ADN es la *Taq* polimerasa, aislada de *Thermophilus aquaticus*, tiene la ventaja de que únicamente se coloca al principio de la reacción debido a que resiste altas temperaturas. Concentraciones elevadas de *Taq* polimerasa producen pérdidas de especificidad originando amplificaciones no deseadas, mientras que bajas concentraciones disminuyen su sensibilidad. En general, se utiliza aproximadamente una unidad cada 25 μ l de mezcla de reacción (Hughes, Moody. 2007).

Al término de la PCR se tienen 2 clases de productos como se mencionó anteriormente (tabla 4):

- Producto A, es sintetizado utilizando el ADN original como molde. Las moléculas del producto A tienen un extremo 5' bien definido una longitud indeterminada.
- Producto B, se sintetiza utilizando el producto A como molde. Ambos extremos del producto B están definidos. El extremo 5' es el extremo 5' que el primer ha hecho, y el extremo 3' está definido por el extremo de su molde (el extremo 5' del producto A). Todas las moléculas de producto B son exactamente del mismo tamaño. En ciclos más tardíos de la PCR, el producto B es utilizado como molde para los próximos ciclos de la síntesis (figura 4) (Salas. Arenas. 2001.).



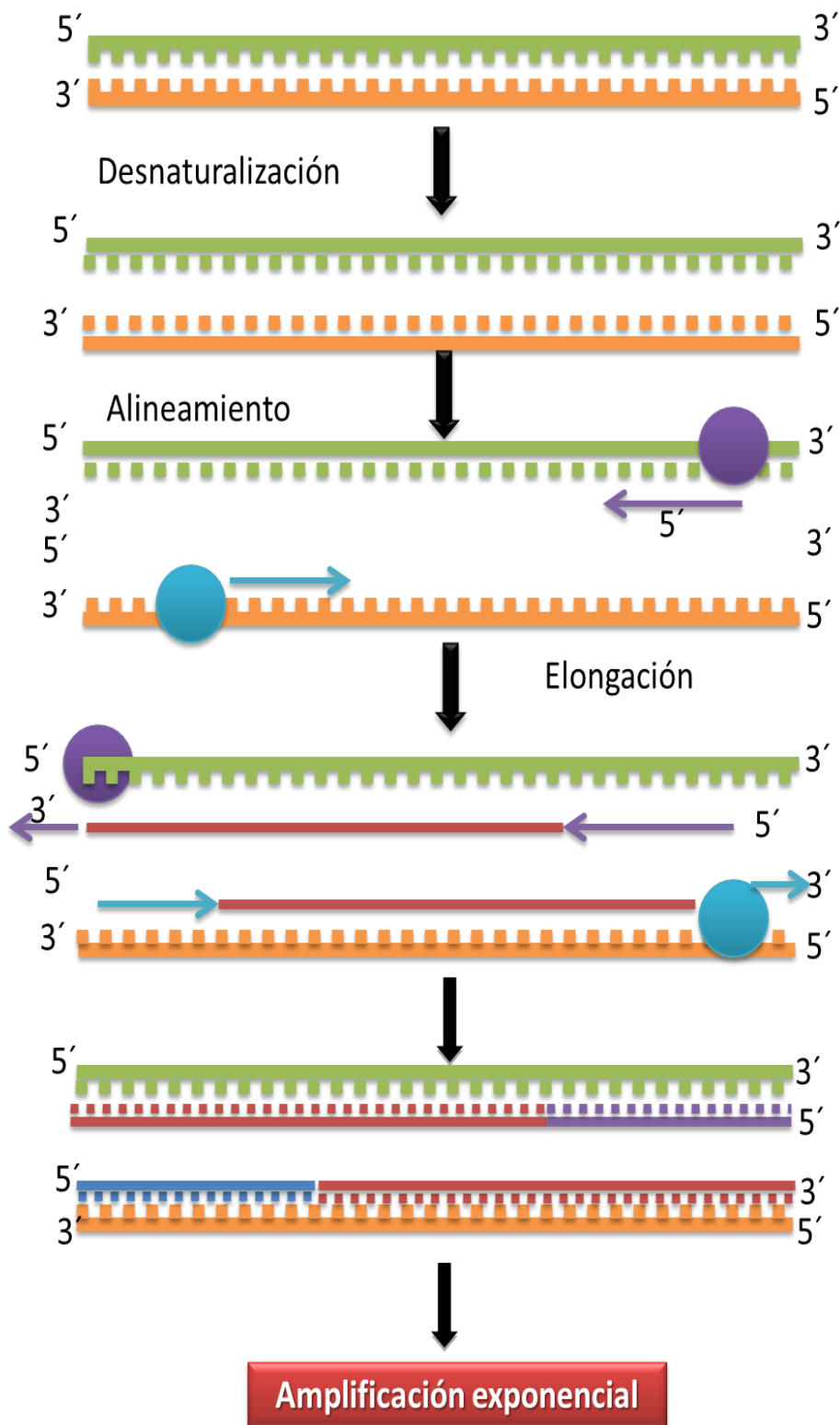


Figura 4. Esquema de la reacción de PCR





2. RT-PCR

En todos los organismos vivos las células regulan sus actividades mediante la activación o desactivación de la expresión de sus genes. La expresión genética es generalmente proporcional al número de copias de ARN mensajero (ARNm) de un gen determinado. Este es un hecho crucial cuando se trata de identificar la presencia de productos celulares específicos ya que el ARNm es traducido en los ribosomas para formar proteínas. Por lo tanto es posible obtener datos relativos a la producción de elementos biológicos si la expresión de los genes de una célula es conocida (A.Read, D. Donnai. 2009).

La RT-PCR es una variante de la PCR tradicional que se usa con la finalidad de visualizar la expresión de un gen por medio de la presencia del ARNm. En esta variante se requiere que una hebra de mRNA sea copiada a ADN (retrotranscripción) generando una molécula conocida como ADN complementario (ADNc), finalmente, este se amplifica por una PCR tradicional.

La técnica consiste en 2 pasos:

- Transcripción reversa (RT): requiere de la enzima transcriptasa inversa, transcriptasa reversa o retrotranscriptasa que es una ADN-polimerasa, con la función de sintetizar ADN de doble cadena utilizando como molde ARN monocatenario (ARNm). Es una enzima que se encuentra de forma natural en los retrovirus.
- Reacción de PCR. Como se describió anteriormente.

En la figura 5 se pueden apreciar los principales pasos de la reacción.



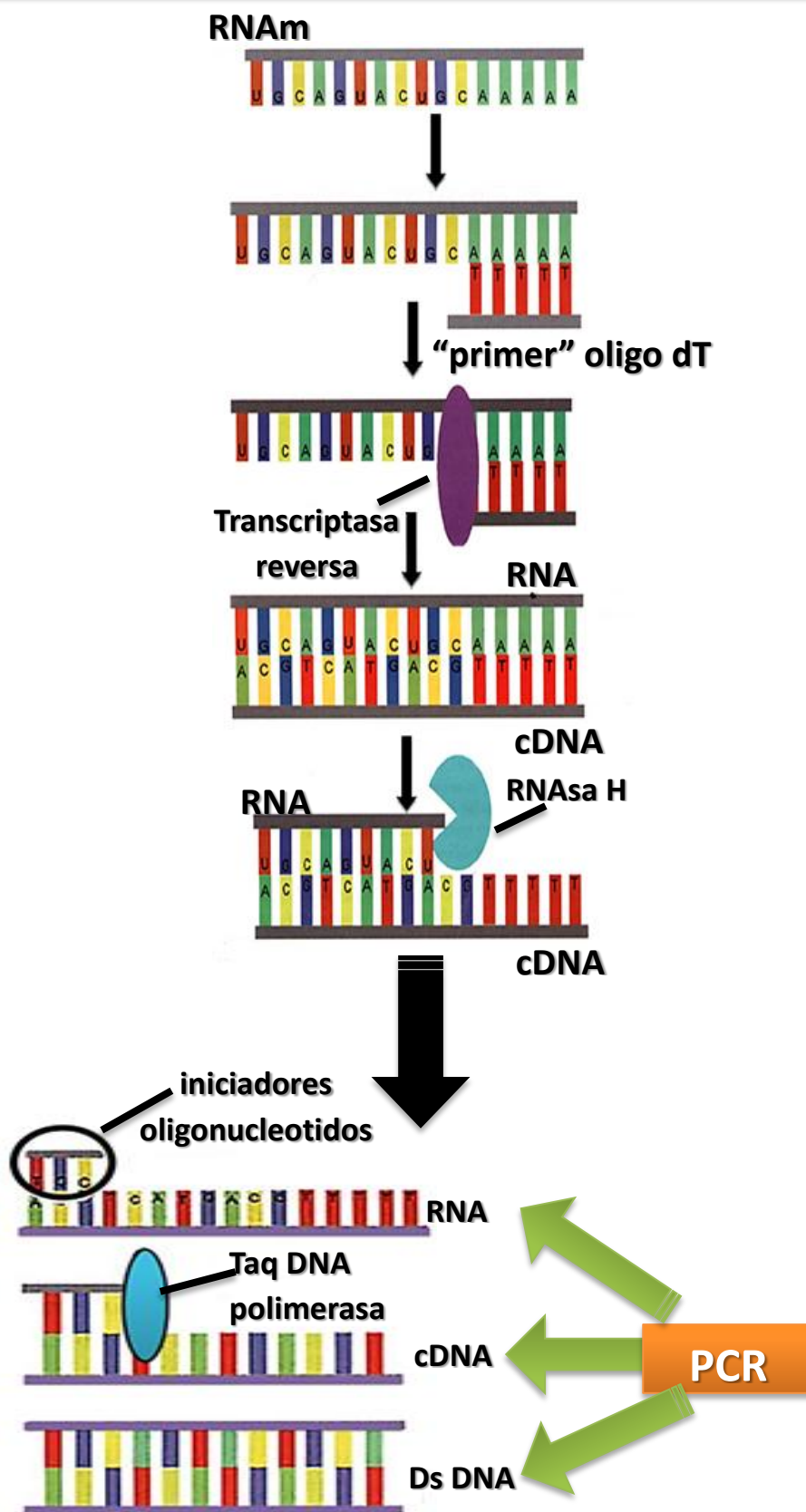


Figura 5. Esquema de la reacción de RT-PCR





La reacción de RT-PCR es un método altamente sensible y específico con gran utilidad para la detección de transcritos o para el análisis de muestras disponibles en cantidades limitadas. En la mayoría de los casos, cuando se requieren análisis de ARN un estudio cualitativo no es suficiente para proporcionar las respuestas deseadas. Cuando se desea cuantificar el número de transcritos o se requiere detectar cualquier variación en los niveles de expresión bajo diferentes condiciones experimentales se requiere de variaciones en las técnicas tradicionales que puedan dar respuesta a estas preguntas.

Dentro de las variaciones que se deben hacer a la RT-PCR se requiere amplificar otro gen que no presente alteración alguna bajo las mismas condiciones y que pueda servir como control interno además de los controles necesarios para las pruebas cuantitativas. En lo que respecta a la extracción de ARN se recomienda partir de 1×10^4 a 2×10^6 células y puede ser empleado prácticamente cualquier método de extracción. La transcripción reversa se lleva a cabo bajo las condiciones tradicionales, generalmente las proporcionadas por el proveedor. Para la PCR es necesario estandarizar las concentraciones de tal forma que ninguno de los ARNs analizados alcance la fase de meseta durante la etapa de amplificación y, si se va a llevar a cabo una co-amplificación, que los dos pares de iniciadores empleados no compitan uno con otro. Cada conjunto de reacciones deberá incluir un control negativo sin muestra; en ocasiones se recomienda colocar un control con ARN en vez de cDNA para descartar contaminación por DNA genómico. No se requiere alguna polimerasa específica. Para la selección de los iniciadores se recomienda que cumplan con los siguientes parámetros: una longitud entre 18 y 25 bases, con un óptimo entre 20-22; la T_m de preferencia deberá encontrarse entre 57 y 65°C con un óptimo entre 60 y 62°C; el fragmento a amplificar deberá ser de entre 200 y 500 pb, y en caso de realizarlo como co-amplificación con el gen control no deberán ser del mismo tamaño. Aunque se recomienda el diseño y selección de iniciadores apoyado con los programas adecuados se puede hacer de forma manual considerando el contenido de C+G > 60%; ausencia de secuencias repetidas, bases repetidas como conjuntos de tres bases iguales (como poli Ts); la secuencia perfectamente homóloga a la secuencia de interés y que de preferencia en el extremo 3' se encuentre una G o una C. Para





determinar la especificidad todas las secuencias deberán ser comparadas con el Genbank usando el programa BLAST. Deberán descartarse cuando ambos iniciadores muestren homología con el mismo gen que no es de interés.

La concentración de los iniciadores a utilizar deberá estar entre 0.05 a 0.3 mM. Bajas concentraciones serán limitantes y en tal caso la amplificación no será cuantitativa. Altas concentraciones pueden dejar grandes concentraciones sin utilizar pudiendo originar productos no específicos. Deberá optimizarse la concentración de $MgCl_2$ para cada par de iniciadores, las concentraciones que pueden probarse son 1, 1.5, 2, 3 y 5mM. Una vez que los productos se corren en el gel de agarosa deberá buscarse el mejor rendimiento y especificidad.

Para la optimización del número de ciclos es necesario considerar que el producto de amplificación sea claramente visible en un gel de agarosa y que pueda ser cuantificado, pero también, la amplificación deberá encontrarse en la fase exponencial y no deberá alcanzar la meseta de la reacción. El número de ciclos empleado deberá ser igual para el gen de interés y para el control interno.

D. ANTECEDENTES DEL TRABAJO

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, principalmente los flavonoides, pinocembrina, galangina y pinobanksina (Castaldo, 2002).

1. Efecto del EEP sobre el crecimiento de *C. albicans* y daños morfológicos

Con la finalidad de conocer un poco más del mecanismo de acción del EEP sobre *C. albicans* en un primer trabajo en el laboratorio evaluamos diferentes extractos de propóleo mexicano, debido principalmente a que en nuestro país la información respecto a la actividad de este producto es muy limitada. Se emplearon cuatro extractos etanólicos de propóleos (EEP) de tres diferentes estados de la República Mexicana, y cuatro extractos comerciales y se evaluó su efecto sobre el crecimiento de *Candida albicans*, para lo cual se





emplearon una cepa de referencia (ATCC 10231) y 36 aislados clínicos de origen humano. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de dilución en agar. El extracto obtenido en Cuautitlán Izcalli, estado de México presentó la mayor actividad biológica inhibiendo el 94,4% de los aislados clínicos a una concentración de 0,8 mg/ml; la cepa de referencia fue inhibida a una concentración de 0,6 mg/ml. El efecto fue fungistático a bajas concentraciones y fungicida a concentraciones superiores a la CMI (Quintero, 2008; Martínez Urban, 2008).

En base a que se han reportado diferencias en la composición química y en la actividad biológica cuando se trata de propóleos de diferentes orígenes geográficos un segundo estudio fue encaminado a evaluar si el daño presentado era igual al observado por otros autores. Martínez Urban (2008) demostró que además de la inhibición del crecimiento de *Candida albicans*, había incapacidad de las levaduras para formar blastoconidias presentándose el efecto desde concentraciones de 0.3 mg/ml (la mitad de la CMI). El cambio morfogénico fue inhibido a concentraciones de 0.6 mg/ml obteniendo un 97% de inhibición. Con el empleo de tinción de Gram y de azul de toluidina se observaron alteraciones en la morfología y tamaño de las levaduras, además de una tinción parcial, lo que sugiere que hay un daño a nivel de pared celular. Por medio de la tinción con bromuro de etidio se puso en evidencia que también había 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. Lo anterior está de acuerdo con lo descrito por D'Auria (2003) y Mello (2006).

2. Efecto del EEP en la expresión genética de *C. albicans* evaluada por despliegue diferencial

Teniendo estos datos y con la finalidad de evaluar el efecto en la expresión genética de *C. albicans*, se empleó la técnica de DD RT-PCR (differential display RT-PCR). Se identificaron alterados los genes ADH1 y PIK1 relacionados con los procesos de adhesión y formación de biofilms para el primero, y el segundo se ha relacionado con la secreción de proteínas y crecimiento celular.





Ambos genes presentaron una subexpresión desde 1 hr de contacto con el EEP a una concentración de 0.3 mg/ml y esta disminución de la expresión fue más evidente conforme se incrementó la dosis y el tiempo de exposición (Quintero, en vías de publicación).

Sin embargo, y debido a que la técnica de despliegue diferencial evalúa una gran cantidad de genes en un momento determinado, para poder validar los resultados obtenidos es necesario hacer la determinación por medio de otra técnica que permita evaluar la expresión diferencial de ese gen en particular, como Northern blot o RT-PCR.

En este trabajo se diseñaron los iniciadores específicos para amplificar el gen PIK1 de *C. albicans*, estandarizando las condiciones de RT-PCR y evaluando los niveles de expresión del gen en presencia del extracto etanólico de propóleo.

3. Gen PIK1

El gen PIK1 de *C. albicans* codifica para la enzima fosfatidilinositol cinasa 4(PIK4K) tipo III isoforma beta. El dominio catalítico es característico de una superfamilia que incluye a otras cinasas como las de la familia de proteínas cinasas serina/treonina/tirosina. Al ser una PIK4 cataliza la transferencia del grupo gamma fosforilo del ATP al 4 hidroxilo del anillo inositol del fosfatidil inositol (PtdIns) para generar PtdIns(4)P, el mayor precursor en la síntesis de otros fosfoinositoles incluyendo PtdIns(4,5)P₂ y PtdIns(3,4)P₂ y PtdIns(3,4,5)P₃. En la mayoría de los eucariotes, existen dos isoformas de la PI4K tipo III, alfa y beta. PIK4 III beta (también llamada Pik1p en levaduras) es una proteína de 110 kDa localizada en el Aparato Golgi y en el núcleo. Es una proteína necesaria para mantener la integridad estructural del Aparato de Golgi y es un regulador clave del transporte de proteínas del Aparato de Golgi a la membrana plasmática. PIK4 II beta también participa en la generación, transporte y exocitosis de las vesículas sinápticas. En el caso de *Drosophila*, PIK4 III beta es esencial para la citocinesis durante la espermatogénesis (Hull 1999, Candida Genome Database).





Los sinónimos que se le han dado a esta proteína son: PIK1, PIK4 y proteína hipotética CaO19.10711 [de *Candida albicans* SC5314] (Candida Genome Database). Hasta la fecha se desconoce el papel que desempeña la fosfatidil inositol 4 cinasa (Pik1p) en *C. albicans*, pero su función ha sido comparada con lo que se conoce de su homólogo en *Saccharomyces cerevisiae* (Candida Genome Database).

El genoma de *Saccharomyces cerevisiae* codifica para tres isoformas de la PtdIns 4 cinasa (PIK4) que generan PtdIns4P, estas son Pik1, Stt4 y Lsb6. Todas son conservadas desde levaduras hasta humanos. Cada una de ellas es esencial para la viabilidad celular indicando que cada una desempeña diferente rol.

Los fosfoinositoles (PIs) son una familia de lípidos que incluye una diversidad de derivados con diferentes niveles de fosforilación en su grupo inositol. Desempeñan papeles esenciales en la regulación del tráfico de membrana, secreción, crecimiento y establecimiento de la polaridad.

El aparato de Golgi juega un papel esencial en el transporte y distribución de proteínas y lípidos mediante las vías secretoras. A pesar de que hay diferencias morfológicas entre el complejo de Golgi de mamíferos y el de levaduras, ambos están organizados en tres compartimentos funcionales: Golgi *cis*, *medio* y *trans*. En cada compartimento se encuentran distintas proteínas responsables de las modificaciones post-traduccionales y la maduración de las proteínas que han de ser secretadas del Golgi para llegar a su destino final (membrana plasmática, endosomas, lisosomas). Este transporte requiere de la actividad concertada de proteínas como las rab-GTPasas, SNAREs, fosfoinositoles y complejos proteicos hetero-oligoméricos que favorecen la especificidad en cada uno de los pasos del transporte. Aun cuando todo este proceso es pobremente entendido se sabe que las moléculas de fosfatidil inositol 4 fosfato (PtdIns (4)P) regulan el tráfico de las proteínas del Golgi a la membrana plasmática.





La evidencia genética implica a Pik1 en la síntesis del PtdIns4P, necesario para las funciones del Golgi, sin embargo, estudios de localización subcelular también ubican a la proteína a nivel de núcleo, por lo que se propone que también juega un papel importante ahí.

Se sabe que PIK1 es un gen esencial requerido para el tráfico vesicular en la vía de secreción tardía, en las funciones celulares y en la citocinesis, sin embargo, requiere de otras proteínas para poder llevar a cabo su función. Una de estas proteínas es la frecuenina, la cual se ha demostrado que regula la actividad de PIK1, incluso se demostró que la eliminación del motivo de unión entre ambas proteínas resulta en la inactivación de la misma (Strahl 2007). Por otra parte se ha demostrado que también interactúa con las proteínas 14-3-3 (Bmh1p y Bmh2p) con las que lleva a cabo el transporte núcleo-citoplasma de la mayoría de las proteínas como cinasas, factores de transcripción y reguladores del ciclo celular. Esta interacción se da en base a los diferentes grados de fosforilación, la cual, también regula si su localización es en núcleo o en citoplasma y el reclutamiento de Pik1 en el Golgi. Estas diferentes localizaciones e interacciones podrían formar parte de un circuito regulador que coordina el crecimiento celular por medio de la señalización con PI(4)P, llevando a cabo el transporte en la membrana de diferentes componentes necesarios para que la célula crezca.





HIPÓTESIS

La amplificación del gen PIK1 de *C. albicans* nos permitirá evaluar las diferencias en la expresión cuando se expone a la levadura a distintos tiempos y concentraciones de extracto etanólico de propóleo y corroborar así los resultados obtenidos en la técnica de despliegue diferencial. De esta forma se puede explicar en forma parcial el efecto del extracto sobre la levadura *C. albicans*.





OBJETIVOS

Objetivo general

Estandarizar la técnica de RT-PCR para la evaluación del gen PIK1 de *Candida albicans* en presencia del extracto etanólico de propóleo con la finalidad de profundizar en el mecanismo de acción molecular.

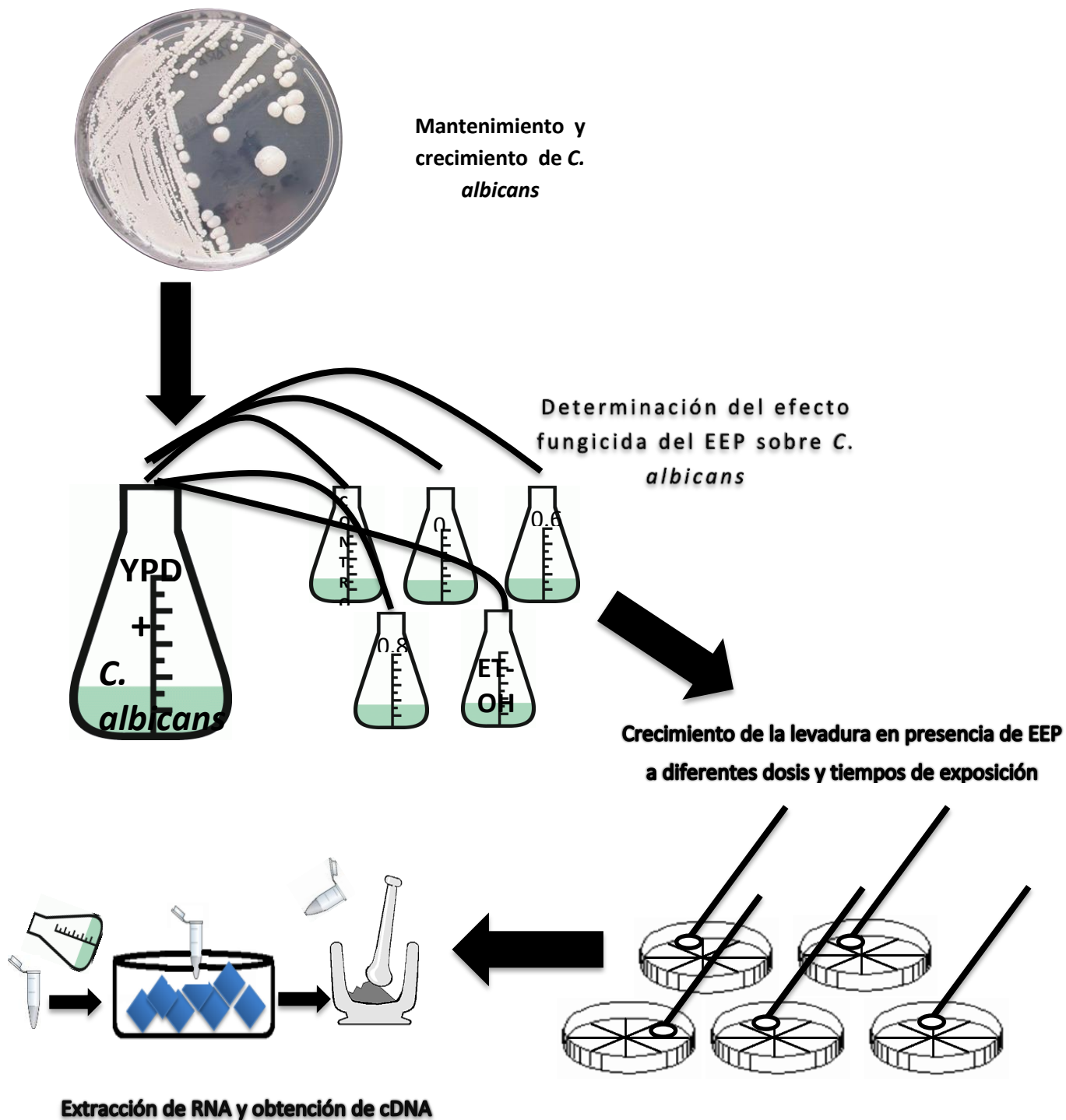
Objetivos particulares

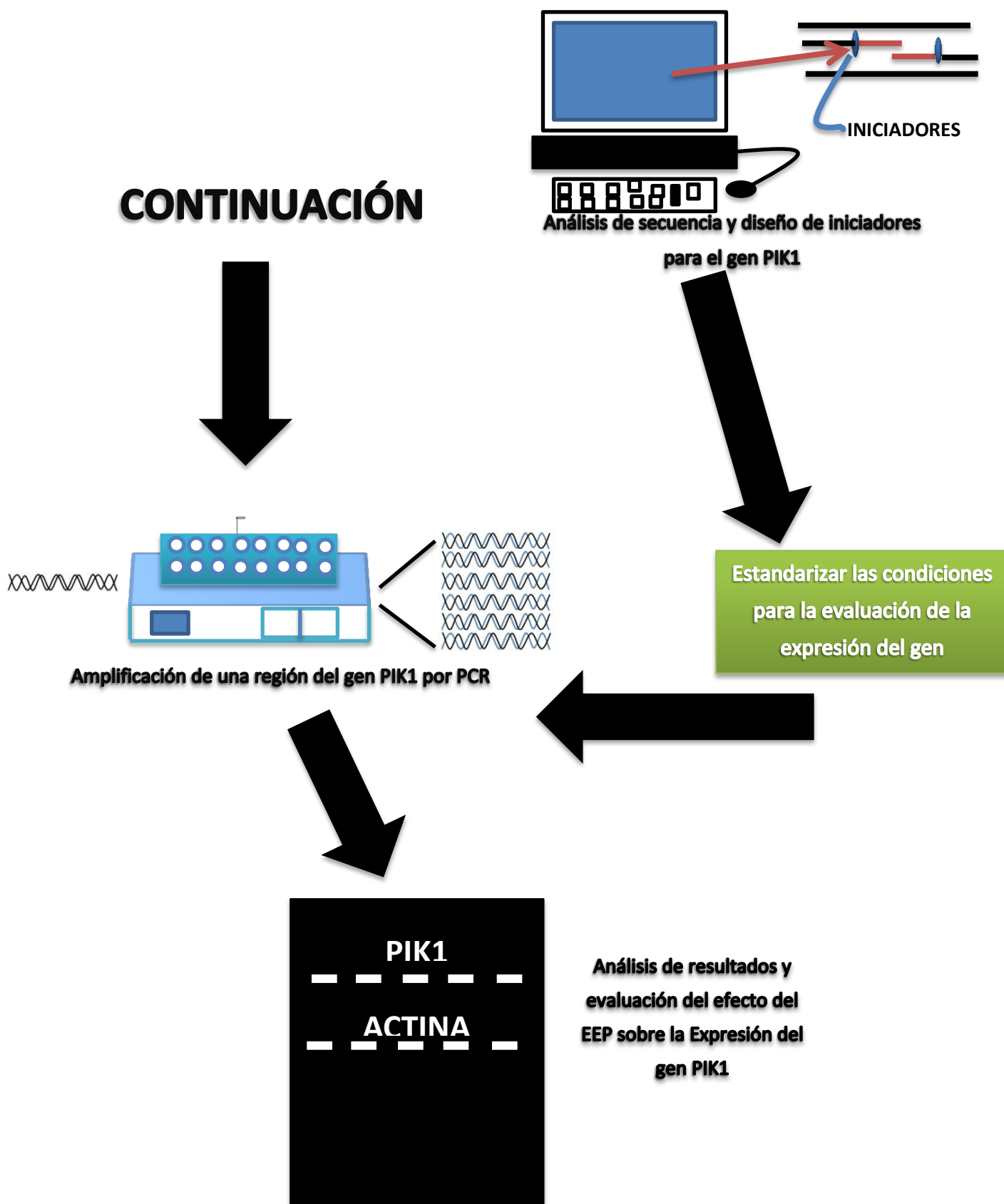
- Análisis de la secuencia del gen PIK1 de *Candida albicans* y diseño de iniciadores que permitan su amplificación.
- Estandarizar las condiciones para evaluar la expresión del gen PIK1 de *Candida albicans* por medio de RT-PCR.
- Evaluar el efecto del extracto etanólico de propóleo sobre la expresión diferencial de dicho gen.





1. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL





**MATERIALES Y MÉTODOS****2. Cepa de *Candida albicans***

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

3. Extracto etanólico de propóleo (EEP)

El extracto empleado fue obtenido a partir de propóleo recolectado de los apiarios de la FES Cuautitlán y se obtuvo al 30% mediante la técnica tradicional.

Para el procesamiento del propóleo se adoptó la técnica empleada por la Organización Nacional de Apicultores (González G. Ana R.), 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.

4. Determinación del efecto fungicida del EEP

Se prepararon suspensiones de *C. albicans* en 10 mL de medio YPD , y se igualaron al 0.5 del nefelómetro de Mc Farland (1×10^6 UFC/mL), posteriormente se le agregó EEP hasta llegar a las concentraciones de 0.3, 0.6 y 0.8 mg/mL. Se utilizó un control en el que se incubó con etanol al 70% y otro en el que no se adicionó nada. Las suspensiones anteriores se dejaron en incubación a 37 °C y se tomó una asada cada hora durante 6 horas y se sembraron en medio YPD (sólido) e incubaron por 24 horas a 37 °C. Se consideró como concentración fungicida aquella en la que ya no se observó crecimiento en la placa.





5. Crecimiento de *C. albicans* en presencia de EEP

Se preparó una solución stock de *C. albicans* de la cual se tomaron 125 mL y se dividieron en 10 matraces Erlenmeyer a los cuales se les agrego medio YPD (liquido) y etanol (ETOH) o EEP, las concentraciones se muestran a continuación.

MUESTRA	SUSP C.a + YPD (mL)	YPD (mL)	EEP ó ETOH (mL)	VOLUMEN FINAL (mL)	[FINAL PROPÓLEO y ETOH] [mg/mL]
Control (-) 1hr	12.5	27.5	-----	40	-----
Control (-) 2hr	12.5	27.5	-----	40	-----
ETOH 1hr	12.5	27.29	0.21	40	0.8
ETOH 2hr	12.5	27.29	0.21	40	0.8
EEP 1hr	12.5	27.42	0.08	40	0.3
EEP 2hr	12.5	27.42	0.08	40	0.3
EEP 1hr	12.5	27.34	0.16	40	0.6
EEP 2hr	12.5	27.34	0.16	40	0.6
EEP 1hr	12.5	27.29	0.21	40	0.8
EEP 2hr	12.5	27.29	0.21	40	0.8

Tabla 5. Preparación de muestras de *C. albicans* con ETOH Y EEP, para extracción de RNA

Las muestras anteriores se incubaron a 37 °C por 1 y 2 hrs y se emplearon para hacerla extracción de RNA.

6. Extracción de RNA y obtención de ADNc

En un tubo Eppendorf de 2.0 mL. Se colocaron 0.75 mL de buffer de lisis (NaCl 0.6 M, EDTA 10 mM, TrisHCl 100 mM pH 8.0, SDS 4%) y 0.75 mL de fenol (saturado con Tris HCl 0.1 M, pH 8.0). Los cultivos se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min. y se desecharon los sobrenadantes y las pastillas se congelaron. Se pulverizó la masa





fúngica en un mortero que contenía nitrógeno líquido. El polvo se transfirió a un tubo que contenía el buffer de lisis y se agitó manualmente por 15 a 20 min. Se centrifugó por 10 min. a 10,000 rpm. Se transfirió la fase superior a un tubo nuevo y adicionó un volumen de fenol (saturado con Tris HCl 0.1 M pH 8.0) y se agitó en vortex hasta obtener una mezcla homogénea. Se centrifugó por 10 min. a 10,000 rpm. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y adicionaron 1.5 mL de LiCl 8M (la muestra se tornó blanca). Las muestras se almacenaron toda la noche a 4 °C. Se agitó en el vortex brevemente y centrifugó a 10,000 rpm por 10 min. Se resuspendió la pastilla en 300 µL de agua destilada estéril, 30 µL de acetato de sodio 3 M (pH 5.2) y 750 µL de etanol absoluto y almacenó a -20 °C por 2 hrs. Se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm por 10 min. Se desechó el sobrenadante y lavó la pastilla con etanol al 70% y centrifugó 10,000 rpm por 10 min. Se secó la pastilla a temperatura ambiente y resuspendió en agua DEPC y almacenó a -20 °C

Los pasos anteriores se repitieron para cada una de las muestras.

Por último las muestras obtenidas se visualizaron en un gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio. Para la cuantificación se realizó una dilución 1:100 de la muestra de ARN y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 260 y 280 nm. Se usó como blanco H₂O-DEPC.

7. Obtención de ADNc

Del ARN obtenido del proceso de extracción se tomaron el equivalente a 5 µg para realizar la reacción. Se adicionaron en un tubo para microcentrifuga libre de nucleasas lo siguiente:

- 1 µL de oligo (dt)₁₂₋₁₈ (500 µg/mL)
- 5 µg de RNAm.
- 1 µL de mezcla de dNTP 10 mM.
- 12 µL de agua destilada estéril.





Se llevó la mezcla a una temperatura de 65 °C por 5 minutos, pasado este tiempo la mezcla se puso en hielo para evitar que la reacción continuara y se adicionó lo siguiente:

- 4 µL de Buffer **first strand**
- 2 µL de DTT 0.2 M

El contenido de la mezcla se llevó a agitación e incubó a 37 °C por 2 minutos. Posteriormente se agregó y mezcló por pipeteo 1 µL de M-MLVRT y se llevó a una temperatura de 25 °C por 10 minutos, terminado este tiempo se llevó a una temperatura de 37 °C por 50 minutos. Por último para inactivar la reacción la mezcla se llevó a una temperatura de 70 °C por 15 minutos.

8. Diseño de iniciadores específicos para el gen PIK1 de *C. albicans*

La secuencia del gen PIK1 de *C. albicans* fue obtenida a partir de GenBank de NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) con el número de acceso XM_709655.1. El diseño de los iniciadores se obtuvo con ayuda del programa primer 3 y las secuencias fueron enviadas para su síntesis

9. Amplificación por PCR

En un tubo de 50 µL se adicionaron los siguientes reactivos para llevar a cabo la reacción de PCR y llevaron a un volumen final de 25 µL:

- 2.5 µL de Buffer para PCR 10X [Tris-HCl (pH 8.4) 200 mM., KCl 5 mM.
- 0.75 µL de MgCl₂ 50 mM.
- 0.5 µL de mezcla de dNTP 10 mM.
- 1 µL de primer de amplificación PIK1 1F (10µM)
- 1 µL de primer de amplificación PIK1 1R (10µM)
- 0.4 µL de *Taq* DNA polimerasa (5 u/µl)
- 4 µL de cDNA obtenido de la reacción previa.
- 14.85 µL de agua destilada estéril.





La mezcla anterior se calentó a 94 °C por 2 minutos para desnaturalizar. Las muestras obtenidas fueron sometidas a 25 y 28 ciclos con una temperatura de alineamiento de °C.

Al terminar la corrida los productos fueron visualizados y analizadas en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio.





RESULTADOS

Determinación del efecto fungicida y daño morfológico del EEP (extracto etanólico de propóleo) sobre *Candida albicans*.

Para poder evaluar la expresión del gen PIK1 de *C. albicans* era necesario determinar una concentración del EEP que produjera inhibición del crecimiento sin que tuviera efecto fungicida.

Con base en los resultados que teníamos de trabajos previos se probaron concentraciones de 0.4, 0.6 y 0.8 mg/mL (cercanos a la CMI que se había determinado que era de 0.6 mg/mL) durante 6 hrs de exposición, tomando muestras cada hora para evaluar el daño. El efecto fungicida se evaluó sembrando la levadura en agar YPD y al mismo tiempo se realizó tinción de Gram. Como control se empleó la levadura crecida en etanol al 70%.

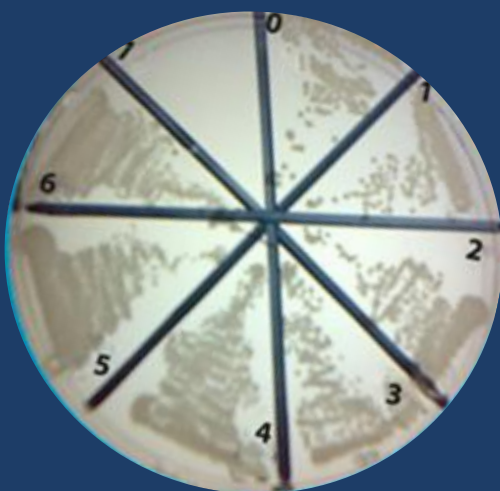
En la figura 6 se muestra el crecimiento de la levadura cuando fue expuesta a concentraciones de 0.4, 0.6 y 0.8 mg/mL. Se observó que en el control hubo crecimiento desde el tiempo 0 y hasta la 6ª hora de incubación, lo mismo que a la concentración de 0.4mg/mL, aunque se aprecia un menor crecimiento. En la concentración de 0.6 mg/mL disminuye considerablemente a partir de la 2ª hora presentándose todavía algunas colonias hasta la 6ª hora. A la concentración de 0.8 mg/mL se observa ya el efecto fungicida desde la segunda hora.

Al mismo tiempo se evaluó el daño estructural por medio de la tinción de Gram debido a que en trabajos previos se había observado que había fragmentación celular en concentraciones cercanas a la fungicida además de que el rendimiento en la obtención del RNA se veía considerablemente afectado. Desde la concentración de 0.3 mg/mL se observó inhibición en la formación de las blastoconidias y un cambio en la morfología pero no hubo fragmentación de la célula hasta la concentración de 0.6 mg/mL con 6 hrs de exposición (figura 7).

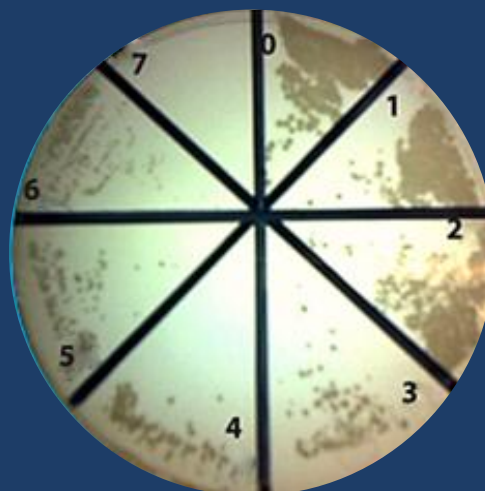




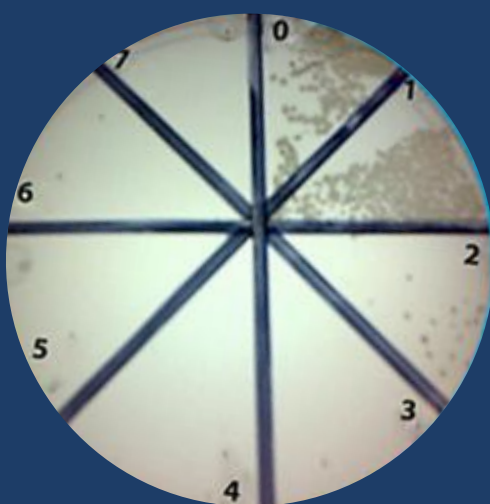
CONTROL



0.3 mg/mL



0.6 mg/mL



0.8 mg/mL

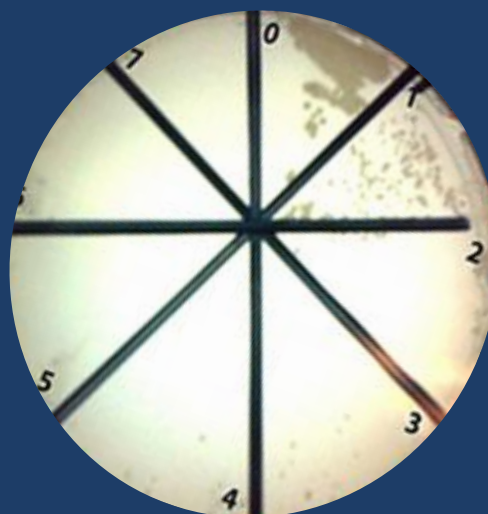


Figura 6. Determinación del efecto fungicida del EEP sobre la cepa de *C. albicans*. El efecto del EEP sobre el crecimiento de *C. albicans* fue dependiente de la dosis y el tiempo de exposición, el cual se indica con la numeración del 0 al 7 el cual corresponde al número de horas encontrando el efecto fungicida a la concentración de 0.8 mg/mL desde la 2ª hora de incubación.



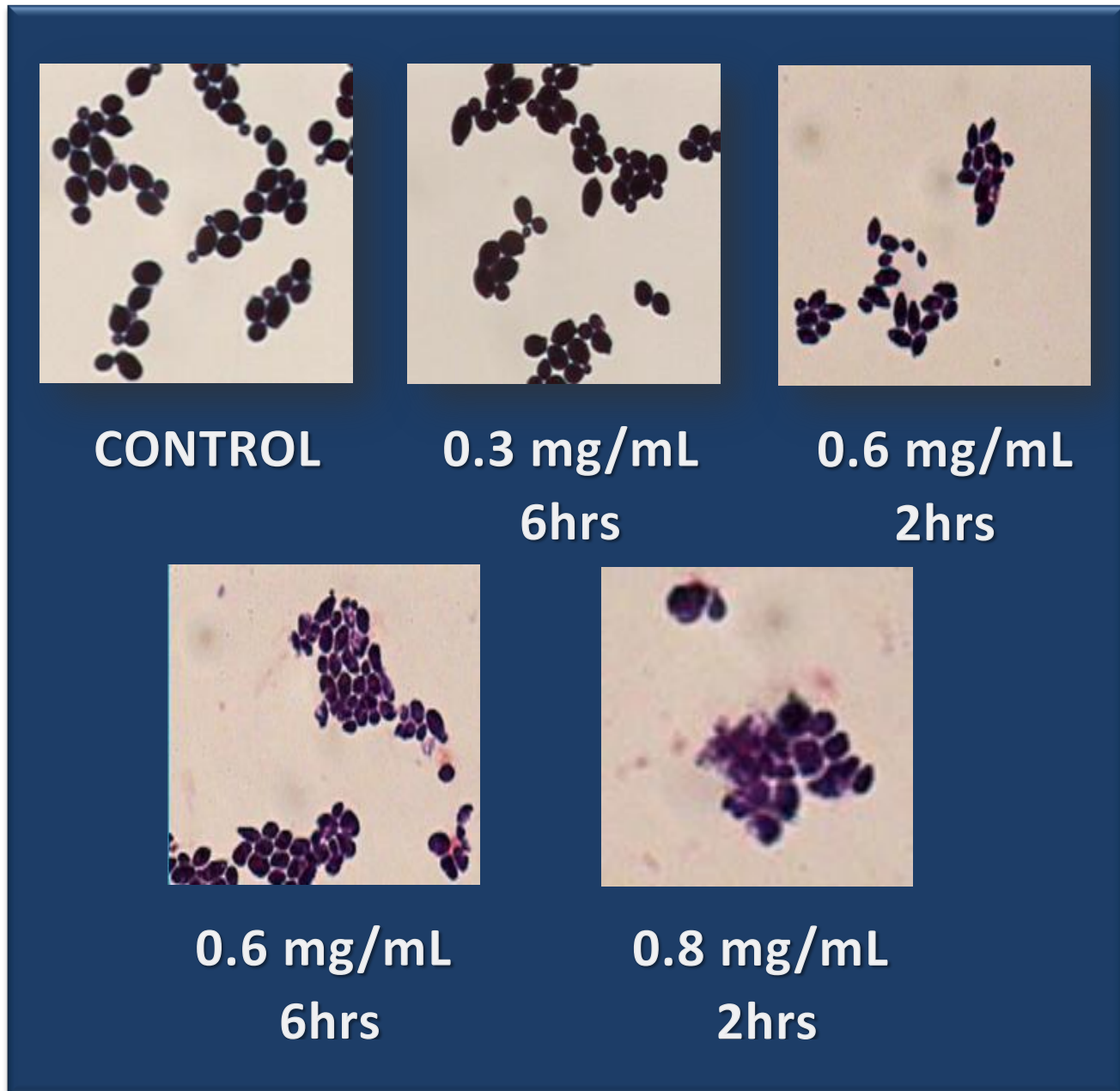


Figura 7. Alteraciones morfológicas de *C. albicans* incubada con EEP. A partir de los mismos tubos que se tomaron las muestras para determinar el efecto fungicida se realizaron frotis y se tiñeron con Gram. Las alteraciones morfológicas se observan desde la concentración de 0.3 mg/mL, al igual que la inhibición de formación de blastoconidias, sin embargo, la fragmentación se observó hasta las 6 hrs de incubación con 0.6 mg/mL y más evidente aún a las 2 hrs en la concentración de 0.8 mg/mL.



De acuerdo a lo anterior, para evaluar el efecto del EEP se seleccionaron las concentraciones de 0.3 y 0.6 mg/mL a 1 y 2 hrs de exposición.

Diseño de iniciadores para el gen PIK1 de C. albicans.

Por otro lado se llevó a cabo el diseño de iniciadores que nos permitieron amplificar el gen PIK1 de C. albicans. La secuencia del gen se obtuvo del GenBank con número de acceso XM_709655.1 (Figura 8). Con ayuda del programa “Primer3” se analizaron los 4300 pb y se solicitaron 5 pares de iniciadores seleccionando un par de ellos (tabla 5), tomando en cuenta el que formara menor número de estructuras secundarias y dímeros (homo y heterodímeros), analizados con el programa Oligo Analyzer 3.1 . Se verificó en “BLAST” que estos iniciadores fueran específicos para esta secuencia y posteriormente se mandaron sintetizar.

agaagatcagagttgatggttagttattccaaaatcagatttcttgtaactcgtctgcagcaatcatggaagggtgcggatagtaactcttgtaaatgggacaacagg
tttactgaatgaaccaacaaatgtttatgtcagaggtattttttggaaaaatgaggacagagttgggtgaccacatgtacgttaaatgtaaagaaatggattggaggcta
atattgaatttaaacgaaaggctttattatggtacttacgatcaattgaaggaatcatcaaggaatcggaaacacagaagaactattcagattctggaaaatggaatg
aagtaattatataaagaactaaacagtaagaagaagttttatgatgacaagagttccaagacacttaagcctaaagtaagaccttagaggaacaatgggatttt
gaatcacgtaaatcttggaaaccaaatgtctggtttggcgaagaacacgaacttgcacagagaagaaactgaaggttgaaaatgaacaaagaataaaagcaaa
aaagcatttagaggatgggtagaattccacctaagttcttcgagaagtaaacgaaaatgataatggagttaaaaatctgaatacgtttttataagaagtttgatttaa
ggaggatccccaggttttgaggagagattgtttacagttgctcggattgtccaggacagaagttgatgagaatcttaccggcttttaaaaaacggaaagtaattaa
ttgttgacttttaatacaggtcatattaacagatttgaatagaatcaagtagtagttgctaatgttctgaattatagtttgaattatagtttattttattctggtg
cttggttttgaaccacatacaaaactatgactgtatgtacatgaagtcgtaaaaaaaaaagttcagcgaacaaagtttgaacaaatgccaacacagcttttggaccagtaa
tcataaactatgtctgcagatataactgaaccccaataaacaacttttgagcagattcggctccactgttttagtttattcaattgcatttatagtttaaaaaaccatacga
tagcattgggattcaacatgagcttgcataaagttatcttccctccatagaaagattgcaattttcattcccccaattgttcaattattggttacatacagatagtgatcaatg
gctcttgaagaattcataatgacttagttctgggtaccctcattcagtttaattgtattttgaaactgcaggcttaccattttgaattgaaaaacgaaccagaatctcgcacat
tccaagccttagaaactaatcactaaaatccagaacattatgttaatgcagatcaacagactgtaaaggctcccgaatttagagaaaaatttctctgctttgctcatgc
ggtgctgtcgcacatcagtagcttttccgctttcaaaagtattgtttacatgataaaagctcagggaagcaacaaaagtcattagtagttaaattggtaaattccagaa
atcattaacaaaaatttgactttgaaaaatcagagaatgctgacatcaaaaggatcacattctgacgatgaaactgcaacgtcttccctgattaaacctcccttca
agatcagcatcagttcctagaagaatactaaaaaacaagtttcttctgctgatgaatcagaggctcactactgatgatgatacaaaaacagcatcgaacta
gagaaggattttacaagatagacttagatggtttactgaaagaaaaatcagctaatttttagagccagaagaaaactaaatgtaaacacagccataaaatcgaaaaaga
gactatctacgcttaccataaagttatgactcaaccgtggatggtattgacgggtataacgtgaattcacaatcattaccggatttgaacaaagcagagggagagattga
tcccccttctcctcaacagaatcagaacgtcattttgtatcataataatcaatttccaatgacttcaaaaaaatattccccgacaacagaaaattctcgccaggtttcgc
aatgtttatataacgaagcttttgaagtgaaatgcaaaaaacgaaacccaatttatcatggcattgcagaatatttcaatcagacttctcaagttccaaaagaagccagac
ttcagcttgagagcagaactttcattatcaatgacagcttactccaagtgaatgacattctcagcttttggccataacaagtaacagaaaataaaaaatacataaaat
ccttaagtgaacttaacgaagctagttttaaattcggctgaacgagtagcatttttctttcattgaactttagtgatgaaatagatttcaatcctacaactgaataca
ccagagaataatccagaaaaaagatgaatggagctacaagtagctgtaagaaaaataaactcattttcgaagttgcagatggtaattcgaagaagagaaacaagatt
aaaagcagtaccctgagactgttcaaatattttataacgagaatactgaaagaagcagacttaagtgaatgcccctggatagaaaaactaccgtttcagatagtttt
ctccagaaatgctagttaccctgctattaccggagcaactgaaacttcaatttccatcttgaatacaaaaagaagtgccacaaagtttttagctgatcagatgagaatcgc
agcagtgatgtgcagcaattggacagctctggtaaagcaaatcagaacaatcattttgatcaaaaaccgtattgctgaatcagatgattacaagccaatttgattct
ttgattttgagaattgagcaattacaagcgcagcagcctagtgccggagaagaaagttgaaaaatgatttcaagttaggagaagattggaacacaaaaaaacaaagg
atcaaaaagtctagtcacacggcatttgaagaattgggatttatgctcagtgatgacaaaaacggagacgatttggcgaagaagctttgcttcaattgatttctatga
ttcaaatatttggaaaaagaacaatactggttggactaaaaggatgaaaatttaattactagtgccaacactggttagttgagactatcactaatgcaatgctattcat
tcgattaaaaaatcgttactgaacactcaaatcaaaagtgtgaaaaacagtaaaaggaataatttactggttactgattttttcatagttttttgggctgcaaacctactag
tttagaacggcccaaaaaacttggcaaaagtttagctgctattcctaattctcaggaaagtgtaggctttgaggctcaccattcaagctcacagttgagtagtggaaactctggtggttgata
tgaaattattcgcagttgtttattatgtaaaaatgctcaagtcgtaagagataatagtgaaagattattgaaattgttgaactaatgcaaaaagattcaactttgcctt
gttttaaatggagaaaaacaaagttttataaaaacaaagttacagttacagctcaatgatgaagacactgatcagttttagagaactttttagtggaaagagctctgg
aagcatgtacactagattatcagatcagttccagatgataacacagggtttatagtttaactgataaattcaatcacaataatcctttaaattgattttatactgtagcagtg
cagccccgctatcagattgtctataaagtaatcatcatctttcttaccattgttatatgcactacaatttggtccatgtaaaattcaactcaatttttaacaattccggt
cagactatgtaac





Figura 8. Localización de los iniciadores PIK1F y PIK11R. La secuencia del gen PIK1 de *C. albicans* se obtuvo a partir del GenBank con número de acceso AJ011588.1. Con ayuda del programa Primer3 se diseñaron los oligos PIK11F y PIK11R que amplifican la región entre 2949 y 3468 generando un producto de 520 pb.

PRIMER	%GC	CADENA	TAMAÑO (pb)	Tm	SECUENCIA
PIK11F	40	sentido	20	60.04	tgtcgaatc gatgattgcat
PIK11R	45	antisentido	20	59.98	gttttgttgggccgttctaa

Tabla 6. Características de los iniciadores PIK11F y PIK11R. Para el diseño de los iniciadores se introdujeron en el programa los siguientes datos: %GC entre 40 y 50%, longitud del primer 20 pb, Tm entre 55 y 60°C.

RT-PCR

Extracción de ARN

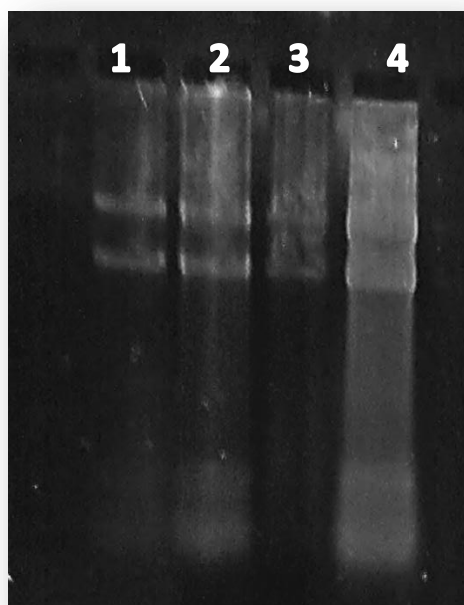
Se llevó a cabo la extracción del ARN a partir de los cultivos en presencia de etanol (control) y en presencia de EEP a diferentes concentraciones y tiempos de exposición (0.3 y 0.6 mg/ml durante 1 y 2 hrs). El RNA obtenido fue cuantificado por espectrofotometría obteniendo las concentraciones mostradas en la tabla 6 donde también se muestra la proporción A_{260}/A_{280} que en todos los casos fue cercana a 1.7 por lo que se consideró que tenía el nivel de pureza suficiente para la PCR. Los resultados que se muestran son promedio de tres extracciones independientes.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
ETOH	30	1.7	1.52
[0.3 mg/mL]	15	1.67	1.18
[0.6 mg/mL]	14	1.69	1.29

Tabla 7. Pureza y concentración del RNA obtenido. Los valores fueron determinados por medio de espectrofotometría.

La integridad del RNA obtenido fue evaluado por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2 %, teñido con bromuro de etidio y usando un transiluminador. Como se muestra en la figura 9 las muestras obtenidas fueron de buena calidad, observándose predominantemente las bandas correspondientes al rRNA 18S y 28S.





CARRILES

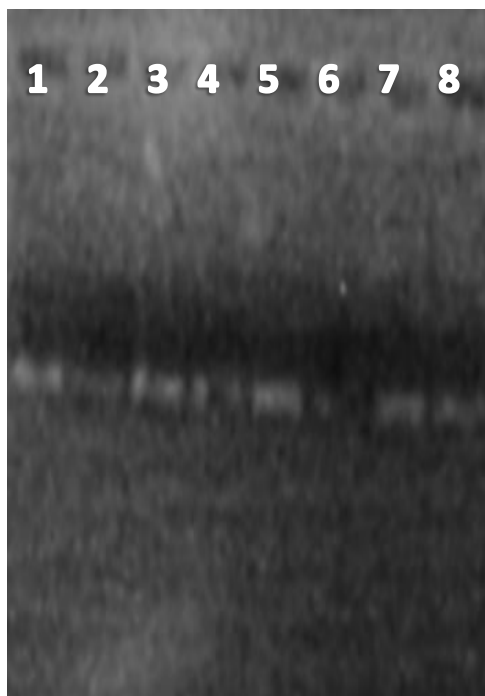
- 1 Control con etanol
- 2 0.3 mg/mL, 1 hr
- 3 0.3 mg/mL, 2 hr
- 4 0.6 mg/mL, 1 hr

Figura 8. Visualización del ARN. El ARN obtenido fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y visualizado en el transiluminador

Transcripción reversa (RT) y PCR

Con las muestras de ARN obtenido se procedió a sintetizar el cDNA de acuerdo a las indicaciones del proveedor. Inicialmente se realizó la reacción de PCR con 40 ciclos, una vez que se logró obtener la banda del tamaño esperado se procedió a estandarizar el número de ciclos de la reacción de PCR, con la finalidad de que nos permitieran evaluar las diferencias en la expresión bajo las condiciones a probar. Se hicieron corridas a 25 y 28 ciclos con los iniciadores seleccionados para amplificar el gen PIK1. Los productos resultantes se muestran en la figura 10. Con ambos números de ciclos se observaron diferencias en la expresión, lo que se puede apreciar por la disminución de la intensidad de las bandas en una forma proporcional a la concentración y tiempo de exposición al EEP, tal y como se esperaba. Se seleccionaron 28 ciclos para el resto de las corridas.





CARRILES

- 1 0.3 mg/mL, 1hr, 25 ciclos
- 2 0.3 mg/mL, 2 hrs, 25 ciclos
- 3 0.6 mg/mL, 1 hrs, 25 ciclos
- 4 0.6 mg/mL, 2 hrs, 25 ciclos
- 5 0.3 mg/mL, 1 hrs, 28 ciclos
- 6 0.3 mg/mL, 2 hrs, 28 ciclos
- 7 0.6 mg/mL, 1 hrs, 28 ciclos
- 8 0.6 mg/mL, 2 hrs, 28 ciclos

Figura 9. Efecto del número de ciclos en la reacción de PCR. Con los iniciadores seleccionados se realizaron las reacciones de PCR con 25 y 28 ciclos y los productos fueron corridos en un gel de agarosa al 1%.

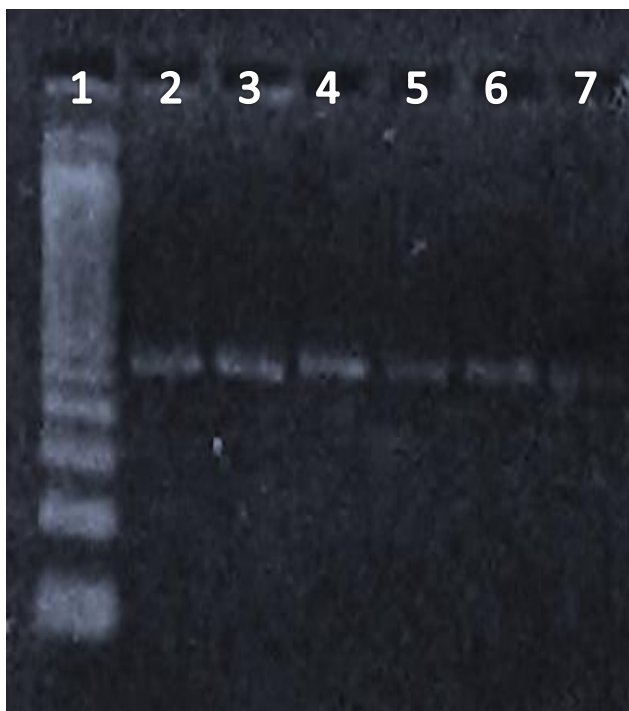
Expresión diferencial del gen PIK1 de *C. albicans* en presencia de EEP

Una vez establecidas las condiciones de la reacción y el número de ciclos adecuados se procedió a evaluar el efecto del EEP en la expresión diferencial del gen PIK1 de *Candida albicans* empleando concentraciones de 0.3 y 0.6 mg/mL a 1 y 2 hrs de incubación. Como se observa en la figura 11, desde la concentración de 0.3 mg/mL con 1 hr de exposición hay una subexpresión del gen PIK1. La intensidad de la banda disminuye aún más en la concentración de 0.6 mg/mL a 1 y 2 hrs de exposición, es decir, que el efecto del EEP sobre la expresión del gen PIK1 es en forma dependiente de la concentración y el tiempo de exposición. No se observa alteración en el control de levaduras crecidas en presencia





de etanol, lo que indica que el efecto es debido únicamente a los componentes del propóleo.



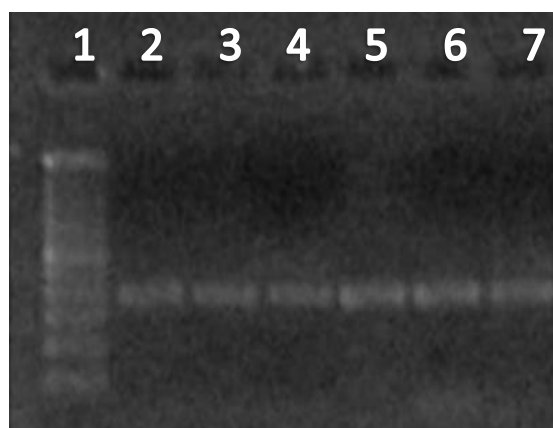
CARRILES

- 1 Marcador de peso molecular
- 2 Control de *C. albicans*
- 3 Control de *C. albicans* crecida en presencia de etanol 70%
- 4 0.3 mg/mL de EEP 1 hr
- 5 0.3 mg/mL de EEP 2 hrs
- 6 . 0.6 mg/ml de EEP 1 hr
- 7 0.6 mg/mL de EEP 2 hrs

Figura 10. Efecto del EEP sobre la expresión del gen PIK1 de *Candida albicans*. El EEP inhibió la expresión del gen PIK1 desde la concentración de 0.3 mg/mL (la mitad de la CMI), carril 5, siendo mayor el efecto al aumentar la concentración y el tiempo de exposición, carriles 6 y 7. Gel representativo, se realizaron tres reacciones de PCR independientes. Se utilizó un marcador de peso molecular marca invitrogen de 1000 pb

Como control de la reacción de RT-PCR se amplificó el gen de actina a partir de las mismas muestras, en la figura 11 se observa el gel completo con el marcador de peso molecular y el producto esperado de 420 pb. La expresión del gen permanece sin cambio alguno bajo todas las condiciones.





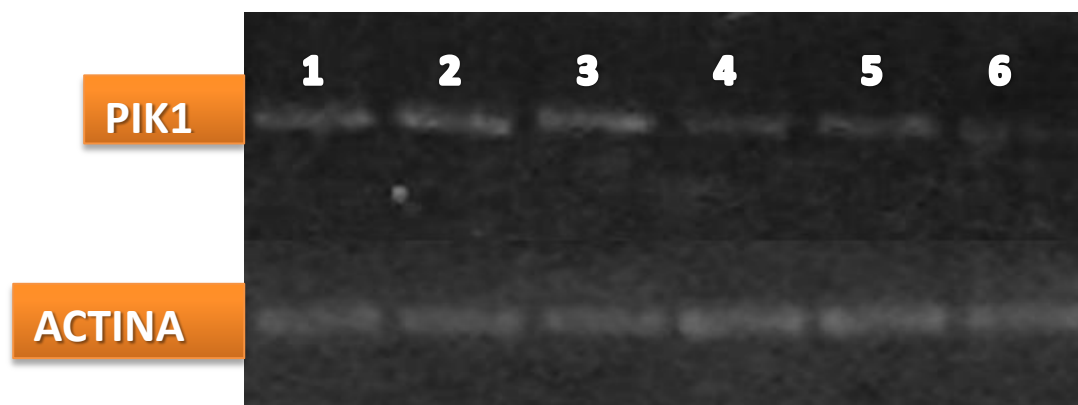
CARRILES

- 1 Marcador de peso molecular
- 2 Control de *C. albicans*
- 3 Control de *C. albicans* crecida en presencia de etanol 70%
- 4 0.3 mg/mL de EEP 1 hr
- 5 0.3 mg/mL de EEP 2 hrs
- 6 0.6 mg/mL de EEP 1 hr
- 7 0.6 mg/mL de EEP 2 hrs

Figura 11. Expresión del gen de actina de *Candida albicans*. Los cDNA empleados para la amplificación del gen PIK1 fueron empleados para amplificar el gen de actina usándolo como control. Gel representativo, se realizaron tres reacciones de PCR independientes.

En la siguiente figura (figura 12) se muestra la comparación de la expresión de ambos genes.





CARRILES

- 1 Control de *C. albicans*
- 2 Control de *C. albicans* crecida en presencia de etanol 70%
- 3 0.3 mg/mL de EEP 1 hr
- 4 0.3 mg/mL de EEP 2 hrs
- 5 0.6 mg/mL de EEP 1 hr
- 6 0.6 mg/mL de EEP 2 hrs

Figura 12. Subexpresión del gen PIK1 de *Candida albicans* por efecto del extracto etanólico de propóleo. Se aisló el RNA total de las levaduras crecidas en medio YPD en ausencia y presencia de EEP empleando un control que creció en presencia de etanol al 70%. Las dosis empleadas fueron de 0.3 y 0.6 mg/mL y tiempos de exposición de 1 y 2 horas. El EEP provoca la subexpresión del gen PIK1 desde la concentración de 0.3 mg/mL con 2 hrs de incubación, comparado con el control interno de actina en el que la intensidad de la banda permanece constante.





DISCUSIÓN

El aumento en la prevalencia de las micosis, la aparición de cepas fúngicas resistentes a los agentes antimicóticos empleados en la actualidad y los efectos secundarios que estos últimos provocan en los pacientes son, sin duda, algunos indicadores de la necesidad de encontrar o desarrollar nuevos compuestos antifúngicos ya sean sintéticos o de origen natural.

Candida albicans es un comensal en humanos que predominantemente coloniza la mucosas y el tracto gastrointestinal, sin embargo, se encuentra dentro de los patógenos oportunistas que pueden causar heridas localizadas o generalizadas. Las infecciones causadas por *C. albicans* en hospederos inmunocomprometidos representan un alto porcentaje entre las causas de mortalidad y morbilidad en la población mundial. En la actualidad se han encontrado cepas resistentes a los antifúngicos actuales, lo cual es un problema que va en aumento (Dennis M; Frattarelli D.A.,2004; Francis P., 1992; Heidemann J.F., 1983; Iwata K., 1994; Walsh T. J, 1987;Adams, D.J., 1997; Georgopapadakou N.H., 1994; Polak, A., 1991; Vanden B.H., 1994).

Se ha descrito por varios autores el uso ancestral del propóleo como remedio medicinal, así como en el área cosmética. Se han llevado a cabo diversos estudios donde se ha demostrado que el propóleo tiene actividad antibacterial, antimicótica y antiviral, además se marca el hecho de que se ha observado actividad con propóleos de diferentes regiones, aun cuando se sabe que varían sus características debido a que las plantas que rodean los apiarios no son las mismas.

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 (Kosalec I. 2005), principalmente los flavonoides pinocembrina, galangina y pinobanksina (Castaldo y Caspaso. 2002).





En el caso de bacterias se ha descrito 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. Debido a lo complejo que resulta este mecanismo de acción no se puede comparar con ninguno de los que presentan los antibióticos actuales (Takaisi N.B., Schilcher H. 1994). También 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 (Cushnie T.P, 2005).

D' Auria y colaboradores (2003) determinaron que en *Candida albicans* había una inhibición de la actividad de fosfolipasa dependiente de la dosis y el tiempo, y se demostró también daño en la membrana. Por su parte, Mello y colaboradores (2006) describieron el daño ultraestructural por microscopía electrónica de transmisión encontrando hiperplasia y cambios en la superficie celular a 0.43 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lo que sugiere que el efecto antifúngico del propóleo es debido a cambios en la pared celular conduciendo a un incremento de tamaño y ruptura de la membrana.

En nuestro laboratorio, con el extracto etanólico de propóleo de la FES Cuautitlán (Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.), y a pesar de las diferencias que pudiera haber en cuanto a su composición química por tratarse de un origen geográfico distinto, se ha podido determinar que a partir de una concentración de 0.3 mg/mL hay inhibición del crecimiento, inhibición de la formación de blastoconidias (incapacidad de reproducirse), inhibición del cambio morfogénico (importante factor de virulencia) y también hay alteraciones a nivel morfológico con daños en pared y membrana celular, incluso, a nivel de membrana nuclear (Martínez Urban, 2008). En estudios de microscopía electrónica con este mismo extracto se observaron alteraciones entre las que se encuentran la presencia de vacuolización, ruptura de la cubierta celular con liberación de material intracelular e incremento en la formación de gránulos de almacenamiento. También es visible la alteración en las estructuras de la cubierta externa de la levadura (Londoño Orozco 2010).





En los últimos años un gran número de investigaciones se ha encaminado a analizar el efecto de los diferentes compuestos antifúngicos sobre la expresión diferencial de genes de *C. albicans*, con la finalidad de profundizar en su mecanismo de acción e incluso encontrar dianas terapéuticas para el desarrollo de nuevos antifúngicos (De Backer, et. al. 2001; Rogers and Barker, 2003; Niewert, et. al. 2003; Agarwal, et. al., 2003; Chau, et. al., 2004; Karababa, et. al., 2004; Liu, et. al. 2005).

Con esta misma intención de profundizar en el mecanismo de acción del extracto etanólico de propóleo sobre *C. albicans* se llevaron a cabo estudios de despliegue diferencial para encontrar los genes que resultaban afectados en su expresión. Los resultados demostraron 22 genes **sobrexpresados y 7 subexpresados**, de estos últimos resaltan ADH1 (alcohol deshidrogenasa 1) y PIK1 (fosfatidil inositol cinasa 1).

Para corroborar estos resultados de subexpresión del gen PIK1 se llevó a cabo este trabajo, en el cual se estandarizó la reacción de RT-PCR con la finalidad de evaluar la expresión diferencial de este gen en *C. albicans* sin tratamiento y con exposición al extracto etanólico de propóleo.

Las concentraciones empleadas fueron de 0.3 y 0.6 mg/mL durante 1 y 2 hrs de exposición. Estas concentraciones fueron determinadas de tal forma que hubiera inhibición del crecimiento pero no un efecto fungicida y que observado con la tinción de Gram no hubiera presencia de lisis celular, lo cual tiene un efecto negativo sobre la obtención de ARN. Los resultados obtenidos fueron los mismos que los obtenidos por Martinez Urban (2008).

Para la reacción de RT-PCR fue necesario diseñar los iniciadores específicos para el gen PIK1 a partir de la secuencia obtenida del GenBank (National Center for Biotechnology Information) con número de acceso XM_709655.1 y con el programa primer 3. Para determinar la especificidad todas las secuencias fueron comparadas usando el programa "BLAST".





En cuanto a las concentraciones de cada uno de los reactivos no fue necesario estandarizarlas debido a que bajo las **condiciones propuestas** por el proveedor se obtuvo un producto único, con buena intensidad de la banda y correspondiente al peso esperado (520 pb). La optimización del número de ciclos se llevó a cabo, y se consideró que el producto de amplificación fue claramente visible en un gel de agarosa, pero también que la amplificación se encontrara en la fase exponencial no alcanzando la meseta de la reacción (Marone, 2001). Otros autores mencionan adecuado un número de ciclos entre 25 y 30, en este caso decidimos trabajar con 28.

Los resultados obtenidos corroboran lo observado en el despliegue diferencial, una subexpresión del gen PIK1 de *Candida albicans* por efecto del extracto etanólico de propóleo. Esta disminución en la expresión fue visible desde la concentración de 0.3 mg/mL (equivalente a la mitad de la CMI) y desde una hora de exposición, condiciones en las que el efecto era fungicida. El efecto de subexpresión fue mayor al incrementar la concentración y el tiempo de exposición.

Aún cuando no se conoce con exactitud el papel que el gen PIK1 desempeña en *Candida albicans*, se piensa que su función y modo de acción es muy parecido al presente en *Sacharomyces cerevisiae*.

La inactivación de Pik1p disminuye los niveles de PtdIns(4)P, produce alteraciones en el tráfico de proteínas de secreción reteniéndolas en el Aparato de Golgi, un tráfico anormal de los endosomas y desestabiliza la integridad estructural del Aparato de Golgi y vacuolas (Hama, 1999; Walch-Solimena, 1999; Audhya 2000). Además se ha demostrado que la pérdida de la función de Pik1p provoca defectos en la citocinesis y en la organización del citoesqueleto de actina (García-Bustos, 1994; Walch-Solimena, 1999) y que la eliminación del gen es letal para la levadura, y su función no es compensada por ninguna otra fosfatidilinositol 4 cinasa (Strahl 2005).

Recientemente se ha descrito que la asociación de Pik1 con las chaperonas dependientes de fosforilación 14-3-3 (Bmh1p y Bmh2p) podrían ser las encargadas de regular el





citoesqueleto de actina. Cuando se emplean mutantes en *bmh* o *pik1*, además de alteraciones en el citoesqueleto, se observan alteraciones en la gemación y en la integridad de la pared celular (Lottersberger, 2006), lo que podría estar relacionado con el transporte de membrana pero también podría ser indicativo de funciones adicionales de ambas proteínas. Se ha propuesto que esta interacción podría formar parte de una vía de señalización que coordina las condiciones de crecimiento con la función del Aparato de Golgi. Las proteínas 14-3-3 están implicadas en muchos procesos celulares. En las levaduras, ellas participan en la cascada de **Ras/MAPK** y posiblemente en la vía de integridad de la pared celular (Demmel, 2008; Faulhammer, 2007).

Aun cuando la participación de la proteína PIK1 en todos los procesos mencionados anteriormente no se ha comprendido del todo, si deja claro que es una proteína que al participar en tantas funciones celulares esenciales cualquier alteración conduce a la muerte celular.

Con los resultados obtenidos en este trabajo podemos afirmar que el extracto etanólico del propóleo provoca una subexpresión del gen PIK1 de *C. albicans* de forma dependiente a la concentración y el tiempo de exposición.

De acuerdo a lo que se ha mencionado de *Saccharomyces cerevisiae*, la alteración de PIK1 podría ser responsable de los daños observados anteriormente, como inhibición del crecimiento, de la gemación (formación de blastoconidias), el cambio morfogénico y del daño a nivel de pared y membrana celular.

Este constituye el primer trabajo en el que se describe la alteración de un gen por efecto del extracto etanólico del propóleo. Sin embargo, para poder proponer un mecanismo de acción molecular del EEP más exacto, se requiere de estudios que involucren proteínas asociadas a PIK1 y evaluar sus niveles de expresión genética y proteína así como su actividad, creación de mutantes y estudios de localización subcelular que además permitirían conocer más acerca del funcionamiento del gen PIK1 en *C. albicans*, ya que hasta la fecha es muy poca la información disponible.





También sería interesante evaluar la expresión de este gen empleando extractos de diferentes orígenes geográficos con la finalidad de determinar si todos provocan la misma alteración. Por otra parte también se podrían probar algunos de los compuestos químicos aislados del propóleo y ver si hay alguno que sea específicamente responsable del daño.





CONCLUSIONES

- Se diseñaron iniciadores específicos para la amplificación del gen PIK1 de *C. albicans*, por medio de la reacción de PCR.
- Se consiguió estandarizar la técnica de RT-PCR que nos permitieran evaluar diferencias en la expresión del gen PIK1 bajo diferentes condiciones
- El extracto etanólico de propóleo de Cuautitlán Izcalli Edo. de Méx. Provoca una subexpresión del gen PIK1 de *C. albicans* desde una concentración de 0.3 mg/ml con 1 hr de incubación, incrementándose el efecto al aumentar la dosis y el tiempo de exposición. Lo cual corrobora lo encontrado previamente por la técnica de despliegue diferencial.
- De acuerdo a lo que se ha descrito para el gen PIK1 de *S. cerevisiae* es muy probable que la disminución de la expresión de este gen esté relacionado con la inhibición del crecimiento, la formación de blastoconidias, el cambio morfológico y el daño a nivel de pared y membrana celular
- Se requieren más estudios para poder esclarecer el mecanismo de acción exacto del EEP sobre *C. albicans*.
- Hasta el momento no hay ningún reporte a nivel internacional del efecto del EEP sobre los genes de ningún microorganismo.





BIBLIOGRAFIA

- Quindós Guillermo. 2002. Las micosis en el amanecer del Siglo XXI. Revista Iberoamericana de Micología 19: 1-4
- Maldonado Luis. 2000. Perfil de los propóleos argentinos. Congreso internacional de propóleos
- Carrillo M. Alfonso J., Brió Sonia, Quindós G. 2001. Una nueva generación de fármacos antifúngicos. Revista Iberoamericana de Micología. 18: 2-5
- Holderna E., Kedzia B., 1987 Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. Herba Pol
- J Luis., L Rubén, H Francisca 2006. Actualidades en micología médica. 3 Ed, Facultad de medicina UNAM
- F. Brooks Geo [et-al]. 2008. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 19 ed. Ed el manual moderno. México
- Pardi G., Cardozo Elba I. 2002. Algunas consideraciones sobre *Cándida albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal. Acta Odontológica Venezolana. 40(1). 9-17
- Calderone Richard A., Braun Phyllis C. 1991. Adherence and Receptor Relationships of *Candida albicans*. Microbiological Reviews. 1-20.
- Del Palacio A., Cuétara María S. 2009. Infecciones por hongos invasores en imágenes. Ed., Ars Medic; Barcelona España.
- Calderone Richard A., Fonzi William A. 2001. Virulence factors of *Candida albicans*, Trends in Microbiology. 9(7)
- Murray P.R., Pfaller M.A., Rosenthal K.S. 2006. Microbiología médica. 5ª.
- Arenas Roberto. 2008. Micología Médica Ilustrada. 3º.





- Bonifaz Alexandro. 2000. *Micología Médica Básica*. Mc Graw Hill.
- Escobar C. Ma., Zuluaga A. 2004. Nuevos antimicóticos de uso en dermatología. *Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana*. 32(6)
- Scherer S., Magee P. 1990. Genetics of *Candida albicans*. *Microbiological Reviews*. 226-241.
- Flanagan CA., Schnieders EA., Emerick AW., Kunisawa R., Admon A., Thorner J. 1993. Phosphatidylinositol 4-kinase: gene structure and requirement for yeast cell viability. *Science*. 262 (5138). 1444- 1448.
- Strahl T., Hama H., DeWald Daryll B., Thorner J. 2005. Yeast phosphatidylinositol 4 kinase, Pik1, has essential roles at the Golgi and in the nucleus. *The Journal Of Cell Biology*.
- Mesa Arango A.C., Bueno Sánchez J.G., 2004 Productos naturales con actividad antimicótica, *Rev. Esp. Quimioterap*. 17(4). 325-331.
- Gregorí Valdés Bárbara Susana. 2005. Estructura y actividad de los antifúngicos. *Rev Cubana Farm* . 39(2)
- Bidart H. T. 2004. Rol de voriconazol y caspofungina en terapia antifúngica, *Rev Chil Infect*. 21(Supl 1). S13-S19.
- Ghisalberty, E. L. 1979. Propolis: a review. *Bee world*. 60(2): 59-84.
- Castaldo S., Capasso F. 2002. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*. 73(sup 1). S1-S6
- Marcucci. 2002. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Fitoterapia*. (73) (Sup1). S1–S6





- 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.
- Burdock G. A. 1998. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis. *Food and Chemical Toxicology*. 36. 347-363.
- 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.
- 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.
- 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.
- Faten K., El Hady A., G. Hegazi A. 2002. Egyptian Propolis: 2. Chemical Composition, Antiviral and Antimicrobial Activities of East Nile Delta Propolis. *Z. Naturforsch.* 57c, 386D394.
- Quintero Mora María Leonor, Londoño Orozco Amparo, Hernández Hernández Francisca. 2008. Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento in vitro de *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol.* 25. 22-26
- S. Hughes, A. Moody. 2007. PCR. Scion Publishing.
- Pérez F., Baridón Ma. A., Henen J., Venegoni G. 2006. Obtención de ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* en un laboratorio de mediana complejidad. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 40(4). 521-524.





- Salas Téllez E. Arenas Roberto. 2001. Biología Molecular En Micología Médica. Dermatología Venezolana. 39(1).
- A.Read, D. Donnai. 2009. Nueva genética clínica. OMEGA. Barcelona España. RB155, R4318 BC
- McPherson, M. J., Hames, B. D., Taylor, G. R, 2008. PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular *PCR a Practical Approach*. Univ. Oxford
- Kujumgiev, I. Tsvetkova. 1999. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of Propolis of different geographic origin. Journal of Ethnopharmacology. 64. 235–240.
- Martínez Urban Carol. 2008. Efecto del extracto etanólico de propóleo sobre el crecimiento y daño estructural de *C. albicans*. tesis de licenciatura, UNAM
- González G. Ana R. Curso de Industrialización de Productos Apícolas Fórmulas apiterapéuticas. Cosméticos, apifármacos y suplementos nutricionales. Organización Nacional de Apicultores. Veracruz México. 2000.





ANEXO



**Preparación de medios****YPD (Sólido)**

2 g	Peptona de caseína
2 g	Dextrosa
2 g	Agar
1 g	Extracto de levadura

Preparación para 100 mL.

YPD (Líquido)

2 g	Peptona de caseína
2 g	Dextrosa
1 g	Extracto de levadura

Preparación para 100 mL.

SDA

6.5 g	SDA
--------------	------------

Preparación para 100 mL.

Alcohol al 70%

72.9 mL.	EtOH (96 %)
27.1 mL.	H₂O (destilada)

Preparación para 100 mL.



**Tinciones****Tinción de Gram**

Tiempo (seg)	Compuesto
30	Cristal violeta
30	Lugol
-----	Alcohol-acetona
30	Safranina

Cristal violeta

2 g	Cristal violeta
20 mL	Etanol al 95%
0.8 g	Oxalato de amonio
80 mL	Agua destilada

Preparación para 100 mL.

Lugol

2 g	Yoduro de potasio
1 g	Yodo metálico
100 mL	H ₂ O destilada

Preparación para 100 mL.



**Safranina**

0.5 g	Safranina
100 mL	H ₂ O

Preparación para 100 mL.

Reactivos para RT-PCR**TBE**

54 g	Tris base
27.5 g	Ácido bórico
3.72 g	Na ₂ EDTA·2H ₂ O
Ajustar a 1 L con H ₂ O destilada	

Preparación para 1 L de solución stock 5X

80 g	NaCl
2 g	KCl
11.5 g	Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O
2 g	KH ₂ PO ₄

Buffer de lisis

2 mL	Tris HCl 50 mM (pH 7.2)
2 mL	EDTA (50 Mm)
6 mL	SDS 3%
200 µL	Beta- mercaptoetanol 1 %
2.8 mL	Agua destilada estéril



**Buffer de carga**

0.25 %	Azul de bromofenol
0.25 %	Azul de xilencianol
30 %	Glicerol en agua

Mantener a 4 °C

Gel de agarosa al 2%

0.7 g	Agarosa
35 mL.	TBE

Características de los iniciadores

Nombre del primer	PIK1 1F
No del primer	126206C08
Longitud del primer	20
Secuencia (5´ a 3´)	TGT CGA ATC GAT GAT TGC AT
Escala de síntesis	50 N
Peso molecular (µg/µmol)	6,148.0
Coefficiente de extinción milimolar	222.8
µg por OD	27.59
nmoles por OD	4.49





Nombre del primer	PIK1 1R
No del primer	126206C09
Longitud del primer	20
Secuencia (5' a 3')	GTT TTG TTG GGC CGT TCT AA
Escala de síntesis	50 N
Peso molecular ($\mu\text{g}/\mu\text{mol}$)	6,146.0
Coefficiente de extinción milimolar	207.3
μg por OD	29.65
nmoles por OD	4.82

