



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTOS DE LA ϵ -POLI-L-LISINA SOBRE LA FISIOLÓGÍA
DE *Candida albicans* Y *Saccharomyces cerevisiae*.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:
FRANCISCO JAVIER PADILLA GARFIAS**



CIUDAD DE MÉXICO

2019



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **PROFESOR:** DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

VOCAL: **PROFESOR:** M. EN B. MARTHA GILES GÓMEZ

SECRETARIO: **PROFESOR:** DR. ANTONIO PEÑA DÍAZ

1ER. SUPLENTE: **PROFESOR:** M EN B. BEATRIZ RUIZ VILLAFÁN

2° SUPLENTE: **PROFESOR:** M. EN C. JAVIER AXOSCO MARÍN

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 306-Oriente, Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Asesor del tema

Supervisor técnico

Dr. Antonio Peña Díaz

M en C. Norma S. Sánchez Sánchez

Sustentante

Francisco Javier Padilla Garfias

ÍNDICE

1. Abreviaturas	
2. Resumen	1
3. Introducción	2
4. Marco teórico	3
4.1 Las levaduras como modelo de estudio	3
4.1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , modelo de estudio.	5
4.1.2 <i>Candida albicans</i> : agente causal de la candidiasis.	5
4.2 ϵ -poli-L-lisina	8
4.2.1 Mecanismo de acción de la ϵ -poli-L-lisina	11
4.3 Pared y membrana celular de las levaduras	12
4.3.1 Pared Celular	12
4.3.2 La membrana celular	14
5. Planteamiento del problema	18
6. Hipótesis de trabajo	19
7. Objetivos	20
7.1 Objetivo general.	20
7.2 Objetivos particulares	20
8. Metodología	21
8.1 Muestra biológica	21
8.2 Medios de cultivo	21
8.3 Condiciones de cultivo	22
8.4 Solución de EPL	22
8.5 Determinación de la CMI	22
8.6 Acidificación del medio	23
8.7 Salida de moléculas pequeñas	23
8.8 Metabolismo aerobio	24
8.9 Metabolismo anaerobio	24
8.10 Efectos sobre el potencial de membrana	25
8.11 Efecto de los metales divalentes	26

8.12 Análisis estadístico	26
9. Resultados	27
9.1 Determinación de la CMI	27
9.2 Acidificación del medio	29
9.3 Flujo de potasio	31
9.4 Flujo de moléculas pequeñas	33
9.4.1 Material que absorbe a 260 nm	34
9.4.2 Material que absorbe a 280 nm	36
9.4.3 Flujo de fosfato inorgánico	37
9.5 La relación entre la cantidad de células y la concentración efectiva de EPL.	39
9.6 Evaluación del metabolismo.	41
9.6.1 Metabolismo aerobio	41
9.6.2 Metabolismo anaerobio	48
9.7 Efectos sobre el potencial de membrana	50
9.8 Efecto de la EPL en presencia de metales divalentes en el crecimiento microbiano.	55
10. Resumen de resultados	57
11. Discusión	58
12. Conclusiones	64
13. Perspectivas	65
14. Bibliografía	66

ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICAS.

Índice de figuras

Título de la figura	Página
Figura 1. Posibles polímeros de la EPL	8
Figura 2. Estructura de EPL	8
Figura 3. Péptido sintetasa no ribosomal de <i>S. albulus</i>	9
Figura 4. Representación esquemática de la pared celular de levaduras.	13
Figura 5. Tipo de proteínas ancladas a la membrana celular en <i>S. cerevisiae</i>	14
Figura 6. Mecanismos de transporte en la membrana plasmática	16
Figura 7. Transporte de potasio y acidificación del medio en una levadura.	33
Figura 8. Esquema de la respiración celular.	42
Figura 9. Cadena transportadora de electrones.	43
Figura 10. Esquema de la respiración celular.	48
Figura 11. Mecanismo de acción propuesto para la EPL.	61

Índice de tablas

Título de la tabla	Página
Tabla 1. Organelos principales de las levaduras.	4
Tabla 2. Factores de virulencia de <i>C. albicans</i> .	7
Tabla 3. CMI de EPL para diferentes microorganismos.	10
Tabla 4. Componentes de la pared celular.	12-13

Índice de gráficas

Título de la gráfica	Página
Gráfica 1. Curva de crecimiento, determinación de la CMI para <i>C. albicans</i> .	27
Gráfica 2. Curva de crecimiento, determinación de la CMI para <i>S. cerevisiae</i> .	28
Gráfica 3. Acidificación del medio por <i>C. albicans</i> .	30
Gráfica 4. Acidificación del medio por <i>S. cerevisiae</i> .	30
Gráfica 5. Salida de K ⁺ por <i>S. cerevisiae</i> .	32
Gráfica 6. Salida de K ⁺ por <i>C. albicans</i> .	32
Gráfica 7. Salida de moléculas que absorben a 260 nm por <i>S. cerevisiae</i> .	35
Gráfica 8. Salida de moléculas que absorben a 260 nm por <i>C. albicans</i> .	35
Gráfica 9. Salida de moléculas que absorben a 280 nm por <i>S. cerevisiae</i> .	36
Gráfica 10. Salida de moléculas que absorben a 280 nm por <i>C. albicans</i> .	37
Gráfica 11. Salida de fosfato inorgánico por <i>S. cerevisiae</i> .	38
Gráfica 12. Salida de fosfato inorgánico por <i>C. albicans</i> .	39
Gráfica 13. Salida de K ⁺ por cantidades variables de levaduras.	40
Gráfica 14. Salida de moléculas que absorben a 260 nm por cantidades variables de levaduras.	40
Gráfica 15. Salida de moléculas que absorben a 280 nm por cantidades variables de levaduras.	41
Gráfica 16. Consumo de oxígeno de <i>C. albicans</i> .	44
Gráfica 17. Efectos sobre la respiración de <i>C. albicans</i> .	45
Gráfica 18. Consumo de oxígeno de <i>S. cerevisiae</i> .	46

Gráfica 19. Efectos sobre la respiración de <i>S. cerevisiae</i> .	47
Gráfica 20. Efectos sobre la fermentación de <i>S. cerevisiae</i> .	49
Gráfica 21. Efectos sobre la fermentación de <i>C. albicans</i> .	49
Gráfica 22. Efectos sobre el potencial de membrana en <i>S. cerevisiae</i> .	51
Gráfica 23. Efectos sobre el potencial de membrana en <i>S. cerevisiae</i> .	52
Gráfica 24. Efectos sobre el potencial de membrana en <i>C. albicans</i> .	53
Gráfica 25. Efectos sobre el potencial de membrana en <i>C. albicans</i> .	54
Gráfica 26. Efecto de metales divalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} sobre el crecimiento de <i>C. albicans</i> .	55
Gráfica 27. Efecto de metales divalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} sobre el crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> .	56

1. ABREVIATURAS

- ADP Adenosín difosfato
- ATCC American Type Culture Collection
- ATP Adenosín trifosfato
- AU Unidades arbitrarias
- BaCl₂ Cloruro de bario
- Bicina N,N-Bis(2-hidroxietil)-glicina
- Ca²⁺ Ion calcio
- CaCl₂ Cloruro de calcio
- CAS *Chemical Abstracts Service*
- CCCP Carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona
- CMI Concentración mínima inhibitoria
- CO₂ Dióxido de carbono
- DiSC₃ 3,3-diethylthiacarbocianina
- DNA Ácido desoxirribonucleico
- DO Densidad óptica
- EPL ε-poli-L-lisina
- EROS o ROS Especies reactivas de oxígeno
- FDA *Food and Drug Administration*
- GRAS *Generally Recognized As Safe*
- H₂O Agua
- H⁺ Ion hidronio
- H₂O₂ Peróxido de hidrógeno
- K⁺ Ion potasio
- KCl Cloruro de potasio
- K₂PO₄ Fosfato dipotásico
- MES Ácido 2-(N-morfolino) propanosulfónico
- Mg²⁺ Ion magnesio
- MgCl₂ Cloruro de magnesio

- MoO_4^{2-} Ion molibdato
- NaCN Cianuro de sodio
- NAD^+ Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
- NADH Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
- natg O Nano átomos gramos de oxígeno
- NRPS Péptido sintetasa no ribosomal
- Pi Fosfato inorgánico
- RNA Ácido ribonucleico
- TEA Trietanolamina
- U Unidad de actividad enzimática
- UDO Unidades de densidad óptica
- UV Ultravioleta
- YPD *Yeast, peptone and dextrose medium*
- $((\text{PO}_4)_2\text{MoO}_3)^{3-}$ Ion fosfomolibdato
- ΔpH Diferencia de pH
- $\Delta\Psi$ Diferencia de potencial.

2. RESUMEN

Se estudiaron los efectos de la ϵ -poli-L-lisina sobre *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans*. Se encontró que produce la salida de K^+ y a altas concentraciones una inhibición de la acidificación extracelular. Se propone que, como resultado de la unión de la ϵ -poli-L-lisina (EPL) a la superficie celular, disminuye la carga superficial negativa de las células.

Con las concentraciones más altas, además del flujo de salida de K^+ , se encontró un flujo de fosfatos y material que absorbe a 260 nm y 280 nm, una inhibición de la fermentación y de la respiración. También se encontró que a concentraciones mayores a la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) disminuye el crecimiento, pero si al mismo tiempo se agregan metales divalentes, no se afecta el crecimiento. El potencial de membrana en presencia de ϵ -poli-L-lisina (EPL) se afecta, ya que produce una despolarización. Los efectos dependen del medio utilizado y la cantidad de células.

La ϵ -poli-L-lisina (EPL) afecta la morfología de la membrana celular debido a las interacciones electrostáticas, provocando la formación de poros por los cuales se da una fuga de intermediarios metabólicos que impiden que ambas levaduras puedan continuar con su metabolismo y proliferar.

3. INTRODUCCIÓN

Actualmente, las cepas resistentes de *Candida albicans* son un problema de salud pública en pacientes inmunocomprometidos; la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas es un campo de investigación para utilizarlas como posibles antimicrobianos en tratamientos de micosis.

Estudios recientes atribuyen propiedades antimicrobianas a la ϵ -poli-L-lisina (EPL) como agente antibiótico contra diferentes especies de bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas, otro estudio sustenta que es una molécula no citotóxica para células de mamífero.

La propuesta más apoyada del mecanismo de acción para los policationes, es la alteración de la membrana citoplasmática, aumentando su permeabilidad, generando así la salida de componentes del interior de la célula. Por lo anterior, en esta tesis se estudió el efecto de la ϵ -poli-L-lisina (EPL) en la fisiología de dos especies de levaduras, *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Las levaduras como modelo de estudio

Los hongos son organismos eucariotas, es decir con núcleos organizados y definidos; la mayoría son aerobios, heterótrofos y no presentan movilidad. En un inicio su clasificación se basaba en observaciones macroscópicas, dividiéndolos en hongos filamentosos o mohos, setas y levaduras (Madigan *et al.*, 2014).

Las levaduras son hongos unicelulares, y una de sus principales características es la capacidad de fermentar azúcares para la producción de etanol, por lo que desde varias culturas de la antigüedad los utilizaron para la producción de vino y de pan; las podemos encontrar en diferentes hábitats naturales, en hojas y flores de plantas, suelo y agua salada, y también forman parte de la microbiota humana, ya que están presentes en la superficie de la piel y en el tracto intestinal, donde viven de manera simbiótica o como parásitos.

Las levaduras pertenecen a la clase de los ascomicetos y a la subclase de hemiascomicetos, se multiplican como células individuales por un proceso de gemación. En el microscopio, son en su mayoría esféricas y de mayor tamaño que las bacterias, poseen estructuras celulares como las que se describen en la Tabla 1 (Feldmann, 2012):

Tabla 1. Organelos principales de las levaduras.

Orgánulo	Función
Pared celular	Estructura rígida; brinda soporte y protección a la célula que rodea.
Membrana plasmática	Sirve como límite entre el interior y exterior de la célula.
Citoplasma	Región del contenido líquido fuera de los organelos, donde se encuentran enzimas y nutrientes.
Núcleo	Estructura que contiene el material genético de una célula eucariota.
Retículo endoplásmico	Un sistema de túbulos, cisternas y vesículas dentro del citoplasma. Tiene una parte lisa que es de transporte y almacenamiento y otra rugosa donde se encuentran anclados los ribosomas y se sintetizan las proteínas.
Vacuola	Estructura individual de transporte y almacenamiento de diversas sustancias, rodeada por una membrana.
Aparato de Golgi	Red de membranas donde se almacenan y modifican proteínas después de su síntesis.
Mitocondrias	Lugar donde ocurre la transducción de energía aeróbica, oxida a los intermediarios metabólicos para producir energía en forma de ATP.
Peroxisoma	Son estructuras multifuncionales, donde se encuentran oxidasas y catalasas, rodeadas por una membrana.

Tomado de Feldmann, 2012 y Karp, 2013.

4.1.1 *Saccharomyces cerevisiae*, modelo de estudio.

Saccharomyces cerevisiae es una levadura del grupo de los ascomicetos que se reproduce por gemación. Prospera en hábitats donde hay azúcares disponibles y es anaerobia facultativa. Esta levadura se utiliza en la investigación como organismo modelo y en la industria para la producción de pan, cerveza, vino y maduración de quesos y embutidos (Madigan *et al.*, 2014).

En condiciones específicas la forma diploide es capaz de reproducirse sexualmente. En estos casos se produce la meiosis en la célula formándose un asca que contiene cuatro ascosporas haploides (Rine, 1989).

4.1.2 *Candida albicans*: agente causal de la candidiasis.

La candidiasis es una micosis causada por diversas especies de levaduras del género *Candida*, principalmente *Candida albicans*. Esta levadura es responsable de enfermedades sistémicas intrahospitalarias, que han aumentado en los últimos años debido a la existencia de cepas resistentes a los tratamientos convencionales. La distribución geográfica de la candidiasis es universal (Pineda *et al.*, 2017).

Cualquier tejido puede ser afectado por *C. albicans*, por lo que existen diversas patologías asociadas directamente al estado inmunológico del paciente. La mayoría de estas infecciones se originan a partir de un foco endógeno (tracto gastrointestinal o respiratorio) o la alteración de la microbiota (Madigan *et al.*, 2014).

Candida albicans es un hongo asexual, que pertenece al género *Candida* y la familia de los Sacaromicetos, pero es altamente variable y adaptable, es pleomórfico; es decir, capaz de crecer ya sea como una levadura mediante gemación, o como un pseudomicelio de células alargadas y unidas, o como hifas verdaderas. También muestra variación no sexual, llamada cambio fenotípico. Crecen normalmente en un periodo de 24 a 48 horas, en una temperatura de 28°C a 37°C; en cajas de agar da colonias lisas blanquecinas sin pigmento, se reproduce por gemación y puede formar pseudohifas (Dumitru *et al.*, 2004).

Su presencia en el intestino como parte de la microbiota se asocia a factores intrínsecos (regulación de genes, morfología, adaptación, carga) y factores extrínsecos (microbioma competitivo, dieta, estado inmunológico del huésped). Su diseminación a distintas partes del cuerpo se debe al daño a los epitelios, desequilibrio de la microbiota, etc., por lo que se le considera un patógeno oportunista (da Silva Dantas *et al.*, 2016).

Como el patógeno que es, *C. albicans* presenta rasgos que le permiten sobrevivir en diferentes nichos del hospedero, evadir el sistema inmune y establecerse como patógeno; estos factores se resumen en el Tabla 2.

Tabla 2. Factores de virulencia de *C. albicans*

Factor de virulencia	Función
Flexibilidad metabólica	Uso eficiente de fuentes de carbono alternativas, resistencia al estrés, cambios en la superficie celular.
Enzimas hidrolíticas	Degradación de los tejidos conectivos del huésped, escisión de factores inmunes del huésped, adquisición de nutrientes.
Candidalísina	Péptido secretado que daña las células epiteliales del hospedero.
Cambio fenotípico	Mutaciones que dan como resultados levaduras que no pueden ser atacadas por los neutrófilos.
Formación de biopelículas	Impide la acción de antifúngicos y acción de la defensa inmune del huésped.
Adherencia	Expresión de adhesinas.
Producción de hifas	En respuesta a temperatura, suero, pH alcalino, CO ₂ , deficiencia de nutrientes, etc.
Contrarrestando la inmunidad nutricional	Expresión de transportadores de captación de micronutrientes.
Evita la fagocitosis	Provoca lisis de hifas en las células huésped, neutralización fagolisosómica, piroptosis.
Evasión del sistema inmune huésped	Cambios en la arquitectura y composición de la pared celular, enmascaramiento de PAMPs.

Tomado de da Silva Dantas *et al.*, 2016.

4.2 ϵ -poli-L-lisina

La ϵ -poli-L-lisina (EPL) es un homopolímero del aminoácido L-lisina caracterizado por su enlace peptídico entre los α -carboxilos y los ϵ -aminos del aminoácido L-lisina (Figura 1 y Figura 2). A pH 7 es un catión, pero su efecto antimicrobiano es muy amplio a diferentes pHs y temperaturas, por lo que es muy estable (Yoshida & Nagasawa, 2003).



Figura 1. Posibles polímeros de la EPL

Hace más de tres décadas se describió a ϵ -poli-L-lisina (EPL) como el polímero con mayor actividad antimicrobiana, comparado con la α -poli-L-lisina, la cual se obtiene por reacciones químicas de condensación (Shima *et al*, 1984).

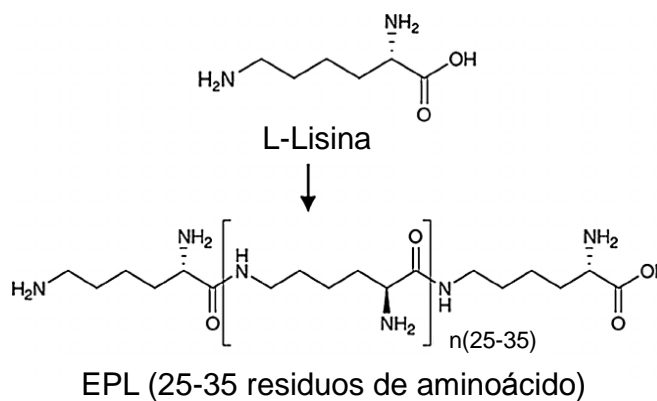


Figura 2. Estructura de EPL (Pandey & Kumar, 2014)

La EPL ϵ -poli-L-lisina (EPL) producida por *Streptomyces albulus* es un biopolímero de 25 a 35 residuos de L-lisina, con una solubilidad muy alta en agua; su punto isoeléctrico es aproximadamente de 9.0, y no se degrada al someterla a esterilización en autoclave o ebullición (Yoshida & Nagasawa, 2003).

Streptomyces albulus cuenta con una sintetasa de ϵ -poli-L-lisina, anclada a la membrana, la cual es una péptido sintetasa no ribosomal (NRPS) con actividad catalítica tipo aminoácido ligasa para la formación de enlaces peptídicos (Figura 3) (Yamanaka, et al, 2008).

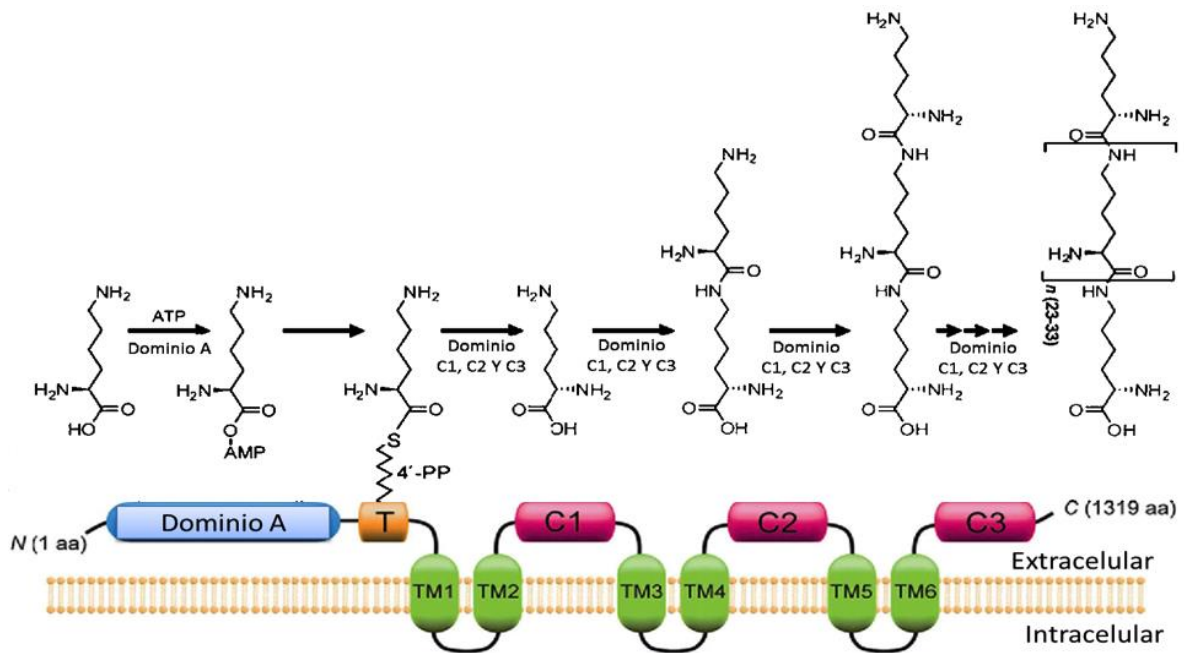


Figura 3. Péptido sintetasa no ribosomal de *S. albulus* (Xu et al., 2016).

La síntesis de ϵ -poli-L-lisina (EPL) depende en gran medida del ATP; la catálisis se inicia en los dominios A y T con la adenilación y la transferencia de un monómero de L-lisina entrante como una unidad de extensión; luego, los dominios C-terminales catalizan la formación de enlaces peptídicos entre la unidad de extensión y una L-lisina libre, que produce un dímero de L-lisina; luego el dímero se usa como un aceptor libre para la siguiente reacción de polimerización, y así se

genera una serie de ϵ -poli-L-lisina (EPL) con longitudes de múltiples cadenas, porque este ciclo catalítico no tiene un punto final predeterminado (Xu *et al.*, 2016).

Este polímero se utiliza en algunos países asiáticos como aditivo y conservador alimenticio, y cuenta con un código GRAS No. 000135 en la US Food and Drug Administration (FDA) (Tan *et al.*, 2018), debido a sus propiedades antimicrobianas para un amplio grupo de microorganismos (Tabla3).

Tabla 3. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de EPL para diferentes microorganismos.

Grupo	Microorganismo	CMI ($\mu\text{g/mL}$)
Hongos filamentosos	<i>Aspergillus niger</i> IFO 4416	250
	<i>Trycophyton mentagrophytes</i> IFO7522	60
Levaduras	<i>Rhodotorula lactase</i> IFO1423	25
	<i>Pichia anomala</i> IFO0146	150
	<i>Candida acutus</i> IFO1912	6
Bacterias positivas	Gram <i>Bacillus subtilis</i> IAM1069	3
	<i>Micrococcus luteus</i> IFO12708	16
	<i>Staphylococcus aureus</i> IFO13276	12
Bacterias negativas	Gram <i>Escherichia coli</i> IFO13500	50
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO3923	3
	<i>Salmonella typhymurium</i>	16

Tomado de Yoshida & Nagasawa, 2003

Además de su amplio espectro, es importante señalar que es selectiva; es decir, no causa daño a las células de mamíferos. En un estudio se investigó el

efecto de EPL (ϵ -poli-L-lisina) de grado alimentario sobre la microbiota intestinal de ratones, encontrando que sólo altera de forma transitoria las comunidades microbianas intestinales y pasado un tiempo o dejándola de ingerir, esta se restablece (You *et al.*, 2017).

En otro estudio se demostró que no es citotóxica; se comprobó que no afecta los fibroblastos dérmicos primarios de humanos ni interviene en el proceso de cicatrización de la córnea en conejos lesionados (Venkatesh *et al.*, 2017).

4.2.1 Mecanismo de acción de la ϵ -poli-L-lisina

Los polímeros catiónicos suelen utilizarse en la terapéutica, y deben su acción a la presencia de grupos de amonio cuaternario en su estructura (Carmona-Ribeiro & de Melo-Carrasco, 2013). La presencia de los grupos cargados positivamente, provoca la desestabilización de las membranas al interactuar con las cabezas de los fosfolípidos que se encuentran cargados negativamente, y producen un plegado de la curvatura en las membranas, que conduce a la formación de vesículas (Hylgaard *et al.*, 2014).

Por otra parte, (Tan *et al.*, 2018) y Ye *et al.* (2013) han postulado que la EPL (ϵ -poli-L-lisina) aumenta la permeabilidad de la membrana, y ello lleva a una acumulación de especies reactivas de oxígeno (EROS o ROS en inglés) que conducen a la fragmentación del DNA.

Pero aunque el mecanismo de acción aún no se ha dilucidado completamente, la mayoría de los estudios concluyen que la alteración de la

membrana se debe en su mayoría a un fenómeno de adsorción iónica (Luz *et al.*, 2018), pero en realidad es la sinergia de múltiples daños en los microorganismos.

4.3 Pared y membrana celular de las levaduras

4.3.1 Pared celular

Es la cubierta exterior de la levadura, es una estructura rígida de 100 a 200 nm de espesor, que constituye el 25% de la masa seca de la levadura, protege a la célula de ataques enzimáticos, proporcionando principalmente estructura, sostén, soporte mecánico y forma a la célula (Feldmann, 2012), está compuesta por cuatro principales moléculas (Tabla 4):

Tabla 4. Componentes de la pared celular.

Componente	Proporción (%)	Función
β -1,3-glucano	50	Es un polímero de cadenas de glucosa, en forma de espiral, que confiere elasticidad y resistencia a la tracción. En los extractos de la pared celular, el β -1,3-glucano se encuentra como un polímero ramificado con β -1,6-glucano.
β -1,6-glucano	10	Es más corto que el β -1,3-glucano, tiene una estructura amorfa y actúa como adhesivo entre la quitina y el β -1,3-glucano.
Manoproteínas	40	Las manoproteínas son proteínas glicosiladas con restos de manosa, que forman parte de la

		capa externa de la pared celular de las levaduras.
Quitina	1-3	Es un polímero de N-Acetil-Glucosamina, unidas por un enlace β -1,4 y estabilizadas por puentes de hidrógeno. La quitina, se concentra principalmente en el septo y en las cicatrices de la gemación.
Tomado de Lipke & Ovalle, 1998; Orlean, 2012 y Lesage & Bussey, 2006.		

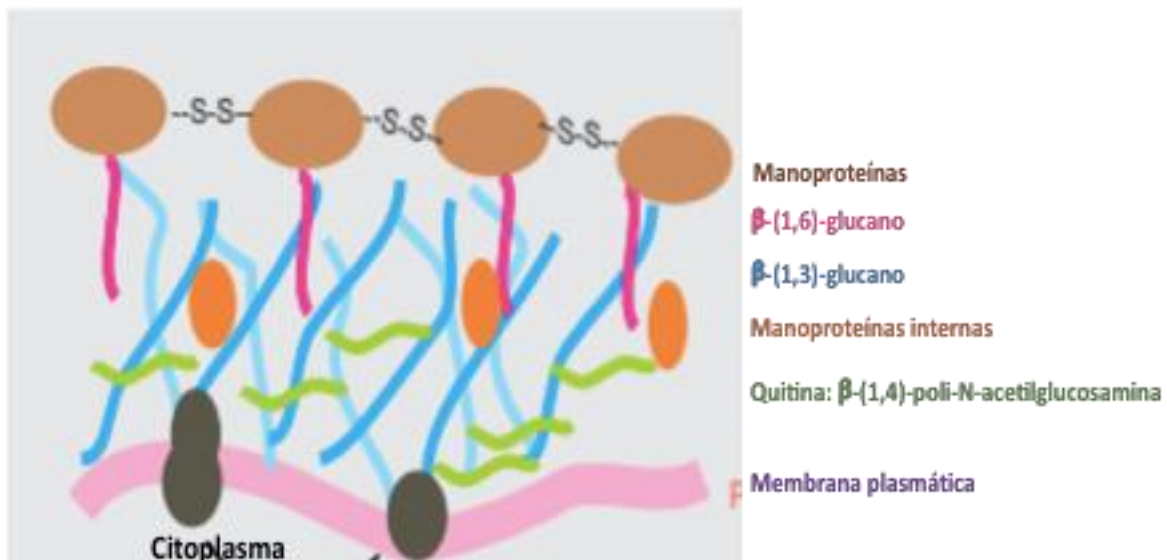


Figura 4. Representación esquemática de la pared celular de levaduras. Tomado de Feldmann (2012).

La pared celular de la levadura puede eliminarse mediante el tratamiento con enzimas líticas en presencia de estabilizadores osmóticos, sin dañar la viabilidad u otras funciones celulares. Estas células "desnudas" se llaman esferoplastos. La pared celular se puede regenerar, y este proceso se ha utilizado para estudiar aspectos de la biosíntesis de la pared celular (Lesage & Bussey, 2006).

4.3.2 La membrana celular

La membrana plasmática de la levadura es una bicapa lipídica, en la cual se anclan las proteínas (Figura 5), que pueden tener diversas funciones, como el anclaje del citoesqueleto, la síntesis de la pared celular, la transducción de señales y el transporte (van der Rest *et al.*, 1995).

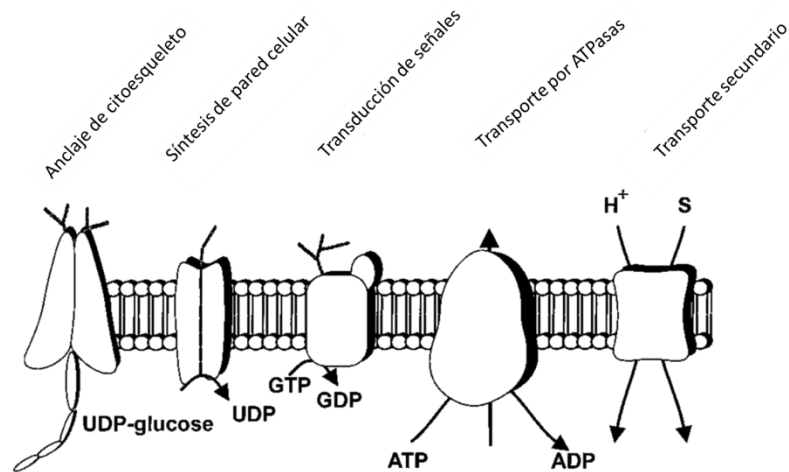


Figura 5. Tipo de proteínas ancladas a la membrana celular en *S. cerevisiae* (van der Rest *et al.*, 1995).

La membrana plasmática de *S. cerevisiae* tiene un grosor aproximado de 7.5 nm. Los componentes lipídicos comprenden principalmente fosfolípidos (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina y fosfatidilglicerol), así como esteroides (principalmente ergosterol y zimosterol), y todos se mantienen unidos por interacciones no covalentes, las cabezas polares (con carga parcial negativa) de los fosfolípidos se dirigen hacia afuera y las colas hidrófobas al interior de la bicapa (Feldmann, 2012).

Las proteínas de la membrana pueden dividirse en tres grupos:

1. Proteínas integrales: penetran y cruzan la bicapa lipídica, con porciones dirigidas al espacio extracelular y al citoplásmico.
2. Proteínas periféricas: se encuentran hacia el espacio extracelular o intracelular, con enlaces no covalentes a las cabezas de los fosfolípidos.
3. Proteínas ancladas a los lípidos: proteínas unidas con enlaces covalentes a las cabezas de los lípidos.

La fluidez de la membrana depende en gran medida de su viscosidad y la temperatura, y del que una membrana sea fluida depende por ejemplo la transducción de señales, división celular y formación de regiones especializadas (van der Rest *et al.*, 1995).

La membrana plasmática es una barrera con permeabilidad selectiva que permite el paso de solutos por varios mecanismos (Figura 6):

- Difusión simple: mediante este proceso el soluto se desplaza a favor de un gradiente electroquímico; pequeños solutos inorgánicos, como O_2 , CO_2 y H_2O , u otras moléculas pequeñas sin carga, penetran con facilidad.

El agua se mueve por ósmosis a través de la membrana plasmática semipermeable de una región de menor concentración a otra de mayor concentración de soluto; la ósmosis tiene una función clave en muchas funciones fisiológicas, como mantener la presión de turgencia.

- Transportadores o conductos de membrana: los iones y solutos como azúcares y aminoácidos requieren de transportadores especiales que son proteínas específicas.
- Difusión facilitada o pasiva: se lleva a cabo por transportadores facilitadores que actúan sin energía y desplazan solutos a favor de un gradiente de concentración en ambas direcciones.
- Transporte activo: estas proteínas requieren de energía para poder mover iones y solutos contra un gradiente de concentración.

El potencial de membrana se debe en gran medida a la permeabilidad limitada de la membrana al K^+ y otras moléculas cargadas (Feldmann, 2012; Karp, 2013).

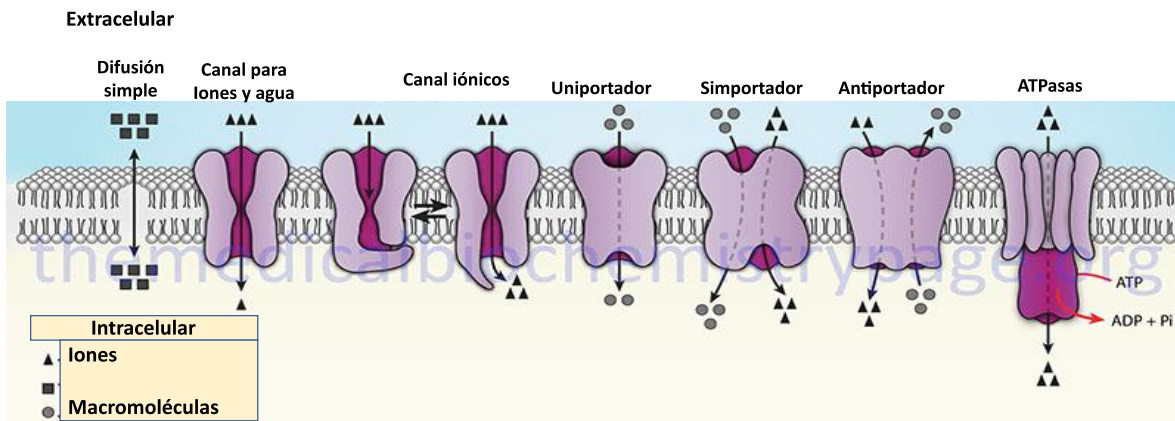


Figura 6. Mecanismos de transporte en la membrana plasmática (Karp, 2013).

Las membranas plasmáticas son estructuras muy delgadas y delicadas, cuya función clave es separar a la célula viva del ambiente, pero también tienen funciones secundarias, como:

- Protección física de la célula.
- Control de la presión osmótica.
- Control de la biosíntesis de la pared celular.
- Anclaje de compuestos citoesqueléticos.
- Permeabilidad selectiva.
- Funciones relacionadas con transporte.
- Localización de los componentes de transducción de señales.
- Sitios de reconocimiento célula-célula y adhesión célula-célula.

El espacio periplásmico es una región asociada a la pared celular delgada externa a la membrana plasmática; comprende principalmente proteínas secretadas que son incapaces de cruzar la pared celular, como la invertasa y la fosfatasa, que catabolizan sustratos que no atraviesan la membrana plasmática (Feldmann, 2012).

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La EPL ϵ -poli-L-lisina (EPL) es un homopolímero de L-lisina, autorizado por la Food and Drug Administration (FDA) como antimicrobiano; las investigaciones previas sustentan que produce daño a nivel de membrana celular, y este daño puede conducir a la falla metabólica y fisiológica de las levaduras.

Candida albicans a nivel intrahospitalario es un agente causal de infecciones en pacientes inmunocomprometidos; han surgido varias cepas resistentes a los antimicóticos clásicos, por ello es importante el efecto que pueda tener la ϵ -poli-L-lisina (EPL) sobre esta levadura patógena oportunista.

Se puede utilizar a *S. cerevisiae* como segunda levadura para realizar un estudio comparativo.

Este tema es de relevancia porque nos puede conducir a conocer el efecto antimicrobiano de este polímero sobre procesos fisiológicos, y proponer otra alternativa antimicótica útil para los problemas de salud mundial en el siglo XXI.

6. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Al exponer a *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* a la ϵ -poli-L-lisina (EPL), las interacciones electrostáticas afectarán la permeabilidad de la membrana celular de ellas, liberando así componentes celulares que alteren su funcionamiento y viabilidad.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

- Estudiar el efecto de la ϵ -poli-L-lisina (EPL) en la fisiología de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans*.

7.2 Objetivos particulares

- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria.
- Evaluar la salida de potasio y acidificación del medio al exponer las levaduras a la ϵ -poli-L-lisina (EPL).
- Examinar la permeabilidad de la membrana celular causada por la ϵ -poli-L-lisina (EPL).
- Estudiar si la ϵ -poli-L-lisina (EPL) afecta funciones como la respiración y fermentación.
- Estudiar efectos sobre el potencial de membrana.
- Estudiar los efectos sobre la viabilidad celular en ausencia y presencia de cationes divalentes.

8. METODOLOGÍA

8.1 Muestra biológica

Para realizar los ensayos se utilizaron las siguientes cepas:

- *Saccharomyces cerevisiae* obtenida de una cepa comercial obtenida y aislada como colonia única de La Azteca, S.A., México.
- *Candida albicans* ATCC 10231, aislada de un paciente con broncomicosis.

Ambas pertenecen a la colección de levaduras del Laboratorio 306 Oriente del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

8.2 Medios de cultivo

Las levaduras se mantuvieron en un medio sólido YPD en cajas de Petri, cuya composición es la siguiente:

- 2% Glucosa.
- 2% Peptona de gelatina.
- 1% Extracto de levadura.
- 2% Agar.

De este cultivo se sembró una asada de levaduras en 250 mL de medio líquido YPD con la siguiente composición:

- 2% Glucosa.
- 2% Peptona de gelatina.
- 1% Extracto de levadura.

8.3 Condiciones de cultivo y obtención de biomasa

Se cultivó una asada de levaduras en 250 mL de medio YPD líquido en un agitador mecánico a 250 rpm, 30°C durante 24 horas. Las células se recolectaron por centrifugación, realizando dos lavados con agua libre de iones, a 2100 rpm durante 10 min. Una vez obtenido el paquete celular se resuspendió en 250 mL de agua para ayunarlas durante 24 horas bajo las mismas condiciones de agitación y temperatura.

Transcurrido el tiempo se obtuvieron las células por centrifugación a 3200 rpm por 10 minutos, y finalmente se resuspendieron en agua en una proporción de 0.5 g/mL de levaduras húmedas.

8.4 Solución de EPL

Se preparó una solución concentrada de EPL (10 mg/mL), utilizando epsilon-Poly-L-lysine hydrochloride $[(C_6H_{12}N_2O)_x \bullet HCl]$ CAS 73584-20-6, lote 2017-09-A, con peso molecular de 2.5-3.8 KDa, distribuido por la empresa Wilshire Technologies, Inc. (Princeton, NJ, EUA).

Se pesó 1 g de EPL en una balanza analítica, el cual se disolvió por agitación en 100 mL de agua destilada.

La EPL que se requería estéril, se esterilizó por filtración, utilizando unidades de filtración Millex-GS con tamaño de poro de 0.22 μm .

A partir de la solución madre de EPL se obtuvieron las concentraciones evaluadas, las cuales se describen en cada ensayo.

8.5 Determinación de la CMI

Se cultivó una colonia de levaduras en 250 mL de medio YPD líquido a 30°C durante 24 horas en un agitador mecánico a 250 rpm, a este cultivo se le

determinó la densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 650, para obtener el volumen del primocultivo que se utilizaría para que el cultivo siguiente tuviera una densidad óptica inicial de 0.03 unidades de densidad óptica (UDO). Se agregaron al medio de cultivo concentraciones variables de EPL estéril (0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 y 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$), los cambios en la absorbancia se determinaron en un lector de placas automatizado BioScreen C durante 72 h, registrando la absorbancia cada 20 minutos, con agitación constante, 30°C y a una longitud de onda de 600 nm.

8.6 Acidificación del medio

Con un electrodo selectivo de pH se midió la acidificación del medio en una cámara con agitación magnética constante y a 30°C. Se incubaron 250 μL de levaduras ayunadas (125 mg de células peso húmedo) en MES-TEA 2 mM, pH 6.0 y 20 mM de glucosa, utilizando concentraciones variables de EPL (0, 10, 25, 50, 100, 125, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

El electrodo se conecta a un potenciómetro, que registra una diferencia de potencial, acoplado al software Monitor_Ph_O2 que transforma la señal en un gráfico.

8.7 Salida de moléculas pequeñas

Para evaluar la salida de K^+ , fosfato inorgánico y moléculas que absorben a 260 y 280 nm, se incubaron 62.5 mg (cantidad final en el ensayo: 12.5 mg/mL) de levaduras previamente ayunadas en MES-TEA 10 mM, pH 6.0, 20 mM de glucosa y concentraciones variables de EPL (0, 10, 20, 30, 50, 100, 200, 250 y 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$), durante 15 min a 30°C en un volumen final de 5.0 mL.

Después de la incubación, las células se centrifugaron y se utilizó el sobrenadante para medir K^+ con un fotómetro de llama Carl Zeiss PF5 371777.

Las moléculas que absorben a 260 nm (nucleótidos) y 280 nm (péptidos) se cuantificaron con un espectrofotómetro Beckman DU 650 y el fosfato inorgánico se cuantificó por el método de Fiske y Subbarow (Fiske & Subbarow, 1925), utilizando el mismo espectrofotómetro.

El total de las moléculas se extrajo de levaduras hervidas en MES-TEA 10 mM, pH 6.0 y 20 mM de glucosa durante 20 minutos (Peña, Sánchez, & Calahorra, 2013).

8.8 Metabolismo aerobio

Se midió el consumo de oxígeno utilizando un electrodo de Clark conectado a un dispositivo de polarización y medición, que recolecta los datos con el software, Monitor_Ph_O2. Se incubaron cantidades variables de levaduras (12.5, 25, 37.5, 50, 62.5 mg) con MES-TEA 10 mM, 20 mM de glucosa y 250 µg/mL de EPL en un volumen final de 5.0 mL, a la mitad del trazo se adicionó CCCP 4 µM. Los experimentos se realizaron en una cámara cerrada a 30°C con agitación constante.

En otra serie de experimentos, en los que se utilizaron 25 mg de levaduras incubadas en MES-TEA 10 mM, 20 mM de glucosa y concentraciones variables de EPL (125, 250 y 500 µg/mL), se agregó una mezcla de K₂HPO₄ 20 mM, NAD⁺ 1.4 mM, ATP 1.8 mM y MgCl₂ 5 mM.

8.9 Metabolismo anaerobio

La producción de etanol se midió incubando por 15 min a 30°C, 200 mg de levaduras ayunadas, peso húmedo, en un volumen final de 4.0 mL que contenía MES-TEA 10 mM, pH 6, 20 mM de glucosa y concentraciones variables de EPL (0, 10, 20, 30, 50, 100, 200, 250, 400 µg/mL), a las células de *S. cerevisiae* se les

adicionó NaCN, y a las de *C. albicans* además de este se les agregó también octilgalato, como inhibidores de la cadena respiratoria.

Se centrifugaron a 3200 rpm y en 100 μ L de sobrenadante se midió el etanol por medio de una reacción enzimática. Se preparó un medio con 10 mM de solución amortiguadora de bicina ajustado con KOH concentrado a pH 9 y 1.5 mM de NAD⁺ a un volumen final de 2 mL.

Para cuantificar el etanol se agregaron 0.285 U de aldehído deshidrogenasa (Sigma-Aldrich A-9770), tomando una lectura a 340 nm; luego se añadieron 141.3 U de alcohol deshidrogenasa (Sigma-Aldrich A-7011), se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos para realizar la lectura de la absorbancia a 340 nm.

Para calcular la cantidad producida de etanol, se realizó una solución estándar de etanol, a una concentración 17.58 mM, la cual se incubó y cuantificó de la misma manera.

Para este ensayo se utilizó el espectrofotómetro Beckman DU 650.

8.10 Efectos sobre el potencial de membrana

Se incubaron 62.5 mg (12.5 mg/mL) de levaduras previamente ayunadas en MES-TEA 10 mM, pH 6.0, 20 mM de glucosa y concentraciones variables de EPL (0, 20, 100, 125, 250 y 500 μ g/mL), durante 15 min a 30°C en un volumen final de 4.0 mL, se centrifugaron, lavaron y se resuspendieron al 50% m/v.

En un fluorómetro SLM AMINCO se estimó el potencial de membrana plasmática de las levaduras previamente tratadas siguiendo la fluorescencia de DiSC₃ (Peña *et al.*, 1984); en 1.9 mL de líquido (MES-TEA 10 mM, pH 6, glucosa 20 mM, BaCl₂ 10 μ M), el trazo se inició por la adición de 100 μ L de levaduras al 50%, posterior a los 10 segundos del trazo se añadieron 4 μ L de cianina (DiSC₃) 0.25 mM; cuando se agotó el O₂, se agregaron 5 μ L de H₂O₂ al 30%, y en forma sucesiva CCCP 10 μ M y KCl 20 mM.

En otro ensayo, en 1.9 mL de líquido (MES-TEA 10 mM, pH 6, glucosa 20 mM, BaCl₂ 10 μM) y concentraciones variables de EPL (0, 20, 100, 125, 250 y 500 μg/mL), el trazo se inició por la adición de 100 μL de levaduras al 50% sin tratamiento previo, luego de 10 segundos del trazo se añadieron 4 μL de cianina 0.25 mM; al agotarse el O₂, se adicionaron 5 μL de H₂O₂ al 30%, seguidos después de CCCP 10 μM y KCl 20 mM.

8.11 Efecto de los metales divalentes

Se cultivó una colonia de levaduras en 250 mL de medio YPD líquido a 30°C durante 24 horas en un agitador mecánico a 250 rpm, a este cultivo se le determinó la densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 650, para obtener el volumen del primocultivo que se utilizaría para que el cultivo siguiente tuviera una densidad óptica inicial de 0.03 UDO, en este nuevo cultivo se utilizaron concentraciones variables de MgCl₂ y CaCl₂ (0, 5, 10 y 20 mM), soluciones que fueron esterilizadas utilizando unidades de filtración Millex con tamaño de poro de 0.22 μm, y 250 μg/mL de EPL estéril. Los cambios en la absorbancia se determinaron en un lector de placas automatizado BioScreen C durante 72 h, registrando la absorbancia cada 20 minutos, con agitación constante, 30°C y a una longitud de onda de 600 nm.

8.12 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software estadístico Graph Prism 5.

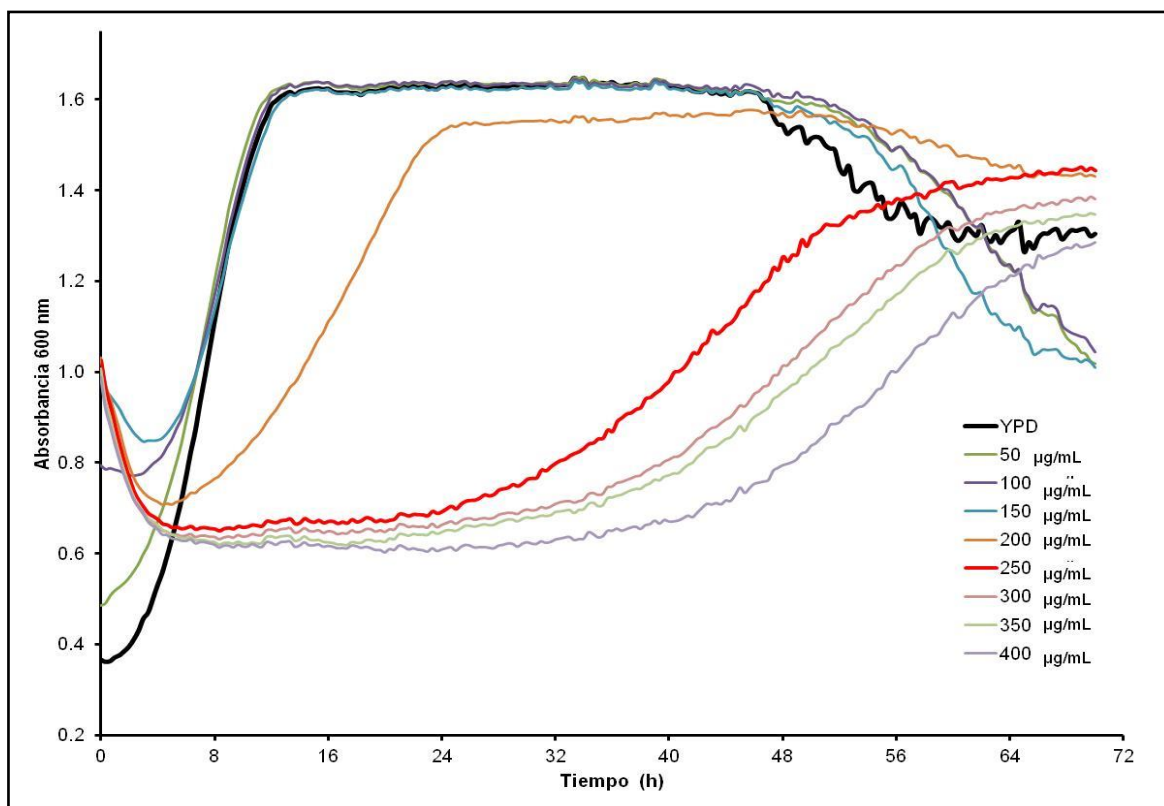
Las pruebas estadísticas realizadas fueron ANADEVa unidireccional y una prueba comparativa de Dunnett, comparando todos los grupos con el control, con un valor de α del 95 %. Las diferencias con un valor de p<0.05 se consideraron estadísticamente significativas.

9. RESULTADOS

9.1 Determinación de la CMI.

Se determinó la CMI en *S. cerevisiae* y *C. albicans*. Esto era importante para conocer las concentraciones que serían utilizadas para experimentos posteriores.

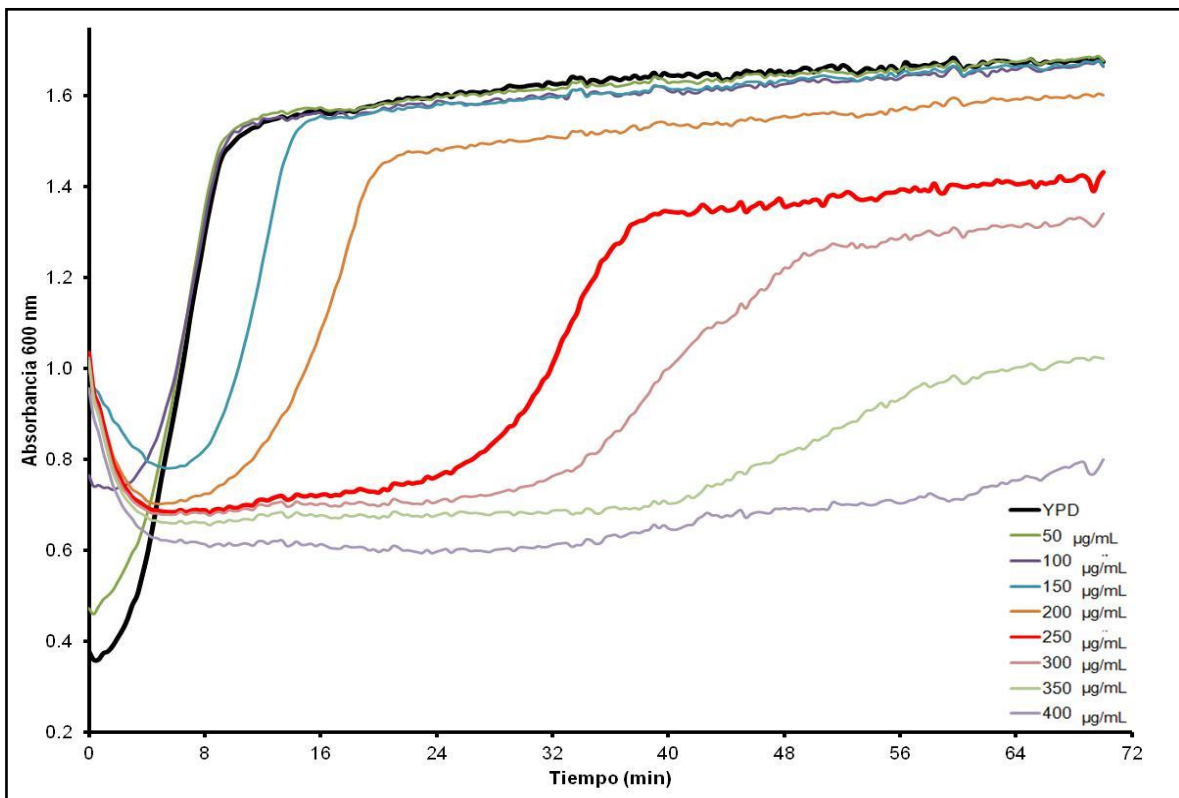
En la Gráfica 1 se presentan curvas de crecimiento para *C. albicans* con concentraciones variables de EPL, en las que se observa que la concentración en la que hay una disminución significativa de la DO es en 250 $\mu\text{g/mL}$. Sin embargo, es importante señalar que luego de un retardo en el crecimiento, se recuperó, aunque con una pendiente menor que la del control, durante la fase logarítmica.



Gráfica 1. Curva de crecimiento, determinación de la CMI para *C. albicans*.

Las curvas se realizaron en un lector de placas automatizado durante 72 h, utilizando YPD, concentraciones variables de EPL.

En la Gráfica 2, se presentan las curvas de crecimiento para *S. cerevisiae*, en la que, de igual manera, se observa que la CMI para esta levadura es de 250 $\mu\text{g/mL}$. También con esta levadura, a las concentraciones de 200 a 300 mg/mL , luego de una inhibición prácticamente total, se observó una recuperación parcial de la velocidad del crecimiento, excepto tal vez a la concentración más alta, de 400 $\mu\text{g/mL}$.



Gráfica 2. **Curva de crecimiento, determinación de la CMI para *S. cerevisiae*.** Las curvas se realizaron en un lector de placas automatizado durante 72 h, utilizando YPD, concentraciones variables de EPL.

La CMI, que es la cantidad más pequeña de un agente antimicrobiano que se requiere para inhibir claramente el crecimiento, suele no ser constante, y no depender del agente, y es única para cada organismo, depende del tamaño del inóculo, la composición del medio de cultivo, el tiempo y condiciones de

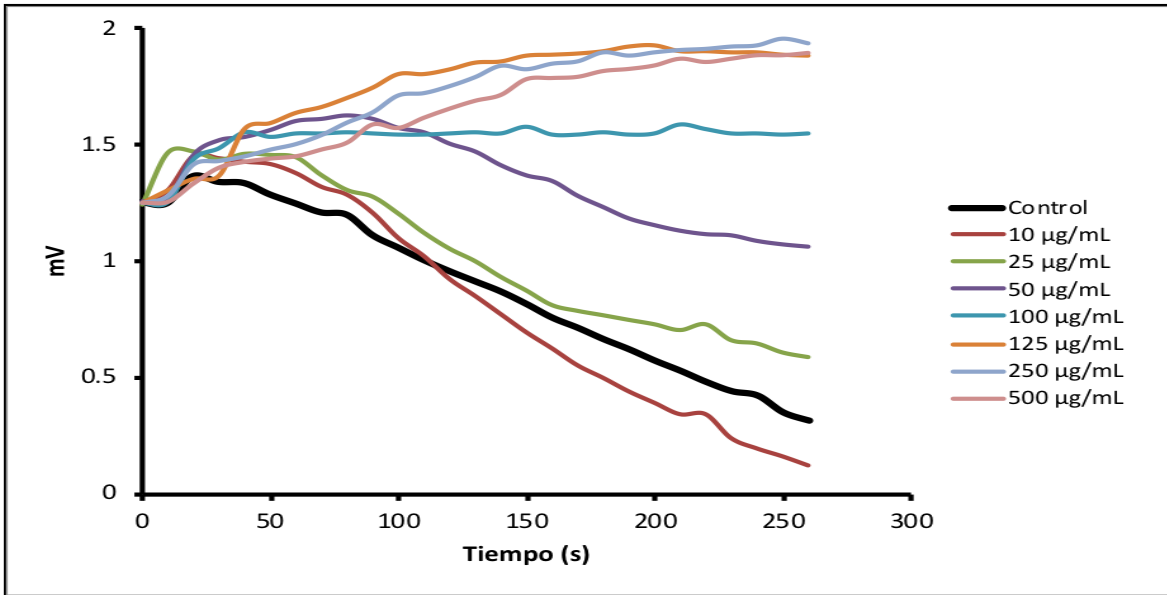
incubación, etc., pero cuando para dos organismos se controlan las condiciones de crecimiento, es válido comparar los valores obtenidos (Madigan *et al.*, 2014), en este caso coincidió que para ambas levaduras es la misma cantidad.

La concentración de 250 µg/mL de EPL, se tomó como un valor central para utilizar concentraciones menores y mayores en los siguientes experimentos, de interacción de las levaduras con el polipéptido. Además, como ya se señaló, incluso a concentraciones más altas, después de varias horas, en la mayoría de los trazos, desapareció parcialmente la inhibición del crecimiento.

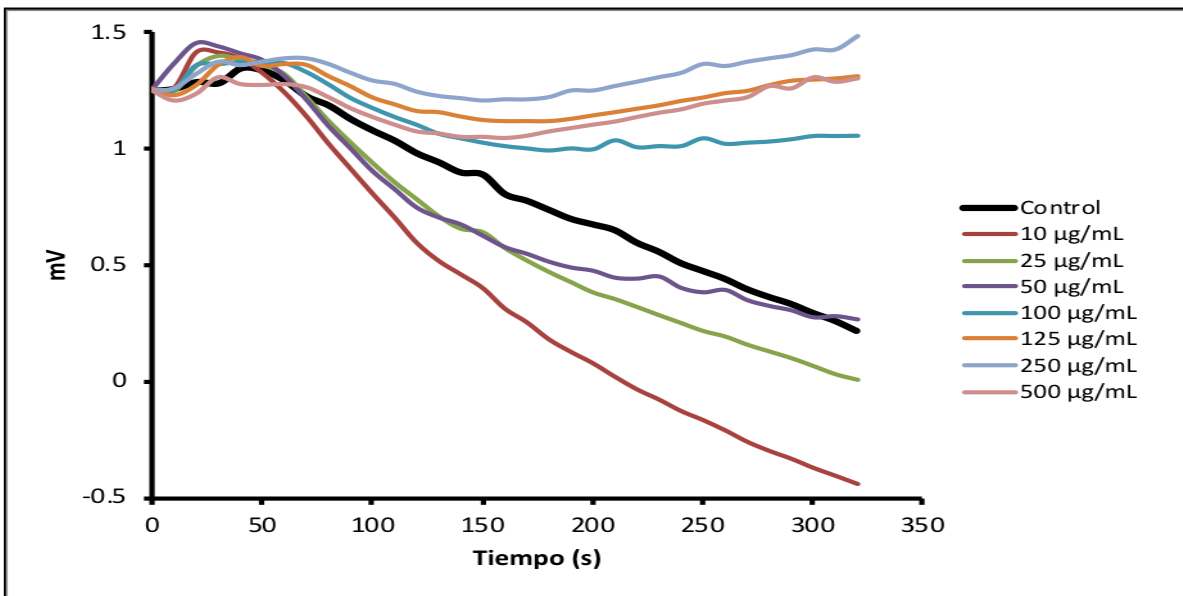
9.2 Acidificación del medio

Tanto *C. albicans* (Gráfica 3) como *S. cerevisiae* (Gráfica 4) son capaces de acidificar el medio en presencia de un sustrato, principalmente la glucosa. Esta acidificación se debe a la presencia de una ATPasa transmembranal, la cual, mediante la hidrólisis del ATP y la expulsión de H⁺, genera un potencial eléctrico de membrana (positivo en el exterior) y un gradiente de pH. Esta diferencia del potencial eléctrico y del pH a ambos lados de la membrana impulsa la entrada de muchos nutrientes, pero la más importante es la del K⁺, así como la salida de iones sodio que son tóxicos para la célula (Madrid Gonzalez *et al* 1998).

El bombeo de protones se puede monitorear con un electrodo de pH, el cual mediante la conversión de los iones hidronio a una tensión eléctrica nos registra los cambios del pH. En las Gráficas 3 y 4 se presenta el efecto de la EPL a diferentes concentraciones sobre este parámetro.



Gráfica 3. **Acidificación del medio por *C. albicans*.** Medio de incubación: MES-TEA 2 mM, pH 6, 20 mM de glucosa, concentraciones variables de EPL y 125 mg de células, peso húmedo, ayunadas, volumen final 10 mL. Gráfica representativa de 4 repeticiones.



Gráfica 4. **Acidificación del medio por *S. cerevisiae*.** Medio de incubación: MES-TEA 2 mM, pH 6, 20 mM de glucosa, concentraciones variables de EPL y 125 mg

de células peso húmedo ayunadas, volumen final 10 mL. Gráfica representativa de 5 repeticiones.

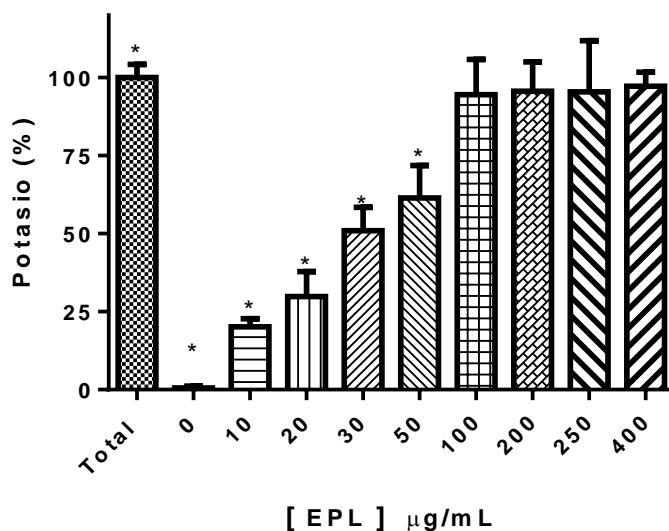
Se puede observar en ambas gráficas, y más notoriamente en *S. cerevisiae*, que a bajas concentraciones, la EPL estimuló el bombeo de protones y a altas concentraciones se observó una inhibición.

9.3 Flujo de potasio.

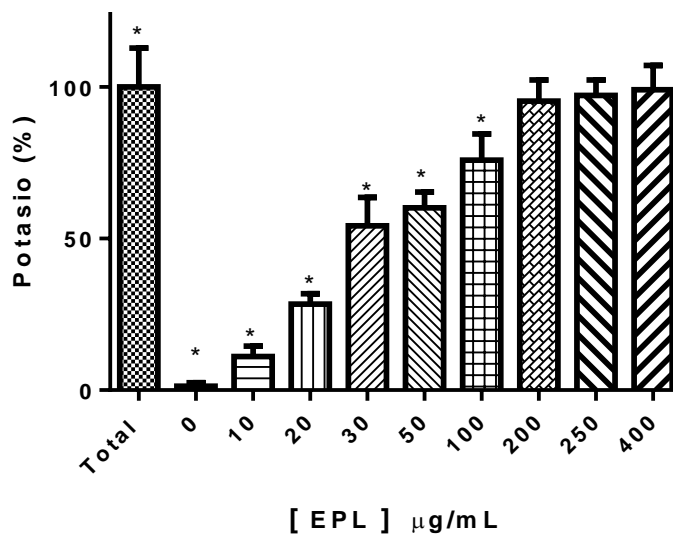
Se sabe desde hace mucho tiempo que el potasio es el principal catión intracelular que participa en el balance osmótico entre la célula y el medio, y mediante su transporte participa en la regulación del pH interno y del potencial de membrana, entre otras funciones de la levadura.

La cantidad de K^+ expulsado por las células a concentraciones variables de EPL, se determinó en el líquido de incubación de las levaduras por flamometría. El método se basa en lo descrito por Plank (Van Loon, 1980) de que un átomo que se encuentra en un estado fundamental absorbe una determinada energía, puede experimentar una transición hacia un estado particular de mayor energía. Como este estado es inestable, el átomo regresa a su configuración inicial, emitiendo una radiación de una determinada frecuencia, la cual se puede cuantificar.

En la Gráfica 5 se presenta el porcentaje de K^+ encontrado en los sobrenadantes de *S. cerevisiae*. Desde una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ expulsaron casi el total del contenido de K^+ , en relación con el contenido total obtenido hirviendo las células control. Por otra parte, en *C. albicans* (Gráfica 6), se observó la salida del total de K^+ con 200 $\mu\text{g/mL}$ de EPL (Total: levaduras lisadas por ebullición).



Gráfica 5. **Salida de K^+ producida por la EPL en *S. cerevisiae*.** Medio de incubación: MES-TEA 2 mM, pH 6, glucosa 20 mM, [EPL] variable y 125 mg de células (peso húmedo) ayunadas, volumen final 4.0 mL, incubación de 15 min a 30°C. El K^+ se cuantificó por flamometría en el sobrenadante. (n=5, * $p < 0.05$ vs. Total).



Gráfica 6. **Salida de K^+ producida por la EPL en *C. albicans*.** Medio de incubación: MES-TEA 2 mM, pH 6, glucosa 20 mM, [EPL] variable y 125 mg de células (peso húmedo) ayunadas, volumen final 4.0 mL, incubación de 15 min a 30°C. El K^+ se cuantificó por flamometría en el sobrenadante. (n=5, * $p < 0.05$ vs. Total).

En la membrana plasmática existe un gradiente electroquímico que se genera por el movimiento de protones al exterior, y parcialmente compensado por la entrada de potasio (Peña *et al.*, 1972). La entrada de potasio aumenta el requerimiento energético de la levadura y se estimula el metabolismo para mantener la concentración de ATP intracelular, el cual es utilizado por la ATPasa transmembranal (Figura 7).

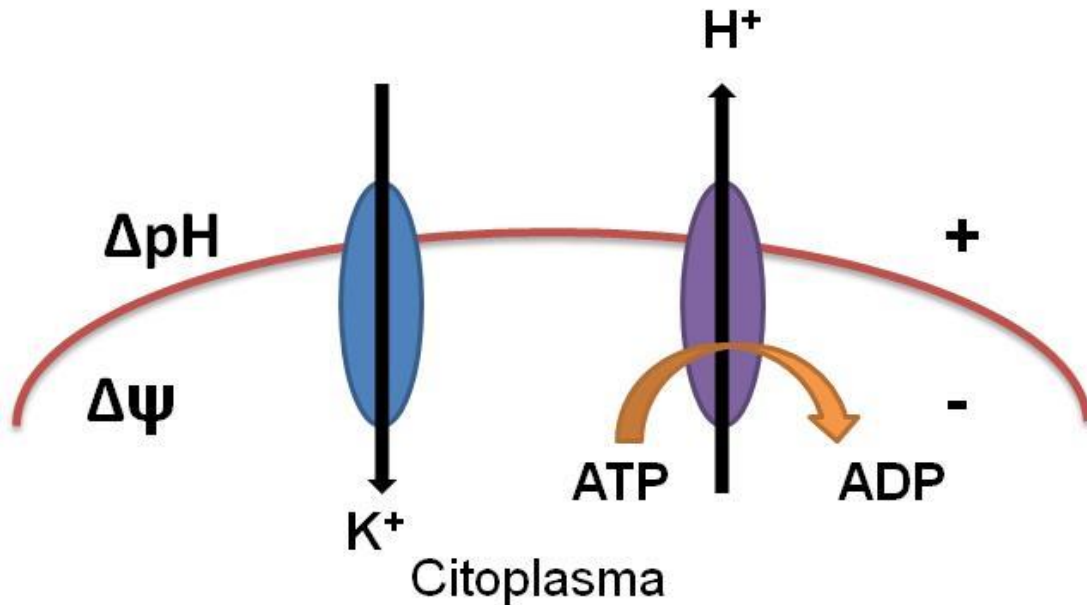


Figura 7. Transporte de potasio y acidificación del medio en una levadura (Peña, *et al.*, 2004).

9.4 Flujo de moléculas pequeñas.

La EPL es principalmente un polímero de L-lisina, el cual es fuertemente catiónico, la consideración inicial fue que se comportaría igual que otros polímeros catiónicos aumentando la permeabilidad de la membrana celular como es el caso del quitosano (Peña *et al.*, 2013), por tal motivo, se decidió evaluar la salida de moléculas pequeñas, o intermediarios metabólicos en los sobrenadantes.

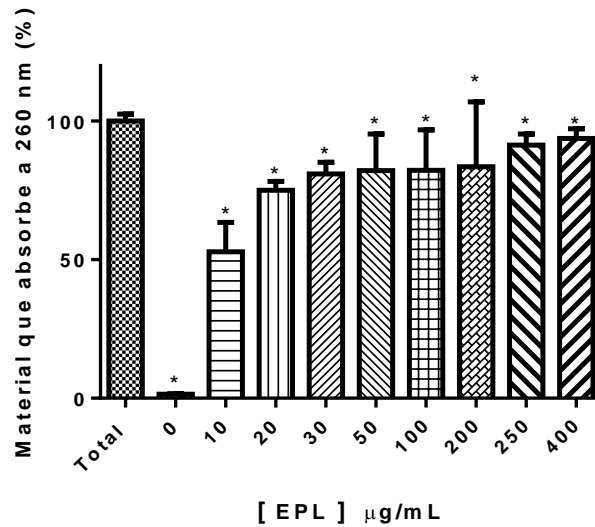
9.4.1 Material que absorbe a 260 nm.

Se sabe que los nucleótidos y los ácidos nucleicos absorben a 260 nm, debido a que las bases de purina y pirimidina de los componentes nucleotídicos, son moléculas aromáticas nitrogenadas, que absorben luz a esa longitud de onda (Porterfield & Zlotnick, 2010).

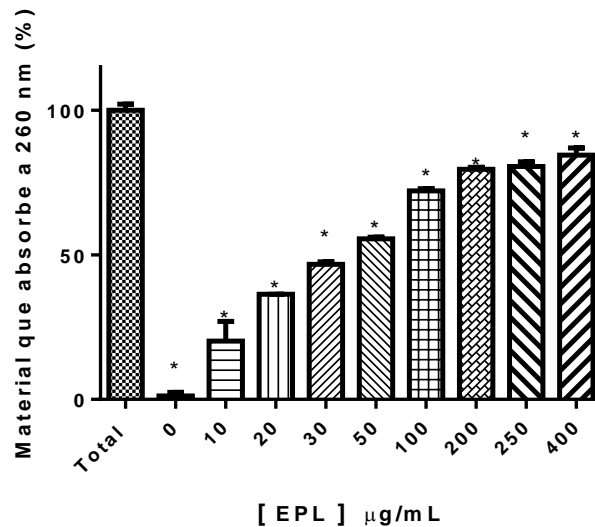
Esa característica de los componentes de los nucleótidos permite utilizar la espectrofotometría UV para cuantificar su presencia en los sobrenadantes después de una incubación.

La presencia de material que absorbe a 260 nm en *S. cerevisiae* (Gráfica 7) se comparó con el total obtenido para las células en ausencia de la EPL (Total: células en ebullición por 20 min.). Se pudo observar que al aumentar la concentración de EPL en el medio, aumentó la presencia de los nucleótidos, y a partir de 50 µg/mL su salida no presentó diferencia significativa en comparación con el total.

En la Gráfica 8, se presentan los resultados de *C. albicans* en la cual se observa un efecto parecido al de *S. cerevisiae*, sólo que los mayores efectos se observan a altas concentraciones 200 µg/mL, indicando una mayor resistencia de este organismo.



Gráfica 7. **Salida de las moléculas que absorben a 260 nm por *S. cerevisiae*.** Medio de incubación: MES-TEA 2 mM, pH 6, glucosa 20 mM, [EPL] variable y 125 mg de células (peso húmedo) ayunadas, volumen final 4.0 mL. Incubación por 15 min a 30°C, cuantificado por espectrofotometría a 260 nm en el sobrenadante. (n=5, * p<0.05 vs. Total).

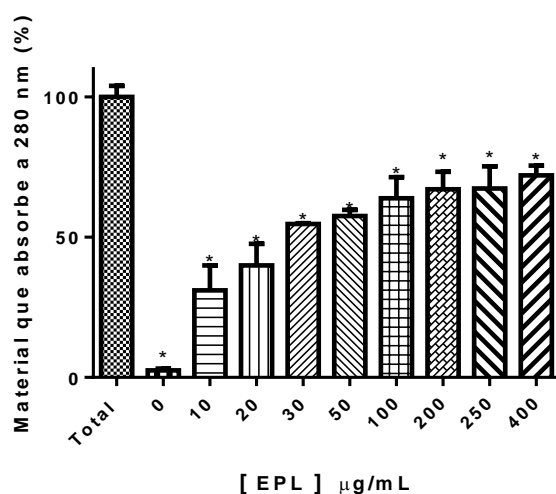


Gráfica 8. **Salida de moléculas que absorben a 260 nm por *C. albicans*.** Medio de incubación: MES-TEA 2 mM, pH 6, glucosa 20 mM, [EPL] variable y 125 mg de células (peso húmedo) ayunadas, volumen final 4.0 mL. Incubación por 15 min a 30°C, cuantificado por espectrofotometría a 260 nm en el sobrenadante. (n=5, * p<0.05 vs. Total).

9.4.2 Material que absorbe a 280 nm.

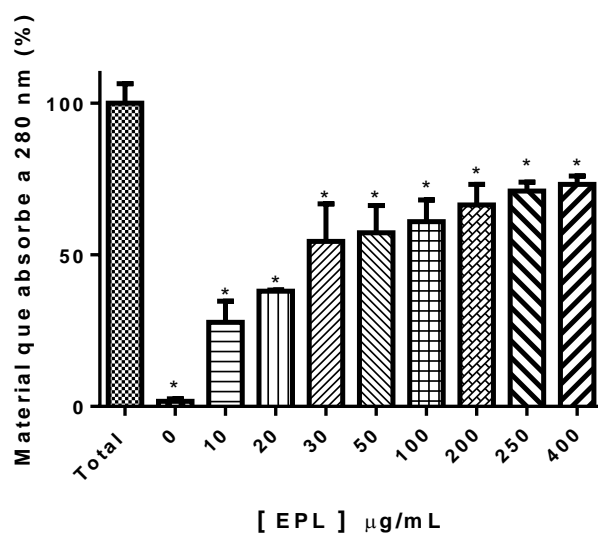
Las proteínas totales, aminoácidos y péptidos se pueden cuantificar de la misma manera a 280 nm, porque a esta longitud de onda absorben la mayoría de los aminoácidos aromáticos, tirosina y triptófano presentes en dichas biomoléculas (Porterfield & Zlotnick, 2010).

La presencia de moléculas que absorben a 280 nm en *S. cerevisiae* (Gráfica 9) se comparó con las células control (Total: células en ebullición por 20 min). Se puede observar que a medida que aumenta la concentración de EPL en el medio, aumenta la presencia de nucleótidos y pequeños péptidos, se observa diferencia significativa en todos los tratamientos respecto al total, ya que es importante destacar que por ebullición se obtienen péptidos totales, es decir pueden ser complejos supramoleculares, no proteínas, que se encuentren en organelos, y en las proteínas que se cuantifican en los sobrenadantes de los tratamientos se obtienen las proteínas citosólicas.



Gráfica 9. **Salida de moléculas que absorben a 280 nm por *S. cerevisiae*.** Medio de incubación: MES-TEA 2 mM, pH 6, glucosa 20 mM, [EPL] variable y 125 mg de células (peso húmedo) ayunadas, volumen final 4.0 mL. Incubación por 15 min a 30°C, cuantificado por espectrofotometría a 280 nm en el sobrenadante. (n=5, * p<0.05 vs. Total).

En la Gráfica 10 se presentan los resultados de *C. albicans* en la que se observa un efecto parecido al de *S. cerevisiae*, sólo que los mayores efectos se observaron a concentraciones de 200 µg/mL, presentando este organismo mayor resistencia, aunque de igual manera no se liberó el 100% de material que absorbe a 280 nm, probablemente polipéptidos, ya que quizá las proteínas no se extraen por este medio, sino que es posible que se coagulen.



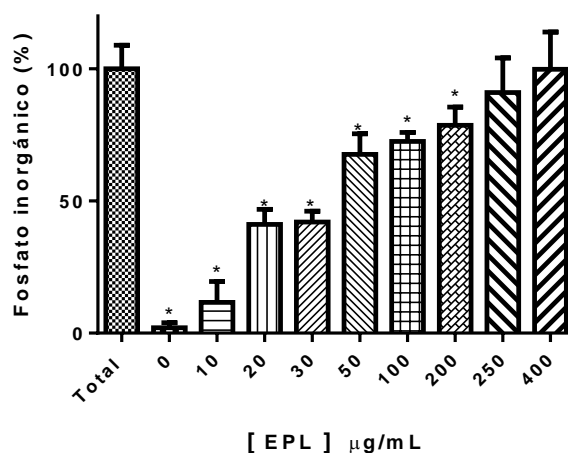
Gráfica 10. **Salida de moléculas que absorben a 280 nm por *C. albicans*.** Medio de incubación: MES-TEA 2 mM, pH 6, glucosa 20 mM, [EPL] variable y 125 mg de células (peso húmedo) ayunadas, volumen final 4.0 mL. Incubación por 15 min a 30°C, cuantificado por espectrofotometría a 280 nm en el sobrenadante. (n=5, * p<0.05 vs. Total).

9.4.3 Flujo de fosfato inorgánico.

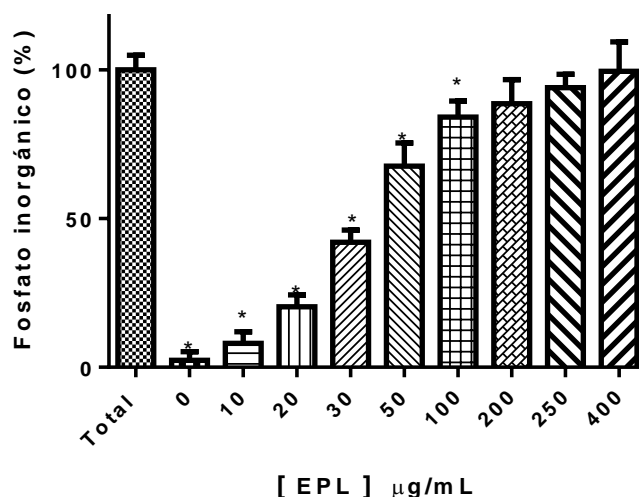
El fosfato inorgánico es un macronutriente esencial requerido en numerosos procesos biológicos, como la síntesis de biomoléculas, el metabolismo energético y la modificación de proteínas.

Para la mayoría de los organismos, la disponibilidad de fosfato inorgánico en el ambiente es un factor limitante del crecimiento, y su presencia se puede cuantificar por reacciones colorimétricas como la descrita por Fiske y Subbarow (1925), en la que reacciona el fosfato con molibdato (MoO_4^{2-}) que da lugar a fosfomolibdato ($[\text{PO}_4]_2\text{MoO}_3^{3-}$). Este último por reducción origina un compuesto cuya estructura exacta se desconoce, denominado “azul de molibdeno”, el cual se puede cuantificar a 660 nm.

La salida de fosfato inorgánico (Pi) producido por la EPL, con *S. cerevisiae* se presenta en la Gráfica 11. Con esta levadura se observó la mayor salida; desde 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se obtuvo una concentración parecida a la total y a 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a la que la EPL produjo una salida muy parecida al control (células lisadas por calor), fugándose en su totalidad el Pi; mientras que con *C. albicans* (Gráfica 12) también se observó la salida del fosfato inorgánico. La concentración detectada de Pi aumentó al incrementar la concentración de EPL y aquí el efecto se observó desde 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.



Gráfica 11. **Salida de fosfato inorgánico para *S. cerevisiae*.** Medio de incubación: MES-TEA 2 mM, pH 6, glucosa 20 mM, [EPL] variable y 125 mg de células (peso húmedo) ayunadas, volumen final 4.0 mL, durante 15 min a 30°C, cuantificado por método de Fiske y Subbarow en el sobrenadante. (n=5, * $p < 0.05$ vs. Total).



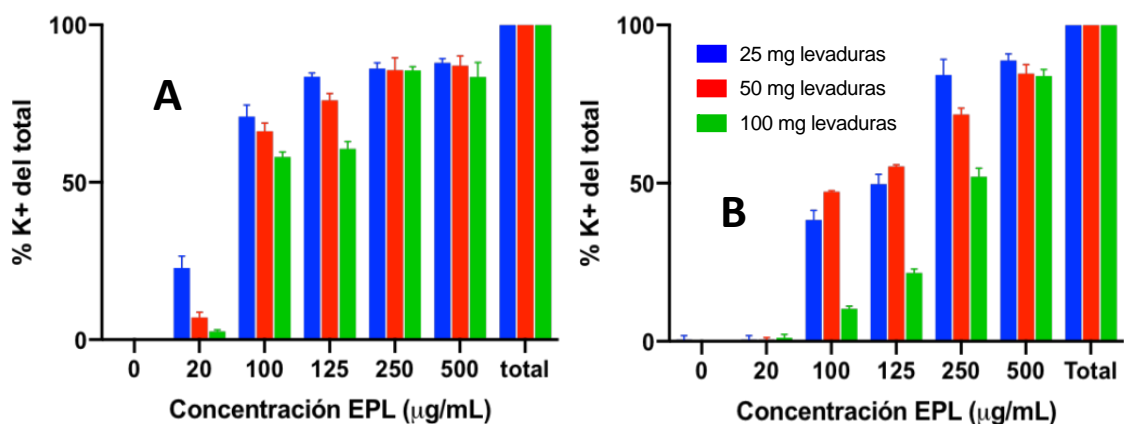
Gráfica 12. **Salida de fosfato inorgánico producida por la EPL para *C. albicans*.** Medio de incubación: MES-TEA 2 mM, pH 6, glucosa 20 mM, [EPL] variable y 125 mg de células (peso húmedo) ayunadas, volumen final 4.0 mL, durante 15 min a 30°C, cuantificado por método de Fiske y Subbarow en el sobrenadante. (n=5, * p<0.05 vs. Total).

9.5 La relación entre la cantidad de células y la concentración efectiva de EPL.

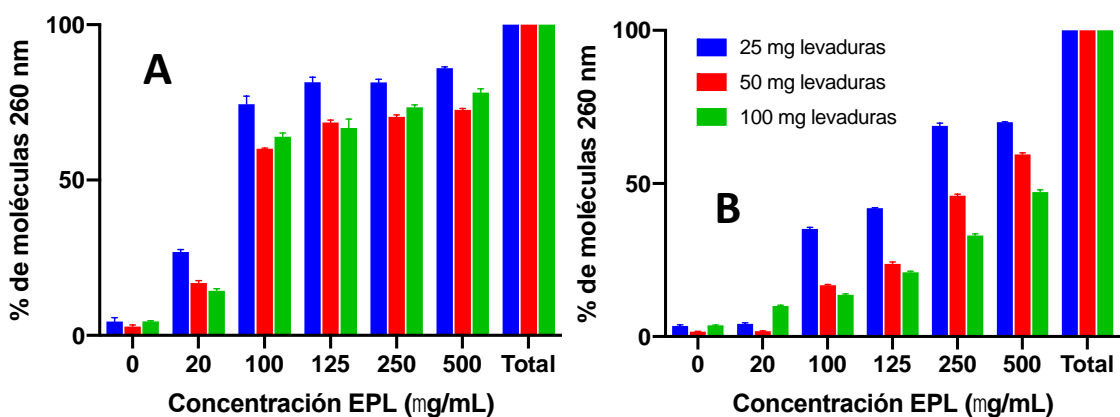
Considerando que al menos un probable mecanismo de acción de la EPL consiste en que, por su carácter policatiónico, actúe sobre la membrana de las células fijándose por atracción electrostática, debe existir una relación entre la cantidad de células y la de la EPL. Deberá suceder entonces que una cierta concentración será más o menos efectiva, en especial sobre la salida de iones y moléculas pequeñas, dependiendo de la cantidad de células.

Por ello, se hicieron experimentos en los que se midió la salida de K^+ y material que absorbe a 260 y 280 nm. Como se muestra en la Gráfica13, en efecto, la magnitud de la salida del catión para una concentración dada de EPL, varía según la cantidad de células presentes durante la incubación, y lo mismo

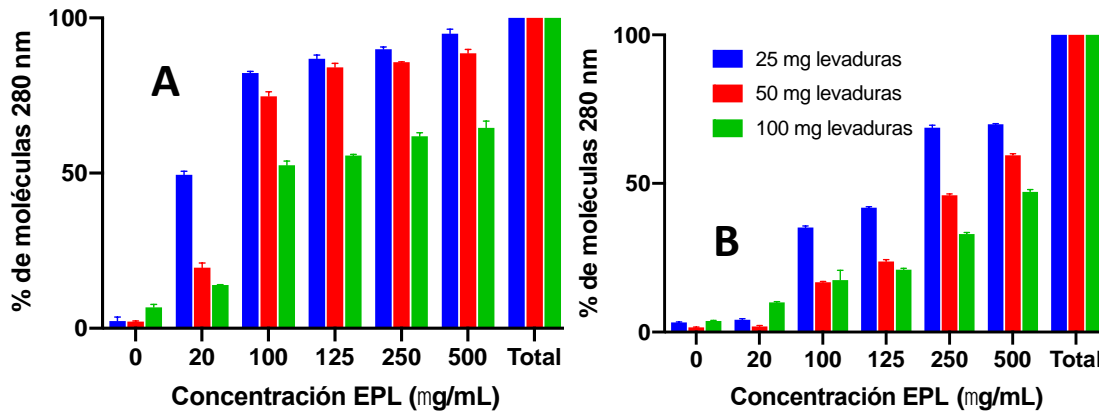
pasa con las otras dos tipos de moléculas, las que absorben a 260 y a 280 nm (Gráfica 14 y Gráfica 15).



Gráfica 13. **Salida de K⁺ por cantidades variables de levaduras.** A: *S. cerevisiae* B: *C. albicans*. Medio de incubación: MES-TEA 2 mM, pH 6, glucosa 20 mM, [EPL] variable y 25, 50 y 100 mg de células (peso húmedo) ayunadas, volumen final 4.0 mL, Incubación de 15 min a 30°C: El potasio se cuantificó por flamometría en al sobrenadante.



Gráfica 14. **Salida de moléculas que absorben a 260 nm por cantidades variables de levaduras.** A: *S. cerevisiae* B: *C. albicans*. Medio de incubación: MES-TEA 2 mM, pH 6, glucosa 20 mM, [EPL] variable y 25, 50 y 100 mg de células (peso húmedo) ayunadas, volumen final 4.0 mL, Incubación de 15 min a 30°C. Se cuantificaron por espectrofotometría a 260 nm.



Gráfica 15. **Salida de moléculas que absorben a 280 nm por cantidades variables de levaduras. A: *S. cerevisiae* B: *C. albicans*.** Medio de incubación: MES-TEA 2 mM, pH 6, glucosa 20 mM, [EPL] variable y 25, 50 y 100 mg de células (peso húmedo) ayunadas, volumen final 4.0 mL, Incubación de 15 min a 30°C. Se cuantificaron por espectrofotometría a 280 nm.

9.6 Evaluación del metabolismo.

La principal fuente de producción de energía en las levaduras es la glucosa, y la vía general para su conversión en piruvato es la glucólisis, y la producción de energía en forma de ATP se acopla a la generación de productos intermedios y al poder reductor en forma de NADH. Se pueden distinguir dos sistemas para la producción de energía: la respiración y la fermentación. Ante la observación de la salida de moléculas pequeñas de la levadura y el daño al transporte de nutrientes, se decidió evaluar el consumo de oxígeno y la producción de etanol.

9.6.1 Metabolismo aerobio.

El metabolismo respiratorio, se puede evaluar mediante el consumo de oxígeno, el cual es necesario para que se lleve a cabo la fosforilación oxidativa en la mitocondria (Figura 8).

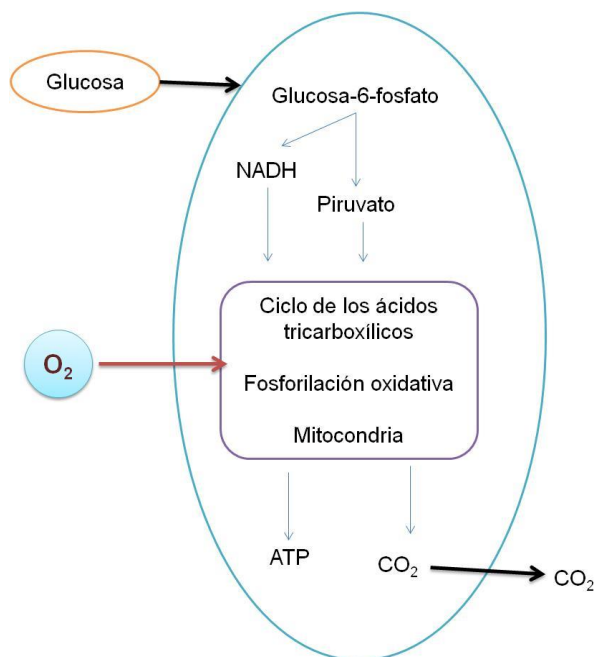


Figura 8. Esquema de la respiración celular (Feldmann, 2012).

El consumo de oxígeno se evaluó utilizando un oxímetro, que es un aparato que determina la concentración de oxígeno disuelto en la solución a ensayar, aplicando una diferencia de potencial eléctrico mediante un electrodo de platino.

En estos experimentos también se utiliza CCCP, que es un desacoplante de la cadena transportadora de electrones (Figura 9), el cual hace que se disocie la oxidación en la cadena respiratoria, de la fosforilación, bloqueando la síntesis de ATP, al tiempo que permite que continúe el transporte electrónico a lo largo de la cadena respiratoria hasta el O₂ (Peña *et al.*, 2004).

La adición de un desacoplante permite entonces conocer la capacidad respiratoria máxima, independiente de la síntesis de ATP.

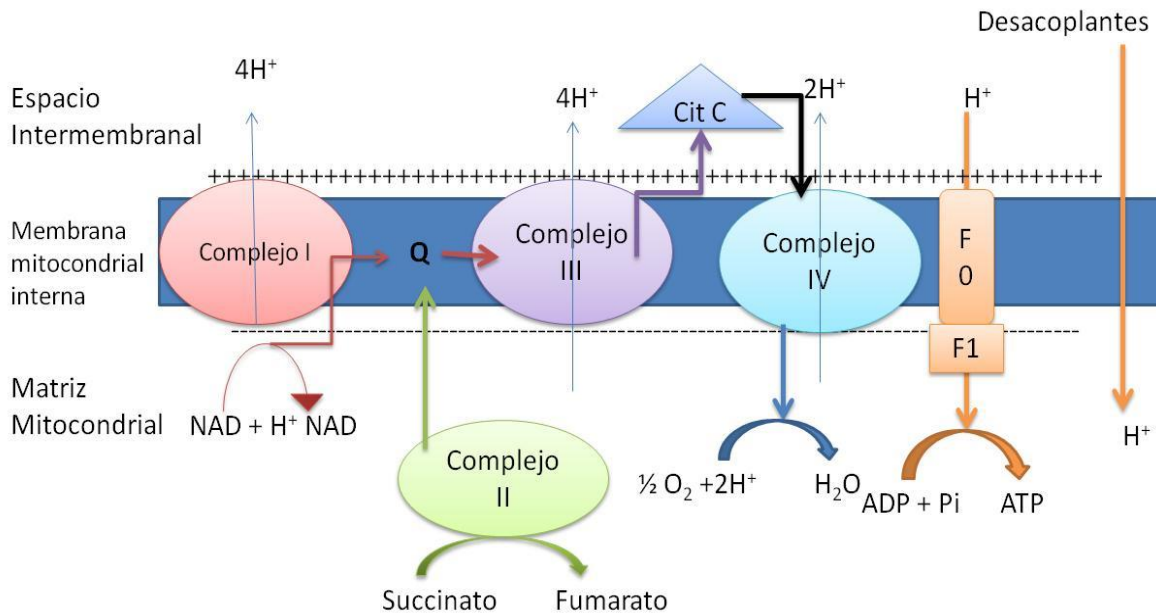
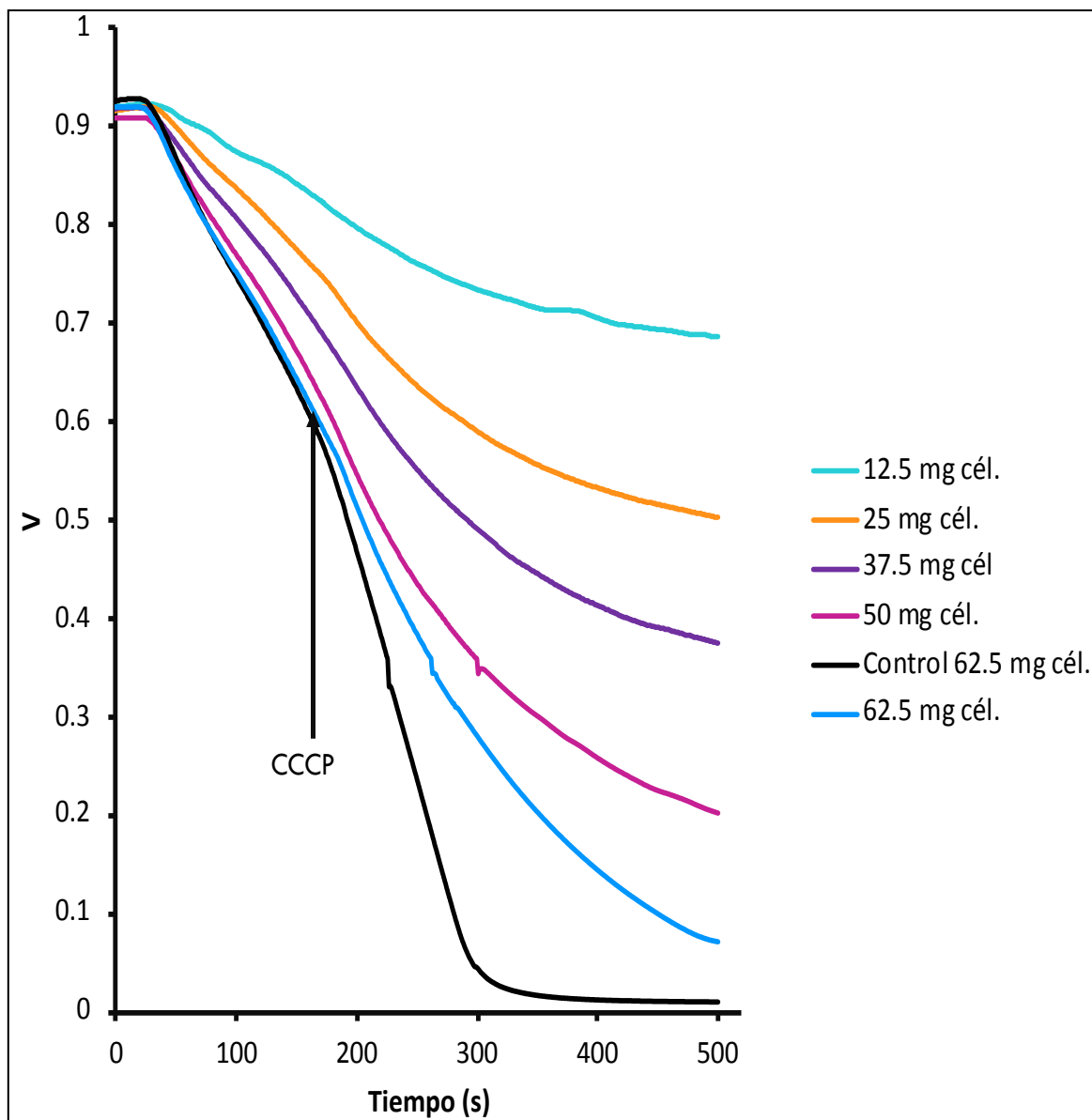


Figura 9. Cadena transportadora de electrones (Murray *et al.*, 2009).

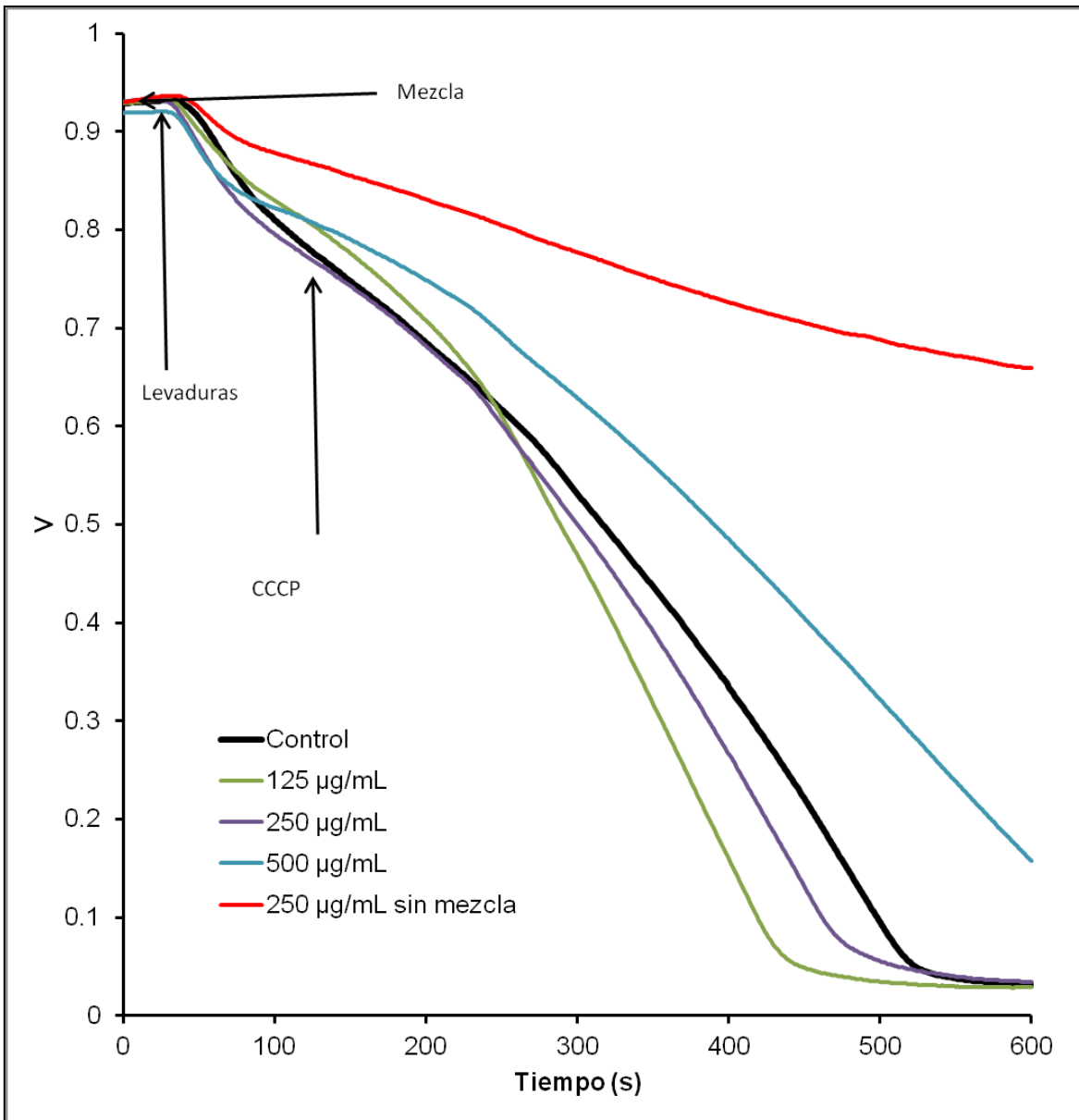
En las Gráficas 16 y 18 se presentan los resultados de medir la respiración en *C. albicans* y *S. cerevisiae*, respectivamente, utilizando cantidades variables de levaduras y la CMI de EPL (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se pudo también observar que al aumentar la cantidad de células disminuye el efecto de la EPL; es decir, la inhibición de la respiración fue menor. Esto parece indicar que existe un número de cargas negativas en la superficie de la célula a las cuales se une el polication para producir sus efectos.

Partiendo de la premisa de que la EPL permeabiliza la membrana, y existe una salida de intermediarios metabólicos, se decidió analizar si las mitocondrias se afectaban, ya fuera porque la EPL entraba a la célula, hasta dañarlas, o porque la permeabilización producía la salida de moléculas pequeñas, necesarias para la respiración. Por ello se decidió medir el consumo de oxígeno en ausencia o en presencia de una mezcla de intermediarios metabólicos: NAD^+ , ATP, MgCl_2 , y K_2HPO_4 . Se encontró primero que la EPL produjo una inhibición del consumo de oxígeno, que además dependía, con la salida de moléculas pequeñas, de la

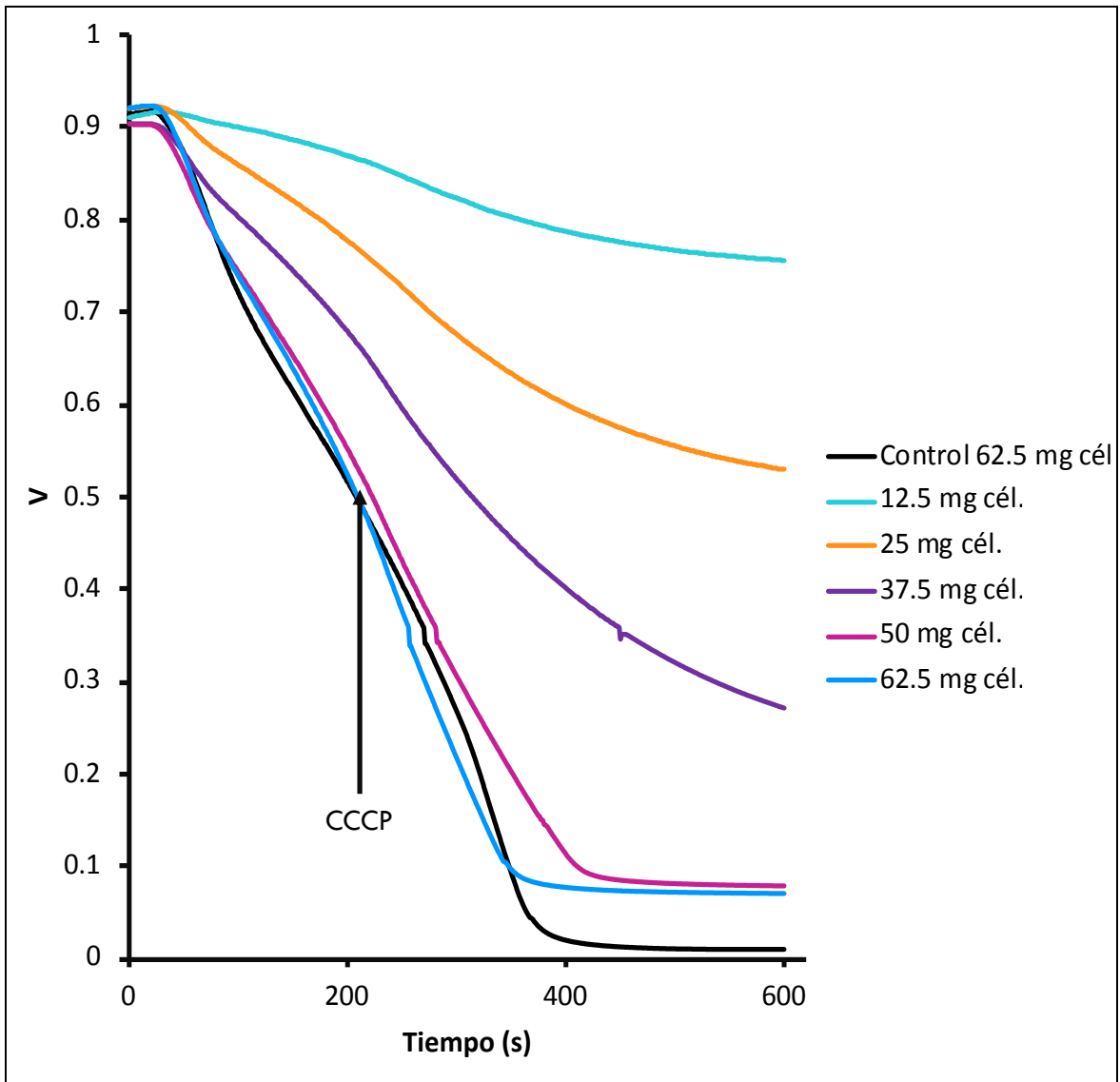
cantidad de células (Gráfica 16 y 18). Por otra parte, al agregar la mezcla de moléculas ya mencionada, el consumo de oxígeno se mantuvo igual que en control (Gráfica 17, *C. albicans* y Gráfica 19, *S. cerevisiae*).



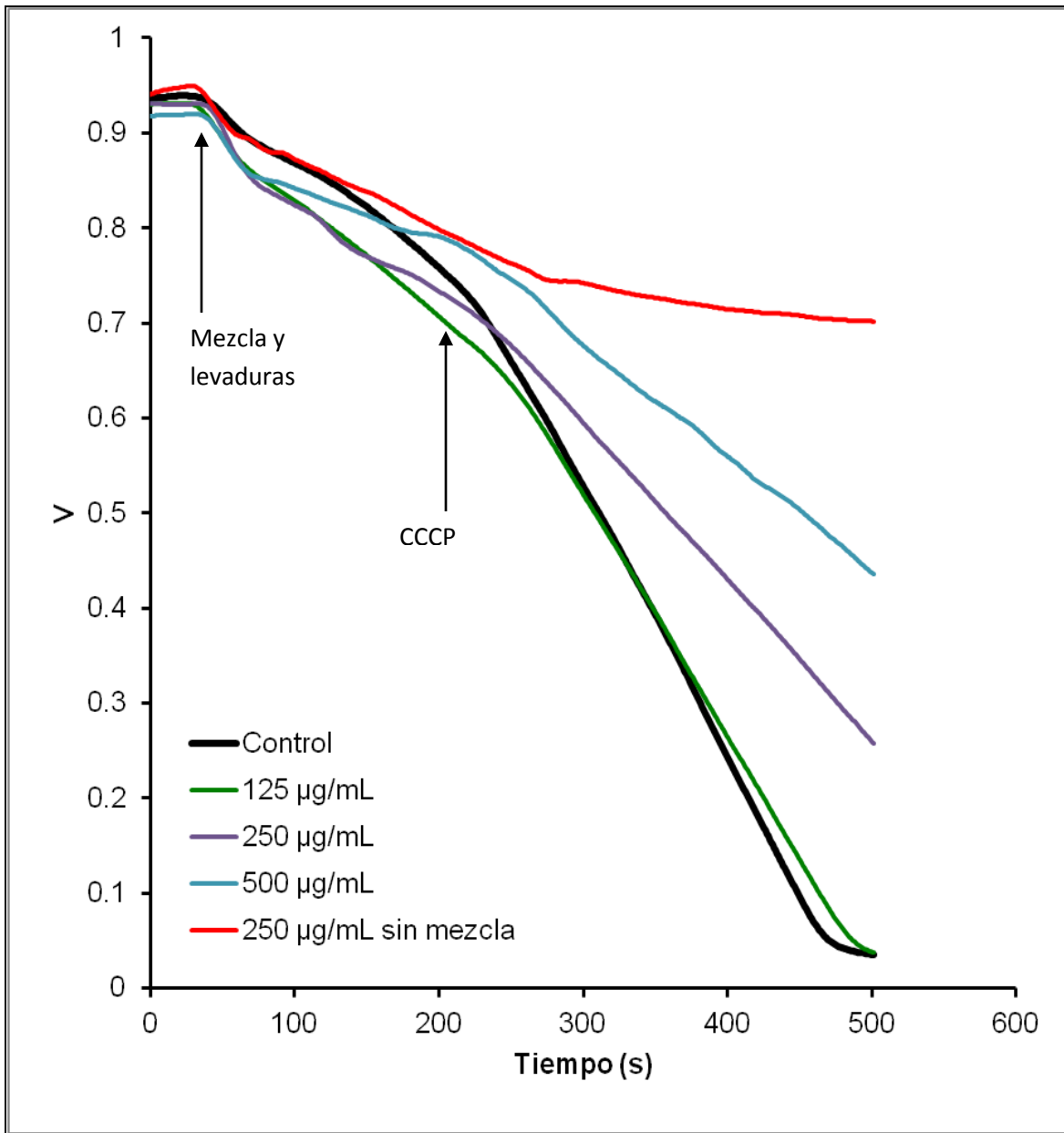
Gráfica 16. **Consumo de oxígeno de *C. albicans*.** Cantidades variables de células ayunadas, CMI de EPL, MES-TEA 10 mM, pH 6 y glucosa 20 mM, CCCP 4 μ M, volumen final 5.0 mL. 1V = 2000 natg O. Gráfica representativa de 5 repeticiones. Las flechas indican la adición de reactivos.



Gráfica 17. **Efectos sobre la respiración de *C. albicans*.** 25 mg de levaduras ayunadas, cantidad variable de EPL, MES-TEA 10 mM, pH 6 y glucosa 20 mM, CCCP 4 µM. Mezcla: NAD⁺ 1.4 Mm, ATP 1.8 mM, MgCl₂ 5 mM, K₂HPO₄ 20 mM, volumen final 5.0 mL. 1V = 2000 natg O. Gráfica representativa de 4 repeticiones. Las flechas indican la adición de reactivos.



Gráfica 18. **Consumo de oxígeno de *S. cerevisiae***. Cantidades variables de células ayunadas, CMI de EPL, MES-TEA 10 mM, pH 6 y glucosa 20 mM, CCCP 4 μ M, volumen final 5.0 mL. 1V = 2000 natg O. Gráfica representativa de 5 repeticiones. Las flechas indican la adición de reactivos.



Gráfica 19. **Efectos de la EPL sobre la respiración de *S. cerevisiae*.** 25 mg de levaduras ayunadas, cantidad variable de EPL, MES-TEA 10 mM, pH 6 y glucosa 20 mM, CCCP 4 µM. Mezcla: NAD⁺ 1.4 Mm, ATP 1.8 mM, MgCl₂ 5 mM, K₂HPO₄ 20 mM, volumen final 5.0 mL. 1V = 2000 natg O. Gráfica representativa de 4 repeticiones. Las flechas indican la adición de reactivos.

9.6.2 Metabolismo anaeróbico.

En ausencia de oxígeno, las levaduras son capaces de fermentar, es decir, continuar con su metabolismo por otras vías alternas para utilizar otros compuestos como aceptores de electrones y producir otros compuestos como el etanol.

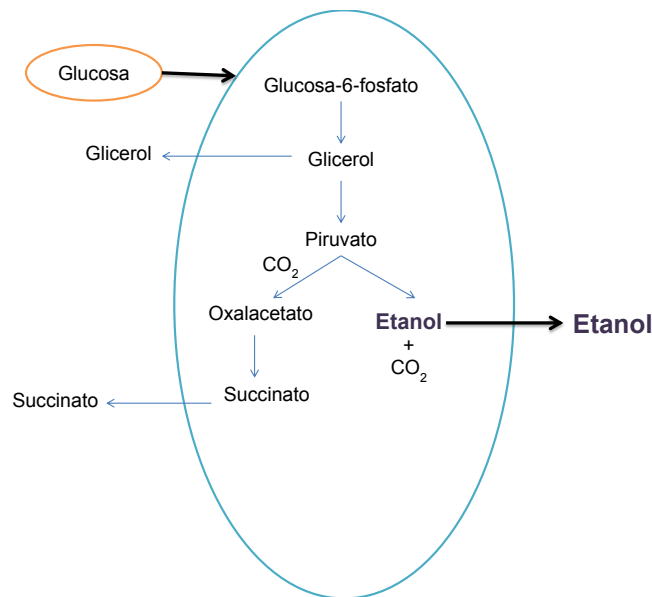
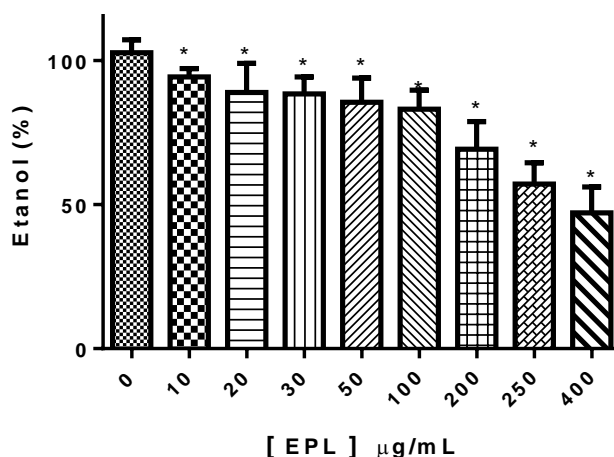


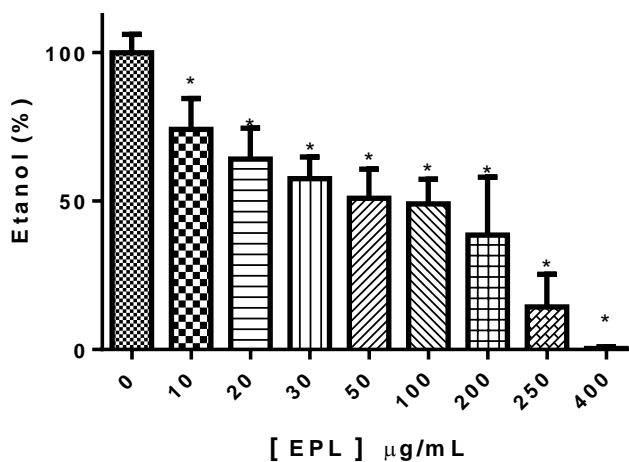
Figura 10. Esquema de la respiración celular. (Feldmann, 2012).

Para obligar a fermentar a las levaduras, se utilizaron inhibidores de la cadena transportadores de electrones; el NaCN para ambas levaduras, y octilgalato para *C. albicans*, que cuenta con una oxidasa alterna (Calahorra, *et al.*, 2012).

En la Gráfica 20 se presentan los resultados de *S. cerevisiae* sobre la fermentación y en la Gráfica 21 los de *C. albicans*. Se encontró que desde la mínima concentración, la fermentación se inhibió, pero es importante destacar que en *C. albicans* a 400 µg/mL se inhibe por completo, cosa que no ocurre con *S. cerevisiae*.



Gráfica 20. **Efectos de la EPL sobre la fermentación de *S. cerevisiae*.** Medio de incubación: MES-TEA 2 mM, pH 6, glucosa 20 mM, [EPL] variable, 4 μM de NaCN y 200 mg de células (peso húmedo) ayunadas, volumen final 4.0 mL, 15 min de incubación a 30°C. El etanol se cuantificó en 0.1 mL del sobrenadante con alcohol deshidrogenasa y NAD⁺ 20 mg/mL a 340 nm. (n=5, * p<0.05 vs. Total).



Gráfica 21. **Efectos sobre la fermentación de *C. albicans*.** Medio de incubación: MES-TEA 2 mM, pH 6, glucosa 20 mM, [EPL] variable, 4 μM de NaCN y 200 mg de células (peso húmedo) ayunadas, volumen final 4.0 mL, 15 min de incubación a 30°C. El etanol se cuantificó en 0.1 mL del sobrenadante con alcohol deshidrogenasa y NAD⁺ 20 mg/mL a 340 nm. (n=5, * p<0.05 vs. Total).

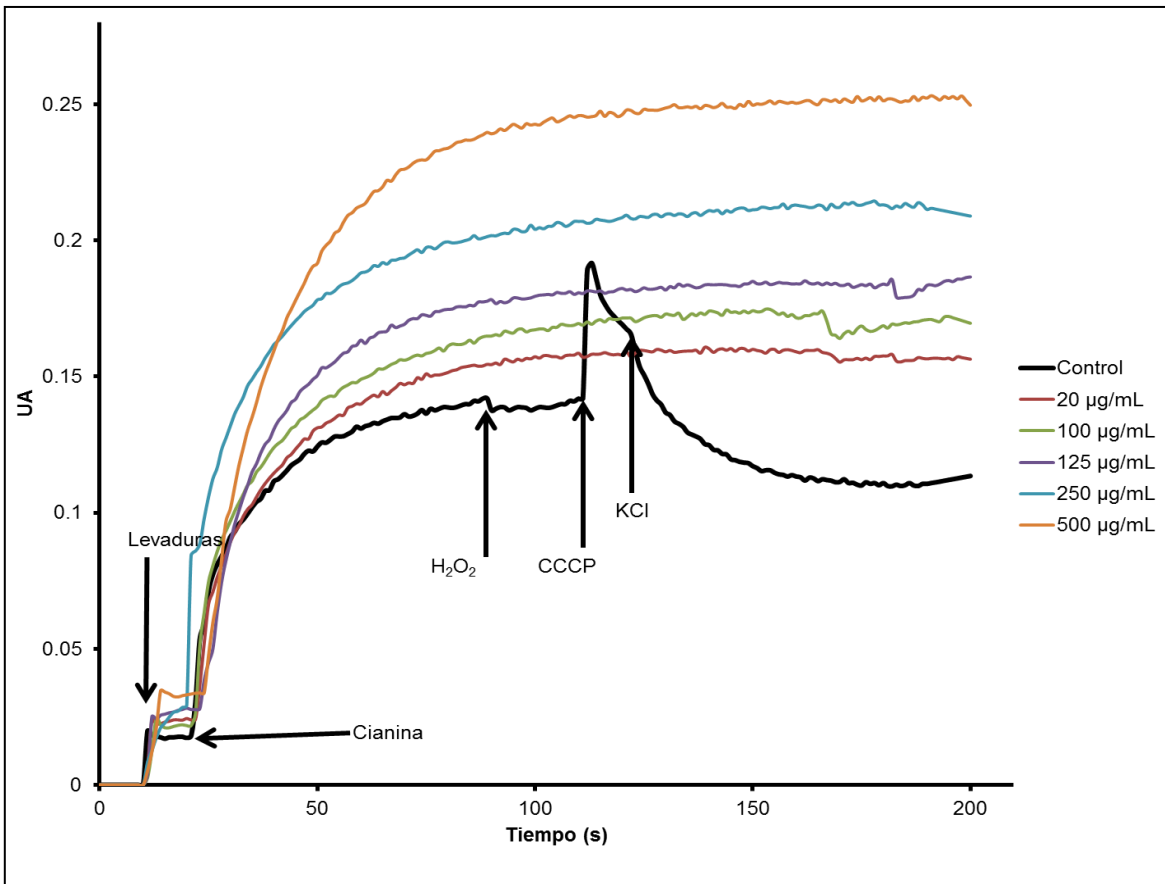
9.7 Efectos sobre el potencial de membrana.

La salida del K^+ , acompañada por nucleótidos, péptidos y fosfato inorgánico, podría producir un cambio en la osmolaridad y potencial de membrana. Por las propiedades que se le atribuyen al K^+ , se estudió si el catión por medio de la EPL estuviera saliendo por un flujo electrogénico, fenómeno que se comprobó con el quitosano (Peña *et al.*, 2013), por ello se estimaron los potenciales de membrana utilizando una cianina ($DiSC_3$); esta molécula produce un aumento de fluorescencia al agregar glucosa y una disminución al agregar K^+ (Peña *et al.*, 1984).

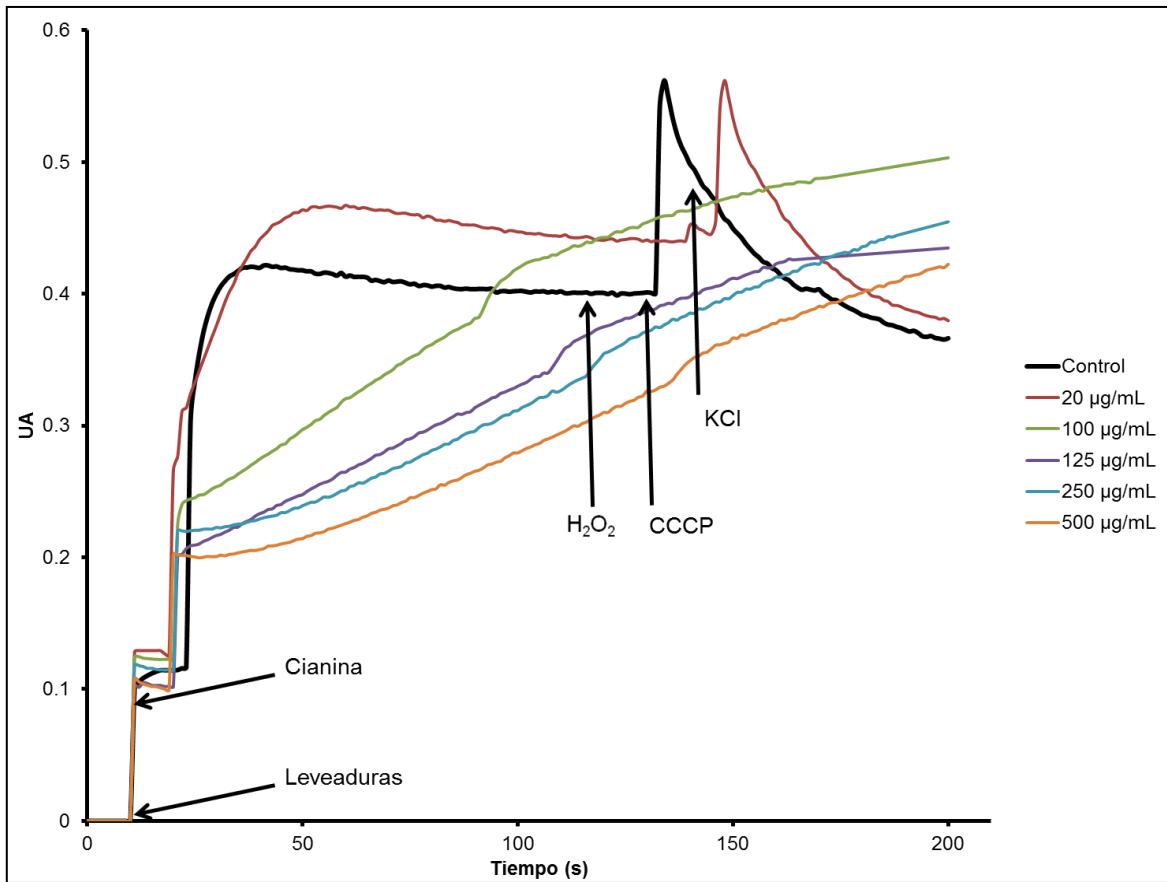
Se realizaron experimentos en dos condiciones diferentes:

- a) Células preincubadas con EPL, lavadas, a las que se les estimó el potencial de membrana, Gráfica 22 para *S. cerevisiae* y Gráfica 24 para *C. albicans*.
- b) Células a las que se les estimó el potencial de membrana en presencia de EPL, Gráfica 23 para *S. cerevisiae* y Gráfica 25 para *C. albicans*.

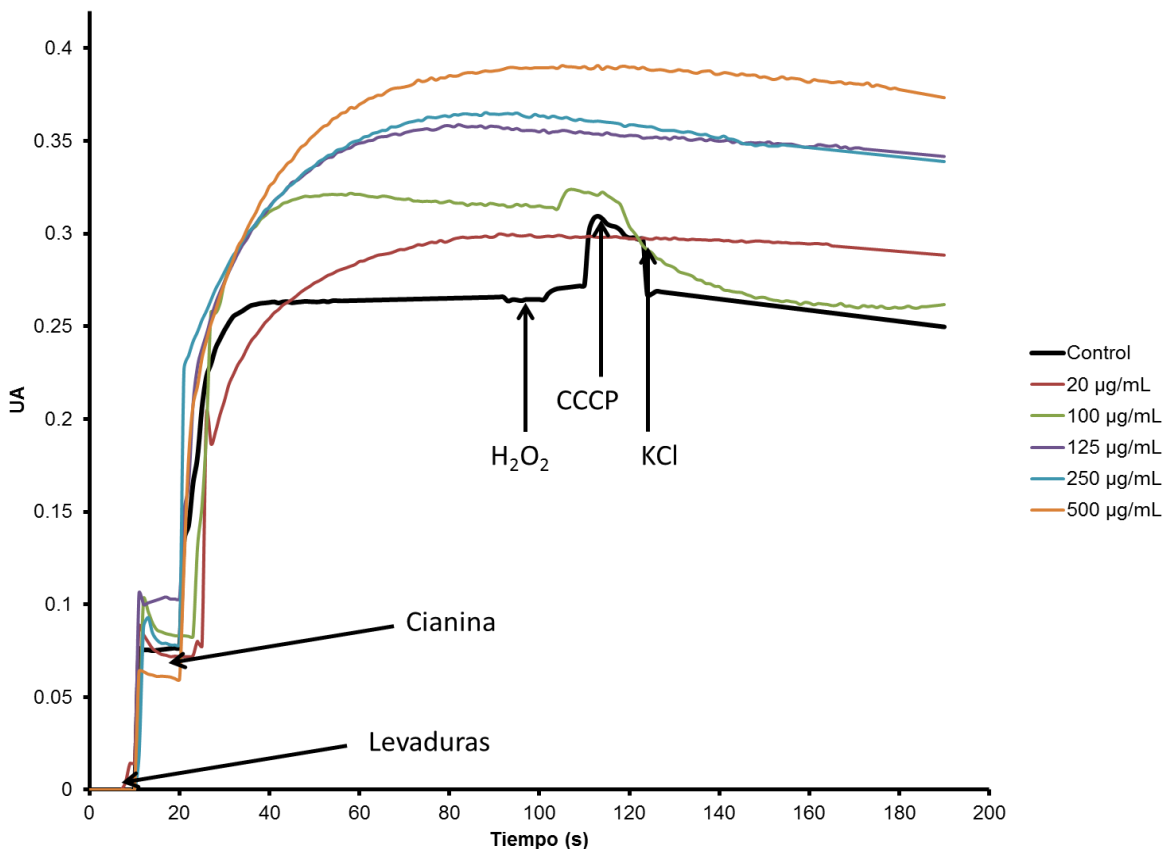
En ambos casos se encontró que el tratamiento previo y células tratadas con EPL al momento, se observó un aumento en la fluorescencia, que podría indicar un flujo de salida de K^+ electrogénico, que despolariza la membrana plasmática; este aumento se encontró en todas las concentraciones de EPL. Esto nuevamente sugiere una permeabilización de la membrana celular, por donde se fugan moléculas y cationes intracelulares los cuales provocan que la membrana celular se despolarice, lo cual se refleja por el aumento de la fluorescencia de la cianina.



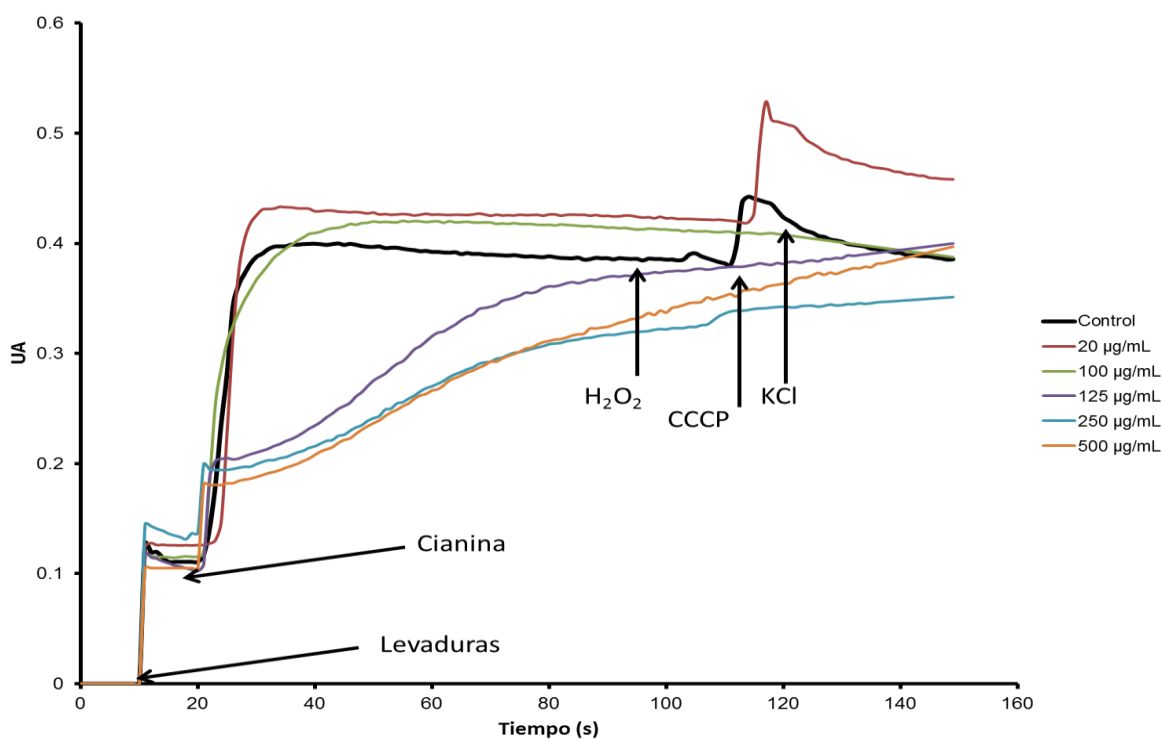
Gráfica 22. **Efectos sobre el potencial de membrana en *S. cerevisiae*.** Las células se incubaron previamente en MES-TEA 2 mM, pH 6, glucosa 20 mM y [EPL] variable durante 15 min a 30°C, se recolectaron y suspendieron al 50% (peso/volumen). 100 µL de la suspensión celular se agregaron a la celda del fluorómetro con solución amortiguadora MES-TEA 10 mM, pH 6, BaCl₂ 10 µM y glucosa 20 mM, en un volumen final de 2,0 mL. Después de 30 s, se adicionó cianina (DiSC₃) 500 nM, después, CCCP 10 µM y finalmente se adicionó KCl 10 mM. Los cambios de fluorescencia se estimaron en 540–590 nm, para excitación y emisión, respectivamente, AU: unidades arbitrarias. Gráfica representativa de 5 repeticiones. Las flechas indican la adición de reactivos.



Gráfica 23. **Efectos sobre el potencial de membrana en *S. cerevisiae*.** Las células (25 mg, peso húmedo) se agregaron a la celda del fluorómetro que contenía el amortiguador MES-TEA 10 mM pH 6, BaCl₂ 10 µM, glucosa 20 mM y concentraciones variables de EPL, en un volumen final de 2,0 mL. Después de 30 s, se añadió cianina 500 nM y CCCP 10 µM y al final se añadió KCl 20 mM. Se siguieron los cambios de fluorescencia, 540–590 nm, para excitación y emisión, respectivamente. UA: unidades arbitrarias. Gráfica representativa de 5 repeticiones. Las flechas indican la adición de reactivos.



Gráfica 24. **Efectos sobre el potencial de membrana en *C. albicans*.** Las células se incubaron previamente en MES-TEA 2 mM, pH 6, glucosa 20 mM y [EPL] variable durante 15 min a 30°C, se recolectaron y suspendieron al 50% (peso/volumen). 100 µL de la suspensión celular se agregaron a la celda del fluorómetro con solución amortiguadora MES-TEA 10 mM, pH 6, BaCl₂ 10 µM y glucosa 20 mM, en un volumen final de 2,0 mL. Después de 30 s, se adicionó cianina (DiSC₃) 500 nM, después, CCCP 10 µM y finalmente se adicionó KCl 10 mM. Los cambios de fluorescencia se estimaron en 540–590 nm, para excitación y emisión, respectivamente, AU: unidades arbitrarias. Gráfica representativa de 5 repeticiones. Las flechas indican la adición de reactivos.



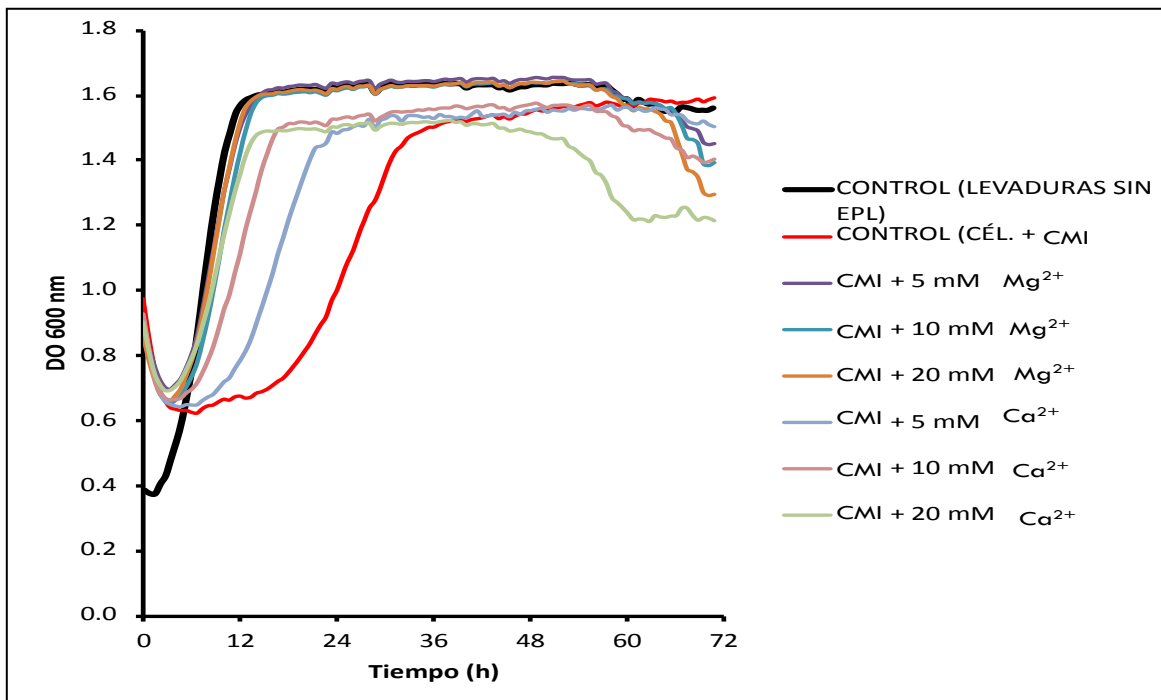
Gráfica 25. **Efectos sobre el potencial de membrana en *C. albicans*.** Las células (25 mg, peso húmedo) se agregaron a la celda del fluorómetro que contenía el amortiguador MES-TEA 10 mM pH 6, BaCl₂ 10 µM, glucosa 20 mM y concentraciones variables de EPL, en un volumen final de 2,0 mL. Después de 30 s, se añadió cianina 500 nM y CCCP 10 µM y al final se añadió KCl 20 mM. Se siguieron los cambios de fluorescencia, 540–590 nm, para excitación y emisión, respectivamente. UA: unidades arbitrarias. Gráfica representativa de 5 repeticiones. Las flechas indican la adición de reactivos.

Es posible también que la simple permeabilización de la membrana permita que la cianina, altamente hidrofóbica, encuentre una vía abierta de acceso a los componentes del interior de la célula, aumentando su fluorescencia. De hecho, esta última posibilidad parece más factible, como puede deducirse de que el aumento de la fluorescencia producido por la EPL casi no disminuya al agregar K⁺, cosa que debería ocurrir si ese incremento se debiera a un eflujo electrogénico del catión.

9.8 Efecto de la EPL en presencia de metales divalentes en el crecimiento microbiano.

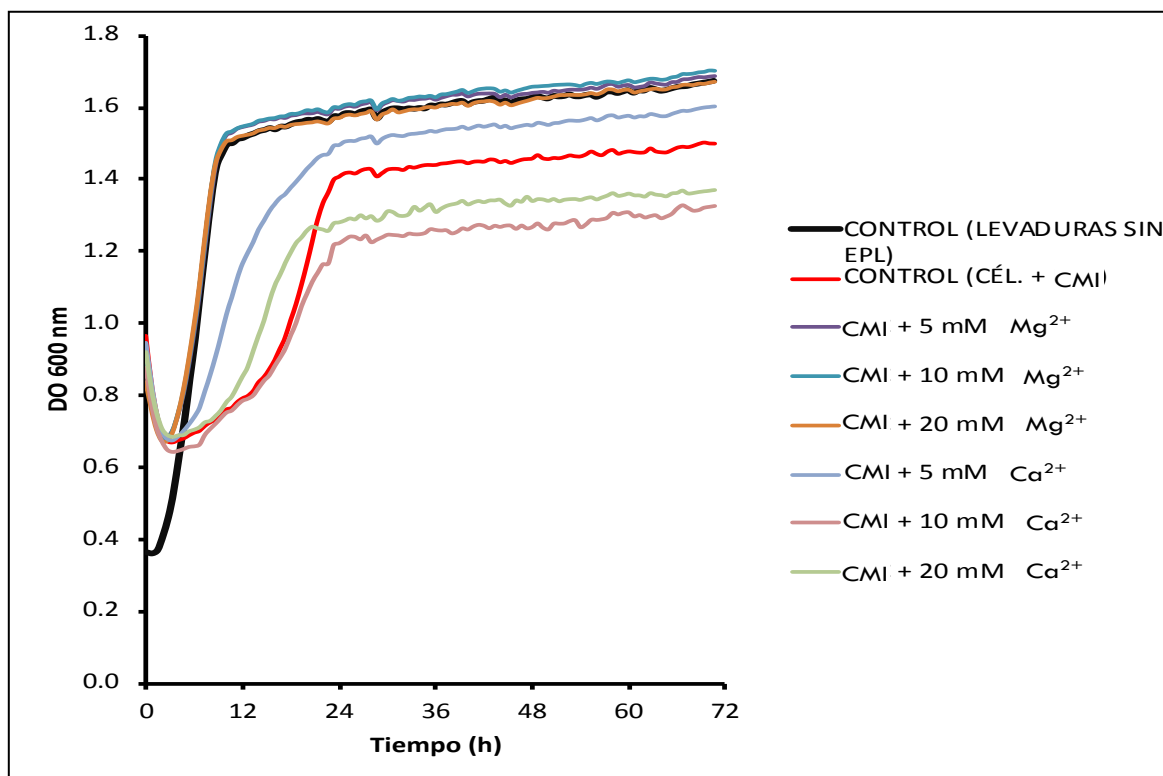
La actividad antimicrobiana de EPL se basa en interacciones electrostáticas por lo ya descrito por otro grupo de investigadores (Hyldgaard *et al.*, 2014), por lo que se decidió probar la CMI en conjunto con Mg^{2+} y Ca^{2+} , encontrándose que el efecto disminuye en presencia de estos metales (5 - 20 mM).

En la Gráfica 26, se presentan los resultados *C. albicans*, en los que se observa que con Mg^{2+} las levaduras que son incubadas con la CMI recuperan su crecimiento, alcanzando la misma velocidad que el grupo control, mientras que con Ca^{2+} no se recuperan al 100%, aunque sí crecen más.



Gráfica 26. Efecto de metales divalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} sobre el crecimiento de *C. albicans*. Las curvas se realizaron en un lector de placas automatizado durante 72 h, utilizando [EPL] variable, YPD con concentraciones variables de $MgCl_2$ y $CaCl_2$. Gráfica representativa de 3 repeticiones.

En la Gráfica 27, se presentan los resultados para *S. cerevisiae*. Se observa que con Mg^{2+} las levaduras incubadas con la CMI recuperan la velocidad del crecimiento, igual que el grupo control, mientras que con Ca^{2+} a la más baja concentración (5 mM) recuperan poco su crecimiento, comparadas con el control, mientras que a las dos más altas (10 y 20 mM) parece resultarles tóxico y se limita su desarrollo.



Gráfica 27. Efecto de metales divalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} sobre el crecimiento de *S. cerevisiae*. Las curvas se realizaron en un lector de placas automatizado durante 72 h, utilizando [EPL] variable, YPD con concentraciones variables de $MgCl_2$ y $CaCl_2$. Gráfica representativa de 3 repeticiones.

En las curvas correspondientes a *C. albicans* (Gráfica 1 y Gráfica 26) se observó la disminución de la DO, esto debido a que mueren las levaduras, se lisan y los componentes celulares se solubilizan, fenómeno que no ocurre con *S. cerevisiae* (Gráfica 2 y Gráfica 27).

10. RESUMEN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en estos desarrollos experimentales y sustentados con la teoría nos indica que:

- La CMI de EPL sobre *S. cerevisiae* y *C. albicans* es de 250 µg/mL para ambas levaduras.
- La acidificación se inhibe a altas concentraciones, probablemente debido a la pérdida de moléculas pequeñas y la inhibición de diversas vías metabólicas.
- La EPL provoca una modificación en la membrana, que da lugar a la fuga de moléculas que absorben a 260 y 280 nm, fosfato inorgánico y K^+ .
- El metabolismo aeróbico y anaeróbico se inhibe a altas concentraciones de EPL.
- A bajas concentraciones de EPL pareciera haber una despolarización de la membrana plasmática, por la salida del K^+ .
- El efecto antimicrobiano de EPL se revierte en presencia de otros cationes como Mg^{2+} y Ca^{2+} .

11. DISCUSIÓN

Hay pocos estudios realizados sobre el posible uso de la EPL como antimicrobiano. Sin embargo, se pueden encontrar varios reportes de su utilización como acarreador de medicamentos, nanopartículas, acarreador de genes en técnicas de biología molecular, inductor de interferones, inhibidor de lipasas, conservador de alimentos, etc., pero la desventaja de los usos de este biopolímero en los tres primeros puntos es que las dimensiones en cuanto al número de residuos no son constantes, y su estabilidad depende precisamente de la longitud del polímero (Shukla *et al.*, 2012).

La mayoría de los trabajos se han centrado en estudiar el efecto antimicrobiano en bacterias, tanto Gram negativas como Gram positivas, pero no existen estudios en levaduras. Los estudios realizados en *Listeria innocua*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* apuntan a que el mecanismo de acción antimicrobiano de la EPL es la sinergia de varios efectos individuales (Hyldgaard *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2017).

Con las concentraciones usadas por Hyldgaard *et al.* (2014), considerando que el trabajo fue realizado con bacterias, se decidió partir de las concentraciones que utilizaron para determinar la CMI. Se obtuvo un valor de 250 µg/mL (250 mg/L) para ambas levaduras. Es importante destacar que al realizar esta determinación, las células incubadas a altas concentraciones de EPL en YPD floculaban y le daban cierta turbiedad al medio, que desaparecía con el paso de unas horas y la agitación. Pasadas unas horas, las levaduras llegaban a la fase estacionaria. Es necesario señalar que los efectos dependen del medio de incubación debido a una serie de factores, ya que el medio YPD es un medio enriquecido.

La información bibliográfica propone que la EPL (policación), a bajas concentraciones, se une a la membrana celular (carga parcial negativa), por medio de un fenómeno de adsorción iónica (Luz *et al.*, 2018), provocando una disminución de la carga parcial negativa de la célula lo que conduce al bombeo excesivo de protones por la ATPasa transmembranal para normalizar este cambio, pero a altas concentraciones el bombeo se inhibe, y la permeabilización conduce a la liberación de K^+ y otras moléculas.

El flujo de salida de moléculas y K^+ provoca la inhibición de las principales vías metabólicas, la respiración y la fermentación que privan a las células de sus principales fuentes de energía, resultados que se sustentan con los observados por un análisis metabólico, en el que encuentran que se suprime el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la glucólisis (Bo *et al.*, 2014), por lo que se propone que la EPL induce un desequilibrio metabólico intracelular a través de la interrupción de las funciones de la membrana celular.

Es importante destacar, que la EPL no dañó organelos como la mitocondria, ya que se demostró que si en el medio de incubación aumentamos la concentración de compuestos indispensables para la mitocondria, esta pudo seguir consumiendo el oxígeno del medio.

Respecto al material que absorbe a 260 nm, que pueden ser nucleótidos o pequeños fragmentos de DNA y RNA, se relaciona con lo que Tan *et al.* (2018) afirmaron que en *S. cerevisiae* se da un aumento de EROS, lo cual conduce que se fragmenten los cromosomas y queda DNA libre; ya desde la década de los años sesenta, se le atribuía a la EPL cierta atracción electrostática por el DNA ("Molecular Biology: DNA and Polylysine," 1969). Basándose en esta propiedad, años después se desarrolló una metodología para cuantificar DNA, haciéndolo

reaccionar con EPL, y la EPL presente en el sobrenadante se cuantificaba con colorantes aniónicos (Itzhaki, 1972), por lo que el posible daño que pueda causar la EPL a esta biomolécula es otra ruta de trabajo muy importante.

Es importante destacar que el efecto de la EPL depende de la cantidad de células, ya que como se adhiere a la membrana celular, se puede hablar de un fenómeno electrostático, es decir, a baja cantidad de células, mayor es el efecto de la EPL; esto se demostró con la salida de K^+ y material que sale, que absorbe a 260 y 280 nm, así como con los efectos sobre la respiración, que a bajas cantidades de levaduras se inhibe por completo.

En el caso de *S. cerevisiae*, que es una levadura más fermentativa que *C. albicans*, la acidificación a bajas concentraciones, además de intentar compensar el potencial de membrana, se puede deber a que la levadura comienza a fermentar (para producir más ATP, como resultado de la activación de la H^+ -ATPasa membranar). En *S. cerevisiae* la fermentación disminuyó, pero no se inhibió completamente, lo que conduce al aumento de la producción de CO_2 , el cual en presencia de H_2O forma H_2CO_3 , que modificó también el pH del medio.

Es interesante que aunque se daña la integridad de la membrana, por espectrofotometría seguramente no se detectaron proteínas, lo que sugiere que en el interior de la levadura se pueden encontrar moléculas de gran peso molecular que podrían ser estudiadas *in situ*, al igual que el estudio de organelos internos, considerando que la restauración de la respiración sugiere que se conservan estas estructuras. Tal cosa es altamente probable; en las células hervidas, las proteínas se desnaturalizan y no son solubles.

Como se mencionó en un inicio, el efecto antimicrobiano de la EPL es la suma de varios daños independientes, lo que conduce a la levadura a que su metabolismo se detenga, ya que en este caso, como resultado de la permeabilización de la membrana celular, se presenta un flujo de salida de moléculas pequeñas y K^+ , capaces de atravesar la pared y membrana celular, llevando a la pérdida de las capacidades metabólicas, como lo demuestran los efectos sobre la respiración y la fermentación, todo ello llevando a la inhibición del crecimiento.

Cuando el medio de cultivo YPD, se enriqueció con metales divalentes como Mg^{2+} y Ca^{2+} disminuyó el efecto de la EPL. Esto se debe a que estos dos cationes son más pequeños que la EPL, lo que hace que ocupen cargas negativas, es decir enmascaran y evitan que la EPL se acerque y cause el daño a la membrana celular.

El grupo de Bo *et al.* (2014) ha concluido que *S. cerevisiae* tratada con EPL a la concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ logra una mortalidad celular cercana al 100%, resultado similar al nuestro. Encontraron que también se produce una curvatura de la bicapa de fosfolípidos, fenómeno observado también en bacterias por Hyldgaard *et al.* (2014), dando como resultado poros en la superficie de los microorganismos, que ambos grupos observaron mediante microscopía electrónica de barrido, y por estos poros es donde proponemos que se lleva a cabo la fuga de las moléculas.

Finalmente en la Figura 11, y de acuerdo a los resultados obtenidos se resumen los mecanismos de acción para la EPL:

1. Unión electrostática de EPL a la membrana celular;

2. Inhibición de la ATP-asa membranaral; por la falta de ATP, debido al flujo de salida de moléculas que absorben a 280 nm.
3. Alteración y permeabilización de la membrana;
4. Salida de K^+ y de moléculas pequeñas (Pi, nucleótidos y pequeños péptidos);
5. Inhibición de procesos metabólicos como la respiración celular y la fermentación, y posteriormente de muchas otras funciones celulares, que llevan a la inhibición del crecimiento o la muerte.

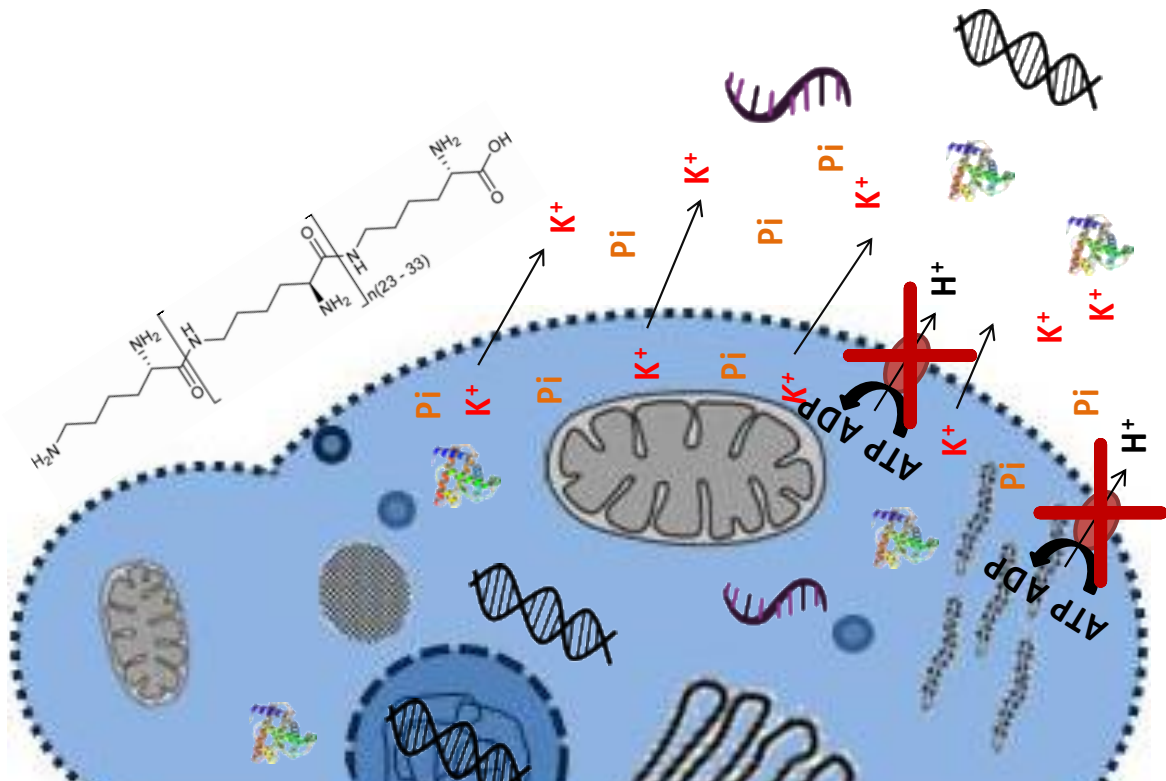


Figura 11. Mecanismo de acción propuesto para la EPL.

En resumen, nuestros estudios, comparándolos con otros ya existentes sobre bacterias, nos ayudan a establecer las propiedades antimicrobianas de EPL, agregando un grupo más de microorganismos a la lista de los ya existentes, lo que hace que este antimicrobiano sea de amplio espectro, ya que sus propiedades son bactericidas y antifúngicas.

Una ventaja para su uso, es que este polímero está considerado como seguro (GRAS) por la FDA de los Estados Unidos y se utiliza como conservador de alimentos en los Estados Unidos, Corea del Sur y Japón.

Nuestros resultados demuestran que la EPL es un agente antifúngico prometedor para el tratamiento de candidiasis locales.

12. CONCLUSION

Se propone que la EPL afecta la morfología de la membrana de las levaduras *S. cerevisiae* y *C. albicans*, ya que al interactuar de una manera electrostática se reacomodan sus componentes, dando como resultado poros por donde se liberan las moléculas pequeñas, las cuales al no encontrarse en el interior de la célula o en equilibrio afectan al menos dos de los procesos metabólicos más importantes, la respiración celular y la fermentación, evitando así que ambas levaduras se puedan desarrollar, por lo que la EPL si muestra un afecto antifúngico.

13. PERSPECTIVAS

Con los resultados obtenidos, se propone:

- Evaluar diferentes concentraciones de EPL para determinar la acumulación de Especies Reactivas de Oxígeno, por el estrés generado por la presencia del polícatión.
- Utilizar algunas moléculas antioxidantes en el medio de crecimiento para intentar lograr un desarrollo normal; es decir, revertir el efecto de la EPL.
- Proponer un modelo de permeabilización celular para el estudio de organelos celulares y enzimas *in situ*.
- Hacer pruebas toxicológicas en animales infectados con *C. albicans* para proponer una alternativa terapéutica.

14. BIBLIOGRAFÍA

- Bo, T., Liu, M., Zhong, C., Zhang, Q., Su, Q.-Z., Tan, Z.-L., Jia, S. (2014). Metabolomic Analysis of Antimicrobial Mechanisms of ϵ -Poly-L-lysine on *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(19), 4454–4465. <https://doi.org/10.1021/jf500505n>
- Calahorra, M., Sánchez, N., & Peña, A. (2012). Characterization of glycolytic metabolism and ion transport of *Candida albicans*. *Yeast (Chichester, England)*, 29, 357–370. <https://doi.org/10.1002/yea.2915>
- Carmona-Ribeiro, A. M., & de Melo Carrasco, L. D. (2013). Cationic antimicrobial polymers and their assemblies. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(5), 9906–9946. <https://doi.org/10.3390/ijms14059906>
- da Silva Dantas, A., Lee, K. K., Raziunaite, I., Schaefer, K., Wagener, J., Yadav, B., & Gow, N. A. R. (2016). Cell biology of *Candida albicans*–host interactions. *Current Opinion in Microbiology*, 34, 111–118. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.08.006>
- Dumitru, R., Hornby, J. M., & Nickerson, K. W. (2004). Defined anaerobic growth medium for studying *Candida albicans* basic biology and resistance to eight antifungal drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.7.2350-2354.2004>
- Feldmann, H. (2012). *Yeast: Molecular and Cell Biology: Second Edition*. *Yeast: Molecular and Cell Biology: Second Edition* <https://doi.org/10.1002/9783527659180>.
- Fiske, C. H., & Subbarow, Y. (1925). The Colorimetric Determination of Phosphorus. *Journal of Biological Chemistry*, 66(2), 375–400. <http://www.jbc.org/cgi/content/short/66/2/375>
- Hyltdgaard, M., Mygind, T., Vad, B. S., Stenvang, M., Otzen, D. E., & Meyer, R. L.

- (2014). The Antimicrobial Mechanism of Action of epsilon-poly-lysine. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(24), 7758 LP-7770.
<http://aem.asm.org/content/80/24/7758.abstract>
- Itzhaki, R. F. (1972). Colorimetric method for estimating polylysine and polyarginine. *Analytical Biochemistry*, 50(2), 569–574.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90067-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90067-X)
- Karp, G. (2013). Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments, 7th Edition. In *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments*.
<https://doi.org/10.1002/bmb.2002.494030049993>
- Karp, G. (2013). The Structure and Function of the Plasma Membrane. In *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments*.
<https://doi.org/10.1002/bmb.2002.494030049993>
- Lesage, G., & Bussey, H. (2006). Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 70(2), 317–343.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00038-05>
- Lipke, P. N., & Ovalle, R. (1998). Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges. *Journal of Bacteriology*, 180(15), 3735 LP-3740.
<http://jb.asm.org/content/180/15/3735.abstract>
- Luz, C., Calpe, J., Saladino, F., Luciano, F. B., Fernandez-Franzón, M., Mañes, J., & Meca, G. (2018). Antimicrobial packaging based on ε-polylysine bioactive film for the control of mycotoxigenic fungi *in vitro* and in bread. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(1), e13370–e13370.
<https://doi.org/10.1111/jfpp.13370>
- Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D., & Stahl, D. (2014). *Brock Biology of Microorganisms*, 14th Edition. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Madrid Gonzalez, R., J Gómez, M., Ramos, J., & Rodriguez-Navarro, A. (1998).

Ectopic Potassium Uptake in *trk1 trk2* Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Correlates with a Highly Hyperpolarized Membrane Potential. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 14838–14844.
<https://doi.org/10.1074/jbc.273.24.14838>

Molecular Biology: DNA and Polylysine. (1969). *Nature*, 223, 1101.
<http://dx.doi.org/10.1038/2231101b0>

Orlean, P. (2012). Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Genetics*, 192(3), 775–818.
<https://doi.org/10.1534/genetics.112.144485>

Pandey, A. K., & Kumar, A. (2014). Improved microbial biosynthesis strategies and multifarious applications of the natural biopolymer epsilon-poly-L-lysine. *Process Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.12.009>

Peña, A; Arroyo, Gómez, Tapia, G. (2004). *Bioquímica*. (Limusa, Ed.) (2a ed.). México.

Peña, A., Cinco, G., Gómez-Puyou, A., & Tuena, M. (1973). Effect of the pH of the incubation medium on glycolysis and respiration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 153, 413–425.
[https://doi.org/10.1016/0003-9861\(72\)90359-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(72)90359-1)

Peña, A., Sánchez, N. S., & Calahorra, M. (2013). Effects of chitosan on *Candida albicans*: Conditions for its antifungal activity. *BioMed Research International*.
<https://doi.org/10.1155/2013/527549>

Peña, A., Uribe, S., Pardo, J. P., & Borbolla, M. (1984). The use of a cyanine dye in measuring membrane potential in yeast. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(84\)90381-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(84)90381-3)

Pineda, J., Cortés, A. Á., Uribarrem, T. del N. Jesus, & Castañón, L. R. (2017). Artículo de Revisión Candidosis vaginal. Revisión de la literatura y situación de México y otros países latinoamericanos. *Revista Médica Risaralda*.

- Porterfield, J. Z., & Zlotnick, A. (2010). A simple and general method for determining the protein and nucleic acid content of viruses by UV absorbance. *Virology*, *407*(2), 281–288. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.08.015>
- Rine, J. (1989). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* in molecular and cellular biology: A smaller but not lower eucaryote. *Integrative and Comparative Biology*. <https://doi.org/10.1093/icb/29.2.605>
- Shima, S., Matsuoka, H., Iwamoto, T., & Sakai, H. (1984). Antimicrobial action of epsilon-poly-L-lysine. *The Journal of Antibiotics*. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.37.1449>
- Shukla, S., Singh, A., Pandey, A., & Mishra, A. (2012). Review on production and medical applications of ϵ -Polylysine. *Biochemical Engineering Journal*, *65*, 70–81. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.04.001>
- Tan, Z., Bo, T., Guo, F., Cui, J., & Jia, S. (2018). Effects of ϵ -Poly-L-lysine on the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* and its involved antimicrobial mechanism. *International Journal of Biological Macromolecules*, *118*, 2230–2236. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.094>
- van der Rest, M. E., Kamminga, A. H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B., & Konings, W. N. (1995). The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiological Reviews*, *59*(2), 304–322. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7603412>
- Venkatesh, M., Barathi, V. A., Goh, E. T. L., Anggara, R., Fazil, M. H. U. T., Ng, A. J. Y., Lakshminarayanan, R. (2017). Antimicrobial activity and cell selectivity of synthetic and biosynthetic cationic polymers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.00469-17>
- Wei, L., Wu, R., Wang, C., & Wu, Z. (2017). Effects of ϵ -Polylysine on *Pseudomonas aeruginosa* and *Aspergillus fumigatus* Biofilm In Vitro. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, *23*, 4225–4229. <https://doi.org/10.12659/MSM.903145>

- Xu, Z., Xu, Z., Feng, X., Xu, D., Liang, J., & Xu, H. (2016). Recent advances in the biotechnological production of microbial poly(ϵ -l-lysine) and understanding of its biosynthetic mechanism. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(15), 6619–6630. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7677-3>
- Yamanaka, K., Maruyama, C., Takagi, H., & Hamano, Y. (2008). ϵ -Poly-L-lysine dispersity is controlled by a highly unusual nonribosomal peptide synthetase. *Nature Chemical Biology*, *4*, 766. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.125>
- Ye, R., Xu, H., Wan, C., Peng, S., Wang, L., Xu, H., Wei, H. (2013). Antibacterial activity and mechanism of action of ϵ -poly-l-lysine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *439*(1), 148–153. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.08.001>
- Yoshida, T., & Nagasawa, T. (2003). ϵ -Poly-l-lysine: microbial production, biodegradation and application potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *62*(1), 21–26. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1312-9>
- You, X., Einson, J. E., Lopez-Pena, C. L., Song, M., Xiao, H., McClements, D. J., & Sela, D. A. (2017). Food-grade cationic antimicrobial ϵ -polylysine transiently alters the gut microbial community and predicted metagenome function in CD-1 mice. *Npj Science of Food*, *1*(1), 8. <https://doi.org/10.1038/s41538-017-0006-0>