



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**“Evaluación *in vitro* del efecto del campo magnético de baja frecuencia en la  
viabilidad de *Candida albicans*.”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

**ROBERTO EMMANUEL CONSTANTINO GONZÁLEZ**

ASESOR: Q.F.B. LETICIA CUBILLO CARRILLO

COASESOR: M. EN C. SOLEDAD CARRETO GARCÍA

**CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2016**



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.

## **Agradecimientos**

Gracias a Dios por haberme ayudado a lo largo de ésta etapa, por haberme cuidado y dado la resolución para finalizarlo

Gracias a mis padres por haberme dado todas las herramientas necesarias para finalizar mi formación, por guiarme y servir de ejemplo, y sobre todo por siempre tener confianza en mí; a mi papá por siempre estar al pendiente de mí, por ocuparse de que no me faltara nada, por ayudarme en mis mudanzas aunque tenía sus días ocupados, por servir de ejemplo y ayudarme a ser un hombre de bien, te quiero papá. A mi mamá por siempre estar al pendiente de mí, de que no me faltara nada, por preocuparse por mis horas de llegada y siempre ser cariñosa al verme llegar a casa, por querer ayudarme y apoyarme siempre, y porque se que ella siempre estará ahí para mí, te quiero mami.

A Pergui, por ser la mejor hermana, por cuidarme y preocuparse por mí, por alimentarme y siempre ser alguien de quien puedo sentirme orgulloso, aparte de también ser alguien de quien me puedo reír a cada instante.

A mi Maestra Lety, por haberme soportado durante toda la realización de mi trabajo, por escucharme en mis momentos de tristeza, por inspirarme cuando ya no tenía ganas de continuar, por ser mi profesora, mi asesora y más importante, mi amiga, por entenderme y quererme de esa manera, por dejar que le ayudara al momento de dar clases y, porque aunque ha pasado mucho tiempo, nuestra amistad sigue igual de fuerte, la quiero mucho.

A la maestra Alma, por haberme enseñado tanto, por haberme tenido la confianza para ayudarme con sus presentaciones en clase, por ser una gran amiga y estar siempre dispuesta a ofrecerme su ayuda y su consejo.

A mis amigos de la universidad, Adrián y Oscar, por su apoyo a lo largo de toda esta travesía, por el apoyo que me brindaron y por seguir al lado mío, porque

muchos de los mejores momentos de esta etapa los viví con ellos, y porque aun estando distanciados, nuestra amistad a perdurado, gracias mijos.

A mi familia qualtiana, Dane, Angie y Rojita, porque ser 3 de las mejores mujeres que he conocido en la vida, por tantos momentos felices que pasé a su lado y por estar siempre pendiente de mí, las quiero mucho amigas.

A mis querido amigo Eiron Meiden BGM y a mi bichita Mafer, por la amistad que me han brindado desde que los conocí y por todos los momentos que he vivido a su lado, por la confianza que nos tenemos y porque espero que estén a mi lado durante mucho tiempo.

A los profesores del área de microbiología, por haberme brindado su apoyo y muchos de ellos su amistad, por haberme permitido conocerlos y por haberme enseñado tanto, muchas gracias.

A los alumnos del servicio social del laboratorio 10, Gustavo, Ilse, Tania, Adán, Monse, Isaac, Sosa y Zoe, por ayudarme y hacer más placentera mi estancia en el laboratorio, y por siempre tener algo de que reírme a raíz de las veces que se equivocan, gracias muchachos.

Por último, a todas las personas que han formado parte de mi vida, porque todos ustedes han dejado una pequeña parte en mí, porque de todos he aprendido algo y, aunque no los frecuente, siempre están en mi memoria y en mis pensamientos.

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO 10 DE LA  
UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN CAMPO 1 DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MEXICO**

**LAS IMÁGENES PRESENTADAS EN ÉSTE TRABAJO FUERON OBTENIDAS CON AYUDA DEL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN EN EL LABORATORIO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE FESC CAMPO 1 A CARGO DE LA M. EN C. SOFÍA GONZÁLEZ GALLARDO MEDIANTE LA TÉCNICA DE TINCIÓN NEGATIVA.**

## Contenido

I. Resumen .....	1
II. Introducción .....	2
A. Levaduras .....	2
1. Morfología .....	4
2. Reproducción .....	6
3. Requerimientos nutricionales .....	8
B. <i>Candida albicans</i> .....	9
1. Dimorfismo .....	11
2. Condiciones experimentales para la producción de tubos germinativos ..	12
3. Factores de virulencia de <i>C. albicans</i> .....	13
C. Candidiasis .....	21
D. Diagnóstico de laboratorio .....	23
1. Toma de muestra .....	23
2. Examen directo .....	24
3. Cultivos .....	24
4. Biopsia .....	26
5. Pruebas inmunológicas .....	26
6. MALDI-TOF .....	27
E. Antimicóticos .....	28
1. Clasificación de los antimicóticos .....	28
2. Sitios de acción para la terapia antifúngica .....	29
F. Campo magnético .....	33
1. Generalidades .....	33
III. Justificación .....	40
IV. Hipótesis .....	41
V. Objetivos .....	42
1. Objetivo general: .....	42
2. Objetivos particulares: .....	42
VI. Materiales .....	43
1. Equipo .....	43

2. Material biológico.....	43
3. Medios de cultivo .....	43
4. Otros .....	43
VII. Metodología.....	44
1. Identificación de <i>C. albicans</i> .....	44
VIII. Resultados .....	49
A. Identificación de <i>C. albicans</i> .....	49
B. Exposición al campo magnético de baja frecuencia.....	53
IX. Discusión.....	63
X. Conclusiones .....	69
XI. Proyecciones.....	70
XII. Bibliografía .....	71

## Índice de figuras

Figura	Página
Fig. 1. Morfología celular de <i>C. albicans</i>	5
Fig. 2. Esquema de un corte transversal de un hongo levaduriforme	6
Fig. 3. Diagrama del ciclo de reproducción asexual de un hongo levaduriforme	7

Fig. 4. Dimorfismo de <i>C. albicans</i>	10
Fig. 5. Primeros eventos de la patogénesis de la candidiasis en una superficie mucosa	14
Fig. 6 Un esquema de las adhesinas polipeptídicas de <i>C. albicans</i>	16
Fig. 7 Diferentes sitios de acción de los antifúngicos	29
Fig. 8 Tinción de gram de <i>C. albicans</i> ATCC 10231 (100x)	49
Fig. 9 Producción de clamidosporas de <i>C. albicans</i> ATCC 10231 en agar Corn-meal (40x)	50
Fig. 10 Producción de tubo germinativo por <i>C. albicans</i> ATCC 10231 a las 2 horas (40x)	51
Fig. 11 Crecimiento de <i>C. albicans</i> ATCC 10231 en SDA incubado a 24 hrs a 37 °C	51
Fig. 12 Crecimiento de <i>C. albicans</i> ATCC 10231 en agar BiGGY incubado a 24 hrs a 37 °C	52
Fig. 13 Crecimiento de <i>C. albicans</i> ATCC 10231 en CHROMagar Candida® incubado a 24 hrs a 37 °C	52
Fig. 14 Exposición de la placa de SDA sembrada con <i>C. albicans</i> ATCC 10231 al campo magnético de baja frecuencia	53
Fig. 15 a) Microscopía electrónica de transmisión teñida negativamente para la levadura <i>C. albicans</i> ATCC 10231 sin exposición al campo magnético de baja frecuencia (10000x) b) Microscopia electrónica de transmisión de un corte transversal de <i>C. albicans</i> ATCC 10231 (10000x), utilizada de referencia para la observación de la estructura de la pared celular	54
Fig. 16 <i>C. albicans</i> ATCC 10231 después de 30 segundos de exposición al campo magnético de baja frecuencia	55
Fig. 17 <i>C. albicans</i> ATCC 10231 después de 1 minuto de exposición al campo magnético de baja frecuencia	56
Fig. 18 <i>C. albicans</i> ATCC 10231 después de 2 minutos de exposición al campo magnético de baja frecuencia	57
Fig. 19 <i>C. albicans</i> ATCC 10231 después de 4 minutos de exposición al campo magnético de baja frecuencia	58
Fig. 20 <i>C. albicans</i> ATCC 10231 después de 8 minutos de exposición al campo magnético de baja frecuencia	59
Fig. 21 <i>C. albicans</i> ATCC 10231 después de 10 minutos de exposición al campo magnético de baja frecuencia	60

## Índice de cuadros

Cuadro	Página
Cuadro No. 1: Clasificación taxonómica del género <i>Candida</i>	4

Cuadro No. 2 Clasificación de las candidiasis	23
---	----

## Índice de tablas y gráficas

<b>Tabla o gráfica</b>	<b>Página</b>
Tabla No.1 Determinación cualitativa del daño celular de <i>C. albicans</i> ATCC 10231 a distintos tiempos de exposición al campo magnético de baja frecuencia.	61
Tabla No.2 Porcentaje de células viables de <i>C. albicans</i> ATCC 10231 al ser expuestas al campo magnético de baja frecuencia.	61
Grafica No. 1 Porcentaje de células viables de <i>C. albicans</i> ATCC 10231 al ser expuestas al campo magnético.	62

## I. Resumen

La resistencia emergente de varios microorganismos a muchos de los antibióticos utilizados en el tratamiento contra las infecciones ha hecho necesaria la investigación y búsqueda de nuevas sustancias y métodos antimicrobianos. La reacción de las entidades biológicas, de proliferación o inhibición, incluyendo las células, a los campos magnéticos muy débiles puede considerarse como una manifestación de esta propiedad fundamental de los seres vivos (Mittenzwey, 1996). Es importante estudiar los organismos no solo a nivel celular o tisular, sino que hay que evaluar los efectos complejos en los organismos completos; por esa razón, las bacterias y las levaduras pueden ser buenos sujetos para el estudio de los efectos del campo magnético (Novak, 2007). La aplicación del magnetismo en los procesos biológicos es relativamente reciente y se encuentra aún muy limitada para aplicarse a una gran escala, los campos magnéticos de baja frecuencia, tienen la capacidad de influenciar a los sistemas biológicos ya que pueden involucrar cambios mayores en la proliferación celular, estimular la producción de ATP, provocar cambios en los flujos de iones a través de las membranas o incrementar la formación de CO<sub>2</sub> en los cultivos celulares. Existe evidencia de estudios realizados con una gran variedad de equipos que generan ondas magnéticas, en donde el crecimiento de bacterias y levaduras puede alterarse a través del uso de este agente físico independientemente del equipo que se utilice. (Rodríguez, 2006)

## II. Introducción

### A. Levaduras

Aunque los conocimientos acerca de los fundamentos moleculares y genéticos de las patogenicias bacteriana y viral son muy extensos, los datos relativos a la patogenicidad de las infecciones causadas por hongos son limitados. Un número relativamente pequeño de hongos es lo suficientemente virulento para ser considerado como patógenos primarios. Los patógenos primarios son capaces de iniciar una infección en un anfitrión normal aparentemente inmunocompetente. Pueden también colonizar el organismo anfitrión, encontrar un nicho ecológico adecuado con abundantes sustratos para evitar o alterar los mecanismos naturales de defensa, y posteriormente multiplicarse en el mismo. Al igual que la mayoría de los patógenos microbianos primarios, los hongos actúan también como patógenos oportunistas, ya que las variantes de mayor gravedad de cada micosis se observan muy a menudo en sujetos con deficiencias a nivel de sus defensas inmunitarias innatas y/o adquiridas.

Normalmente, los individuos sanos inmunocompetentes muestran una notable resistencia innata a las micosis, a pesar de verse expuestos de manera constante a las formas infecciosas de varios hongos presentes en la microbiota (flora comensal) o en su entorno natural (exógenos). Los patógenos fúngicos oportunistas, como el género *Candida*, *Cryptococcus neoformans* y el género *Aspergillus*, tan sólo producen infección en los individuos con alteraciones en las barreras protectoras de la piel y las membranas mucosas o bien deficiencias del sistema inmunitario que les permiten atravesarlas, colonizar y reproducirse en el hospedero. No obstante, incluso en el caso de estos patógenos oportunistas, algunos factores asociados al microorganismo, pero no al hospedero influyen en la capacidad del hongo para causar enfermedad. Sin embargo ciertos factores asociados a estos microorganismos pueden considerarse factores de virulencia, ya que participan en el proceso patológico y en algunos casos, pueden explicar las diferencias a nivel del potencial patógeno de los distintos microorganismos (Murray, 2009).

Las levaduras se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, localizadas en el suelo, en la superficie de las frutas, néctar de las flores y en ambientes acuáticos. La mayoría son saprófitas y llegan a proliferar en materia orgánica muerta; otras son parasitas, facultativas u obligadas, por lo que se desarrollan en otros seres. Algunas levaduras que son parasitas pueden causar enfermedades en el hombre, animales y plantas. Entre las saprófitas, las fermentativas llevan a cabo la fermentación alcohólica de azúcares, característica que ha sido aprovechada por el hombre desde tiempos remotos (García, 2004).

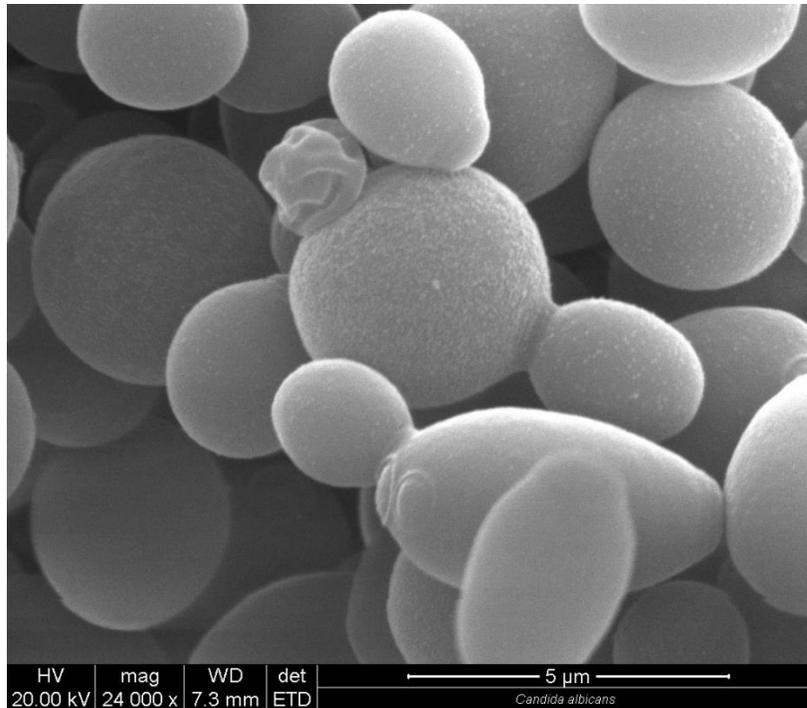
Las levaduras son definidas como hongos unicelulares microscópicos, que se reproducen por gemación, constituyendo un grupo taxonómico complejo y heterogéneo, que incluye actinomicetos y basidiomicetos. La unidad más importante en la taxonomía de las levaduras es la especie, se define como un conjunto de cepas que comparten numerosas propiedades estables, pero que difieren de forma significativa de otro propio de cepas distintas. Durante el siglo XX se han sucedido diversas clasificaciones de levaduras, debidas a autores como Lodder, Kreger y von Rij (1952), Lodder (1970), Kreger y Von Rij (1984), Kurtzman y Fell (1998) en sus respectivas ediciones correspondientes a "The yeast. A taxonomic study" y a otros como Barnett y col. (1983, 1990, 2000), autores de la obra "Yeast: characteristics and identification", agruparon y separaron las distintas levaduras (Hidalgo, 2010), aunque el género *Candida* ha sufrido nuevas clasificaciones y su taxonomía quedó establecida como se describe en el cuadro No. 1

<b>Clase</b>	<i>Ascomycetes</i>
<b>Subclase</b>	<i>Hemiascomycetes</i>
<b>Orden</b>	<i>Saccharomycetales</i>
<b>Familia</b>	<i>Saccharomycetes</i>
<b>Genero</b>	<i>Pichia, Hansenula, Arxiozyma</i> (estados teleomórficos)
<b>Especies</b>	<p>A los estados anamórficos se les denomina <i>Candida</i> y los ejemplos mas importantes son: <i>C. albicans</i>, <i>C. glabrata</i>, <i>C. tropicalis</i>, <i>C. krusei</i>, <i>C. parapsilosis</i> (sensu stricto), <i>C. orthopsilosis</i>, <i>C. metapsilosis</i> y <i>C. dubliniensis</i>.</p> <p>Las especies de <i>Candida</i> reportadas con menor frecuencia son <i>C. ciferrii</i>, <i>C. kefyri</i>, <i>C. lipolytica</i>, <i>C. lusitaniae</i>, <i>C. norvegensis</i>, <i>C. rugosa</i> y <i>C. zeylanoides</i>, entre otras.</p>

**Cuadro No. 1:** Clasificación taxonómica del género *Candida*. (Bonifaz Trujillo, 2015)

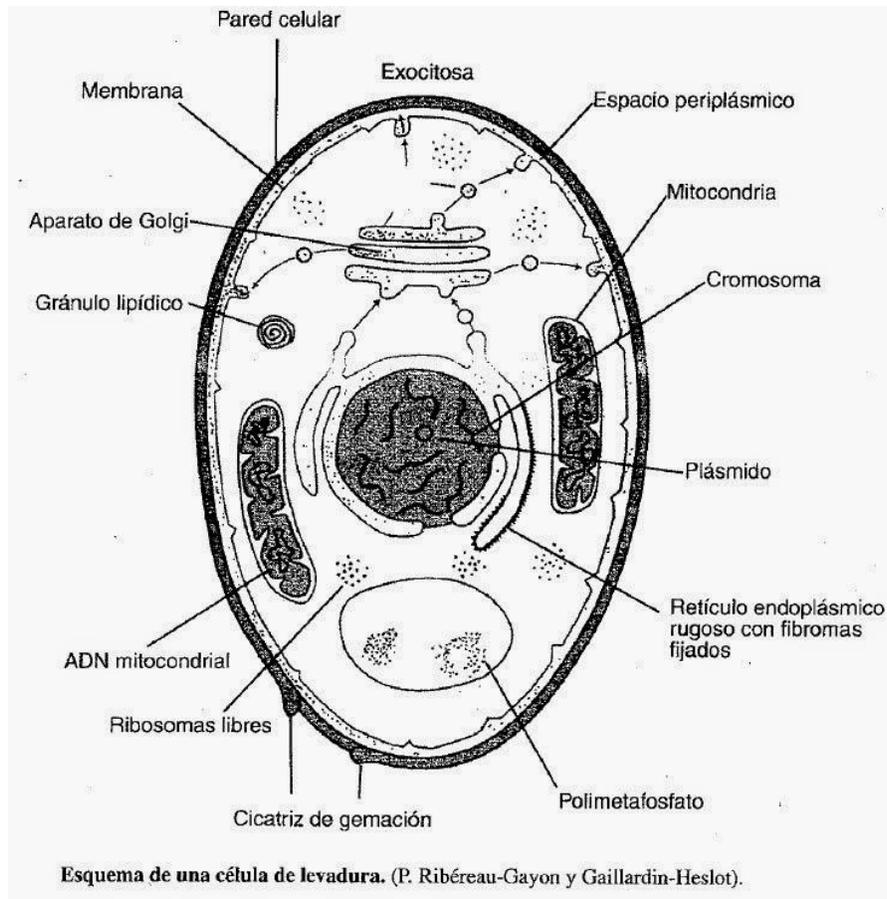
### 1. Morfología

Las levaduras son relativamente grandes (si se comparan con las bacterias) oscilan entre 1-5  $\mu\text{m}$  de anchura. Cada levadura posee una característica específica como se observa en la figura 1, pero aún en un cultivo puro, entre las células individuales, existen una considerable variación en el tamaño y la forma que puede ser redonda, elipsoide o casi cilíndrica. Estas características se ven afectadas por la edad y el entorno (García, 2004).



**Fig. 1** Morfología celular de *C. albicans*. Se pueden apreciar las levaduras gemantes y células elongadas con cicatrices de gemación microscopio. (García, 2004)

La estructura de la levadura es la de una típica célula eucariota como se muestra en la figura 2. Al microscopio se puede observar la pared celular, el citoplasma con vacuolas, glóbulos de grasa y gránulos metacromáticos. Las levaduras no poseen flagelos ni otros órganos de locomoción; algunas pueden presentar un material viscoso, compuesto de polisacáridos, que rodea la célula y que es semejante a la cápsula bacteriana. (Montoya, 2008)



**Fig. 2** Esquema de un corte transversal de un hongo levaduriforme. (Hidalgo, 2010)

## 2. Reproducción

Existen dos tipos de reproducción para las levaduras:

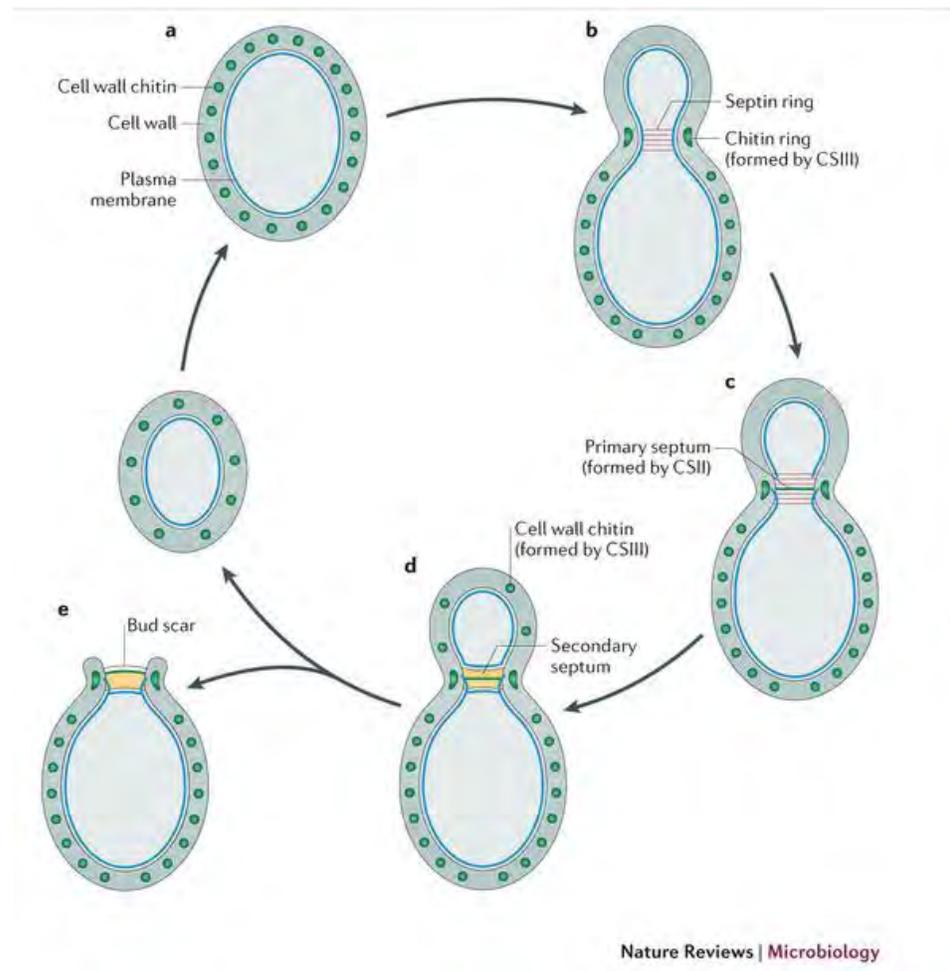
- Reproducción asexual.
- Reproducción sexual.

### a) Reproducción asexual.

La mayoría de las levaduras se reproducen asexualmente por gemación (**Figura 3**) y unas pocas por fisión binaria. En el proceso de gemación se forma una pequeña protuberancia en la periferia de la célula, la cual se debe a un debilitamiento local de la pared. Esta pequeña protuberancia se agranda al irse llevando material citoplasmático proveniente de la célula madre, hasta alcanzar el tamaño de ésta. El material nuclear se replica por mitosis y una parte pasa a la

célula hija; luego se forma la pared que divide las dos células y la célula hija se desprende de la madre. (García, 2004)

La producción de las gemas puede ocurrir en uno o en ambos extremos de la célula, lo que se conoce como gemación polar, o pueden producirse en lugares diferentes de la superficie celular, en cuyo caso se trata de la gemación multilateral o multipolar. En el lugar donde se formó una gema queda una cicatriz en la pared de la célula madre. En las levaduras polares, la producción de gemas se da siempre en el mismo lugar lo que contrasta con las levaduras multipolares en las cuales la gemación, generalmente, no ocurre de nuevo en el mismo lugar.



**Fig. 3.** Diagrama del ciclo de reproducción asexual de un hongo levaduriforme. (Cabib & Arroyo, 2013)

### **b) Reproducción sexual**

La reproducción sexual de las levaduras se da por medio de la formación de esporas las cuales pueden ser ascosporas o basidioesporas, dependiendo del tipo de célula especializada donde se formen (asca o basidia). Ambos tipos de esporas requieren que ocurra la unión de núcleos compatibles y una división mitótica. La mayoría de las levaduras son ascosporadas y su reproducción sexual ocurre mediante la fusión de 2 células, llevando a cabo una fusión de paredes con la consiguiente producción de plasmogamia o fusión de plasmas. Después de esto ocurre una cariogamia o unión de núcleos, la cual da origen a una célula diploide la cual puede seguir reproduciéndose por gemación. A continuación los núcleos se cubren se citoplasma y de pared propia, conteniendo las ascosporas en la vieja pared de la célula llamada asca. De acuerdo con las condiciones del medio, podría suceder que la mayoría de la población pase por alguno de los dos ciclos, pero en la mayoría de los casos los ciclos se dan simultáneamente.

### **3. Requerimientos nutricionales.**

Las levaduras son organismos heterótrofos y por lo tanto requiere de carbono orgánico para obtener energía y sintetizar sus componentes estructurales celulares. Sin embargo, los requerimientos de nutrimentos específicos para las levaduras pueden variar dependiendo de las diferentes especies.

Los azúcares constituyen el mejor alimento energético de las levaduras. Muchas pueden catabolizar la glucosa, ya sea en forma aerobia (respiración oxidativa) o anaerobia (fermentación). Bajo condiciones aerobias las levaduras, al utilizar el oxígeno del aire, pueden oxidar la glucosa hasta dióxido de carbono y agua, o parcialmente produciendo diversos ácidos orgánicos y otros intermediarios.

Las levaduras pueden obtener el nitrógeno que requieren para la síntesis proteica tanto de sustancias orgánicas como inorgánicas y muchas especies pueden utilizar el ion amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). La capacidad para utilizar diferentes compuestos nitrogenados es una de las características que se usa para distinguir entre las diferentes especies.

Otros nutrientes como el azufre puede ser suplementado por los iones sulfato ( $\text{SO}_4^{-2}$ ) presente en el medio, pero algunas crecen mejor si está presente una fuente de azufre orgánico (aminoácidos azufrados como cisteína). También las levaduras requieren de minerales para su crecimiento, por ejemplo, se ha determinado que el potasio, magnesio, sodio y calcio se incluyen entre los necesarios. En cuestión para tener un mejor rendimiento para lograr un mejor crecimiento en un medio sintético se requiere de boro, cobre, zinc, manganeso, hierro, iodo y molibdeno. (García, 2004)

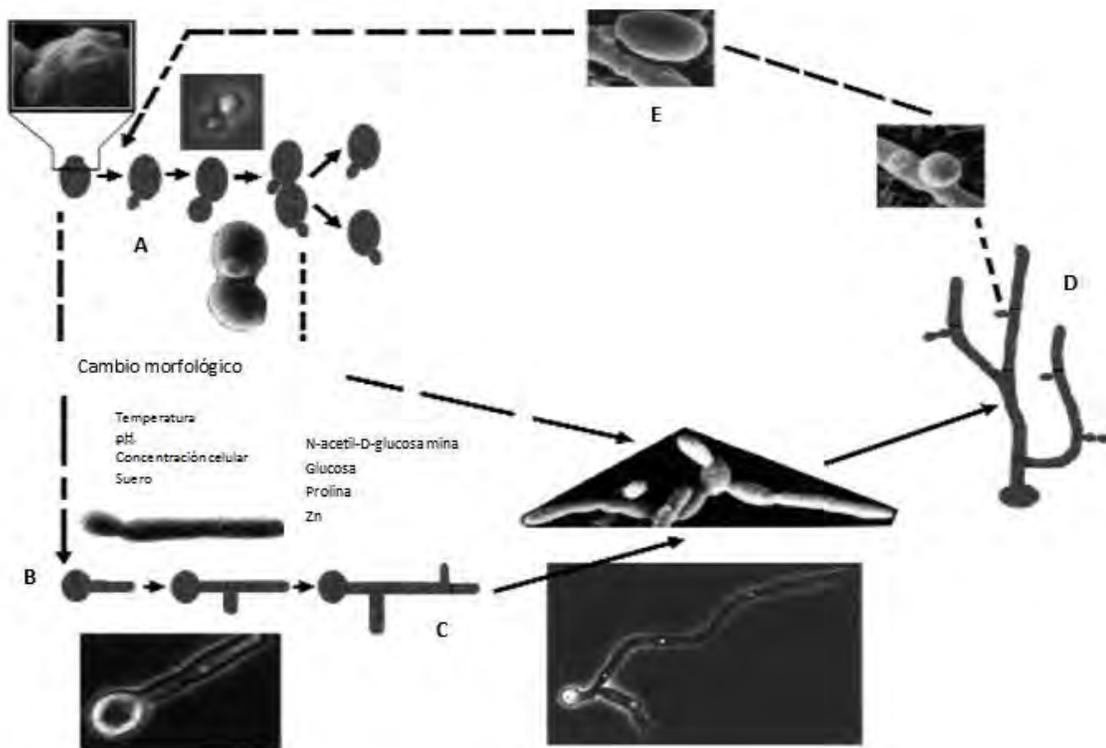
### B. *Candida albicans*

Las especies de *Candida* representan un grupo de levaduras de especial importancia para la salud humana. *Candida* forma parte de la flora normal en individuos sanos, y se encuentra comúnmente en la piel y en la mucosa de la cavidad oral, tracto gastrointestinal, urogenital y vagina. Sin embargo, *Candida* spp. puede provocar una amplia variedad de infecciones bajo ciertas condiciones. Los ejemplos más comunes incluyen candidiasis orofaríngea (OPC) y candidiasis vulvovaginal (VVC). La OPC se encuentra asociada a enfermedades crónicas como la diabetes, además de que es una de las primeras manifestaciones reconocidas de inmunodeficiencia provocada por VIH, además de ser un indicador centinela para la progresión de esta enfermedad antes de la aparición de síntomas más severos. El principal agente causal de OPC es *C. albicans*, sin embargo también se han asociado algunas otras especies tales como *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. dubliniensis*. *C. albicans* provoca aproximadamente un 90% de VVC y *C. glabrata* es responsable del 10% restante. Aunque la relación entre la VVC y VIH no ha sido aclarada, la VVC es una preocupación importante en mujeres infectadas con VIH; la mayoría de cepas aisladas de *C. albicans* provocando enfermedad en pacientes con SIDA se derivan de cepas asociadas originalmente a infecciones comensales, y la reincidencia puede resultar de estas mismas cepas.

Además de causar enfermedades en las mucosas, *Candida* spp. puede también provocar infecciones invasivas sistémicas, en las cuales *Candida* penetra y

atraviesa la barrera epitelial para ganar acceso al torrente sanguíneo (candidemia). Una vez en la sangre, puede diseminarse e infectar cualquier órgano. A causa de esto, *Candida* ha emergido como el cuarto patógeno de sangre más común en los Estados Unidos. La mortalidad asociada a estas infecciones invasivas en adultos varían del 14.5% al 49%, y *C. albicans* es responsable del 50-60% de los casos de candidiasis invasiva. (Tsai, Chen, Hsu, & Lan, 2013)

Una característica muy interesante de *C. albicans* es su habilidad para crecer de dos formas distintas; la reproducción por gemación (formando una gema elipsoide) y en forma hifal, la cual se puede fragmentar periódicamente y dar origen a nuevos micelios o a nuevas células levaduriformes. (Fig. 4)



**Fig. 4.** Dimorfismo de *C. albicans*. (A) las blastosporas son formas unicelulares del hongo que se dividen por gemación. (B) en presencia de factores ambientales, se inicia un crecimiento cilíndrico en la superficie de la blastospora formando un tubo germinativo. (C) el tubo germinativo crece y va formando septos para formar una hifa. (D) Se forman ramas hifales y/o ramas secundarias a partir de los septos, constituyendo un micelio. (E) Las blastosporas secundarias son separadas del filamento. Los principales factores que favorecen la filamentación (de levadura a hifa) son: temperatura 35 °C, pH de 7.0, un inóculo de  $1 \times 10^6$  blastosporas/mL y la presencia de distintos compuestos, tales como N-acetilglucosamina, prolina o suero (Molero, 1998).

Las transiciones entre estos dos fenotipos pueden ser inducidas *in vitro* en respuesta a estímulos ambientales tales como pH o temperatura, o por diferentes compuestos como N-acetilglucosamina o prolina. Además del interés biológico de este dimorfismo, la habilidad para cambiar entre la forma levaduriforme y la forma micelial ha sido implicada en la patogenicidad de esta levadura.

## 1. Dimorfismo

Tal y como otros hongos patógenos, *C. albicans* presenta dimorfismo. Esta levadura exhibe una variedad de distintas morfologías bajo distintas condiciones ambientales; tales formas incluyen células levaduriformes gemantes (blastosporas, blastoconidias), pseudohifas (células alargadas que forman filamentos), hifas verdaderas y clamidosporas (**Fig. 4**). Una blastospora es una forma unicelular del hongo que se divide por gemación. Dicho proceso de gemación involucra el crecimiento de nuevo material celular a partir de un lugar específico de la superficie de la levadura. La célula hija usualmente se desarrolla en el polo distal de la cicatriz de nacimiento e inicia una fase de crecimiento; después se lleva a cabo la división nuclear y se forma un septo entre la célula madre y la célula hija, y, al final, las dos se separan para formar nuevas blastosporas. (Molero, 1998)

Una hifa es una larga estructura tubular microscópica que está formada por múltiples células fúngicas divididas por septos. El tubo germinativo es la etapa inicial en la transición de la forma levaduriforme a la forma hifal. Una blastospora da origen a nuevo material celular en la forma de un cilindro, llamado tubo germinativo, el cual crece continuamente por extensión del polo distal. La división celular mitótica ocurre dentro de la hifa, y los septos son formados a ciertos intervalos sin interrumpir la tasa de extensión. Puede haber el surgimiento de hifas secundarias como ramificaciones de la hifa primaria o por germinación de las esporas. Un micelio es un agregado de células fúngicas que incluye a las hifas junto con todas sus ramificaciones. (Molero, 1998)

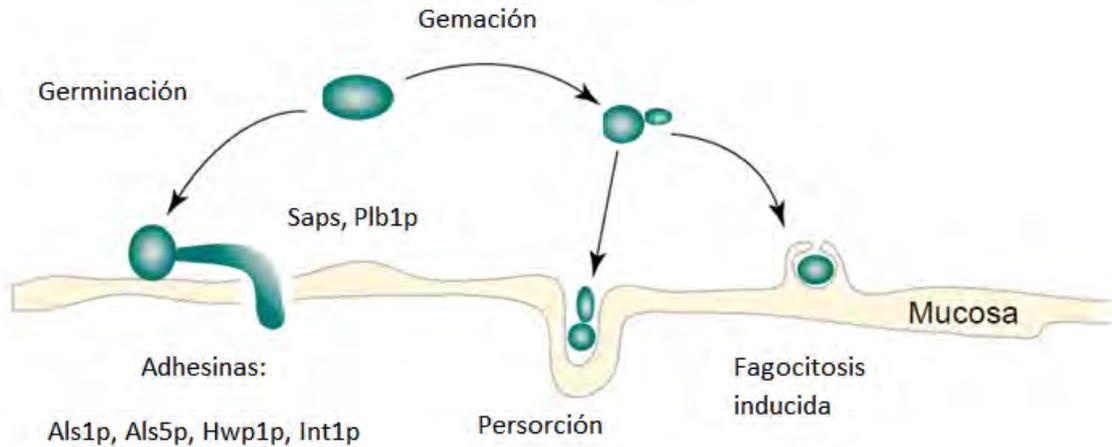
## 2. Condiciones experimentales para la producción de tubos germinativos

Existen varias características esenciales para la transición morfológica *in vitro* de *C. albicans*. Los primeros científicos en trabajar con *C. albicans* encontraron que los cambios en el ambiente de crecimiento de la levadura conllevan cambios en la morfología celular, sin embargo, nadie ha logrado identificar a algún “*morfógeno*” que actúe solo y que bajo cualquier condición provoque la transformación de cualquier cepa de *C. albicans* a una sola de sus variantes morfológicas. Algunos de los factores ambientales que favorecen la filamentación son: temperatura de 37-40°C, pH cercano a 7.0 y una concentración inicial de blastosporas no mayor a  $1 \times 10^6$  UFC/mL. También, se ha encontrado que ciertos agentes químicos, tales como la N-acetil-D-glucosamina, aminoácidos, biotina, compuestos azufrados, el grupo hemo, zinc y suero son requeridos para llevar a cabo la filamentación. Aunque el suero es excelente para promover la conversión de levadura a micelio, su complejidad química lo hace inapropiado para el estudio de los fundamentos moleculares que inducen el cambio a la forma hifal. (Molero, 1998)

*C. albicans* parece regular su propia morfología al menos bajo dos circunstancias: como una respuesta lenta a ambientes nutricionales adversos en general, y como una respuesta rápida a ciertas condiciones fisicoquímicas. En el último caso, las formas filamentosas parecen desarrollarse bajo condiciones de temperatura y pH encontradas en los tejidos del hospedero *In vivo*. Ciertos medios de cultivo han sido desarrollados para la obtención de ambas formas de crecimiento, siendo el factor determinante la temperatura o el pH; en general, el fenotipo levaduriforme prevalece a bajas temperaturas o bajo pH, mientras que el fenotipo hifal lo hace a altas temperaturas y pH elevado. Un medio de cultivo sintético, compuesto de una mezcla de aminoácidos ha sido descrito por Lee en el cual un cambio en el pH basta para garantizar la producción de la forma levaduriforme (pH 4.5) o de la forma hifal (pH 6.5), ambos siendo incubados a una temperatura de 37 °C. (Molero, 1998)

### 3. Factores de virulencia de *C. albicans*

Como en el caso de otros patógenos, la virulencia de *C. albicans* depende de su reconocimiento por el hospedero. La unión del microorganismo a las células del hospedero, proteínas o competidores microbianos (co-agregación) probablemente previene, o al menos reduce, el grado de eliminación por parte del sistema inmune del hospedero; además, la levadura posee varias enzimas que tienen como función aumentar su virulencia. Intuitivamente, la invasión debería de ser facilitada por la transición de las células levaduriformes al crecimiento filamentosos (morfogénesis) en comparación con el crecimiento isotrópico (levadura); aparte de esto, otros mecanismos, donde se incluyen la persorción de las levaduras en la mucosa intestinal para llegar a los tejidos internos así como la fagocitosis inducida por las células esofágicas. Todos estos mecanismos pueden promover la invasión de las superficies de las mucosas (Fig. 5). Finalmente, se le ha atribuido al fenómeno del cambio fenotípico la capacidad de la plasticidad del microorganismo; los estudios en dicho cambio se han enfocado principalmente en un sistema de cambio en particular, la transición blanca-opaca, la cual se refiere al cambio en el color y en la morfología colonial de la cepa WO-1, aunque este cambio también se presenta en cepas clínicas; con este cambio, además del color y la morfología, también se incluyen otras propiedades como el cambio de propiedades de adherencia, expresión antigénica y distintas afinidades por los tejidos. (Calderone & Fonzi, 2001)



**Fig. 5.** Primeros eventos de la patogénesis de la candidiasis en una superficie mucosa. Se ilustra una levadura de *C. albicans* que esta gemando (derecha) o germinando (izquierda). En la parte izquierda de la figura se muestra la formación del tubo germinativo y la penetración de la mucosa. Sin embargo, la persorción de las células levaduriformes (centro) también resulta en la penetración de células gemantes a la submucosa. A la derecha, se muestra la fagocitosis inducida de una levadura por una célula de la mucosa. Todos estos eventos son promovidos por las adhesinas Als1p, Als5p (Ala1p), Hwp1p e Int1p, y por las enzimas hidrolíticas Saps y Plb1p. En la figura, se representa al tubo germinativo como una entidad que es capaz de expresar diferentes antígenos comparado con la levadura; la contribución de este cambio fenotípico a la patogénesis puede ser la promoción de afinidades específicas de tejido para el microorganismo así como el cambio antigénico. (Calderone & Fonzi, 2001)

### a) Adhesinas

Se define a una adhesina como una biomolécula que promueve la adherencia de *C. albicans* a la célula del hospedero a los ligandos de la célula hospedero. La iniciativa para estudiar este tipo de moléculas se debió a las numerosas descripciones de mutantes avirulentas no adherentes, así como la identificación de las proteínas que se unen a varias proteínas de matriz extracelular (ECM) de las células de los mamíferos, como la fibronectina (FN), laminina, fibrinógeno, colágeno de tipo I y IV. Estos estudios fueron cruciales para el entendimiento de las interacciones ce *C. albicans* con su hospedero. Los ejemplos de adhesinas aquí nombradas fueron elegidas debido a que los genes que las codifican han sido aislados y se han podido construir cepas con genes suprimidos que han ayudado a evaluar la función de cada uno; sin embargo, otras proteínas interesantes también poseen actividad de adhesina, pero sus genes que las codifican no han sido aislados, en estas se incluyen a las adhesinas del grupo de las mananas, una adhesina del tipo de las lectinas así como una adhesina fimbrial que tiene

homología al dominio de unión a ligando del pili PAK de *Pseudomonas aeruginosa*. También, una proteína de unión a fibrinógeno inducida por hemoglobina ha sido parcialmente caracterizada. (Calderone & Fonzi, 2001)

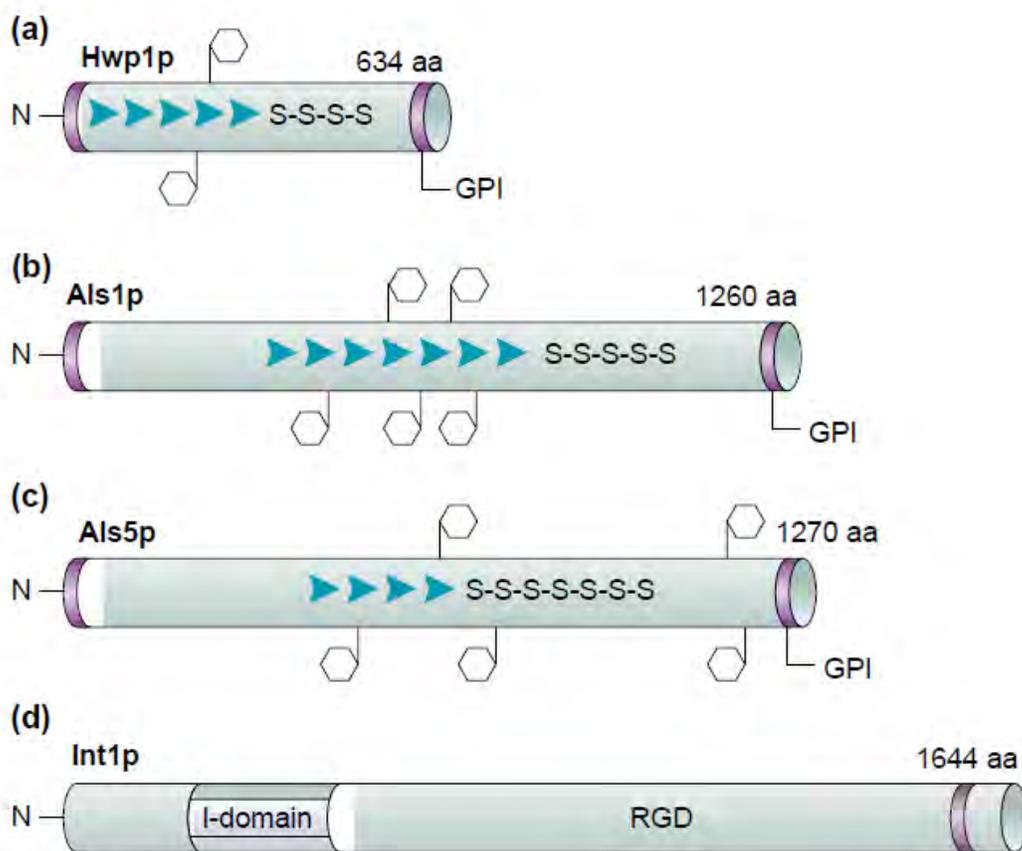
La adherencia a las células y tejidos del hospedero es el primer paso y el más crítico en las infecciones de *C. albicans*. En el caso de las afectaciones a las mucosas, *C. albicans* primero coloniza y prolifera en las superficies cutáneas de las células epiteliales, siguiendo la invasión, diseminación y daño tisular. La capa más externa de la levadura, la pared celular, contiene diversos carbohidratos y proteínas, que permiten el contacto y la interacción con diversas proteínas y células epiteliales y endoteliales del hospedero; adicionalmente, *C. albicans* se puede adherir a superficies inertes, tales como dispositivos médicos, y formar comunidades celulares asociadas a dicha superficie, conocidas como biofilms. (Tsai, Chen, Hsu, & Lan, 2013)

#### **b) Producción de biofilms**

Los biofilms son comunidades microbianas estructuradas en las cuales las células se unen estrechamente a una superficie y son embebidas en una matriz de sustancias poliméricas producidas por dichas células. Las comunidades formadas sobre la superficie de los dispositivos médicos poseen una arquitectura característica y propiedades fenotípicas que son distintas a las de su contraparte planctónica; su fenotipo más notable es que poseen una susceptibilidad reducida al sistema inmune del hospedero y a la terapia antifúngica farmacéutica convencional y, la remoción del dispositivo médico es casi siempre necesaria para la cura de éstas infecciones. (Nett & Andes, 2006)

Los biofilms no son acumulaciones al azar de células, resultado de la división celular, sino comunidades celulares organizadas bajo el control de moléculas señalizadoras. Los biofilms completamente desarrollados exhiben una arquitectura muy heterogénea, compuesta de elementos celulares y no celulares; están conformados por una mezcla de células del hospedero, levaduras, pseudohifas e hifas, y la matriz extracelular derivada del hongo, la cual está compuesta de polisacáridos y proteínas. Su desarrollo ocurre en tres fases en un periodo de 24 a

48 horas; en primer lugar, la fase inicial comienza con la adherencia de células individuales a un substrato, en segundo lugar, las células adheridas proliferan hasta formar microcolonias y empiezan a producir la matriz extracelular; finalmente, una vez que se ha alcanzado la confluencia celular, la red de levaduras comienzan un proceso de transición a formas filamentosas (hifas y pseudohifas), y son envueltas por la matriz exopolimérica. El biofilm resultante posee una estructura tridimensional y es tiene varios cientos de  $\mu\text{m}$  de profundidad. (Nett & Andes, 2006)



**Fig. 6** Un esquema de las adhesinas polipeptídicas de *C. albicans*. Als1p y Als5p (Ala1p) están comprendidas por tres dominios, el amino terminal, relativamente libre de glucosilación, un dominio central de repeticiones en tándem (flechas) que varían en longitud pero están altamente conservadas, y un dominio carboxilo terminal rico en serina, que es el menos conservado entre la familia de proteínas Als. Existen sitios de consenso de N-glicosilación, indicados por hexágonos. Int1p está representada debajo de las proteínas Als; un dominio-I (de unión a ligando) se posiciona cerca de otro dominio que es homólogo a la proteína de unión a fibrinógeno de *Staphylococcus aureus* ClfA. Cada una de éstas proteínas están sujetas a una extensa O-glucosilación. Existen regiones hidrófobas que sirven como señales secretoras, señales de unión de fosfatidilinositol, o dominios transmembranales que están indicados por las bandas moradas. La S representa los dominios serina/treonina. (Calderone & Fonzi, 2001)

### c) *Als1p y Als5p*

La Als1p (secuencia parecida a aglutinina) de *C. albicans* es un miembro de la familia de siete proteínas glucosiladas con homología a la aglutinina- $\alpha$  de *S. cerevisiae* que es requerida durante el apareamiento. Las características comunes de cada uno de los genes ALS incluyen: cada uno posee tres dominios; un dominio 5' relativamente conservado de 1299-1308 (433-436 aminoácidos); un dominio central de longitud variable; repeticiones en tándem cada una de 108 bp; y un dominio 3' que es variable en su longitud y que codifica una proteína rica en serina/treonina. (Fig. 6). La familia de Als tiene características típicas de las proteínas de secreción y una región de carboxilo terminal hidrófoba, lo que sugiere un ancla para glucofosfatidilinositol. Se cree que la unión a ligando está asociada a la región de amino terminal de la proteína. Ambas proteínas, Als1p y Als5p proveen la función de adhesinas; Als1p es esencial para la virulencia en la candidiasis sistémica en modelos murinos. (Calderone & Fonzi, 2001)

### d) *Hwp1p*

El gen HWP1 codifica una manoproteína de superficie externa la cual se cree que está orientada con su dominio de amino terminal expuesto en la superficie, y el dominio carboxilo terminal unido covalentemente al  $\beta$ -glucano de la pared celular. La secuencia amino terminal de Hwp1 (un dominio rico en prolina y glutamina) tiene parentesco con un sustrato de transglutaminasa (TGase); las cepas de *C. albicans* a las cuales se les ha suprimido el gen HWP1 han demostrado ser menos virulentos en los modelos murinos, además de tener una tasa reducida de mortalidad y provocar menos daño en las células del endotelio. (Calderone & Fonzi, 2001)

### e) *Int1p*

*C. albicans* tiene la capacidad de unirse a varios ligandos de matriz extracelular, incluyendo fibronectina, laminina y colágeno de tipo I y IV; debido a esto, se ha sugerido que la levadura expresa una proteína similar a una integrina. El gen INT1 contiene un dominio I que es aproximadamente 18% idéntico al dominio  $\alpha$  de la proteína M humana implicada en la coordinación de cationes divalentes, y un 25%

idéntico a la región no repetida de la proteína de unión a fibrinógeno ClfA de *Staphylococcus aureus*. La proteína INT1 posee interesantes características y funciones; en primer lugar, los anticuerpos dirigidos contra el dominio de unión a cationes divalentes confirman que se trata de una proteína de superficie; segundo, su expresión heteróloga en *S. cerevisiae* da como resultado la formación de células alargadas que son similares, en apariencia, a los tubos germinativos que se adhieren a las células epiteliales; en tercer lugar, las células transformadas de *S. cerevisiae* tienden a agregarse de una manera similar a *C. albicans*. Las cepas de *C. albicans* a las cuales se les suprimió el gen INT1 fueron menos virulentas, se adhirieron en menor proporción a una línea de células epiteliales (40% de reducción) y tuvieron dificultades para formar filamentos en agar leche-tween y agar de Spider. Pudiera parecer que el gen INT1 juega un importante papel en la adherencia y filamentación de *C. albicans*; además, recientes estudios indican que la talina, una proteína de citoesqueleto, puede interactuar con Int1p para intervenir la morfogénesis modulando a la actina en el citoesqueleto. (Calderone & Fonzi, 2001)

#### f) *Mnt1p*

Las cepas de *C. albicans* a las cuales se les ha suprimido el gen  $\alpha$ -1,2-manosiltransferasa son menos virulentas y presentan dificultades para adherirse en experimentos *in vitro*. La Mnt1p es una proteína de membrana de tipo II que se requiere para el proceso de O- y N-manosilación en los hongos. El dominio catalítico del carboxilo terminal es esencial para la actividad enzimática, y esta enzima ha demostrado requerir a los cationes divalentes  $Zn^{+2}$  y  $Mn^{+2}$  como cofactores. Esta proteína participa en el proceso de adherencia. (Calderone & Fonzi, 2001)

#### g) *Morfogénesis*

Anteriormente, en el presente trabajo, se ha mencionado que, la morfogénesis se refiere a la transición entre el estado de levaduras unicelulares a la forma de crecimiento filamentoso; *C. albicans* puede convertirse de manera reversible de una forma unicelular a una forma de crecimiento hifal p pseudohifal. De todas las

especies de *Candida* spp, solo *C. albicans* y *C. dubliniensis* pueden formar ambos tipos de crecimiento filamentoso, es así que, estas especies son capaces de crecer isotrópicamente (levadura) o apicalmente (hifa y pseudohifa), y son definidas, propiamente, como polimórficas en sus patrones de crecimiento. Con respecto a la morfogénesis, ha habido una gran cantidad de estudios para demostrar la relación entre la forma filamentosa de *C. albicans* y su virulencia. Aún con los métodos moleculares modernos, aun se tiene que distinguir la relación entre la morfología del microorganismo y el desarrollo de la enfermedad; la virulencia se ve atenuada en cepas mutantes que se encuentran confinadas a la forma filamentosa o a la forma levaduriforme. La mayoría de las lesiones se encuentran pobladas por ambas formas de crecimiento, sugiriendo que las dos tienen un papel importante en el desarrollo de la enfermedad; la situación se complica más cuando se observa que existe la presencia de genes específicos para la forma, y que cuya expresión es controlada por las mismas moléculas que controlan el desarrollo morfológico, por lo que es imposible atribuir la atenuación de un defecto morfológico contra la expresión alterada de genes específicos para la forma que puedan ser cruciales para la virulencia. (Calderone & Fonzi, 2001)

Mucho de lo que se ha descubierto acerca de las vías de transducción de señales que regulan la morfogénesis ha sido obtenido de estudios realizados en *S. cerevisiae*, y varios de los homólogos de *C. albicans* fueron identificadas a partir de la complementación o supresión de los defectos correspondientes en las mutantes de *S. cerevisiae*. Hace algunos años, los investigadores notaron que *S. cerevisiae* producía un crecimiento pseudohifal en medios de cultivo pobres en nutrientes, sugiriendo que las pseudohifas proveen de una función de búsqueda de alimento; concomitantemente, dos vías de señalización asociadas con este fenotipo fueron identificadas no sólo en *S. cerevisiae*, sino también en *C. albicans*. Las deleciones de los genes involucrados en el cambio de fase en *C. albicans* dan como resultado defectos en la morfogénesis en ciertos medios con agar. Existen otras vías de morfogénesis que han sido descubiertas recientemente cuando se encontró que una mutante doble *efg1cph1*, la cual no es filamentosa *in vitro* y es avirulenta, desarrolló hifas en la lengua de cobayos inmunosuprimidos infectados;

de hecho, se ha identificado un tercer factor de transcripción (CZF1) en *C. albicans* que regula la morfogénesis cuando las células están embebidas en agar. Pareciera que otras vías son requeridas para la morfogénesis, incluyéndose las vías de integridad de la pared celular (protein-cinasa C, PKC), y la vía de osmorregulación (glicerol de dos componentes de alta molaridad, Hog1); curiosamente, la función de la vía de Hog1p en *C. albicans* no se encuentra totalmente relacionada con la osmorregulación, ya que la mutantes suprimidas en los genes SLN1 o SSK1 resultan ser deficientes en la filamentación. Otras proteínas supuestas, como las proteínas histidin-cinasas Chk1p y Cos1/Nik1, son necesarias para la morfogénesis y, como en el caso de PHR1, CHK1 es requerido para la enfermedad invasiva, pero no para la infección vaginal. (Calderone & Fonzi, 2001)

#### **h) Enzimas que contribuyen a la invasividad.**

Las aspartil proteasas de secreción (SAP) y las fosfolipasas (PL) son dos grandes familias de enzimas producidas por *C. albicans*, de las cuales, como ya se mencionó, algunas están relacionadas con la virulencia. De las cuatro fosfolipasas identificadas hasta ahora (PLA, PLB, PLC y PLD), únicamente PLB1 ha demostrado ser necesaria para la virulencia en modelos animales de candidiasis; una cepa con este gen suprimido produce fosfolipasa *in vitro* en menor cantidad y fue menos virulenta, 40% de animales muertos en comparación con el 100% de la cepa salvaje. La actividad de la Plb1p ha sido detectada recientemente en la punta de las hifas durante la invasión de los tejidos; Plb1p es una glucoproteína de 84 kDa que posee actividad tanto de hidrolasa como de lisofosfolipasa-transacetilasa, y probablemente, se trata de una proteína de secreción.

Al menos se conocen nueve proteínas de la familia de las SAP; estas proteínas no se encuentran limitadas en cuanto a presencia a *C. albicans*, ya que también se han encontrado en *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, así como también en *C. guilliermondii*. Los marcos de lectura abiertos (ORFs) de SAP1-9 varían en tamaño, desde 1170 hasta 1780 bp y SAP7 parece ser el más divergente de la familia. La contribución de la familia SAP al desarrollo de la enfermedad ha sido

estudiado utilizando RT-PCR, mutantes con genes suprimidos, así como métodos inmunoquímicos; en modelos de enfermedad invasiva en ratones y cobayos, la supresión de SAP1-6 resultaron en una menor virulencia, sugiriendo que dichas SAP son requeridas para el desarrollo de la forma invasiva de la candidiasis. Un modelo *In vitro* de candidiasis oral humana ha sido utilizado para seguir la transcripción temporal de SAP1-8; las SAPs 1 y 3 son expresadas dentro de las primeras 42 hrs post-infección del tejido, seguidas por SAP6 a las 48 hrs, siendo las últimas las SAP2 y SAP8 a las 60hrs.; SAP4-5 nunca fueron detectadas. El daño al tejido fue más extenso en las primeras 48 hrs. La contribución de las SAPs también ha sido estudiada en cultivos de tejido oral humano utilizando cepas de *C. albicans* con una delección individual de SAPs o con triples delecciones ( $\Delta sap1-3$ ,  $\Delta sap4-6$ ); en este estudio, se determinó que las SAP1-3 son requeridas para el desarrollo de la enfermedad, mientras que las SAP4-6 no son requeridas. Un modelo de epidermis humana *In vitro* también ha sido utilizado para medir la expresión temporal de SAPs por RT-PCR; el orden de expresión de las proteínas fue: SAP1, SAP2, seguidas de SAP8, SAP6 y SAP3. Dicha expresión estaba correlacionada con la invasión del tejido, eso es que fase de invasión temprana fue producto de SAP1-2, la fase de penetración extensiva por SAP8 y la fase de crecimiento hifal extensivo por SAP6. En el caso de la vaginitis, aunque no se han evaluado la actividad de todas las SAPs, se ha descubierto que la SAP2 se requiere para el desarrollo de la enfermedad. (Calderone & Fonzi, 2001)

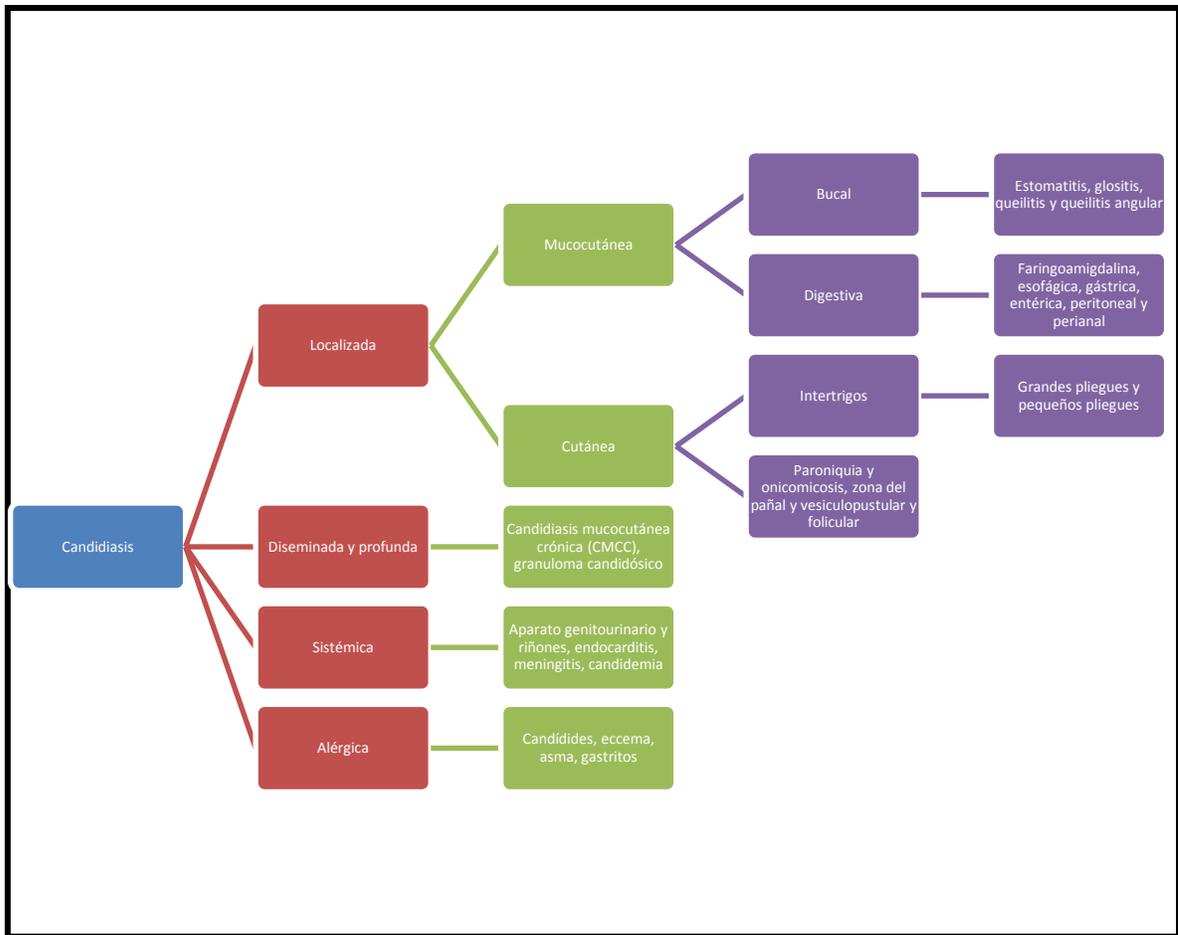
### C. Candidiasis

La candidiasis es una micosis primaria o secundaria ocasionada por levaduras endógenas y oportunistas del género *Candida*, en especial *Candida albicans*. Las manifestaciones clínicas son localizadas, diseminadas o sistémicas; puede afectar piel, mucosas, estructuras profundas y órganos internos. Las alteraciones histopatológicas varían desde inflamación mínima hasta supuración o granuloma. La candidiasis se considera una de las infecciones oportunistas más frecuentes en humanos; afecta a individuos de cualquier edad, grupo étnico o sexo, no tiene relación con el clima, la situación geográfica ni el estado socioeconómico; sin embargo, se han encontrado algunas diferencias regionales, por ejemplo, la

candidiasis interdigital de los pies es más frecuente en lugares tropicales y la onicomycosis sin paroniquia, en los más fríos. (Arenas Guzmán, 2014)

*C. albicans*, la especie más importante, es parte de la microbiota de las vías gastrointestinales, las mucosas bucal (31 a 55%) y vaginal (13% de las mujeres), así como la piel periorificial de individuos sanos (25 a 50%). *Candida* vive en equilibrio con otros microorganismos del cuerpo humano y coexiste como comensal, pero cuando éste equilibrio se pierde, se torna patógena y causa afecciones mucocutáneas. Los factores predisponentes son múltiples y muchas veces pueden combinarse, por ejemplo, en la boca se relacionan con aplicación local de antibióticos o pérdida del espacio interdentario por el uso de prótesis inapropiadas; las formas intestinales, con el consumo de dietas abundantes en frutas; el intertrigo y la onicomycosis de manos, con humedad, contacto con alimentos que tienen alto contenido de azúcares, hábito de chuparse el dedo o acudir al manicuro; las lesiones en pliegues o pies, con prendas de material sintético como fajas, botas de plástico, y las formas graves y diseminadas, con intervención quirúrgica cardiovascular o uso de drogas por vía intravenosa, como heroína. (Arenas Guzmán, 2014)

La gravedad de la infección depende sobre todo de las alteraciones primarias del hospedero más que de las propiedades patógenas del hongo; se desconoce cuánto dura el periodo de incubación y en cada ubicación anatómica existen distintas modalidades clínicas. (Arenas Guzmán, 2014)



**Cuadro No. 2** Clasificación de las candidiasis (Arenas Guzmán, 2014)

## D. Diagnóstico de laboratorio

### 1. Toma de muestra.

La toma de muestra es variable, ya que la candidiasis puede presentarse en todas las partes del cuerpo, así que los productos que se recolectan son exudados, escamas, sangre, esputo, orina, LCR, etc. En el caso particular de muestras de sangre (candidemia), es de suma importancia que se tomen con tubos con microperlas para lisis, o bien las muestras deberán agitarse (vórtex) para realizar el lisado celular; esto permite incrementar el número de aislamientos. (Bonifaz Trujillo, 2015)

## 2. Examen directo

El material obtenido se coloca entre portaobjetos y cubreobjetos con un aclarante, de preferencia hidróxido de potasio en una concentración del 10 al 20%. Se pueden realizar también tinciones como Gram, Wright, Giemsa, PAS e incluso Papanicolaou. Al microscopio se observan grandes cúmulos de blastoconidias de aprox. 2 a 4  $\mu\text{m}$  de diámetro y pseudohifas cortas o largas, que determinan el estado patógeno y virulento de la levadura y confirman el diagnóstico. En el caso de piel y uñas, por lo regular no se encuentran pseudohifas, pero el solo aislamiento del hongo en los medios de cultivo indica la enfermedad, debido a que *Candida* sp. no es parte de la microbiota de esa región. Para los casos de muestras de orina, o bien provenientes de catéteres, se pueden observar biopelículas, que no son más grandes que los cúmulos de pseudohifas y levaduras. (Bonifaz Trujillo, 2015)

## 3. Cultivos

Las diversas especies de *Candida* crecen en la mayor parte de los medios de cultivo habituales, como lo son: agar dextrosa de Sabouraud (SDA), agar sangre, agar infusión de cerebro, corazón y extracto de levadura (BHYI). las características de las colonias en la mayor parte de los medios son similares, crecen en dos a tres días a 28 o 37 °C, dando colonias blanquecinas, lisas (en ocasiones rugosas), húmedas, limitadas, opacas y en algún momento se observan pseudomicelio y micelio dentro del agar. Para el caso específico de muestras de orina, es necesario emplear un criterio de aislamiento, con un punto de corte de  $10^3$  UFC/mL; esto permite eliminar los casos de “arrastre” de levaduras que son parte de la microbiota. (Bonifaz Trujillo, 2015)

Hay medios de cultivo selectivos para el género *Candida*, como el BiGGY (Bismute, Glucose, Glicine and Yeast) o también llamado medio de Nickerson, que contiene gran cantidad de citratos que eliminan la flora bacteriana, así como sulfitos que son reducidos a sulfuros; de esta manera las colonias se ven de color café claro u oscuro, lo que las hace distinguibles de otros hongos levaduriformes y se considera un excelente medio de primoaislamiento, por lo que es muy útil

para el trabajo rutinario, pero de baja especificidad; es decir, no permite el reconocimiento de las especies, incluso se pueden confundir con otros géneros. (Bonifaz Trujillo, 2015)

Desde hace algunos años han surgido una serie de medios de cultivo cromogénicos que permiten hacer una identificación desde los primeros aislamientos; por ejemplo, el medio pionero de CHROMagar-*Candida* (Becton and Dickinson Company) está hecho a base de sales cromógenas y enzimas, que permiten el desarrollo de las especies más comunes de *Candida* y otros hongos levaduriformes (*Geotrichum*, *Trichosporon*, *Saprochaete*), mediante la formación de colonias coloridas, perfectamente diferenciadas: *C. albicans* (verde claro), *C. dubliniensis* (verde oscuro), *C. tropicalis* (azul-gris), *C. krusei* (rosa pálido), *C. glabrata* (rosa intenso), *Candida* sp. (blanco-crema); *Trichosporon* sp. (azul gris) y *Geotrichum candidum* (púrpura). Este medio tiene una alta especificidad, de al menos 95%. Su utilidad radica en que con el solo primoaislamiento se sabe por lo general la especie causante, lo cual disminuye el costo de la identificación por medio de pruebas bioquímicas; además también permite reconocer infecciones mixtas (ahora se reconocen entre el 2 y el 4%), sobre todo en pacientes que se hayan muy inmunosuprimidos. Se considera que es el medio de cultivo más eficaz para el aislamiento e identificación presuntiva de las especies más frecuentes del género *Candida*. Otros medios comerciales con características y resultados similares al anterior son la nueva serie de medios como Candiselect-4 (Bio-Rad) y *Candida*-ID (bioMérieux), los cuales también permiten la identificación primaria de las especies más importantes de *Candida*. El desarrollo y color de las colonias son diferentes en cada uno de estos medios cromogénicos. Los resultados de estos medios cromogénicos comerciales son muy similares; su sensibilidad fluctúa entre el 85 y el 98% mientras que la especificidad de 95 a 100%. (Bonifaz Trujillo, 2015)

Los porcentajes de aislamientos de las diversas especies de *Candida* cambian dependiendo del tipo clínico, factor predisponente y zona geográfica. La mayor parte de los informes indican que ha habido un decremento importante en la especie de *C. albicans*, que aunque sigue teniendo el primer lugar, éste fluctúa

entre 45 y 60% de los aislamientos. El restante lo ocupa el grupo de *Candida non-albicans*, con un segundo lugar para *C. tropicalis* (25%) y en tercer lugar *C. glabrata*, aunque en algunos reportes esta posición puede invertirse con *C. parapsilosis*; el resto de las especies se aíslan con porcentajes menores al 1%. El hecho que exista un cultivo positivo no indica necesariamente una candidiasis, debido a que *Candida* forma parte de la microbiota humana, por eso es importante la correlación de los aspectos clínicos y micológicos para confirmar el diagnóstico. (Bonifaz Trujillo, 2015)

#### **4. Biopsia**

Útil solo en los casos cutáneos profundos. La histopatología por lo regular reporta proceso granulomatoso acompañado de estructuras fúngicas (blastoconidias y pseudohifas) que se resaltan más con tinciones especiales como PAS y Gomori-Grocott. (Bonifaz Trujillo, 2015)

#### **5. Pruebas inmunológicas**

##### **a) Intradermorreacción a la candidina**

Puede ser monovalente (de *C. albicans*) o polivalente; ambas indican en exclusiva primocontacto y, por lo regular, es positivo en todo tipo de personas, lo que disminuye la ayuda diagnóstica. En la actualidad, esta prueba, al igual que el PPD, se utiliza para evaluar hipersensibilidad tardía. La dosis empleada es una décima del antígeno (dilución 1:2000) aplicada vía intradérmica, y se lee con los mismos criterios que el PPD, es decir, si se observan, a las 48 horas, más de 5 mm de induración y eritema, se considera positiva. Es importante saber que se ha estado empleando la intradermorreacción de candidina como tratamiento de verrugas vulgares (virales), debido a la estimulación inmunológica que produce. (Bonifaz Trujillo, 2015)

##### **b) Serología**

Recomendable sobre todo para los casos profundos y sistémicos, o bien cuando se reportan títulos altos y repetidos. Las técnicas más usadas son precipitación, fijación de complemento, inmunofluorescencia directa o indirecta. Es importante

citar que se han reportado cruces inmunológicos con algunas variedades de *Salmonella* sp., lo que les resta importancia. La PCR y RAPD son en la actualidad las pruebas más útiles para la identificación de las diversas especies de *Candida*. Ambas son pruebas de alta sensibilidad y especificidad (>90%), y se recomiendan sobre todo en infecciones severas, como candidemias, endocarditis y afecciones pulmonares. (Bonifaz Trujillo, 2015)

#### **c) Determinación de mananos**

Se realiza en suero y otros fluidos mediante el método de ELISA, a través de la prueba comercial Platelia-*Candida* Ag (Bio-Rad), la cual detecta los mananos circulantes en sangre, aunque se considera una prueba de baja sensibilidad (40 a 70%). (Bonifaz Trujillo, 2015)

#### **d) Determinación de $\beta$ -1,3-D-glucanos**

Se trata de productos que son liberados en algunas infecciones fúngicas (candidiasis, aspergilosis, neumocistosis), es decir, se considera una prueba panfúngica; al igual que la prueba anterior, se realiza en suero sanguíneo por método de ELISA, y su positividad sólo es sugestiva de infección fúngica, pero con correlación clínica, puede ser de utilidad. (Bonifaz Trujillo, 2015)

### **6. MALDI-TOF**

Es uno de los nuevos métodos de diagnóstico e identificación de una serie de hongos, y puede servir para las diversas especies de *Candida*; es una técnica de espectrometría de masas: las siglas provienen del inglés *Matrix-assisted laser desorption ionization* (MALDI)- *time of flight mass*. Esta metodología se empieza a posicionar, con el inconveniente de ser costosa (equipo), pero con insumos baratos e identificación muy rápida, ya el tiempo le dará una ubicación precisa; con los estudios actuales se requiere incrementar la sensibilidad (para fungemias). (Bonifaz Trujillo, 2015)

## E. Antimicóticos

Existen mucho menos antimicóticos, antiparasitarios y antivirales que antibacterianos. En el caso de los dos primeros esto es consecuencia de que los hongos y los parásitos están constituidos por células eucariotas, lo mismo que los mamíferos y, por lo tanto lo que los afecte probablemente también tenga efecto a las células humanas. (Negroni, 2009)

Ya que la incidencia de infecciones producidas por hongos ha aumentado, comienzan a existir modernos antifúngicos que presentan una mayor selectividad de actuación y han aparecido nuevas formulaciones galénicas que reducen los efectos secundarios de los usados clásicamente. Como ya se había mencionado, los hongos son seres eucariontes sin clorofila, en su mayoría con un comportamiento saprofito. De las 250 000 especies conocidas, aproximadamente unas 400 ocasionan enfermedades en el hombre. Al ser una célula eucariota, los antifúngicos deben actuar sin lesionar química y metabólicamente las células del hospedero, pero deben de ser capaces de destruir (fungicida) o al menos impedir el crecimiento (fungistático) tanto de las formas filamentosas como de las levaduriformes del hongo. (Negroni, 2009)

### 1. Clasificación de los antimicóticos

Los antimicóticos se pueden clasificar de la siguiente manera:

- a) Por su estructura química
- b) Por el tipo de micosis en la cual se emplea
- c) Por su origen (antimicóticos antibióticos) y antimicóticos sintéticos (Velasco, 2002)

Existe una creciente preocupación dentro de la comunidad médica con respecto a las enfermedades provocadas por hongos. Las infecciones causadas por dermatofitos, tales como la tinea pedis, aunque son raramente fatales, son muy comunes y están diseminadas mundialmente. Patógenos tales como *Candida*

*albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis carinii* y *Aspergillus fumigatus* son agentes importantes de mortalidad y morbilidad en los pacientes inmunocomprometidos. (Muthu, 2012)

Estudios epidemiológicos recientes indican un cambio hacia infecciones causadas por *Aspergillus* spp y *Candida* spp no *albicans* y otros hongos poco comunes que poseen una susceptibilidad disminuida hacia los agentes antifúngicos actuales. Clínicamente, la candidiasis y la aspergilosis son responsables de entre un 80% y 90% de las infecciones sistémicas en pacientes inmunocomprometidos. (Muthu, 2012)

A pesar de que el arsenal de medicamentos antifúngicos se ha expandido, los fármacos disponibles actualmente no cumplen con los requerimientos necesarios para el manejo de las enfermedades en las diversas poblaciones de pacientes por lo que el desarrollo de nuevos medicamentos antifúngicos ha sido requerido constantemente para la terapia clínica. (Muthu, 2012)

## 2. Sitios de acción para la terapia antifúngica.

Los diferentes sitios de acción para la terapia con antifúngicos se muestran en la fig. 7 ( (Muthu, 2012)

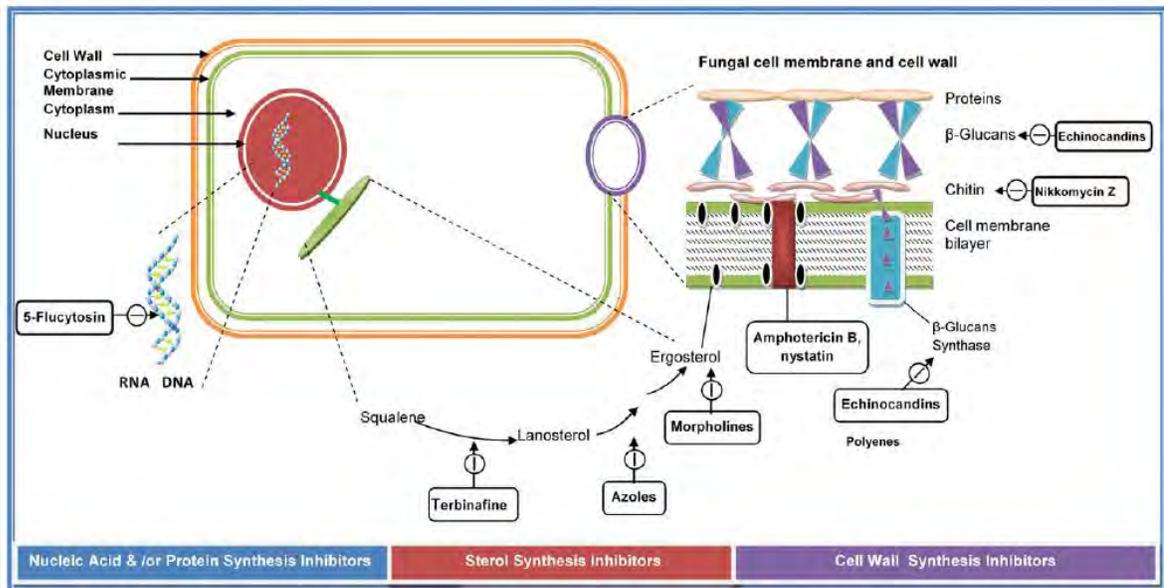


Fig. 7 Diferentes sitios de acción de los antifúngicos (Muthu, 2012)

### **a) *Inhibidores de la síntesis de ergosterol***

El ergosterol es el principal componente de la membrana celular fúngica. Es un bioregulador de la fluidez de la membrana, de su asimetría y de la integridad. La inhibición de la 14 $\alpha$ -desmetilasa resultará en una disminución de la síntesis de ergosterol y a una acumulación concomitante de esteroides 14-metilados. Estos agentes previenen la 14 $\alpha$ -desmetilación del lanosterol a ergosterol dentro de la vía de síntesis de ergosterol. El ergosterol también desempeña una función hormonal dentro de la célula fúngica, ya que estimula el crecimiento de éstas. (Muthu, 2012)

#### **(1) Azoles**

Los agentes antifúngicos azólicos bloquean la síntesis de ergosterol, el principal componente de las membranas citoplasmáticas fúngicas. (Muthu, 2012)

- Ketoconazol
- Itraconazol
- Fluconazol
- Voriconazol
- Posoconazol
- Ravuconazol

### **b) *Inhibidores de la escualeno-epoxidasa: morfollnas y alilaminas***

La escualeno-epoxidasa, una enzima que, junto con la escualeno-ciclasa, convierte el escualeno a lanosterol, el cual, cuando es inhibido, previene la conversión de lanosterol a ergosterol. (Muthu, 2012)

#### **(1) Morfolinas**

Las morfollnas fueron descubiertas en 1970 y son compuestos enteramente de origen sintético. La mayoría de ellos han sido utilizados exitosamente en agricultura y de entre ellos, únicamente la amorollfina es utilizada en el tratamiento tópico de infecciones ungueales. (Muthu, 2012)

- Amorollfina

## (2) Alilaminas

- Terbinafina

### c) *Disruptores del ergosterol (antifúngicos poliénicos)*

El ergosterol es el principal componente de la célula fúngica. Los antifúngicos poliénicos forman un complejo con el ergosterol y disrumen la membrana plasmática fúngica, lo que provoca un aumento en la permeabilidad de la membrana, la pérdida de contenido citoplasmático y finalmente la muerte de la célula fúngica. Es así como los polienos poseen una actividad fungicida y tienen el mayor espectro de actividad antifúngica que cualquiera de los agentes clínicamente disponibles. (Muthu, 2012)

- Anfotericina B
- Nistatina

### d) *Inhibidores de la síntesis de glucanos*

Los glucanos son los principales componentes que fortalecen la pared celular. En polisacárido de glucano consiste de monómeros de D-glucosa unidos por enlaces  $\beta$ -(1,3)-glucano o  $\beta$ -(1,6)-glucano. El bloqueo de la glucano-sintetasa provoca una disminución en la incorporación de glucosa al polímero de glucano, he aquí que estos inhibidores causan la lisis de las células fúngicas susceptibles. La  $\beta$ -(1,3)-glucano sintetasa es inhibida de manera no competitiva por las papulacandinas y equinocandinas. Dependiendo de la concentración, también se puede inducir o inhibir la liberación del factor de necrosis tumoral- $\alpha$  en los macrófagos. Las equinocandinas son lipopéptidos anfifílicos, productos de la ciclopentamina, los cuales se forman durante el proceso de fermentación de algunos hongos tales como *Zalerion arboricola* o *Aspergillus nidulans* var. *Echinulatus*. El mecanismo de acción incluye la inhibición de  $\beta$ -(1,3)-glucano sintetasa; esta inhibición lleva a la disrupción de la estructura creciente de la pared celular, resultando en la inestabilidad osmótica y a la muerte de las células susceptibles. El sitio de acción de las equinocandinas no existe en las células de los mamíferos, así que su toxicidad es mínima. (Muthu, 2012)

- Caspofungina
- Micafungina
- Anidulafungina

**e) *Inhibidores de la síntesis de quitina***

La quitina es un polisacárido muy importante en la pared celular fúngica, ya que ayuda a determinar la morfología celular, aunque el porcentaje de quitina en la pared celular es de aproximadamente 1%. Es un polímero prácticamente insoluble en agua que está formado por unidades de N-acetilglucosamina unidas por enlaces  $\beta$ -(1,4). Se encuentra bien separada de los glucanos en la pared celular, pero está unida covalentemente a ésta para fortalecerla. La quitina es esencial para los hongos y se encuentra ausente en los humanos, es por eso que quitina-sintetasa representa un atractivo objetivo para el desarrollo de fármacos antifúngicos. (Muthu, 2012)

- Nikkomicina
- Polioxinas

**f) *Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos***

La flucitosina interfiere con el metabolismo de la pirimidina, con la síntesis de ADN/ARN y en la síntesis de proteínas. La flucitosina es convertida en 5-fluorouracilo por una citosin-desaminasa, y después es convertido en ácido 5-fluorouracilico por la UMP-pirofosforilasa, el cual se vuelve a fosforilar y es incorporado en el ARN, resultando en la interrupción de la síntesis proteica. El 5-fluorouracilo es convertido en monofosfato de 5-fluorodesoxiuridina, un potente inhibidor de la timidilato-sintetasa. Esta enzima está involucrada en la síntesis de ADN y en el proceso de división celular. (Muthu, 2012)

**g) *Inhibidores de la síntesis proteica: sordarinas***

Las sordarinas han sido identificadas como agentes inhibidores selectivos de la síntesis proteica en hongos. La sordarina fue aislada a partir de *Sordaria araneosa* en 1971. El grupo de las sordarinas son inhibidores de la síntesis proteica que actúan bloqueando el proceso de traducción. Las sordarinas se encuentran

ausentes en las células de los mamíferos o en la cadena de transporte de electrones. (Muthu, 2012)

#### ***h) Inhibidores de la síntesis de microtúbulos***

Los microtúbulos son polímeros dinámicos de dímeros de  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina. Ellos forman un esqueleto celular altamente organizado en todas las células eucariotas. Los agentes como la griseofulvina o vinblastina interactúan con la  $\beta$ -tubulina, una proteína altamente conservada en eucariontes. (Muthu, 2012)

### **F. Campo magnético**

#### **1. Generalidades**

La ciencia del magnetismo nació de la observación de que cierta "piedra", mineral como la magnetita o "piedra imán" ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) atraían pedazos de hierro, este fenómeno se lo conoce desde la antigüedad como magnetismo que viene de la región de Magnesia en el Asia Menor, que es uno de los lugares en donde se encontraban este tipo de piedras. En China se conocían desde muy antiguo las propiedades de las agujas imantadas, que, suspendidas de un hilo, señalaban el norte, fenómeno base de la brújula, que pasó a Occidente en el siglo XIII. (Goñi & García, 2006)

Paracelso, en el siglo XVI, utilizaba en sus tratamientos barras imantadas, distinguiendo los distintos efectos terapéuticos del polo norte y del polo sur. En 1600, el médico inglés William Gilbert, en su obra *De Magnete*, considera la tierra como un enorme imán, lo que explicaba la orientación de la aguja magnética en el sentido de los meridianos. La utilización de la imanoterapia es discontinua pero, en el siglo XVIII, Mesmer la fundamenta y aplica con gran éxito, ante de establecer la teoría de "magnetismo animal". (Goñi & García, 2006)

En el siglo XIX, el estudio de las corrientes alternas conduce al descubrimiento de la producción, a partir de ellas, del campo electromagnético. Los trabajos de Faraday, Maxwell y Gauss establecen las bases teóricas de sus aplicaciones prácticas, industriales y médicas. (Goñi & García, 2006)

A principios del presente siglo, destaca el interés por el efecto de los campos magnéticos sobre el organismo humano. M.F. Barnothy, en Estados Unidos, inicia una serie de recopilaciones de trabajos sobre el efecto biológico de los campos magnéticos. La NASA tiene un interés especial en el tema, por lo que propicia numerosas investigaciones. Y en distintos países, en especial en Alemania e Italia, destaca el interés por la aplicación terapéutica de la magnetoterapia. (Goñi & García, 2006)

#### **a) *El Campo Magnético Terrestre***

Todos los seres vivos se encuentran bajo el influjo del campo magnético terrestre. Este campo, a lo largo de la historia geológica de la tierra, ha sufrido notables modificaciones, tanto en dirección como en intensidad. En la actualidad, y aunque su intensidad varía según diversos factores, en especial la latitud, se considera que su intensidad promedio es de 0.4-0.5 gauss. (Goñi & García, 2006)

Muchos seres vivos presentan sensibilidad al campo magnético terrestre (ciertas bacterias, palomas mensajeras, delfines, etc.), algunas personas tienen también una sensibilidad especial en este sentido. (Goñi & García, 2006)

La prueba definitiva de la importancia del campo magnético, en determinadas funciones fisiológicas, la ha proporcionado el examen médico de astronautas que han permanecido algún tiempo en estaciones espaciales: se les ha detectado la existencia de un discreto grado de osteoporosis, solo atribuible a la permanencia temporal en un medio con ausencia de campo magnético. Esta alteración, que se recupera con la vuelta a la superficie terrestre, ha mostrado la importancia de los campos magnéticos para el mantenimiento de una correcta osificación o para el tratamiento de la osteoporosis. (Goñi & García, 2006)

#### **b) *Biofísica del Campo Magnético***

El campo magnético se establece entre un polo norte y un polo sur. La intensidad del campo magnético (H) se mide en gauss. (Del Moral & Azanza, 1992)

El campo magnético no afecta por igual las diferentes sustancias, por ello se denomina inducción magnética (B); la relación entre ambas magnitudes es:  $B =$

$\mu H$ , en donde  $\mu$  es una constante denominada permeabilidad magnética, que depende de las características del medio. En relación a la inducción magnética, se distinguen tres tipos de sustancias:

- Diamagnéticas: que son repelidas por los campos magnéticos (tienen permeabilidad magnética negativa), como el bismuto, el cobre, el antimonio.
- Paramagnéticas: que son atraídas por los campos magnéticos con una intensidad de magnitud semejante a la intensidad de dicho campo (permeabilidad magnética igual a 1)
- Ferromagnéticas: que son atraídas con gran intensidad por los campos magnéticos. La más importante es el hierro y, en menor proporción, el níquel y el cobalto. (Del Moral & Azanza, 1992)

Es importante saber que el organismo humano, en su conjunto, se comporta ante los campos magnéticos como paramagnético, es decir, que su inducción magnética es prácticamente igual, numéricamente, a la intensidad del campo magnético. No obstante, en el organismo humano hay ciertas localizaciones de comportamiento diamagnético (membranas celulares), y otras de comportamiento ferromagnético (hierro contenido en la hemoglobina y en ciertas enzimas y pigmentos). (Del Moral & Azanza, 1992)

### **c) Efectos Biológicos**

La eficacia del efecto terapéutico de los campos magnéticos, plantea la posibilidad de utilizar estos en bajas frecuencias, ya que al contrario de la alta frecuencia, el campo magnético es mucho más intenso que el eléctrico. En la actualidad, la frecuencia empleada en la producción de campos magnéticos terapéuticos es de 1 a 100 Hz. (Cedillo Urbán, 2012)

Los campos magnéticos producen efectos bioquímicos, celulares, tisulares y sistémicos. En el ámbito bioquímico, encontramos los siguientes efectos fundamentales:

- Desviación de las partículas con carga eléctrica en movimiento.
- Producción de corrientes inducidas, intra y extra-celulares.
- Efecto piezoeléctrico sobre hueso y colágeno.
- Aumento de la solubilidad de distintas sustancias en agua.

En el ámbito celular, los efectos indicados en el ámbito bioquímico determinan los siguientes:

- Estímulo general del metabolismo celular.
- Normalización del potencial de membrana alterado.

Por una parte, las corrientes producidas por el campo magnético producen un estímulo directo del tropismo celular, que se manifiesta por el estímulo en la síntesis del ATP, del AMPc y del ADN, favoreciendo la multiplicación celular, y en la síntesis proteica y de la producción de prostaglandinas (efecto antiinflamatorio). (Cedillo Urbán, 2012)

La bomba sodio potasio ATPasa es un complejo enzimático ubicado en la membrana celular, el cual convierte la energía química del ATP para ayudar al traslado de los iones a través de un gradiente electroquímico. Además, su rol fundamental es mantener altas concentraciones de potasio intracelular y bajas de sodio. Esta bomba mantiene el gradiente de sodio entre los compartimientos extra e intracelulares en varios tejidos influyendo en el volumen celular. (Al-Shameri, 2012)

Por otra parte, hay un estímulo del flujo iónico a través de la membrana celular, en especial de los iones  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . Esta acción tiene gran importancia, cuando el potencial de membrana está alterado. Las cifras normales del potencial de membrana se sitúan entre -60 y -90 mV. Este potencial se mantiene mediante un

mecanismo activo, en el que es fundamental la expulsión al exterior de la célula del ion  $\text{Na}^+$ , que penetra en ella espontáneamente (bomba de sodio). (Cedillo Urbán, 2012)

El proceso de mantenimiento de las concentraciones de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  ha sido denominado como un “ciclo fútil” que consiste en el transporte cíclico de iones sodios donde la energía residual (liberada en forma de calor) ocurre en todas las células del organismo jugando un rol significativo en la termogénesis y la regulación del balance energético. (Al-Shameri, 2012)

En circunstancias patológicas, la bomba de sodio no actúa y el ion sodio queda intracelular, con retención de agua (edema celular). En esta situación, los campos magnéticos pueden normalizar el potencial de membrana alterado. Tanto por el efecto de las corrientes inducidas intracelularmente, como por el efecto directo de los campos magnéticos sobre los iones sodio, éstos se movilizan hacia el exterior y restablecen la normalidad del potencial de membrana, por lo que reducen el edema celular, que es uno de los primeros estadios de la inflamación a escala celular, tisular y de órganos. (Cedillo Urbán, 2012)

#### **d) *Aplicación del campo magnético en la Medicina***

Los efectos biológicos se pueden clasificar básicamente en dos grupos:

##### **(1) Efecto de magnetización:**

Es el efecto primario responsable de la orientación de moléculas y de átomos dipolares. El efecto de magnetización comprende las siguientes acciones:

- **Modificación de la permeabilidad celular:** Se ha demostrado que los campos magnéticos son capaces de modificar la distribución de iones a ambos lados de la membrana plasmática. (Borrego, Torrico, & Castilla, 2003)
- **Estabilización de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ :** La función de la bomba sodio potasio es impedir el edema intracelular, el cual aparecería en el caso de que no existiera el suficiente aporte energético para su mantenimiento. Los campos

magnéticos apoyan la acción de la ATPasa y de la de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  oxidasa, consiguiendo así un mejor funcionamiento y estabilización de la bomba. (Borrego, Torrico, & Castilla, 2003)

- Estimulación de la reproducción celular: La mayoría de los trabajos revisados hablan a favor de un incremento de la síntesis del DNA, ATP y del AMPc, favoreciendo de esta manera la reproducción o multiplicación celular, la síntesis proteica y la modulación de producción de prostaglandinas. (Borrego, Torrico, & Castilla, 2003)

## (2) Efecto piezoeléctrico:

Es, por definición, la propiedad de ciertos cuerpos de sufrir algunas deformaciones mecánicas, ya sea por:

- Efecto directo: polarización eléctrica de la masa de un cuerpo o creación de cargas eléctricas en su superficie cuando se le somete a fuerzas mecánicas.
- Efecto inverso: la deformación de un cuerpo cuando se le somete a un campo eléctrico. El efecto piezoeléctrico es propio de las estructuras como proteicas, sobre todo a nivel óseo, y es debido a la relación directa entre vibraciones y oscilaciones eléctricas y elásticas. (Fustel, 2012)

Además, se han empezado a estudiar los efectos del campo magnético sobre los microorganismos, principalmente para incrementar la vida de anaquel de los alimentos o el desarrollo de mejores cepas para incrementar el rendimiento en la producción de distintos grupos alimenticios (cerveza, productos lácteos, etc.). Algunos ejemplos de estos estudios incipientes son:

- La combinación de nisina (conservador) y el campo magnético aplicado a una población de células vegetativas

de *B. cereus*, resultó en un aumento en la eliminación de 1.8 unidades logarítmicas en comparación al grupo control, indicándose una sinergia.

- Los tratamientos combinados de campo magnético y el agente mutagénico N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) para la obtención de mutantes superiores para la producción de etanol de *Saccharomyces* sp., incrementaron el efecto letal y la tasa de mutación auxotrófica del NTG, incrementaron la probabilidad de obtener cepas superiores de la levadura para la producción de etanol a partir de tapioca y, finalmente, produjo un número mayor de clonas superiores.
- El campo magnético puede inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, y éste efecto es dependiente de la amplitud y frecuencia del campo generado, además se demostró una sinergia al ser evaluado un tratamiento con cloranfenicol. (Kostoff, 2013)

### **III. Justificación**

El presente trabajo tiene la finalidad de proponer un procedimiento terapéutico alternativo o complementario al tratamiento de la candidiasis superficial basándose en el efecto inhibitorio in vitro de la exposición al campo magnético de baja frecuencia evitando así la aparición de efectos secundarios provocados por la administración de antimicóticos de tipo azólico (fluconazol, ketoconazol, clotrimazol, itraconazol) o de tipo poliénico (anfotericina B, nistatina), ya que pueden provocar en el paciente diversos efectos adversos tales como irritación gástrica, náuseas, vómito, dolor abdominal, por mencionar algunos. (Muthu, 2012)

#### **IV. Hipótesis**

Si el campo magnético de baja frecuencia ejerce una acción inhibitoria sobre *C. albicans*, entonces se observara daño estructural en dichas células, por lo tanto el número de células viables disminuirá.

## V. Objetivos

### 1. Objetivo general:

Estudiar in vitro el efecto del campo magnético de baja frecuencia sobre *C. albicans* mediante la realización de las técnicas de conteo de células viables y tinción negativa para microscopia electrónica para determinar el porcentaje de inhibición del microorganismo y el tipo de daño que le ocasiona dicho campo magnético.

### 2. Objetivos particulares:

- Determinar de forma cuantitativa la disminución de la viabilidad celular causada por el efecto del campo magnético de baja frecuencia sobre *C. albicans*, mediante la técnica de conteo de células viables.
- Evaluar el efecto del campo magnético de baja frecuencia sobre las células de *C. albicans* mediante el uso de microscopia electrónica para conocer los componentes celulares dañados por la exposición a dicho campo magnético.

## VI. Materiales

### 1. Equipo

- Equipo de campo magnético de baja frecuencia perteneciente al “Laboratorio de dinámica no lineal de series de tiempo electrofisiológicas”
- Microscopio óptico de campo claro *LEICA*
- Estufa bacteriológica marca RiOSSA
- Microscopio electrónico de transmisión

### 2. Material biológico.

- Cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 Culti-loop® (Oxoid Laboratories) cerrado y viable, donado por el laboratorio 10 de la unidad de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1 de la Universidad Nacional Autónoma de México
- Suero fetal bovino Biowest®

### 3. Medios de cultivo

- Agar Sabouraud Dextrosa MCD Lab®
- Agar BiGGY Merck®
- Medio cromógeno para *Candida* MCD Lab®
- Agar Corn Meal Oxoid®

### 4. Otros

- Tubo con solución salina fisiológica
- Tren de colorantes para tinción de Gram
- Tubo 0.5 de la escala de McFarland

## VII. Metodología

### 1. Identificación de *C. albicans*

Debido a que se trabajó con una cepa de referencia, únicamente se realizaron pruebas básicas de identificación para corroborar la identidad de la levadura y eliminar cualquier presencia de contaminantes microbianos.

#### (1) Siembra en SDA

- a) A partir del liofilizado contenido en el Culti-loop, sembrar por dilución americana en agar SDA.
- b) Incubar a 37 °C durante 48 horas y observar la morfología colonial.

#### (2) Tinción de gram.

Para la realización de esta tinción se realiza la siguiente técnica. (Lopez Martinez, 2012)

##### a) Procedimiento

- Preparar un frotis y fijarlo con calor
- Cubrir con cristal violeta durante 1 minuto y después lavar ligeramente con agua corriente
- Cubrir con Lugol durante 1 minuto y lavar con agua corriente
- Decolorar con una cantidad de 10 a 20 gotas de una solución de alcohol-acetona al 50% y lavar con agua corriente
- Cubrir con safranina durante 30 segundos y lavar ligeramente con agua corriente, dejar secar y observar

- Las estructuras fúngicas se observan de color azul violeta.

### (3) Producción de clamidosporas.

- a) A partir de un cultivo joven en SDA (48 hrs a 37 °C), tomar una asada.
- b) Sembrar con el asa en "L", rasgando ligeramente la superficie del agar corn-meal.
- c) Colocar sobre la rasgadura 1 cubreobjetos (previamente esterilizado) e incubar 72 hrs a 37 °C.
- d) Una vez transcurrido el tiempo de incubación, con ayuda de pinzas, tomar el cubreobjetos del medio y colocarlo sobre un portaobjetos nuevo con una gota de azul de algodón.
- e) Observar con el objetivo de 40x y buscar las clamidosporas.

### (4) Producción de tubo germinativo

- a) A partir de un cultivo joven en SDA (48 hrs a 37 °C), tomar una asada y transferirla a 500 µL de suero fetal bovino
- b) Incubar 2 hrs a 37 °C
- c) Una vez transcurrido el tiempo, tomar, con ayuda de una pipeta pasteur estéril, una fracción del líquido y colocar 2 gotas sobre un portaobjetos limpio y seco.
- d) Observar al microscopio óptico con el objetivo de 40x y buscar las pseudohifas.

### (5) Siembra en agar BiGGY

- a) A partir de un cultivo joven en SDA (48 hrs a 37 °C), sembrar por dilución americana en agar BiGGY.

- b) Incubar a 37 °C durante 48 horas y observar la morfología colonial.

**(6)** Siembra en CHROMagar *Candida*

- a) A partir de un cultivo joven en SDA (48 hrs a 37 °C), sembrar por dilución americana en CHROMagar *Candida*
- b) Incubar a 37 °C durante 48 horas y observar la morfología colonial.

**(7)** Exposición al campo magnético de baja frecuencia

- a) A partir de un cultivo joven en SDA (48 hrs a 37 °C), preparar una suspensión celular ajustado al tubo 0.5 de la escala de McFarland, para obtener una concentración celular de  $1 \times 10^6$  UFC/mL-  $5 \times 10^6$  UFC/mL.
- b) Realizar diluciones decimales (1:10) hasta obtener una concentración de  $1 \times 10^3$  UFC/mL a  $5 \times 10^3$  UFC/mL y un volumen final de 5 mL.
- c) Transferir 0.1 ml de la dilución del punto anterior a una placa de SDA y realizar un sembrado masivo con ayuda de un asa bacteriológica.
- d) Repetir el inciso “c” cinco veces para cada intervalo de tiempo trabajado así como para el control (30 segundos, 1 minuto, 2 minutos, 4 minutos, 8 minutos y 10 minutos).
- e) Exponer las placas al campo magnético de baja frecuencia durante los diferentes intervalos de tiempo.
- f) Incubar las placas expuestas y el control a 37 °C durante 24 horas para poder realizar el conteo correcto de las colonias que crecieron sobre la placa de agar.

- g) Realizar la cuenta de células viables al cabo de 24 hrs y obtener el promedio para cada uno de los tiempos trabajados y para el control.
- h) Obtener el porcentaje de viabilidad de acuerdo al siguiente cálculo

$$\% \text{ de viabilidad} = (UFC_{exp} \div UFC_{cont}) \times 100$$

• Dónde:

- UFC<sub>exp</sub>: promedio del conteo de las 5 placas expuestas a un tiempo determinado
  - UFC<sub>cont</sub>: promedio del conteo de las 5 placas control
- i) Realizar el gráfico colocando en el eje X los tiempos de exposición y en el eje Y el % de viabilidad.

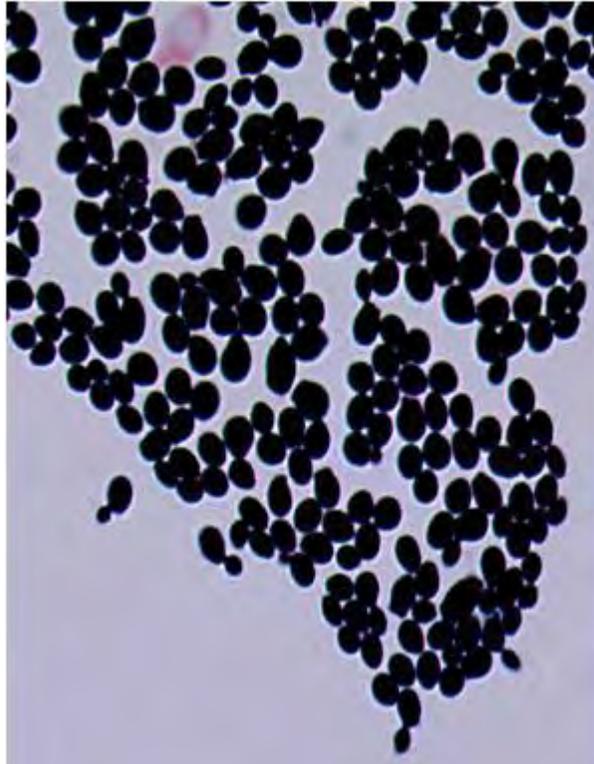
**(8) Preparación de muestra para microscopia electrónica.**

- a) A partir de un cultivo joven en SDA (48 hrs a 37 °C), tomar con ayuda de un asa bacteriológica de 2 a 3 colonias de levadura y disolverlas en un tubo que contenga solución salina fisiológica (NaCl al 0.9%)
- b) Repetir el punto anterior para cada uno de los tiempos trabajados (30 segundos, 1 minuto, 2 minutos, 4 minutos, 8 minutos y 10 minutos) y para el control.
- c) Exponer los tubos al campo magnético de baja frecuencia.
- d) Centrifugar a 1500 RPM durante 5 minutos para obtener un pellet.

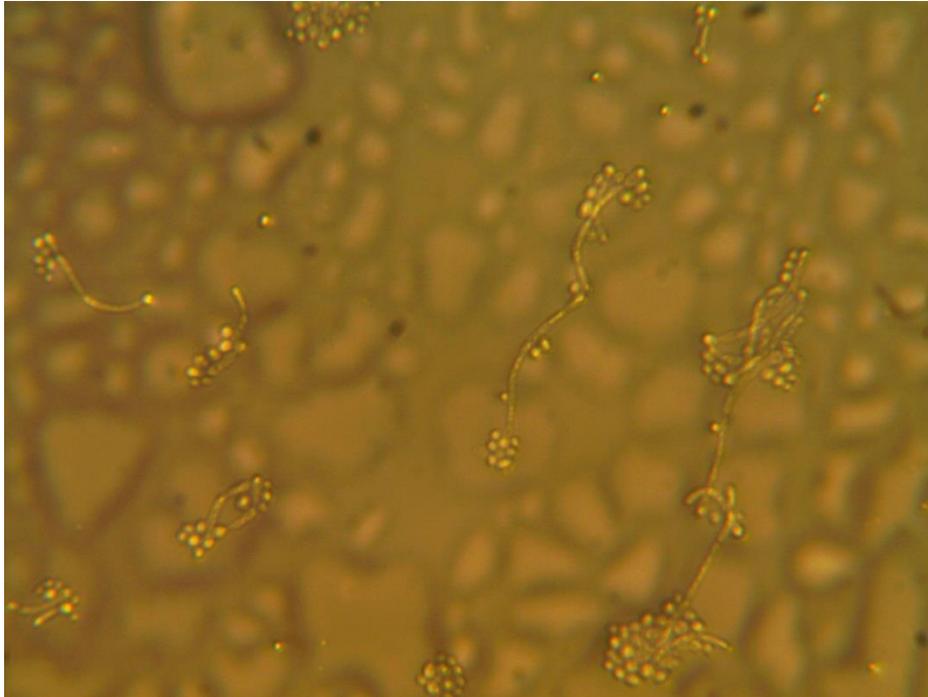
- e) Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en fijador de Karnosky y dejar reposar 1 hora.
- f) Centrifugar nuevamente a 1500 RPM durante 5 minutos para la obtención del pellet y eliminar el sobrenadante
- g) Resuspender el pellet en solución salina fisiológica. Ésta muestra será tratada para realizar la técnica de tinción negativa por la M. En C. Sofía González Gallardo y ser observada al microscopio electrónico de transmisión.
- h) Fotografiar los hallazgos

## VIII. Resultados

### A. Identificación de *C. albicans*



**Fig. 8** Tinción de gram de *C. albicans* ATCC 10231(100x), donde se puede observar una morfología celular uniforme (células ovaladas) y células en gemación. Imagen tomada en el Laboratorio 10 de Microbiología, Unidad de Posgrado, FESC Campo 1 UNAM



**Fig. 9** Producción de clamidosporas de *C. albicans* ATCC 10231 en agar Corn-meal (40x). Imagen tomada en el Laboratorio 10 de Microbiología, Unidad de Posgrado, FESC Campo 1 UNAM



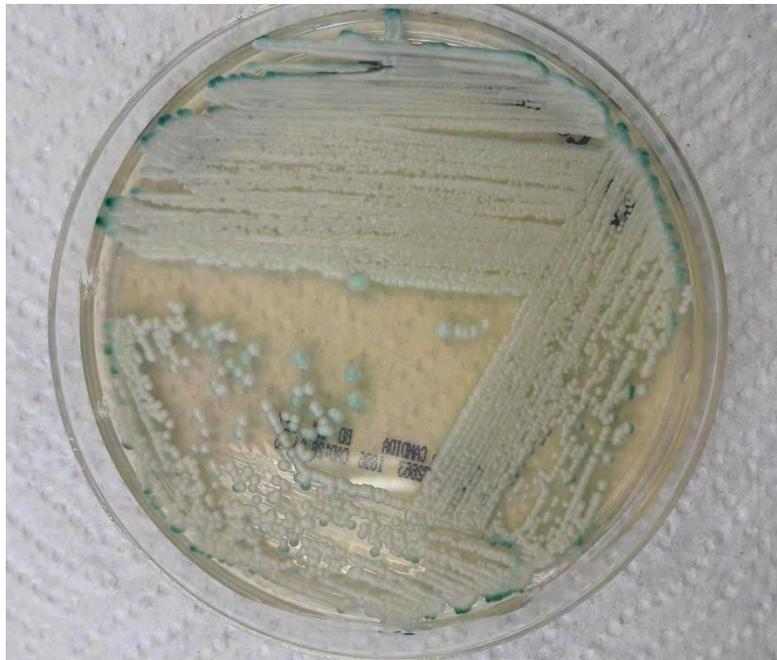
**Fig. 10** Producción de tubo germinativo por *C. albicans* ATCC 10231a las 2 horas (40x). Se visualizan las pseudohifas elongándose a partir de la célula levaduriforme. Imagen tomada en el Laboratorio 10 de Microbiología, Unidad de Posgrado, FESC Campo 1 UNAM



**Fig. 11** Crecimiento de *C. albicans* ATCC 10231 en SDA incubado a 24 hrs a 37 °C. Imagen tomada en el Laboratorio 10 de Microbiología, Unidad de Posgrado, FESC Campo 1 UNAM

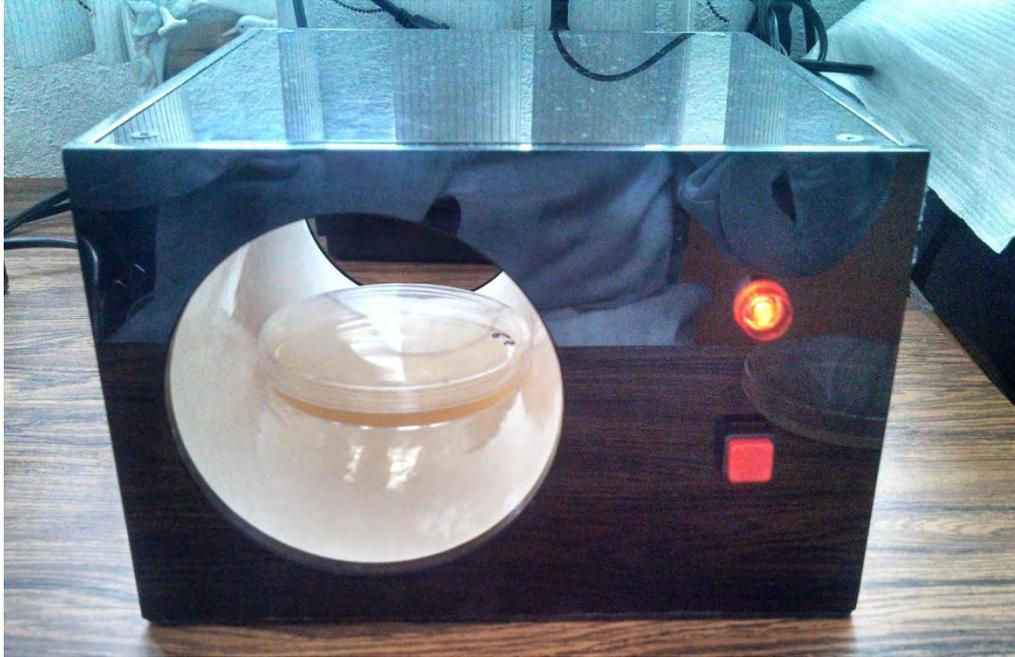


**Fig. 12** Crecimiento de *C. albicans* ATCC 10231 en agar BiGGY incubado a 24 hrs a 37 °C. Imagen tomada en el Laboratorio 10 de Microbiología, Unidad de Posgrado, FESC Campo 1 UNAM



**Fig. 13** Crecimiento de *C. albicans* ATCC 10231 en CHROMagar Candida® incubado a 24 hrs a 37 °C. Imagen tomada en el Laboratorio 10 de Microbiología, Unidad de Posgrado, FESC Campo 1 UNAM

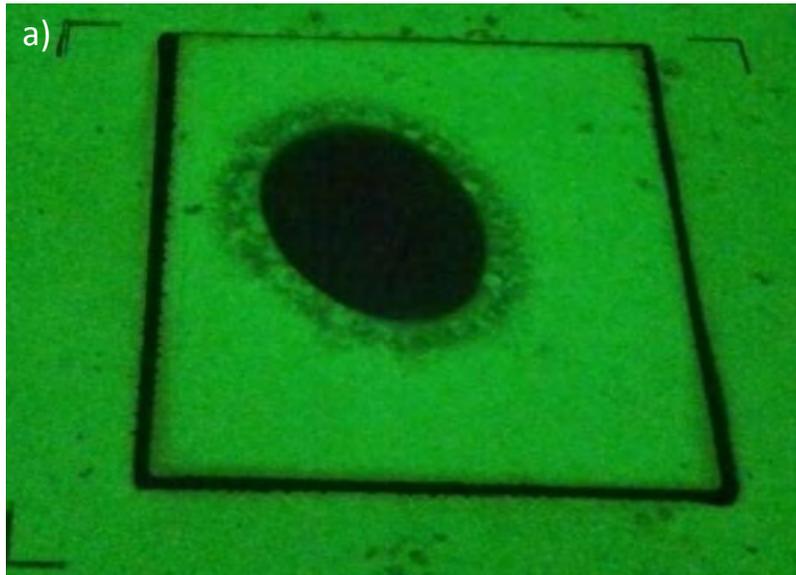
## B. Exposición al campo magnético de baja frecuencia



**Fig. 14** Exposición de la placa de SDA sembrada con *C. albicans* ATCC 10231 al campo magnético de baja frecuencia. Imagen tomada en el Laboratorio de Dinámica No Lineal, L-5 FESC Campo 1 UNAM

(1) Observación de las muestras preparadas para microscopía electrónica de transmisión (tinción negativa)

a) **CONTROL**

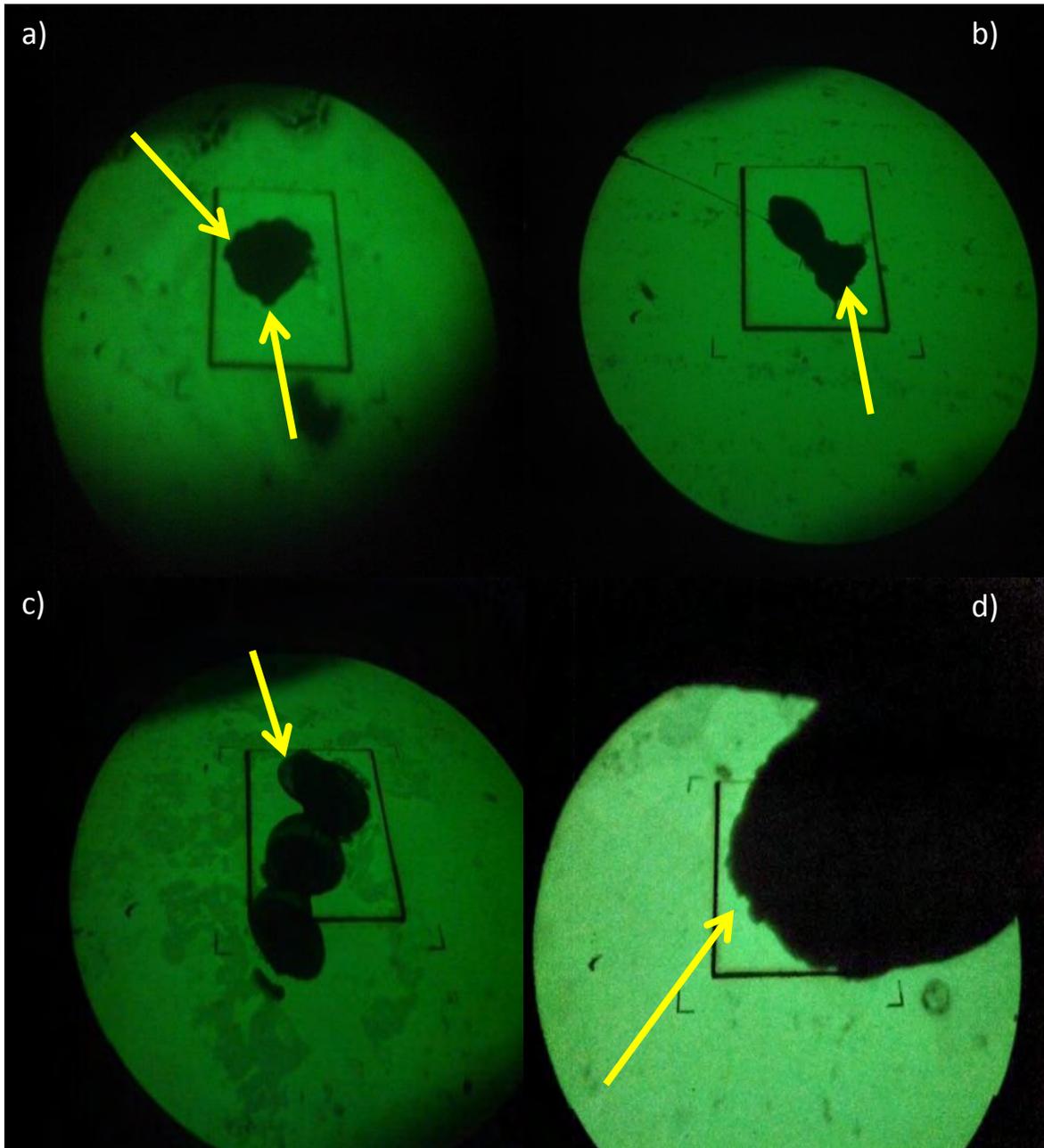


b)



**Fig. 15** a) Microscopía electrónica de transmisión teñida negativamente para la levadura *C. albicans* ATCC 10231 sin exposición al campo magnético de baja frecuencia (10000x); se observa la pared celular con borde integro. Imagen tomada en el Laboratorio de Microscopía, FESC Campo 1 UNAM. b) Microscopía electrónica de transmisión de un corte transversal de *C. albicans* ATCC 10231 (10000x), utilizada de referencia para la observación de la estructura de la pared celular. (Schneiter, 2004)

**b) 30 SEGUNDOS DE EXPOSICIÓN**



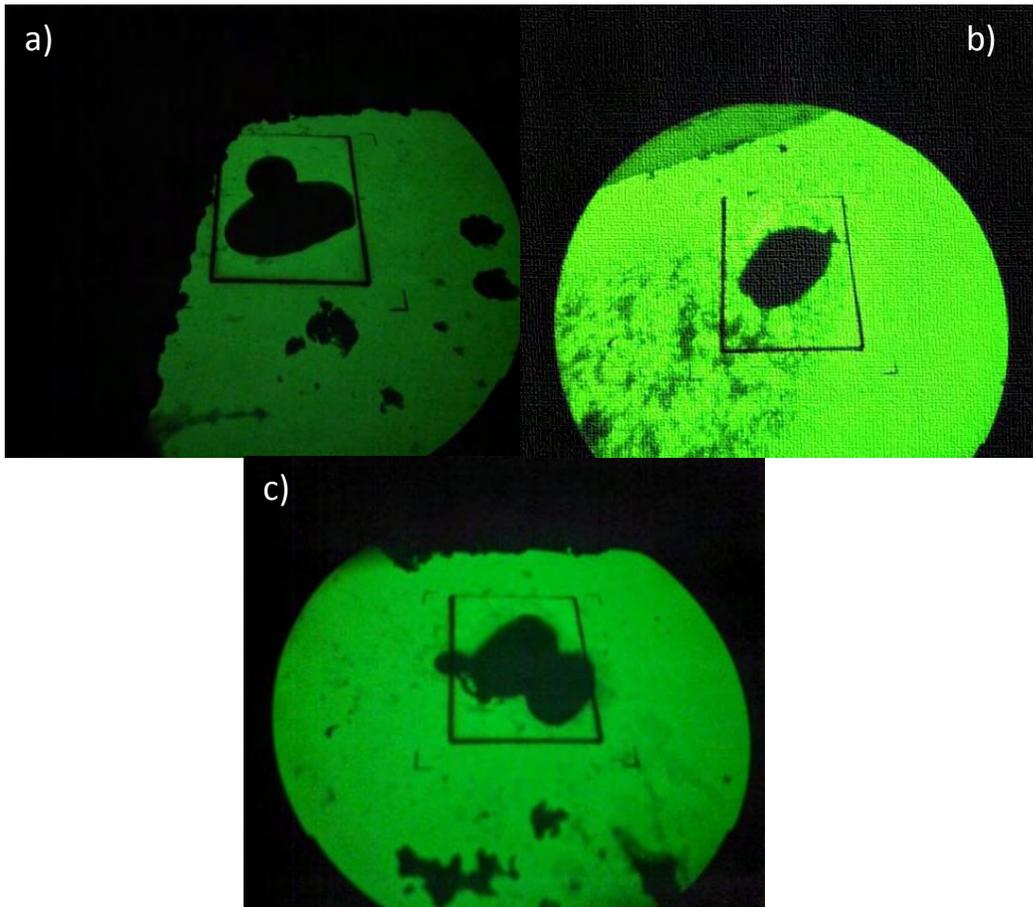
**Fig. 16** *C. albicans* ATCC 10231 después de 30 segundos de exposición al campo magnético de baja frecuencia; **a)** se notó la aparición de deformidades en la estructura celular con respecto al control (4000x); **b)** se observó la fuga de componentes celulares por uno de los polos de la levadura (4000x); **c)** Se pudo apreciar acumulaciones celulares y la presencia de distintos tipos de deformidades (4000x); **d)** Acercamiento a las deformidades en la estructura celular (10000x). Imágenes tomadas en el Laboratorio de Microscopia, FESC Campo 1 UNAM

c) 1 MINUTO DE EXPOSICIÓN



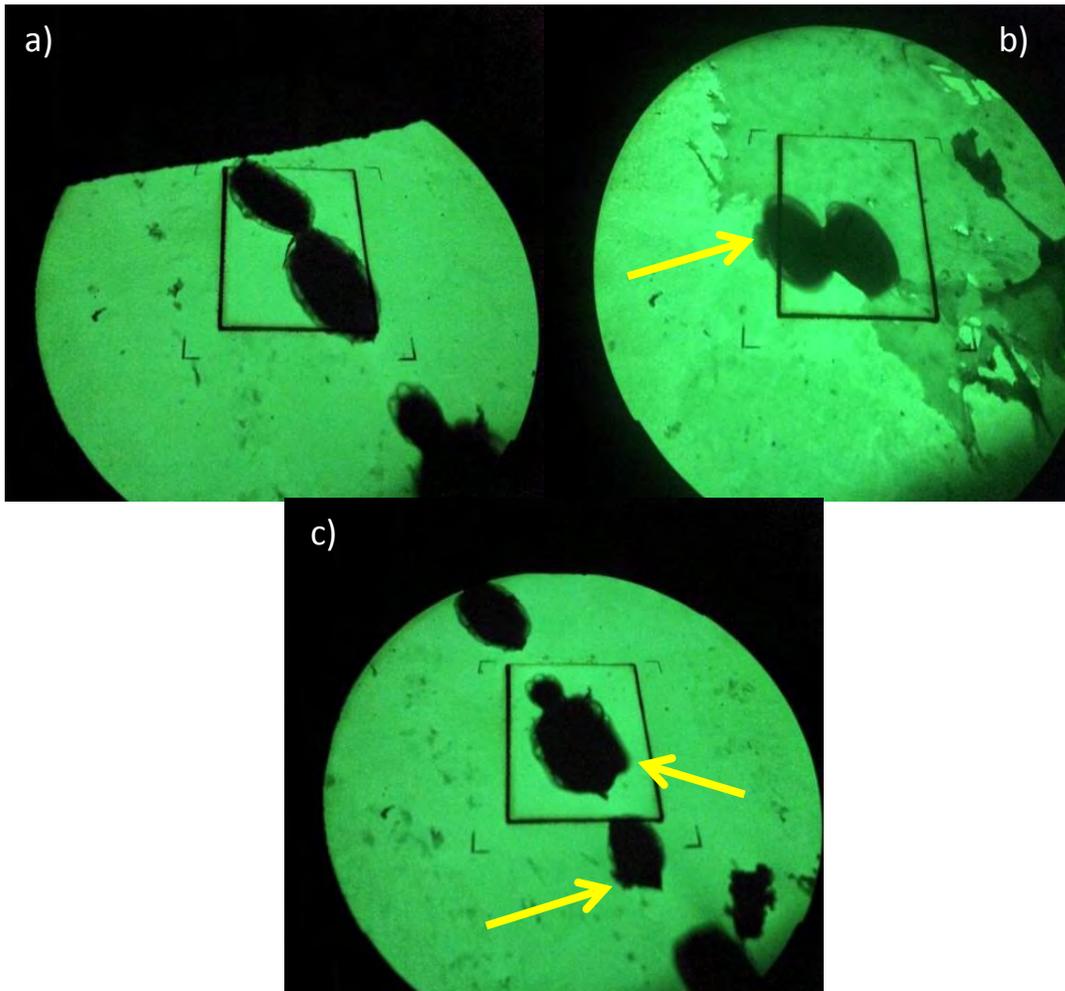
**Fig. 17** *C. albicans* ATCC 10231 después de 1 minuto de exposición al campo magnético de baja frecuencia; **a)** Levaduras en gemación con liberación de material intracelular (4000x); **b)** levadura lisada (4000x). Imágenes tomadas en el Laboratorio de Microscopía, FESC Campo 1 UNAM

d) 2 MINUTOS DE EXPOSICIÓN



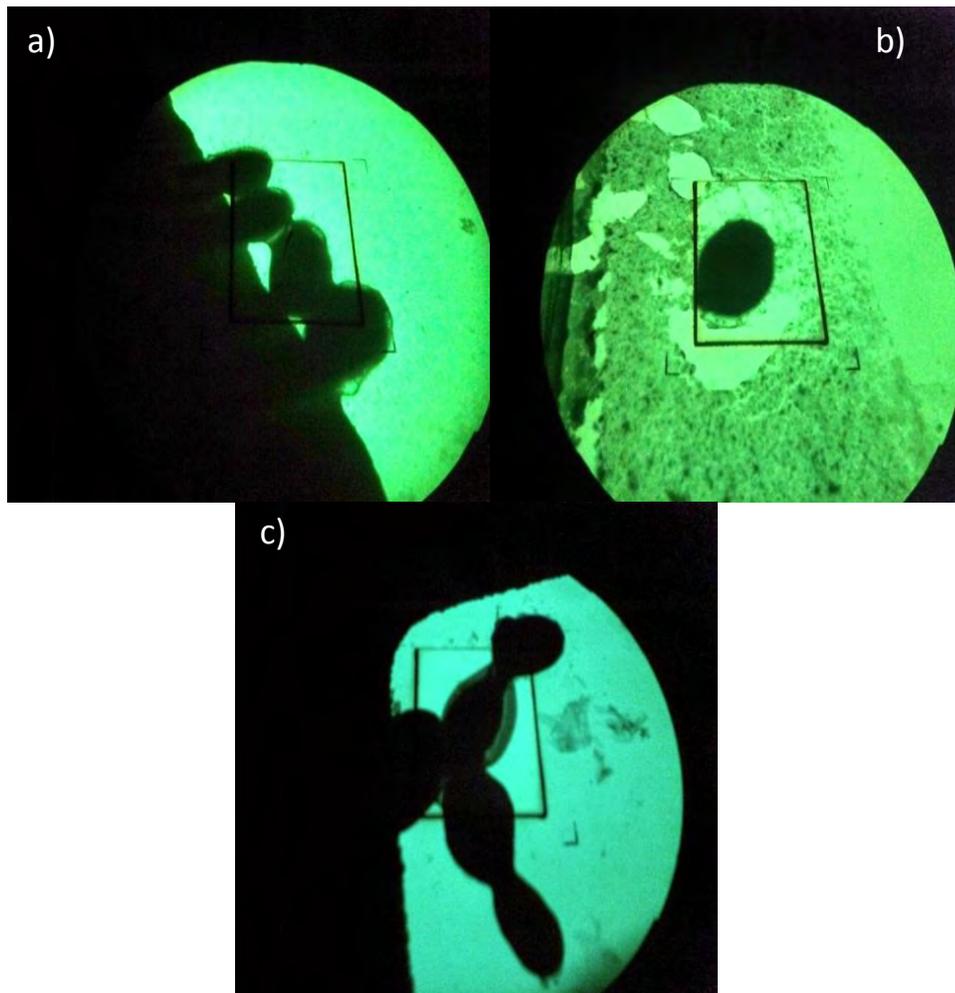
**Fig. 18** *C. albicans* ATCC 10231 después de 2 minutos de exposición al campo magnético de baja frecuencia; **a), b) y c)** levaduras en distintas etapas de crecimiento sin efecto aparente del campo magnético (4000x). Imágenes tomadas en el Laboratorio de Microscopia, FESC Campo 1 UNAM

e) 4 MINUTOS DE EXPOSICIÓN



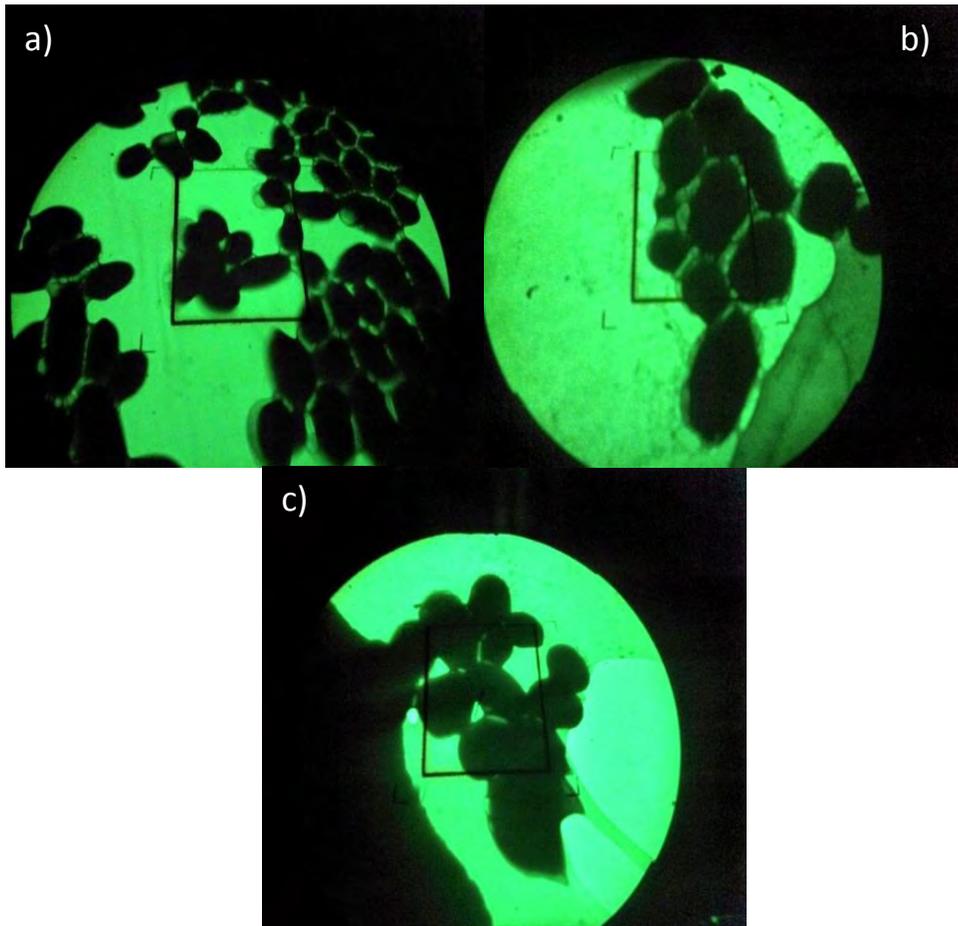
**Fig. 19** *C. albicans* ATCC 10231 después de 4 minutos de exposición al campo magnético de baja frecuencia; **a), b) y c)** levaduras adaptadas al efecto del campo magnético, se observaron ligeras deformidades en la superficie celular y se encontraron células gemantes sin liberación de material intracelular (4000x). Imágenes tomadas en el Laboratorio de Microscopia, FESC Campo 1 UNAM

f) 8 MINUTOS DE EXPOSICIÓN



**Fig. 20** *C. albicans* ATCC 10231 después de 8 minutos de exposición al campo magnético de baja frecuencia; **a) y c)** se notaron conjuntos de levaduras sin alteraciones producidas por el campo magnético (4000x); **b)** levadura aislada sin presentar deformaciones (4000x). Imágenes tomadas en el Laboratorio de Microscopia, FESC Campo 1 UNAM

g) 10 MINUTOS DE EXPOSICIÓN



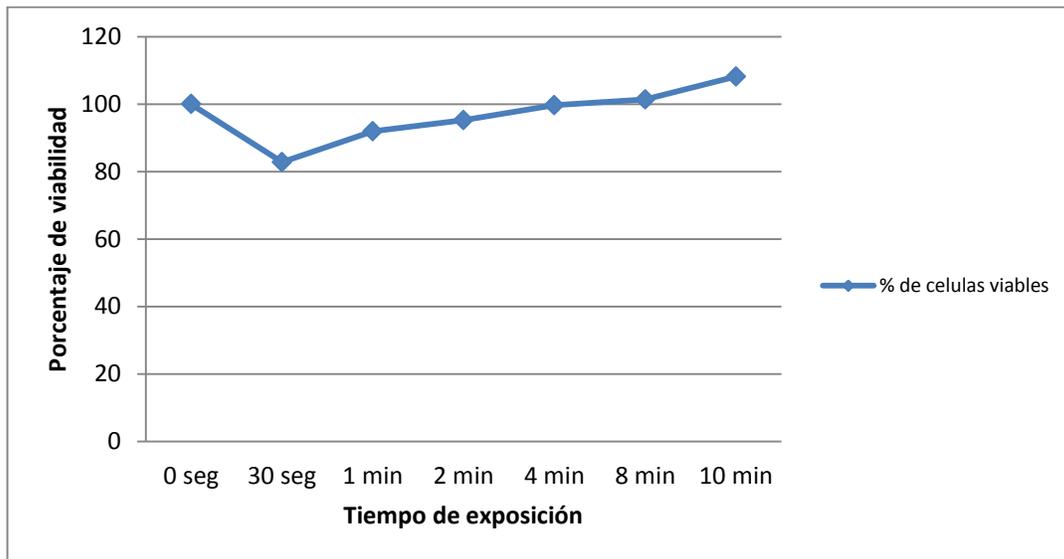
**Fig. 21** *C. albicans* ATCC 10231 después de 10 minutos de exposición al campo magnético de baja frecuencia; **a)**, **b)** y **c)** levaduras adaptadas totalmente al efecto del campo magnético, observándose mayor proliferación celular con respecto a los tiempos anteriores (4000x). Imágenes tomadas en el Laboratorio de Microscopía, FESC Campo 1 UNAM

Tiempo de exposición	Daño celular
30 seg	Si
1 min	Si
2 min	No
4 min	Si
8 min	No
10 min	No

**Tabla No.1** Determinación cualitativa del daño celular de *C. albicans* ATCC 10231 a distintos tiempos de exposición al campo magnético de baja frecuencia.

Tiempo	% Células viables	Desviación estándar
30 segundos	82.78	2.41
1 minuto	91.94	2.57
2 minutos	95.23	2.31
4 minutos	99.65	2.46
8 minutos	101.37	2.11
10 minutos	108.17	2.38

**Tabla No.2** Porcentaje de células viables de *C. albicans* ATCC 10231 al ser expuestas al campo magnético de baja frecuencia.



**Grafica No. 1** Porcentaje de células viables de *C. albicans* ATCC 10231 al ser expuestas al campo magnético. Se observó que el tiempo en el cual se logra el menor porcentaje de viabilidad es a los 30 segundos de exposición.

## IX. Discusión

En el presente trabajo se evaluó el efecto del campo magnético de baja frecuencia sobre la viabilidad de *C. albicans* ATCC 10231 y los posibles efectos que éste tiene sobre la morfología celular de la fase levaduriforme, para así explicar parte del modo de acción de éste sobre los microorganismos eucariontes. En estudios anteriores, se ha evaluado el efecto que poseen los campos magnéticos sobre los microorganismos, utilizando distintos modelos para la comprensión de dicho efecto; Kostoff (2013) estudió la interacción entre la actividad microbicida de antibióticos al ser empleados en conjunto con el campo magnético; Fojt, et al (2004) midieron la dinámica de crecimiento de un grupo de bacterias y la dependencia de las UFC con respecto al tiempo de exposición al campo magnético y a la magnitud de éste; Mittenzwey (1996) estudió la síntesis *in vivo* de proteínas en bacterias expuestas al campo magnético, así como sus efectos en la producción de bioluminiscencia y en los tipos de proteínas que eran liberadas al medio por dichas bacterias. Aunque estos estudios han ayudado a la comprensión de los efectos que tiene el campo magnético sobre las bacterias, existe muy poca evidencia científica sobre microorganismos superiores, tales como los hongos, levaduriformes o filamentosos, dado que éstos presentan una complejidad estructural y biológica superior, y dichos estudios se han centrado principalmente en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*; Novak (2007) experimentó con las dinámicas de crecimiento de *S. cerevisiae* dependientes del tiempo de exposición y de la intensidad al campo magnético, Iwasaka, et al (2004) trabajó con el efecto del campo magnético fuerte sobre la proliferación y distribución de *S. cerevisiae*. Aunque existen más trabajos sobre los efectos del campo magnético en las levaduras, no hay mucha evidencia científica sobre el efecto de éste sobre *C. albicans*, por lo que los hallazgos presentados en este trabajo ayudan a la comprensión de éste tema.

En la figura 14 se puede observar la fase levaduriforme de *C. albicans* que corresponde al grupo control, observándose una morfología bien definida, ovalada, sin gemas. Esta imagen se comparó con una fotografía tomada de una

microscopía electrónica de transmisión de un corte transversal de *C. albicans* ATCC 10231 realizado por Schneiter (2004), observándose semejanzas en la estructura e integridad de la pared celular.

El primer tiempo de exposición al efecto del campo magnético fue de 30 segundos, apreciándose los efectos de éste en la figura 15. A éste tiempo se observa un daño en la estructura de *C. albicans*, ya que se presentó lisis celular, salida de componentes intracelulares y deformidades en la estructura celular. La magnitud del efecto del daño se ve reflejada en la gráfica No. 1, ya que a éste intervalo de tiempo se obtuvo el menor porcentaje de viabilidad del microorganismo, 82.78%. A pesar de que no se ha aceptado ninguna hipótesis del mecanismo de acción del campo magnético de baja frecuencia, existen tres principales teorías que pretenden explicar su efecto en los sistemas biológicos:

- a) Teoría de la membrana: las membranas plasmáticas de las células están compuestas de moléculas anisótropas diamagnéticas, que en presencia del campo magnético van a rotar y, finalmente van a alcanzar una orientación al equilibrio, representando el estado de mínima energía libre. La rotación molecular dentro de la matriz membranal va a influenciar a los canales iónicos embebidos y, por lo tanto, afectar la movilidad iónica.
- b) Mecanismo de interferencia iónica: los campos magnéticos afectan el estado de unión de los complejos proteína-ion, por lo que el equilibrio:  $Proteína(\dots) + Ca^{2+} \leftrightarrow Proteína(Ca^{2+})$  se ve alterado. Y ésta teoría sostiene que los campos magnéticos no causan ninguna transición cuántica, sino que es sólo un efecto de interferencia de los estados cuánticos del ion dentro de la proteína.

- c) Teoría de los radicales libres: los radicales libres de oxígeno son producidos en las soluciones acuosas cuando éstas se exponen al campo magnético. Éstos radicales libres incluyen  $\text{HO}_2^-$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $^-\text{OH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , etc. Todos éstos radicales son altamente reactivos y pueden causar grandes daños a las células de un organismo vivo. (Wenjin, 2009)

De acuerdo al trabajo presentado por Wenjin, (2009), los fenómenos observados en el presente trabajo sugieren que el efecto del campo magnético de baja frecuencia en *C. albicans* pueden ser explicados mediante una combinación de las 3 teorías anteriores, debido a que se observó la salida de componentes celulares provocado por la lisis, posiblemente dado por la acción de los radicales libres, y la aparición de deformidades en la pared celular, explicado principalmente por la teoría de la membrana (alteración en la actividad de los canales iónicos) y en menor medida por el mecanismo de interferencia iónica, ya que pudo presentarse la deformación de proteínas estructurales de la pared celular por acción del campo.

Por otro lado, al exponer la levadura al campo magnético durante 1 minuto, se observó lisis celular así como la liberación de componentes intracelulares, aunque sin la misma intensidad con la que se manifestó a los 30 segundos de exposición, además, se pudieron apreciar campos en los cuales había células gemantes, hecho que indica el esfuerzo de la levadura por adaptarse a la exposición, éste hecho se confirma con el porcentaje de viabilidad celular, el cual aumentó con respecto a los 30 segundos de 82.78% a 91.94%, como se puede consultar en la gráfica No. 1.

En cuanto al tiempo de exposición de 2 minutos, se puede apreciar una notable disminución en la intensidad del daño, ya que en ésta exposición no se encontraron células lisadas ni con alteraciones estructurales, únicamente se notó una ligera elongación y la aparición de pequeñas protuberancias en uno de los polos de la célula; al consultar la literatura para definir la naturaleza de éstas protuberancias, se encontró que son alteraciones en la membrana celular, (Tyagi

& Malik, 2010) Otro de hecho notable de la observación al microscopio de ésta exposición fue la aparición de células gemantes y la curiosa agrupación en pares de las levaduras, lo que nos indica una mejor adaptación de la levadura ya que, como en el caso anterior, el porcentaje de viabilidad tiene tendencia a aumentar y en ésta ocasión, hubo un incremento de 91.94% (1 minuto de exposición) a 95.23% (2 minutos de exposición).

Para el caso de los 4 minutos de exposición al efecto del campo magnético de baja frecuencia, continúa notándose la adaptación de la levadura al medio, ya que aunque hay células elongadas, éstas no han perdido la capacidad de reproducirse, además de que continúan agrupándose en pares, indicando que éste comportamiento puede ser un mecanismo de defensa celular para la mitigación del efecto del campo. El porcentaje de viabilidad continúa a la alza, ésta vez aumentando del 95.23% (2 minutos de exposición) al 99.65%, muy cercano al 100% de viabilidad del grupo control, lo que señala una total adaptación al efecto del campo magnético.

La exposición durante 8 minutos al efecto del campo magnético fue una de las más interesantes de las expuestas en el presente trabajo, ya que se observaron fenómenos muy peculiares de comportamiento y adaptación del hongo, ya que se apreciaron levaduras aisladas con una morfología muy parecida a la que presentó el microorganismo control, además de que aparecieron cúmulos de células en la mayoría de los campos, con un mayor número de integrantes y en un estadio de crecimiento avanzado. Con respecto al porcentaje de viabilidad, continúa la tendencia en aumento del 99.65% (4 minutos) a 101.37%. A partir de éste tiempo, la exposición al campo magnético no es recomendada, ya que la levadura se adaptó totalmente al medio y es posible que se module positivamente alguna de las teorías de explicación del campo magnético, como una mayor velocidad de transporte intracelular, la apertura de más canales iónicos o una mayor velocidad de las reacciones enzimáticas catalíticas.

Para finalizar, los 10 minutos de exposición continuaron con la tendencia de fenómenos observados en el tiempo anterior, ya que se observaron levaduras con

morfologías similares a las del control, sin deformaciones aparentes y agrupadas en comunidades con un mayor número de miembros con respecto a los grupos anteriores. Es de particular interés notar la capacidad que posee *C. albicans* para adaptarse al medio, ya que no sólo logró sobreponerse al daño causado inicialmente por el efecto del campo magnético, sino que pudo utilizarlo para su beneficio y consiguió un porcentaje de viabilidad celular del 108.17%, confirmando finalmente la tendencia que vino presentándose a lo largo del experimento.

Los resultados obtenidos en éste trabajo contrastan de manera muy significativa con los obtenidos en los estudios realizados a bacterias (Fojt, Strasak, Vetterl, & Smarda, 2004) (Mittenzwey, 1996) (Rodríguez, 2006), ya que en éste grupo de microorganismos, la viabilidad celular disminuye gradualmente conforme se aumenta el tiempo de exposición o la intensidad del campo magnético, debido a que no poseen un mecanismo efectivo para controlar la formación de radicales libres de oxígeno, lo que causa su acumulación intracelular y, posteriormente su lisis (Wenjin, 2009).

Al ser comparados los resultados obtenidos con los estudios realizados en levaduras por Novak en 2007, se observa que la disminución de la viabilidad celular ocurre en menor grado, además de que el efecto es más dependiente de la intensidad del campo magnético utilizado, que del tiempo de exposición, obteniéndose menor viabilidad celular de *S. cerevisiae* al exponerse a una intensidad mayor de campo (Novak, 2007); la principal diferencia radica en que los resultados obtenidos en éste trabajo tienen una tendencia a aumentar la viabilidad celular de *C. albicans*. Además del tipo de microorganismo utilizado para la realización de estos experimentos, una de las posibles explicaciones para los fenómenos observados puede ser la diferencia de forma entre *S. cerevisiae* y *C. albicans*, ya que entre más alargada sea la célula, se puede observar un mayor efecto inhibitorio del campo magnético (Novak, 2007); otra explicación puede ser que el campo magnético (o la corriente inducida por el campo magnético) mata a una parte de las levaduras (quizá las más sensibles a los campos externos) y el resto de ellas continúan creciendo normalmente. Los resultados del experimento

de Novak sustentan esta explicación, ya que el punto más bajo de viabilidad celular que obtuvieron fue al menor tiempo de exposición. Para confirmar lo antes dicho, es necesaria la realización de experimentos más complejos para saber si hay una interacción con los componentes intracelulares de las levaduras que afecten el metabolismo o el ciclo celular.

## **X. Conclusiones**

Se determinó que el campo magnético de baja frecuencia posee poca actividad inhibitoria frente a levaduras, siendo efectivo únicamente a tiempos cortos de exposición (30 segundos), ya que a éste tiempo se logró el menor porcentaje de viabilidad celular, 82.78%.

De acuerdo a Wenjin et al se determina que el daño a la estructura celular se atribuye a una combinación de las 3 hipótesis propuestas sobre el mecanismo de acción del campo magnético de baja frecuencia, siendo esto visible al realizarse la observación al microscopio electrónico con ayuda de la tinción negativa.

Se logró observar el daño a las células levaduriformes, determinándose que el principal sitio de acción del campo magnético de baja frecuencia es a nivel de pared celular.

## XI. Proyecciones

Se sugiere darle continuidad a éste proyecto utilizando otros tipos de microorganismos, para verificar si el mecanismo de acción es el mismo ó puede afectar distintos componentes celulares.

El presente estudio puede complementarse con la realización de pruebas inmunológicas que ayuden a determinar si existe una posible reorganización antigénica de la pared celular del hongo que permita ser reconocida más fácilmente por las células fagocíticas del sistema inmunitario, para poder confirmar la utilidad terapéutica del campo magnético de baja frecuencia.

Se recomienda realizar microscopia electrónica de barrido para realizar la cuantificación del daño a la pared celular de *C. albicans*.

## XII. Bibliografía

- Al-Shameri, W. (2012). Correlation dimension of an attractor generated by an orbit of general two-dimensional iterated quadratic map. *Int. J. Contemp. Math. Sciences*, 7(9), 413-424.
- Arenas Guzmán, R. (2014). *Micología medica ilustrada*. Mexico, D.F.: McGraw-Hill Education.
- Bonifaz Trujillo, J. A. (2015). *Micología medica básica*. México, D.F.: McGraw-Hill.
- Borrego, P. D., Torrico, J. F., & Castilla, J. .. (2003). Efectos biológicos de los campos electromagnéticos sobre el tejido óseo. *Rehabilitación* 37(5), 252-255.
- Cabib, E., & Arroyo, J. (2013). How carbohydrates sculpt cells: chemical control of morphogenesis in the yeast cell wall. *Nature Reviews Microbiology* 11 (9), 648-655.
- Calderone, R. A., & Fonzi, W. A. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in microbiology* Vol. 9 No. 7, 327-333.
- Cedillo Urbán, N. (2012). *Aplicación de la dinámica no lineal para caracterizar la función de la presión arterial y presión ventricular en rata Wistar*. Facultad de estudios superiores Cuautitlán, UNAM.
- Del Moral, A., & Azanza, M. J. (1992). Model for the effect of static magnetic fields on isolated neurons. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 240-242.
- Fojt, L., Strasak, L., Vetterl, V., & Smarda, J. (2004). Comparison of low-frequency magnetic field effects on bacteria *Escherichia coli*, *Leclercia adecarboxylata* and *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry* 63, 337-341.
- Fustel, A. (2012). *Campos electromagnéticos y efectos en salud*. Biskaia: España.
- García, V. (2004). *Introducción a la Microbiología*. San José: UNED.
- Goñi, J., & García, J. M. (2006). Dinámica de sistemas biológicos: modelando la complejidad. *Iniciación a la investigación (1), revista electronica de la Universidad de Jaen*.
- Hidalgo, J. (2010). *Tratado de enología*. Madrid: Mundi-Prensa.

- Iwasaka, M., Ikehata, M., Miyakoshi, J., & Ueno, S. (2004). Strong static magnetic field effects on yeast proliferation and distribution. *Bioelectrochemistry* 65, 59-68.
- Kostoff, R. N. (2013). Combined biological and health effects of electromagnetic fields and other agents in the published literature. *Technological Forecasting and Social Change* (80) 7, 1331-1349.
- Lopez Martinez, R. (2012). *Micología médica*. Mexico, D.F.: Trillas.
- Luo, S., Christine, S., Oliver, K., & Zipfel, P. f. (2013). Complement and innate immune evasion strategies of the human pathogenic fungus *Candida albicans*. *Molecular Immunology*, 161-169.
- Mittenzwey, R. (1996). Effects of extremely low-frequency electromagnetic fields on bacteria-the question of a co-stressing factor. *Bioelectrochemistry and bioenergetics* 40, 21-27.
- Molero, G. (1998). *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. *International Microbiology*, 95-106.
- Montoya, H. (2008). *Microbiología básica para el área de la salud y afines*. Medellín: Universidad de Antioquia.
- Murray, P. R. (2009). *Microbiología Médica*. Barcelona: Elsevier España.
- Muthu, K. e. (2012). The biology and chemistry of antifungal agents: A review. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 20, 5678-5698.
- Negróni, M. (2009). *Microbiología Estomatológica. Fundamentos y guía práctica*. Buenos Aires: Panamericana.
- Nett, J., & Andes, D. (2006). *Candida albicans* biofilm development, modeling a host pathogen interaction. *Current opinion in microbiology* 9 (4), 340-345.
- Novak, J. (2007). Effects of low-frequency magnetic fields on the viability of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioelectrochemistry* 70, 115-121.
- Rodríguez, J. O. (2006). Growth of *Escherichia coli* under extremely low-frequency electromagnetic fields. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 134, 155-163.
- Schneiter, R. (2004). *Genetics, Molecular and Cell Biology of Yeast*. Universität Freiburg Schweiz.

- Tsai, P.-w., Chen, Y.-T., Hsu, P.-C., & Lan, C.-Y. (2013). Study of *Candida albicans* and its interactions with the host: A mini review. *Biomedicine*, 51-64.
- Tyagi, A. K., & Malik, A. (2010). In situ SEM, TEM and AFM studies of the antimicrobial activity of lemon grass oil in liquid and vapor phase against *Candida albicans*. *Micron* 41, 797-805.
- Velasco, M. e. (2002). *Farmacologia fundamental*. Madrid: McGraw-Hill.
- Wenjin, J. (2009). Effects of static magnetic fields on *Escherichia coli*. *Micron* 40, 894-898.