



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

Evaluación del daño estructural sobre *Candida albicans* producido por propóleo mexicano mediante Microscopía Electrónica de Barrido

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

Rosa Lilián Gómez Palacios

ASESORA

M. en C. Nelly Tovar Betancourt

COASESORES

Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez  
M.V.Z. Marco Antonio Mendoza Saavedra

Cuatitlán Izcalli, Estado de México, 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN  
ASUNTO: ~~EXÁMENES~~ APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTÉZ FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales



DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES  
EXÁMENES PROFESIONALES

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Evaluación del daño estructural sobre Candida albicans producido por propóleo mexicano mediante Microscopía Electrónica de Barrido

Que presenta la pasante: ROSA LILIÁN GÓMEZ PALACIOS

Con número de cuenta: 30500354-8 para obtener el Título de la carrera: Medicina Veterinaria y Zootecnia

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 15 de enero de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	M. en E. Susana Elvira García Vázquez	
<b>VOCAL</b>	M.V.Z. Silviano Trejo Núñez	
<b>SECRETARIO</b>	M. en C. Nelly Tovar Betancourt	
<b>1er. SUPLENTE</b>	Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán	
<b>2do. SUPLENTE</b>	M. en C. Elisa Gutiérrez Hernández	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente, agradezco a Dios por darme la tenacidad, la fortaleza y la sabiduría para alcanzar esta meta y por estar siempre conmigo en cada uno de los proyectos de vida que he llevado a cabo.

Agradezco infinitamente a mis padres, Moisés e Irma, por ser mi mayor apoyo, por creer en mí, por darme otra oportunidad y por no dejarme nunca ante la adversidad. Gracias por enseñarme con el ejemplo a ser una mejor persona, gracias por todos los valores que me inculcaron desde pequeña, gracias por darme tanto. ¡Los amo, padres!

A Moisés, mi hermano mayor, por ser un apoyo, una guía y un gran ejemplo para mí tanto en la vida académica como en la vida personal. Eres una persona muy fuerte y muy grande; siempre tendrás mi admiración y respeto. Jamás voy a olvidar esos días en los que regresabas a casa agotado de la escuela y aun así te tomabas el tiempo para explicarme de matemáticas y química, ja ja ja. ¡Te amo, hermano!

A Ricardito, mi hermano menor, por ser mi gran confidente y cómplice. Gracias por todas esas mañanas que te levantaste temprano para llevarme al suburbano para que no me fuera sola, gracias por escucharme y aconsejarme cuando algo andaba mal, gracias por enseñarme a ser una persona más tolerante y calmada. También has sido un gran ejemplo para mí y te amaré toda la vida por todo eso.

A mi cuñada Elena, quien me ha visto crecer y me ha brindado su apoyo incondicional tanto en mi trayectoria escolar como a nivel personal. Gracias también por darme la dicha de ser tía; Diego y Sofi han traído a mi vida una alegría inigualable. Los amo con todo mi corazón.

A Salvador, por ser uno de mis más grandes apoyos, por sacar lo mejor de mí, por enseñarme a ver las cosas de una manera diferente y por llenarme de tanto amor y comprensión. No hay día que no agradezca la fortuna de tenerte como compañero de vida. Te amo, Chavita y siempre estaré agradecida por toda la

felicidad y crecimiento que has traído a mi vida. Gracias también por darme el regalo más grande y especial: a nuestra hija Alicia, a quien ya muero de ganas por conocer y que muy pronto estará en nuestros brazos. ¡Significan todo para mí!

A todos mis tíos y tías, pero en especial a mis tías Rosario, Malena, Rosita, Lety y Martha, y a mis tíos Miguel, Manolo, José María, Fernando, Alejandro, Felipe y Enrique, por quererme y apoyarme tanto, por escucharme, consentirme y siempre creer en mí. Los quiero muchísimo y tienen un lugar muy grande en mi corazón.

A todos mis primos y mis primas, quienes me han dado una amistad especial dentro del mismo árbol familiar, con quienes he reído y llorado, con quienes he crecido y han visto lo bueno y lo malo de mí. Quiero resaltar en especial a Eli, Paola, Vero, Mariel, Dianita, Anayantzin, Sarahí, Claudia, Rubí, Juanita, Pepe, David, Edson, Jair, Víctor y Adrián; son como mis hermanos y siempre estaré para ustedes así como ustedes han estado para mí, ¡los adoro!

A Berenice, mi amiga de toda la vida, quien me conoce en cada una de mis etapas. Te estoy inmensamente agradecida por todo el cariño que me das, por tus buenos consejos, por el tiempo que me dedicas y sobre todo por tu invaluable amistad. Estoy segura que haberte conocido es una de las cosas más lindas que me han sucedido. ¡Gracias por siempre estar!

A Lucy, por demostrarme que la amistad es sinónimo de respeto, lealtad, cariño y honestidad. Gracias por tu apoyo incondicional, por los ánimos que siempre me has dado para seguir adelante, por ser la mejor colega y por aceptarme como soy. Tú amistad es invaluable para mí y estaré siempre agradecida de tener a alguien como tú en mi vida.

A Milet, Saúl y Lalo, por darme momentos inolvidables, por hacerme reír a carcajadas cada que nos vemos, por ser los primeros en enseñarme el valor de aceptar a las personas como son y por extenderme su mano en las dificultades. ¡Los quiero muchísimo! Son irremplazables y siempre serán “mi fraternidad”.

A mis amigos y compañeros de la universidad, con quienes tuve buenas y malas experiencias, por crecer junto conmigo en el camino. Quiero agradecer en especial a Katy, Anelita, Rocío, Eli y Adriana, por compartir conmigo un pedacito de su vida en esta trayectoria.

A mis profesores, por ser un pilar en mi formación profesional. Gracias por todas sus enseñanzas, llamadas de atención y reconocimientos; gracias a ustedes es que también he llegado a donde estoy. Quiero agradecer en especial a Norita, mi profesora y amiga, gracias por apoyarme y permitirme conocerla. A la Maestra Nelly, quien me orientó en este trabajo de investigación y me tuvo la paciencia y la dedicación para lograr llevarlo a cabo.

A la FES Cuautitlán, mi segunda casa, por abrirme sus puertas y darme tantas oportunidades de crecimiento académico.

A la Universidad del Pacífico en Chile, por permitirme cursar un semestre en sus aulas y dejarme aprender de su cultura y su sistema educativo. Sin duda, fue una experiencia que me ayudó a crecer muchísimo en todos los aspectos.

A todas las personas que por algún motivo ya no me acompañan pero que estuvieron conmigo en alguna etapa de mi vida, pues yo soy ahora un cachito de cada uno de ustedes. Gracias a todos los que me han ayudado a crecer y a hacer de mí lo que soy ahora.

A todas mis mascotas, pero en especial a mi Rododendro y a mi Toto, por ser los gatos más geniales del mundo y a mis perros Coral, Lucas y Morris. Gracias por motivarme a ser una mejor veterinaria.

Gracias a todos ustedes es que estoy donde me encuentro ahora, culminando un proyecto que en algún momento pareció muy lejano; hoy es ese mañana que ayer tanto me preocupaba. ¡Gracias infinitas a todos!

*“La diferencia entre ganar y perder a menudo consiste en no abandonar.”*

-Walt Disney

Investigación realizada gracias a los siguientes programas:

- Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IT200915 denominado “Desarrollo de productos con propóleo para su uso en la pasteurelosis del conejo, distemper canino y la otitis canina.”
- PIAPI 1632 denominado “Desarrollo de productos sintéticos y prototipos farmacéuticos a base de propóleo para su aplicación en la salud animal.”



Áreas de trabajo para el desarrollo de la presente investigación:

- **Laboratorio 6 de Bioprospección Microbiológica** de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4, UNAM, bajo la responsabilidad del Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez.
- **Laboratorio de Microbiología** de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4, UNAM, bajo la responsabilidad de Marco Antonio Mendoza Saavedra.
- **Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido** de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4, UNAM, bajo la responsabilidad de la M. en C. Sofía González Gallardo.



Los resultados parciales de este trabajo se presentaron en la modalidad de cartel en el 3er Congreso de Ciencia, Educación y Tecnología, celebrado del 19 al 22 de junio de 2017 en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1, Estado de México, México (Anexo).

También se presentó en el IX Congreso Nacional de Micología Médica “*Dr. Amado González Mendoza y Dr. Jesús Mayorga Loera*”, celebrado del 19 al 21 de octubre de 2017 en Guadalajara, Jalisco, México (Anexo).



## ÍNDICE

I. RESUMEN.....	X
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Propóleo.....	1
Composición química.....	1
Fenoles y flavonoides.....	3
Propiedades biológicas del propóleo.....	3
Mecanismos de acción del propóleo.....	4
1.2 Micosis en animales.....	4
Micosis oportunistas.....	5
1.3 Candidiasis.....	6
Métodos de identificación fenotípica de <i>C. albicans</i> .....	7
Patogénesis.....	8
Importancia y aspectos clínicos de la candidiasis en Medicina Veterinaria.....	8
1.4 Antecedentes del efecto antimicótico del propóleo mediante la Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).....	10
1.5 Antecedentes de los usos del propóleo en la Medicina Veterinaria.....	11
1.6 Antecedentes del uso de ketoconazol como antifúngico.....	12
2. JUSTIFICACIÓN.....	13
3. HIPÓTESIS.....	13



4. OBJETIVO GENERAL.....	13
5. OBJETIVOS PARTICULARES.....	13
6. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	15
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
7.1 Microorganismo.....	16
7.2 Extracto Etanólico de Propóleo (EEP).....	16
a) Determinación de Fenoles (método Folin-Ciocalteu).....	16
b) Determinación de Flavonoides.....	17
c) Preparación de sensidiscos con EEP de FES Cuautitlán.....	18
7.3 Inhibición de Crecimiento Radial.....	18
7.4 Microscopía Electrónica de Barrido.....	18
a) <i>C. albicans</i> sin tratamiento para MEB.....	18
b) <i>C. albicans</i> con tratamiento de EEP de FES Cuautitlán.....	18
c) <i>C. albicans</i> con tratamiento de ketoconazol.....	19
7.5 Protocolo para levaduras que serán observadas mediante MEB.....	19
7.6 Análisis estadístico.....	20
8. RESULTADOS.....	20
8.1 Extracto Etanólico de Propóleo.....	20
a) Porcentaje de fenoles en EEP de FES Cuautitlán.....	20
b) Porcentaje de flavonoides en EEP de FES Cuautitlán.....	20



8.2 Prueba de Inhibición de Crecimiento Radial.....	20
8.3 Microscopía Electrónica de Barrido.....	24
a) <i>Candida albicans</i> sin tratamiento.....	24
b) <i>Candida albicans</i> con tratamiento de EEP de FES Cuautitlán.....	26
c) <i>Candida albicans</i> con tratamiento de ketoconazol.....	27
9. DISCUSIÓN.....	31
10. CONCLUSIONES.....	34
11. BIBLIOGRAFÍA.....	35
12. ANEXO.....	38
• Reconocimiento por asistir y participar con el cartel “ <b>Efecto antimicótico de propóleos mexicanos sobre la estructura celular de <i>Candida albicans</i></b> ” en el 3er Congreso de Ciencia Educación y Tecnología, Junio 2017.....	38
• Constancia por participar con el cartel “ <b>Evaluación mediante microscopía electrónica de barrido del daño sobre la estructura celular de <i>Candida albicans</i> producida por propóleos mexicanos</b> ” en el IX Congreso de Micología Médica Dr. Amado González Mendoza y Dr. Jesús Mayorga Loera, Octubre 2017.....	39

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición cualitativa en porcentaje del propóleo.....	2
Cuadro 2. Conversión de los µg de ketoconazol a mg.....	21



Cuadro 3. Promedio de los diámetros de los halos de inhibición producidos por el EEP de FES Cuautitlán, ketoconazol, DMSO y Alcohol al 70%.....21

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Prueba de Inhibición de Crecimiento Radial de *Candida albicans*; tratada con ketoconazol a una dosis de 0.05 mg.....22

Figura 2. Prueba de Inhibición de Crecimiento Radial de *Candida albicans*; tratada con Extracto Etanólico de Propóleo a una dosis de 50 mg.....22

Figura 3. Controles negativos de la prueba de Inhibición de Crecimiento Radial de *C. albicans*.....23

Figura 4. Diámetro (mm) de los halos de inhibición producidos por EEP de FES Cuautitlán y por ketoconazol.....24

Figura 5. Microscopía Electrónica de Barrido de *C. albicans* sin tratamiento.....25

    5A) *C. albicans* sin tratamiento a 1500x.....25

    5B) *C. albicans* sin tratamiento a 5000x.....25

Figura 6. Microscopía Electrónica de Barrido de *C. albicans* con tratamiento de EEP de FES Cuautitlán a una concentración de 50 mg/mL.....26

    6A) *C. albicans* con tratamiento de EEP de FES Cuautitlán a 1500x.....26

    6B) *C. albicans* con tratamiento de EEP de FES Cuautitlán a 5000x.....27

Figura 7. Microscopía Electrónica de Barrido de *C. albicans* con tratamiento de ketoconazol a una concentración de 50 mg/mL.....28

    7A) *C. albicans* con tratamiento de ketoconazol a 1500x.....28

    7B) *C. albicans* con tratamiento de ketoconazol a 5000x.....28



Figura 8. Comparación del tamaño de *Candida albicans* ATCC 14053 sin tratamiento y con tratamiento de EEP de FES Cuautitlán.....29

Figura 9. Comparación del tamaño de *Candida albicans* ATCC 14053 sin tratamiento y con tratamiento de ketoconazol.....30



## **I. RESUMEN**

En el presente trabajo se evaluó la actividad antimicótica del Extracto Etanólico de Propóleo (EEP) mexicano obtenido de los apiarios de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (Estado de México) sobre la estructura celular de *Candida albicans* a través de la Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).

Se trabajó con una cepa de referencia de *Candida albicans* American Type Culture Collection (ATCC) 14053 proporcionada por el Laboratorio 6 de Bioprospección Microbiológica de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FES Cuautitlán Campo 4, UNAM. Para evaluar el efecto antimicótico del EEP, se realizó la prueba de Inhibición de Crecimiento Radial (ICR) utilizando discos estériles impregnados con EEP a una concentración de 50 mg/mL y discos estériles con ketoconazol a una concentración de 0.05 mg/mL. Al comparar los halos de ambos tratamientos se observó una mayor sensibilidad al ketoconazol, mientras que la respuesta al tratamiento hacia el EEP fue menor.

Por otra parte, se evaluó el efecto del EEP sobre la estructura celular de *Candida albicans* mediante MEB. En las micrografías de barrido de *C. albicans* tratadas con EEP a una dosis de 50 mg/mL se observaron levaduras con una superficie celular de aspecto grumoso, además de una pérdida de continuidad en la misma. Con el tratamiento de ketoconazol a una dosis de 50 mg/mL se apreció un aumento en el tamaño de la célula, ruptura de la capa celular más externa e invaginación de la misma. Estos cambios fueron evidentes al comparar las micrografías de *C. albicans* sin tratamiento con las de las levaduras tratadas con EEP y ketoconazol, las primeras se observaron ovaladas, con una superficie lisa e íntegra, mientras que los cambios sufridos por las que recibieron tratamiento ya se mencionaron con anterioridad.

Con estos resultados, se comprobó que el EEP de FES Cuautitlán provoca daño estructural en *Candida albicans*.



## **1 INTRODUCCIÓN**

### **1.1 PROPÓLEO**

La palabra “propóleo” proviene del griego “*Propolis*” que significa “Defensa” o “Defensor de la ciudad” (Nogueira, 2014), es una sustancia de origen vegetal que preparan las abejas (*Apis mellifera*) a partir de la recolección de gotas de resina que se forman por exudación en la corteza de las ramas y troncos de los árboles principalmente (Root, 1978), luego son mezcladas con polen, cera y secreciones glandulares en la cavidad oral de las abejas. Esta sustancia adhesiva es utilizada como pegamento, sellador de grietas, barniz interno de la madera del colmenar y para embalsamar cadáveres de animales invasores que por su tamaño no pueden ser sacados de la colmena (Rodríguez, 2011). También es utilizado por las abejas para recubrir el interior de su nido con el fin de reforzarlo y mantener una temperatura adecuada dentro de la colmena, optimizando así la regulación del microclima dentro de la misma (Jean-Prost, 2007).

### **COMPOSICIÓN QUÍMICA**

La composición química del propóleo es muy compleja, ya que contiene más de 160 componentes activos, entre ellos, ácido benzoico, ácido cafeico y sus derivados (Quintero, 2008). El propóleo, además, contiene carburos de hidrógeno, lípidos, alcoholes y aldehídos (Jean-Prost, 2007). Tiene resinas, bálsamos, aceites esenciales, minerales, vitaminas, aminoácidos y más de 50 grupos de flavonoides (Rodríguez, 2011).

En particular, la composición del propóleo depende de la flora circundante al sitio de recolección, y es adecuado determinar la fuente vegetal próxima de la colmena para correlacionar los componentes activos presentes en sus resinas y estimar la proporción de éstos en el propóleo (Viloria, 2012).

Según Tovar (2016), las diferencias en la composición están determinadas por:

- Las flora del área ecológica.





- Los ciclos evolutivos de las plantas proveedoras de resinas que condicionan cambios en las concentraciones de las mismas.
- Microorganismos presentes en el entorno geográfico.
- Factores climatológicos.
- Técnica de obtención.

Cualitativamente, numerosas sustancias se encuentran en el propóleo de modo constante y relativamente estable (ver cuadro 1).

Composición	Porcentaje
<b>Cera</b>	30%
<b>Resinas y bálsamos</b>	50%
<b>Aceites</b>	10%
<b>Polen</b>	5%
<b>Sustancias orgánicas y minerales</b>	5%

Cuadro 1. Composición cualitativa en porcentaje del propóleo (tomado de Tovar, 2016)

La composición química del propóleo determina la calidad del mismo. Se sabe que los compuestos fenólicos representan más del 50% de su peso total y son los responsables de conferirle la actividad biológica que posee (Bedascarrasbure, 2004).

Tovar (2016), menciona que la composición cualitativa principal del propóleo puede resumirse en:

- a) Aminoácidos; se considera que son aportados por las abejas a través del polen.
- b) Ácidos aromáticos y ésteres; principalmente ácido benzoico, ácido cafeico y ácido ferúlico.



- c) Flavonas y flavononas; tienen elevada actividad biológica. Resaltan la pinocembrina, quercitina, galangina, pinostrobin, sakuranetina y crisina.
- d) Terpenoides; son los responsables del aroma del propóleo y de ellos destacan el limoneno, cimeno y estireno.

## **FENOLES Y FLAVONOIDES**

Las plantas sintetizan una gran variedad de metabolitos secundarios que contienen un grupo fenol, por lo que reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides (Rodríguez, 2015).

El progreso de la investigación sobre el propóleo ha permitido identificar que los compuestos fenólicos, dentro de los cuales se encuentran los flavonoides, son el grupo más importante de compuestos bioactivos por sus propiedades medicinales, en especial los flavonoides pinocembrina, galangina y pinobanksina (Rodríguez, 2015).

El uso de los flavonoides contra infecciones bacterianas o fúngicas tiene como objetivo eliminar las células de los microorganismos o dificultar los efectos de difusión de las toxinas bacterianas. De los flavonoides con acción antimicótica destacan el Kaempferol-7,4'-dimetil-éter, Ermanina, Galangina, Pinocembrina, Pinobanksina, Pinobanksina-3-acetato (Tovar, 2016).

## **PROPIEDADES BIOLÓGICAS DEL PROPÓLEO**

Científicamente, al propóleo se le han demostrado 20 propiedades: es antibacteriano, antimicótico, antiolesterolémico, antiparasitario, antiinflamatorio, antioxidante, antitóxico, antialérgico, analgésico, anestésico, antituberculoso, antiviral, citostático, desodorante, epitelizante, estimulante de la inmunogénesis, fitoinhibidor, hemostático, hipotensor y termoestabilizador. Otra virtud del propóleo es su capacidad de distribuirse indistintamente a través de la sangre y la linfa a todo el organismo (Rodríguez, 2011). La actividad antimicrobiana del propóleo se atribuye principalmente a los flavonoides pinocembrina, galangina y pinobanksina



(Silva, 2016). Estas características le permiten al propóleo acelerar la cicatrización de heridas y quemaduras y cuidar las afecciones de la piel. El propóleo es la única sustancia de la colmena que impide el desarrollo de los hongos (Jean-Prost, 2007).

Silva (2016), evaluó la capacidad de diferentes productos de abejas (miel, jalea real, polen, propóleo) para inhibir el crecimiento de 40 cepas de levaduras de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* y *Trichosporon spp.* La actividad antifúngica de cada producto disminuyó en el siguiente orden: propóleo, polen, jalea real, miel. Este estudio demostró que los productos de las abejas, en particular el propóleo y el polen, pueden ayudar a controlar algunas cepas de hongos.

## **MECANISMO DE ACCIÓN DEL PROPÓLEO**

A través de la microscopía óptica, se ha demostrado que el Extracto Etanólico de Propóleo (EEP) causa un importante daño celular en *Candida albicans*, ya que inhibe la formación de tubo germinativo y provocando la deformación de algunas levaduras (Londoño, 2010).

A través de microscopía electrónica de transmisión en secciones ultrafinas de *C. albicans* ATCC 10231, se identificó la formación de gránulos de almacenamiento además de la alteración y ruptura de las estructuras de la cubierta externa de la levadura (Londoño, 2010), lo que sugiere que el EEP debilita a la célula fúngica alterando la membrana celular y/o la pared celular (Tovar, 2016).

## **1.2 MICOSIS EN ANIMALES**

Los hongos son organismos eucariotas, heterótrofos no fotosintéticos, que sintetizan exoenzimas y obtienen nutrientes mediante absorción (Quinn, 2002), no son móviles y poseen una pared celular rígida que es el elemento que les confiere su forma y los protege de elementos osmóticos y ambientales agresivos. Las paredes de los hongos están hechas en gran medida de capas de carbohidratos y también de glucoproteínas y lípidos. Cada hongo tiene como mínimo un núcleo



con una membrana nuclear, retículo endoplásmico, mitocondria y aparato secretor. En promedio, se han descrito unas 80 000 especies de ellos, pero menos de 400 poseen importancia médica, y menos de 50 especies ocasionan más de 90% de las micosis en animales (Brooks, 2014).

Existen tres Phylums dentro del reino Fungi: Ascomycota (ascomicetos), Basidiomycota (basidiomicetos) y Zygomycota (zygomicetos), que pueden diferenciarse por las características de sus formas sexuales (teleomorfos). Un cuarto tipo viene representado por los hongos imperfectos (deuteromicetos), (Quinn, 2002).

Las dos morfologías fúngicas principales son los hongos filamentosos o mohos y las levaduras. Los primeros (pluricelulares) crecen por medio de filamentos ramificados, que se denominan hifas (2-10µm de diámetro), mientras que las levaduras (unicelulares) poseen un aspecto esférico u ovoidal (2-5 µm de diámetro). Se denominan hongos dimórficos aquéllos que pueden presentar morfología de hongo filamentoso y de levadura. Se describen como polimórficos otros hongos, como por ejemplo *Candida albicans*, que todavía presenta formas adicionales a estas dos principales (Quinn, 2002).

## **MICOSIS OPORTUNISTAS**

En muchos casos, el tipo de hongos y la evolución natural de la micosis son gobernados por el estado predisponente básico del hospedador. Como miembros de la microbiota normal de los mamíferos, *Candida* y levaduras afines son oportunistas endógenos. Otras micosis oportunistas son causadas por hongos exógenos que aparecen en forma global en la tierra, el agua y el aire (Brooks, 2014).

Las levaduras crecen en aerobiosis en agar Sabouraud dextrosa y las especies capaces de invadir tejidos crecen bien a 37°C. Las colonias, por lo general, son de textura húmeda y cremosa (Quinn, 2002).



### 1.3 CANDIDIASIS

*Candida albicans* es un hongo dimórfico, oval, mide de 2-6 X 3-9  $\mu\text{m}$  con paredes finas. Su reproducción es asexual por gemación. Su composición química en cuanto a proteínas es de 20-40%, polisacáridos de 30-50% y en cuanto a lípidos es variable. La pared celular de *C. albicans* está conformada por los polisacáridos Manán, Glucán y Quitina; éstos le proporcionan rigidez y protección. Su número de capas y su morfología varían según su etapa de crecimiento celular, forma de crecimiento y el medio de cultivo. La membrana citoplasmática contiene enzimas responsables de la síntesis de la pared celular, presenta doble capa compuesta por lípidos y proteínas y carbohidratos en menor proporción (Bonilla, 2012).

Los factores de virulencia de *C. albicans* son los siguientes:

- Adhesinas: permiten la unión de la célula fúngica a los receptores del hospedador.
- Proteinasas y fosfolipasas: corresponden a enzimas que favorecen la diseminación por los tejidos del hospedador.
- Tigmotropismo: permite encontrar discontinuidades entre las células y penetrar en los tejidos.
- Producción de toxinas y sustancias inmunosupresoras.
- Sinergismo con bacterias y otras levaduras.

La candidiasis es la micosis oportunista más frecuente. Es una infección aguda o crónica de las mucosas, tejidos profundos, uñas o piel causada por levaduras del género *Cándida spp.* Las candidiasis de mucosas y piel son las más profundas, mientras que las sistémicas son de evolución aguda o crónica y generalmente severa (Flores, 2015).



Las manifestaciones clínicas son localizadas, diseminadas o sistémicas. Las alteraciones histopatológicas varían desde inflamación mínima hasta supuración o granuloma (Arenas, 2011).

Existen más de 200 especies dentro del género *Candida* (Quinn, 2002). Estas levaduras están ampliamente distribuidas en la naturaleza, pudiendo vivir también en forma saprófita en la piel, mucosas y el tracto digestivo del hombre y los animales (Stanchi, 2005). *Candida albicans*, la especie implicada con más frecuencia en la enfermedad animal, carece de forma sexual. Crece en aerobiosis a 37°C en una gran variedad de medios, incluido el agar Sabouraud dextrosa. En los tejidos animales, *C. albicans* puede producir polimorfismo en forma de hifas o pseudohifas. En ciertos medios, produce células de resistencia características, dotadas de una gruesa pared, denominadas clamidosporas (Quinn, 2002). Su estado anamorfo pertenece a la subdivisión Deuteromycotina, y su estado teleomorfo puede ser Ascomycotina (Arenas, 2011).

### **MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICOS DE *C. albicans***

- A) Blastoconidios.** Todas las especies de *Candida* se reproducen asexualmente por blastoconidios, dependiendo de la especie. Se tiñen bien con azul de algodón, PAS y Wright. No obstante que la composición química de la pared celular de las levaduras está integrada por glucanas, mananas, manoproteínas y quitina y no entran en la definición de respuesta a la tinción de gram (Méndez, 2012).
- B) Formación de tubo germinativo.** Se puede emplear suero humano, glucosamina o sales de amonio. Se siembra un inóculo bajo de levadura y se incuba a 37°C durante 2 a 2 ½ horas. En las condiciones descritas, la emisión de una prolongación citoplasmática, al menos el doble de tamaño de la célula madre es presuntiva para *C. albicans* (Méndez, 2012).
- C) Producción de clamidoconidios.** Esta prueba permite identificar a *C. albicans* y a su vez diferenciarla de *C. dubliniensis*. En medio de agar de



harina de maíz o agar clamidospora incubados a 25°C durante 48-72 horas se puede observar la formación de clamidoconidios. Además, en estos medios, incubados a 37°C, también se induce filamentación, la cual es característica de cada especie (Méndez, 2012).

Las características de *C. albicans* útiles para una identificación presuntiva son (Quinn, 2002):

- Crecimiento a 37°C a las 48h.
- Producción de túbulos germinales en 2 horas, cuando se incuba en suero a 37°C.
- Crecimiento en agar Sabouraud dextrosa.

## **PATOGÉNESIS**

*Candida albicans* posee estructuras superficiales que le permiten unirse al fibrinógeno y a componentes del complemento. El cambio fenotípico, posible en *C. albicans*, puede facilitar la evasión de los mecanismos de defensa del hospedador (Quinn, 2002). *Candida* elabora polisacáridos, proteínas y glucoproteínas que además de estimular las defensas del hospedador facilitan el “acoplamiento” y la invasión de sus células (Brooks, 2014). Las adhesinas que se localizan en la superficie celular promueven la unión y posiblemente la penetración al tejido del hospedador. Las proteínas, lipasas y fosfolipasas secretadas proporcionan los nutrientes que la célula necesita y promueven la invasión. Las transiciones morfológicas entre levaduras y pseudohifas o hifas promueven la diseminación y penetración de las células de *C. albicans* (Flores, 2015).

## **IMPORTANCIA Y ASPECTOS CLÍNICOS DE LA CANDIDIASIS EN MEDICINA VETERINARIA**

En los carnívoros, *Candida albicans* puede aislarse de zonas húmedas de la piel, como son los pliegues y las áreas de unión mucocutánea. La piel se encuentra erosionada, eritematosa y húmeda, cubierta de un depósito blanquecino. Las otitis



externas bacterianas pueden agudizarse en presencia de *Candida* o ser ésta directamente el agente causal primario. También se describen conjuntivitis en perros y gatos (Stanchi, 2005). Se ha descrito estomatitis micótica en cachorros de perros, gatos y en potrillos (Quinn, 2002).

En las mucosas las lesiones consisten en placas gris-blanquecinas que tienden a coalescer, observándose debajo de estas placas una mucosa eritematosa, ulcerada e inflamada (Stanchi, 2005).

En los lechones lactantes criados con dieta artificial se presenta un tipo de lesión parecida al algodoncillo. Éstos manifiestan disfagia y enflaquecimiento (Stanchi, 2005). También se ha relacionado *Candida albicans* con la aparición de úlceras gastroesofágicas en cerdos y potrillos (Quinn, 2002).

En los sementales y yeguas de cría se describe una forma genital, así como también una localización oral con inflamación pseudomembranosa de la mucosa.

Los bovinos también presentan formas clínicas como las de los equinos, sin embargo, la lesión más significativa en el ganado lechero es la mastitis, que es una de las lesiones más importantes que se presenta en estos animales, pudiendo afectar entre el 80% y 100% de las hembras tratadas con antibióticos, presentando la signología 3 a 10 días post tratamiento (Stanchi, 2005). En la mastitis bovina la fuente de infección es generalmente exógena, y la introducción de las levaduras del medio externo al interior de la glándula mamaria resulta provocada por un mal manejo. *Candida spp.* penetra yatrógenamente en la glándula mamaria por medio de cánulas de infusión, jeringas, o de soluciones de infusiones mamarias de envases contaminados. Por esta razón, la mastitis por levaduras casi siempre es secundaria a una mastitis bacteriana aguda primaria (Rebhum, 1995). La mastitis es uno de los problemas más graves en los rebaños lecheros. La gran mayoría de los casos son causados por bacterias, aunque últimamente la literatura está registrando un aumento de los casos de etiología micológica (Spanamberg, 2008). Las mastitis subclínicas y clínicas en bovinos por





hongos se han incrementado principalmente por levaduras del género *Candida* (Segundo, 2011). Las levaduras no invaden el tejido, pero viven en el revestimiento mucoso y en esta ubicación producen inflamación. La levadura crece muy bien en la presencia de algunos antibióticos, y por esta razón, el uso prolongado de antibióticos o de asociaciones de antibióticos para intentar curar esta infección “resistente” no hace más que confirmar una infección por levaduras (Rebhum, 1995).

Las mastitis micóticas aparecen esporádicamente como consecuencia de preparaciones intramamarias contaminadas o debido a una gran contaminación ambiental. Por lo general, sólo se ve afectado un cuarto y suele producirse la eliminación espontánea de la infección (Quinn, 2002).

#### **1.4 ANTECEDENTES DEL EFECTO ANTIMICÓTICO DEL PROPÓLEO MEDIANTE LA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)**

Hee Young Chee, 2002, empleó propóleo coreano sobre *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*, mostrando actividad fungicida contra *C. neoformans* y actividad fungistática contra *C. albicans*. A la microscopía electrónica de barrido, la morfología celular de *C. neoformans* fue afectada por el tratamiento de propóleo, observándose ruptura de la superficie celular del hongo (Tovar, 2016).

Mello, *et. al.* (2006), mencionan que la adherencia de *Candida albicans* a las células está implicada como el primer paso de la patogénesis de la candidiasis oral, y que la formación del tubo germinativo se ha atribuido como un factor que promueve la adherencia. Debido a esto, el objetivo de su estudio fue investigar la capacidad de *C. albicans* (ATCC 18804) para formar el tubo germinativo bajo la exposición de propóleo verde brasileño a diferentes concentraciones, mostrando como resultado daños en la pared celular e inhibición del crecimiento de tubo germinativo.



## **1.5 ANTECEDENTES DE LOS USOS DEL PROPÓLEO EN LA MEDICINA VETERINARIA**

En medicina veterinaria, se ha empleado el propóleo para el control y tratamiento de enfermedades que afectan a las especies domésticas; se han reportado casos de TVT (tumor venéreo transmisible) dando como resultado la inhibición de la actividad de las células de origen cancerígeno. El propóleo también se ha empleado en el tratamiento de úlceras corneales inducidas en conejos, logrando una regeneración epitelial. Se han realizado estudios en los cuáles se han demostrado con gran éxito el uso del propóleo, como es en el caso de las bacterias y los hongos que comúnmente producen otitis en los perros, donde diferentes agentes patógenos como *Staphylococcus aureus*, *E. coli* y *Malassezia pachydermatis* han sido aislados. Además, se ha estudiado el uso de este producto en afecciones oftálmicas en perros y gatos de diversas edades y razas, dando buen resultado, demostrando que es un tratamiento alternativo para estas enfermedades sin causar efectos adversos en los pacientes (Nogueira, 2014).

Mediante estudios sobre la actividad antifúngica del propóleo de diferentes áreas geográficas, muchos autores han encontrado que todos los propóleos han mostrado, en diferentes grados, efectos antifúngicos contra muchas especies de *Candida*. En el laboratorio de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, se ha evaluado la actividad antifungal de extractos obtenidos de propóleo colectado en el apiario de la misma Facultad.

Aunque muchos estudios se han concentrado en demostrar la actividad antifungal del propóleo, pocos han demostrado sus efectos en la morfología y estructura del hongo, ya que mediante la ayuda de la microscopía óptica se ha observado que hay un importante daño celular. El EEP, en concentraciones de 0.25 mg/ml, inhibe la formación del tubo germinativo, lo que revela que el EEP tiene efecto sobre el proceso morfogénico en *Candida albicans*, previniendo la transformación de levadura a micelio. Un resultado similar fue reportado en *Cryptococcus neoformans* (Quintero, 2011).



## **1.6 ANTECEDENTES DE LOS USOS DEL KETOCONAZOL COMO ANTIFÚNGICO**

El primer derivado azólico que estuvo disponible en el mercado fue el miconazol, aunque el primero de uso oral y efectivo como antifúngico fue el ketoconazol seguidos por otros compuestos que intentan superar a sus predecesores, tanto en su espectro clínico como en su inocuidad. Todos tienen un mecanismo de acción en común, ya que actúan inhibiendo al citocromo P-450 a través de la inactivación de la enzima C-14- $\alpha$ -desmetilasa, precursora del lanosterol, esterol base de la síntesis del ergosterol de la pared de la membrana celular, aumentando la permeabilidad de la membrana e interrumpiendo el crecimiento del hongo.

El ketoconazol es un derivado imidazólico que surge en la década de los 80, tiene un amplio espectro de acción y la facilidad de darse vía oral. Es efectivo contra *Blastomices dermatitidis*, *Candida albicans*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides braziliensis*, moderadamente efectivo en criptococosis e inefectivo contra *Aspergillus*. Por su eficacia en estas micosis, junto a su fácil administración, ha sido ampliamente utilizado en los últimos años con buenos resultados, en ocasiones sustituye a otros antifúngicos de uso parenteral. Se usa en dosis de 200 a 600 mg diarios repartidos en 2 tomas. La ingestión de alimentos disminuye su absorción y tiene poca penetración en el SNC. Requiere un pH ácido para su absorción. El ketoconazol ha sido usado además como profiláctico en pacientes inmunocomprometidos (Martínez, 2008).



## **2 JUSTIFICACIÓN**

La inclinación del hombre hacia el aprovechamiento de los productos apícolas, en especial el propóleo, se ha convertido en una opción para satisfacer las carencias en nutrimentos, o para ser empleados en el tratamiento de diversas enfermedades (Londoño, 2008).

*Candida albicans* es uno de los agentes etiológicos más comunes de las micosis oportunistas en animales y de mayor distribución geográfica. Se sabe que el propóleo inhibe el crecimiento de esta levadura, sin embargo, se conoce poco sobre los posibles mecanismos de acción del propóleo sobre los hongos, por ello la importancia de este trabajo es observar alteraciones morfológicas y estructurales producidas por el propóleo.

Debido a la acción antimicótica del propóleo es conveniente apoyar el desarrollo de prototipos farmacológicos elaborados con propóleo mexicano como una alternativa de tratamiento natural (Tovar, 2016).

## **3 HIPÓTESIS**

Si el propóleo mexicano tiene un efecto antimicótico sobre *Candida albicans*, es posible que éste origine alteraciones en la estructura celular de este microorganismo.

## **4 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar mediante el uso de la microscopía electrónica de barrido el posible daño en la estructura celular de *Candida albicans* producidos por el Extracto Etanólico de Propóleo (EEP) de FES Cuautitlán, Estado de México.

## **5 OBJETIVOS PARTICULARES**

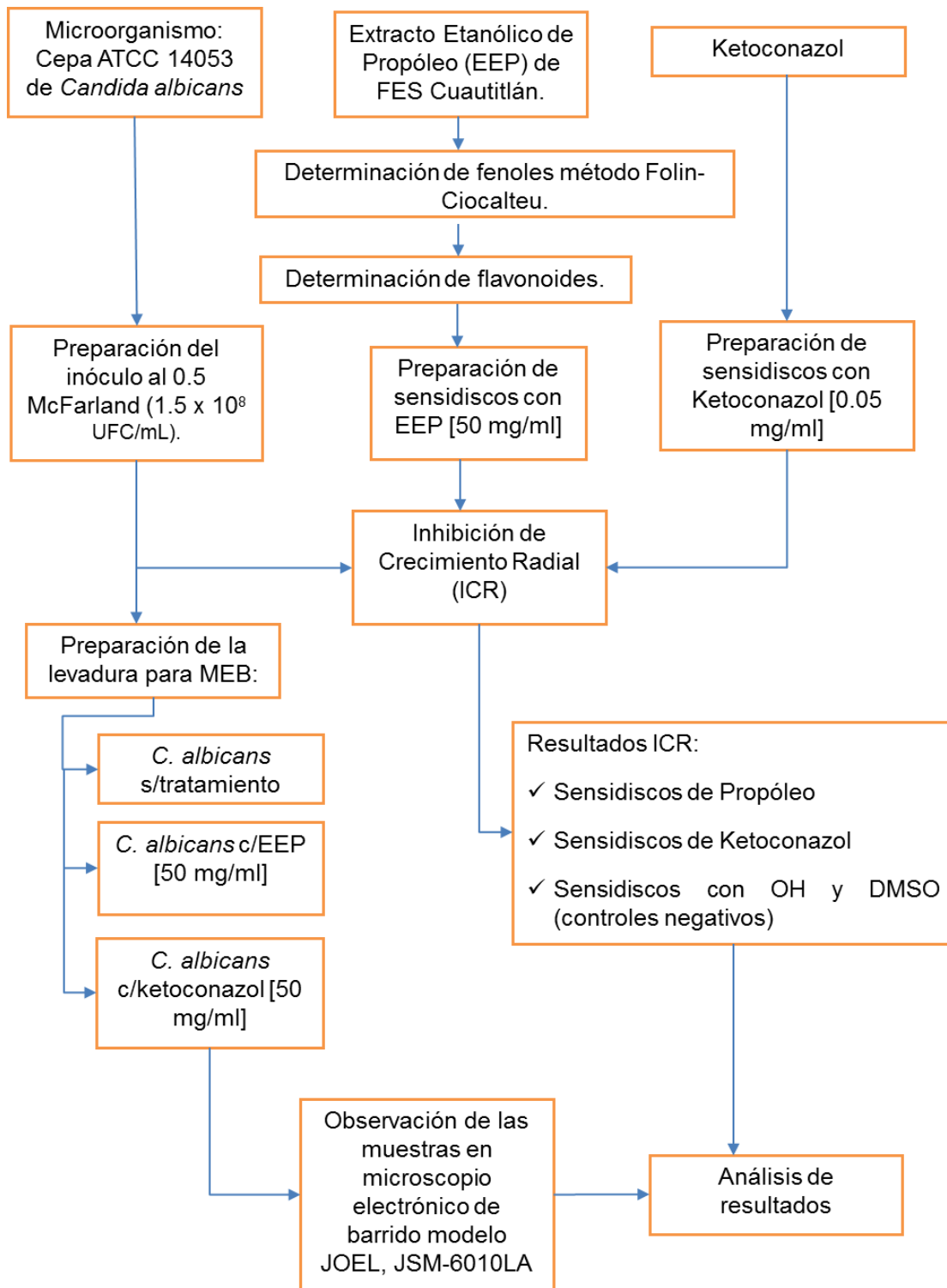
1. Determinar cuantitativamente el porcentaje de fenoles en el Extracto Etanólico de Propóleo de FES Cuautitlán.



2. Determinar cuantitativamente el porcentaje de flavonoides en el Extracto Etanólico de Propóleo de la FES Cuautitlán.
3. Realizar la prueba de Inhibición de Crecimiento Radial (ICR) de *Candida albicans* para comprobar el efecto del EEP y compararlo con el efecto del ketoconazol.
4. Observar mediante Microscopía Electrónica de Barrido la morfología clásica de una cepa ATCC de *C. albicans* sin tratamiento.
5. Evaluar mediante microscopía electrónica de barrido el efecto antimicótico que causa el EEP de FES Cuautitlán sobre la morfología y/o estructura de *Candida albicans* ATCC No. 14053
6. Evaluar mediante microscopía electrónica de barrido el efecto antimicótico que causa el ketoconazol sobre la estructura celular de la cepa de *Candida albicans* ATCC No. 14053 para comparar con la acción antimicótica del EEP de FES Cuautitlán.



## 6 DISEÑO EXPERIMENTAL





## 7 MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Microorganismo

Se utilizó una cepa de *Candida albicans* ATCC 14053. Para este trabajo experimental, se activó la cepa sembrando la levadura en cajas de Petri con agar dextrosa Sabouraud (SDA), dejándola incubar por 48 horas a 37°C. Al término del tiempo se retiraron las cajas de la estufa y se preparó el inóculo con Solución Salina Fisiológica (SSF) estéril hasta igualar por turbidez al No. 0.5 de McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL).

### 7.2 Extracto Etanólico de Propóleo

Se utilizó uno elaborado con propóleo proveniente de los apiarios de FES Cuautitlán, Estado de México. Para extraer los compuestos se utilizó alcohol al 70% y se dejó macerar durante una semana, dejando el recipiente en un lugar oscuro y agitando cada uno de los días, al término de la semana se eliminó el alcohol con un rotovapor. El EEP fue proporcionado por el Laboratorio 6 de Bioprospección Microbiológica de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) de la FES Cuautitlán.

#### a) Determinación de fenoles (método Folin-Ciocalteu)

Para el análisis se prepararon dos soluciones estándar, una de ácido gálico a una concentración de 0.2 mg/mL, que se mantuvo en refrigeración a 4°C y protegida de la luz y otra de carbonato de sodio al 2%.

Por otra parte, se preparó una solución estándar a una concentración de 0.2 mg/mL del propóleo; de ésta se tomaron 250  $\mu$ L y se agregaron 750  $\mu$ L de agua destilada para obtener una concentración de 0.05 mg/mL.

Para la lectura de los resultados se realizó una curva de calibración con las siguientes concentraciones seriadas 0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.2 mg/mL a partir de la solución estándar de ácido gálico. Posteriormente, a cada



concentración se le adicionó el reactivo de Folin-Ciocalteu y se esperó 5 minutos, posteriormente se adicionó 1.5 ml de la solución de carbonato de sodio y se dejaron las concentraciones 2 horas a temperatura ambiente, para que se lleve a cabo la reacción y determinar la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro de absorción UV-VIS. La muestra de propóleo se trabajó del mismo modo que cada una de las concentraciones de ácido gálico.

Los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico/g de extracto o en porcentaje (%), los valores por encima de 5% o 5 equivalentes de ácido gálico de extracto indican que la muestra es de calidad y puede presentar actividad biológica **[NOM-003-SAG/GAN-2017]**.

#### **b) Determinación de flavonoides**

Para esta determinación se prepararon dos reactivos, el primero fue una solución estándar de quercetina (1mg/mL) la cual se protegió de la luz y en refrigeración, también se preparó una solución de tricloruro de aluminio al 2%.

A partir de la solución estándar de quercetina se tomaron alícuotas para obtener concentraciones seriadas de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 µg/mL (ppm) y con ellas preparar la curva de calibración. Posteriormente a cada concentración se le adicionó 3 mL de la solución de tricloruro de aluminio, dejando reposar 10 min. Para que se lleve a cabo la reacción y determinar la absorbancia a 415 nm por espectrofotometría de absorción UV-VIS.

La muestra de propóleo se preparó igual que en la determinación de fenoles y se le agregó el tricloruro de aluminio como se indica en el párrafo de arriba.

El contenido total de flavonoides se expresa como mg de equivalentes de quercetina (QE)/g de extracto o en porcentaje (%). Los valores por encima de 0.5% ó 0.5 equivalentes de quercetina /g de extracto indican que la muestra es de calidad y que puede presentar actividad biológica biológica **[NOM-003-SAG/GAN-2017]**.





### c) Preparación de sensidiscos con EEP de FES Cuautitlán

En tubos eppendorf se pesaron 2 mg, 4 mg, 8 mg, 16 mg, 32 mg, 50 mg, 64 mg y 128 mg de EEP de FES Cuautitlán y se les añadió 1 ml de Dimetil Sulfóxido (DMSO) para disolver. Se utilizaron sensidiscos estériles de papel filtro Whatman No. 5 de 5 mm de diámetro y se impregnaron con las concentraciones de EEP antes mencionadas. Para los controles negativos se impregnaron sensidiscos con alcohol al 70% y DMSO y para el control positivo se utilizó ketoconazol (Conazol, Laboratorios LIOMONT, 200mg) a una concentración de 0.05 mg/mL.

### 7.3 Inhibición de Crecimiento Radial

Para montar la prueba, a partir del inóculo se realizó un sembrado masivo en cajas de Petri con SDA y posteriormente se colocaron los sensidiscos impregnados con las diferentes concentraciones del EEP de FES Cuautitlán. También fueron colocados los sensidiscos con alcohol al 70% y DMSO (controles negativos) y sensidiscos con ketoconazol (control positivo). El ensayo se hizo por triplicado.

Las cajas se incubaron a 37°C durante 48 horas, haciendo una revisión a las 24 horas para monitorear la formación de halos de inhibición. Al terminar el ensayo, los halos fueron medidos con un Vernier.

### 7.4 Microscopía Electrónica de Barrido

Para el ensayo de MEB se trabajó con tres grupos de muestras:

#### a) *C. albicans* sin tratamiento para MEB

Se colocó en un tubo de ensaye 1mL de caldo dextrosa Sabouraud y 100 µL de inóculo de *C. albicans* ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL) para observar la estructura celular de *Candida albicans* sin efecto del ketoconazol y del EEP de FES Cuautitlán.

#### b) *C. albicans* con tratamiento de EEP de FES Cuautitlán

Para el tratamiento se pesaron 50 mg de EEP de FES Cuautitlán en un tubo eppendorf y se le añadió 1 mL de DMSO. Posteriormente, se colocó en un tubo de



ensaye 1mL de caldo dextrosa Sabouraud, 100  $\mu$ L de inóculo de *C. albicans* y 1 mL del EEP. Se dejó incubar por 48 h a 37°C.

**c) *C. albicans* con tratamiento de ketoconazol**

Se pesaron 0.05 mg de ketoconazol en un tubo eppendorf y se le añadió 1 mL de DMSO. A continuación, se colocó en un tubo de ensaye 1mL de caldo dextrosa Sabouraud, 100  $\mu$ L de inóculo de *C. albicans* y 1 mL de Ketoconazol. Se dejó incubar por 48 h a 37°C.

**7.5 Protocolo para levaduras que serán observadas mediante MEB**

Los tres grupos de muestras siguieron el mismo protocolo; El primer paso fue lavar la levadura, para ello se eliminó el caldo dextrosa Sabouraud mediante centrifugación a 1500 rpm por 2 minutos y se decantó el sobrenadante. Para lavar las muestras se les añadió PBS 1X, se agitó con el vórtex y se centrifugaron a 1500 rpm durante 2 minutos para después decantar el sobrenadante. Este procedimiento se llevó a cabo dos veces. Posteriormente, se fijó la levadura con 1 mL de glutaraldehído al 2% y se dejó incubar a 4°C durante 2 h. Después, se centrifugaron a 1500 rpm durante 2 minutos para eliminar el glutaraldehído y se decantó el sobrenadante. Para lavar se utilizó solución PBS 1X, se centrifugó a 1500 rpm durante 2 minutos y se decantó el sobrenadante. Para finalizar, se le añadió PBS 1X y se conservó a 4°C hasta la preparación de la muestra para observación a microscopio. Para observar las muestras en MEB se colocó una gota de cada una de las muestras fijadas en el portamuestras con cinta electroconductiva del microscopio electrónico de barrido y se incubó a 37°C durante 10 min para el secado de la misma. Por último, se bañó la muestra con oro a 10 microamperios durante 300 segundos en un cobertor iónico Denton VacuumDESKV. Finalmente, se observaron las muestras en el microscopio electrónico de barrido (JOEL, JSM-6010LA) que se localiza en la UIM de FES Cuautitlán Campo 4, cuya responsable es la M. en C. Sofía González Gallardo.



## 7.6 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó T de Student, con el paquete estadístico Graph Pad Prism 5 Project, Versión 5.01, 2007.

## 8 RESULTADOS

### 8.1 Extracto Etanólico de Propóleo

#### a) Porcentaje de fenoles en el EEP de FES Cuautitlán

Según la NOM-003-SAG/GAN-2017 *Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento*, los valores por encima de 5% indican que la muestra es de calidad y puede presentar actividad biológica.

❖ Porcentaje obtenido en la muestra: 27.4%

#### b) Porcentaje de flavonoides en el EEP de FES Cuautitlán

Según la NOM-003-SAG/GAN-2017 *Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento*, los valores por encima de 0.5% indican que la muestra es de calidad y puede presentar actividad biológica.

❖ Porcentaje obtenido en la muestra: 3.5%

### 8.2 Prueba de Inhibición de Crecimiento Radial

Debido a que todas las concentraciones del EEP de FES Cuautitlán que se utilizaron para el proyecto se expresaron en miligramos (mg), fue necesario la conversión de la concentración del Ketoconazol a miligramos como se muestra en el cuadro 2.



Antifúngico	Carga del disco	Carga del disco en mg
<b>Ketoconazol</b>	50 µg	0.05
<b>EEP de FES Cuautitlán</b>	50 mg	50

Cuadro 2. Conversión de los µg de ketoconazol a mg.

El promedio de los diámetros de los halos de inhibición producidos por EEP de FES Cuautitlán, ketoconazol, DMSO y Alcohol al 70% se expresan en el cuadro 3.

Antifúngico	Promedio de los diámetros de los halos de inhibición (mm)
<b>EEP de FES Cuautitlán</b>	1.85
<b>Ketoconazol</b>	24.83
<b>DMSO</b>	Negativo
<b>Alcohol al 70%</b>	Negativo

Cuadro 3. Promedio de los diámetros de los halos de inhibición producidos por el EEP de FES Cuautitlán, ketoconazol, DMSO y Alcohol al 70%.

Al comparar los halos de inhibición producidos por ambos tratamientos, se observó una mayor sensibilidad de la levadura hacia ketoconazol (fig. 1), sin embargo, sí hubo efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *C. albicans* ATCC 14053 con el tratamiento del EEP de FES Cuautitlán al formarse un halo de inhibición (fig. 2).

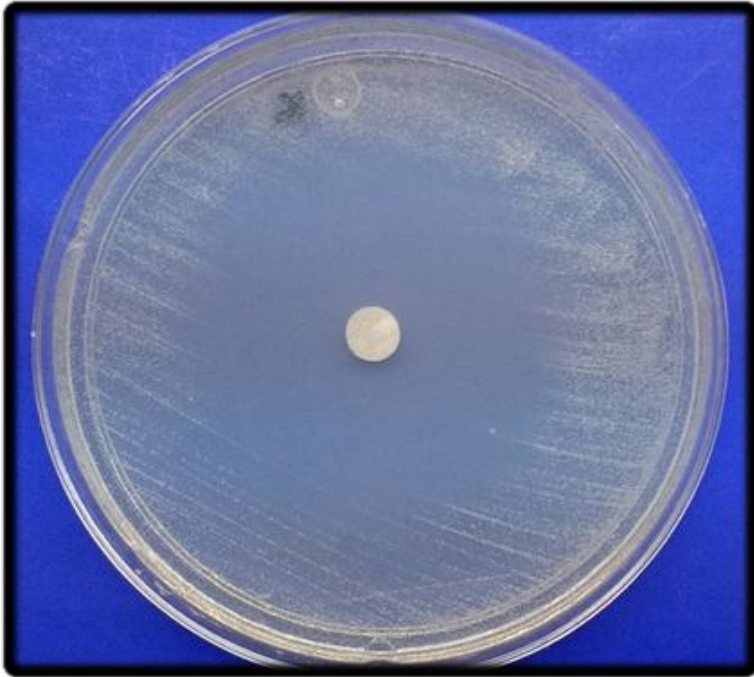


Fig. 1 Prueba de inhibición de crecimiento radial de *Candida albicans*; Ketoconazol 0.05 mg.

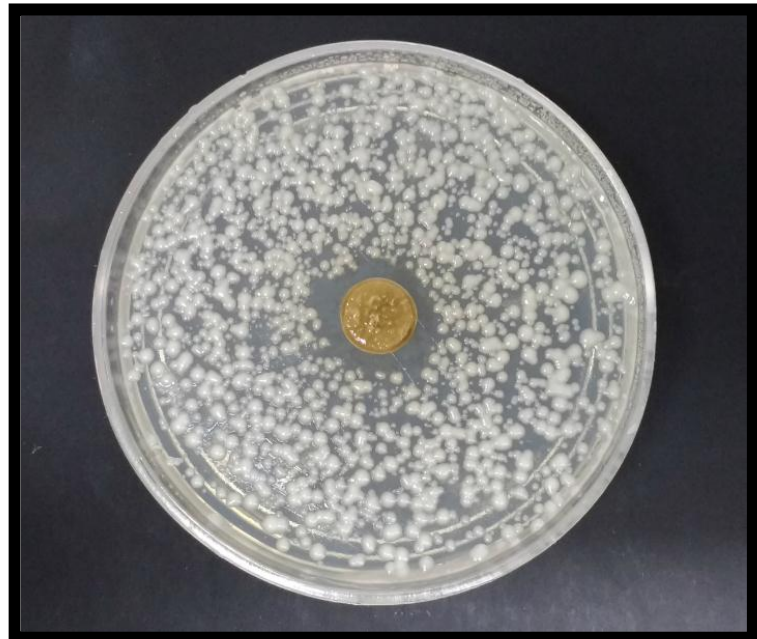


Fig. 2 Prueba de inhibición de crecimiento radial de *Candida albicans*; EEP de FES Cuautitlán 50 mg.



Por otro lado, no se observaron halos de inhibición con los sensidiscos impregnados con alcohol al 70% y DMSO (Figura 3).



Fig. 3 Controles negativos de la prueba de inhibición de crecimiento radial de *Candida albicans*; los sensidiscos impregnados con alcohol y DMSO no provocan la formación de halos de inhibición.

Al analizar estadísticamente los resultados, se demostró que la cepa de *C. albicans* ATCC 14053 es más sensible a ketoconazol a una concentración de 0.05 mg que al EEP de FES Cuautitlán a una concentración de 50 mg (figura 4).



### Promedio de los diámetros (mm) de los halos de inhibición producidos por EEP de FES Cuautitlán, ketoconazol, DMSO y Alcohol al 70%

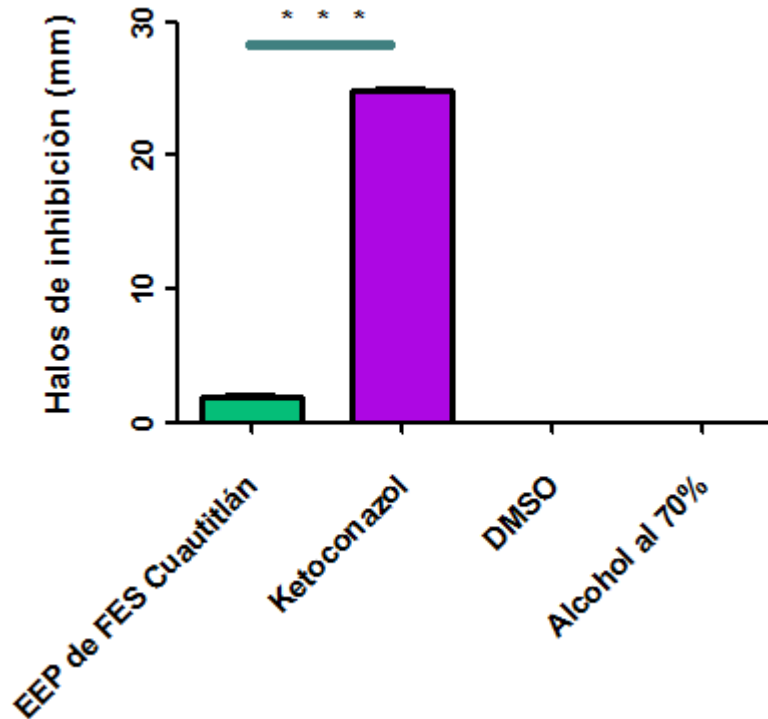


Fig. 4. La gráfica demuestra que *Candida albicans* ATCC 14053 fue más sensible al tratamiento con ketoconazol, sin embargo, también muestra una sensibilidad al tratamiento con EEP de FES Cuautitlán, mientras que con los controles negativos (DMSO y Alcohol al 70%), no hubo ninguna inhibición. Las mediciones de los halos de inhibición muestran una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

## 8.3 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

### a) *C. albicans* sin tratamiento

En las micrografías electrónicas de barrido de la cepa de *Candida albicans* ATCC 14053 sin tratamiento, las levaduras se observaron de forma oval con una superficie lisa e íntegra (figura 5 A). Algunas se observan agrupadas y en un estadio de gemación (figura 5 B).

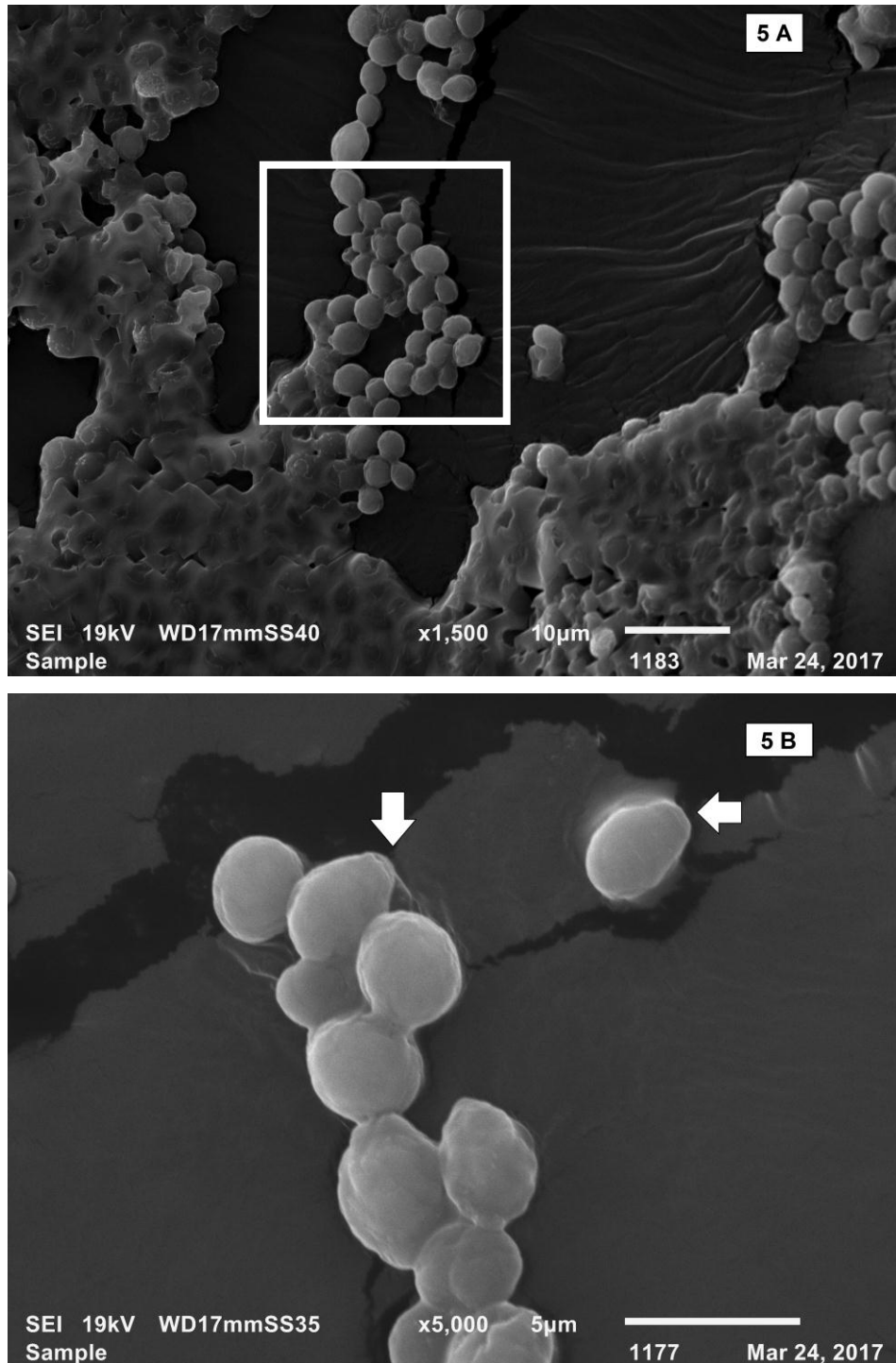


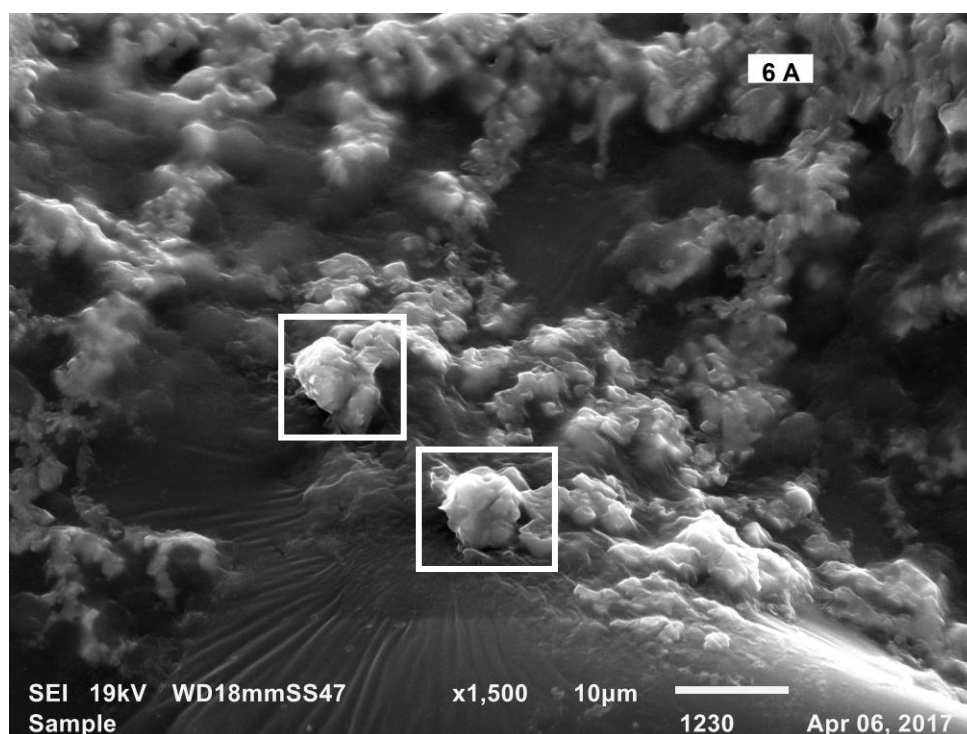
Fig. 5 Microscopía Electrónica de Barrido de *Candida albicans* cepa ATCC 14053 sin tratamiento de propóleo. 5A) *C. albicans* a 1500x formando racimos y con una morfología oval (cuadro). 5B) *C. albicans* a 5000x donde se muestra la forma de reproducción asexual de la levadura (gemación) (flechas).





**b) *C. albicans* con tratamiento de EEP de FES Cuautitlán**

Las levaduras presentaron un cambio en su morfología (figura 6 A); además se observaron con una superficie irregular, dando el aspecto de tener grumos y un aumento de tamaño (figura 6 B).



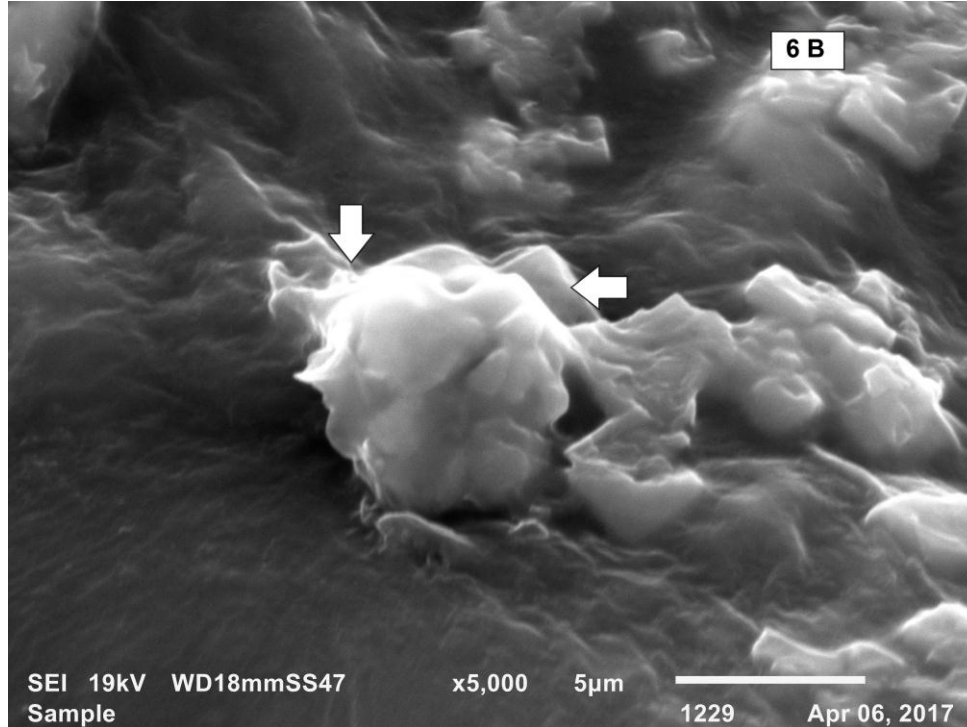


Fig. 6 Microscopía Electrónica de Barrido de *Candida albicans* cepa ATCC 14053 con tratamiento de EEP de FES Cuautitlán. 6A) Micrografía de la levadura a 1500x que muestra la forma redondeada a causa del tratamiento con EEP a una concentración de 50 mg/mL. 6B) Micrografía de la levadura a 5000x en donde se observa aspecto grumoso de *C. albicans* por efecto del tratamiento con EEP, además se observa la irregularidad en la superficie de las levaduras (flechas) y el aumento de tamaño.

### c) *C. albicans* con tratamiento de ketoconazol

La muestra que recibió el tratamiento con ketoconazol luce una superficie celular invaginada con pérdida de integridad y cambios en la morfología (figura 7 A y 7 B).

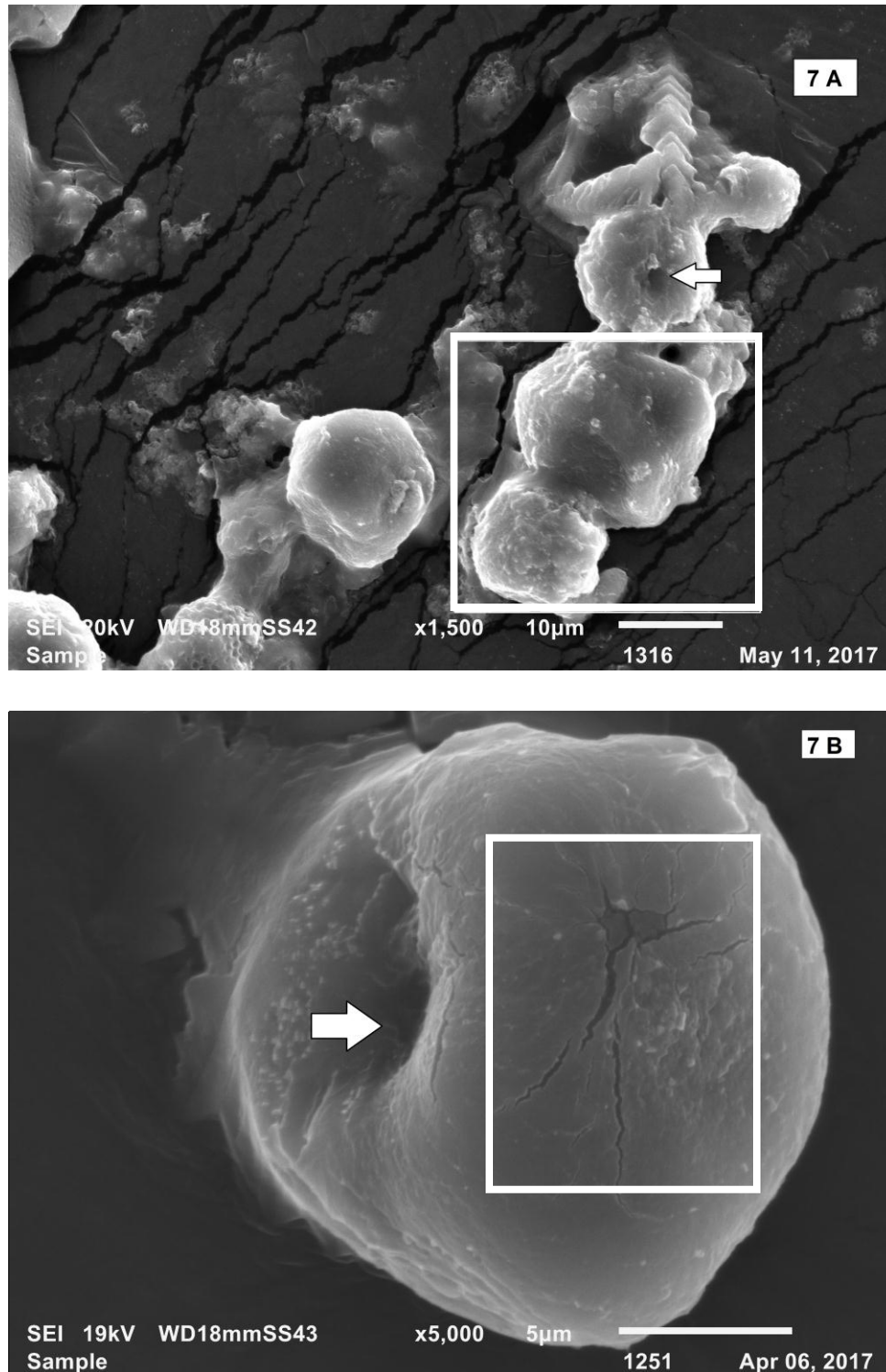


Fig. 7 Microscopía Electrónica de Barrido de *Candida albicans* cepa ATCC 14053 con tratamiento de Ketoconazol a 50 mg/mL. 7A) Se observan cambios en la morfología por un aumento en el tamaño de las levaduras (cuadro) además de tener un aspecto grumoso y la superficie invaginada (flecha), (1500x). 7B) Se aprecia la invaginación (flecha) y pérdida de la continuidad (cuadro) de la superficie de la levadura debido al tratamiento con el antifúngico (5000x).



El análisis estadístico de las mediciones de cinco levaduras con los daños más representativos de cada grupo de muestras de *C. albicans* ATCC 14053, determinó que la levadura sufre un aumento en su tamaño al ser tratada con EEP de FES Cuautitlán (figura 8)  $p < 0.0029$  y con ketoconazol (figura 9), siendo más evidente lo observado bajo el efecto de ketoconazol ( $p < 0.0002$ ).

**Figura 8. Comparación del tamaño de *Candida albicans* ATCC 14053 sin tratamiento y con tratamiento de EEP de FES Cuautitlán**

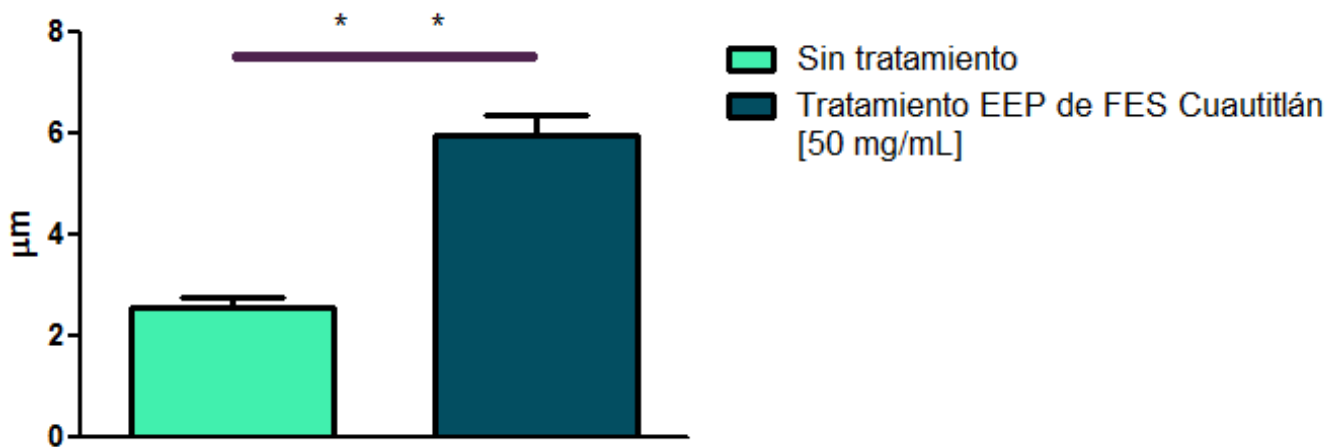


Fig. 8. Comparación del tamaño de *Candida albicans* ATCC 14053 sin tratamiento y con tratamiento de EEP de FES Cuautitlán. Se muestra una diferencia significativa en comparación con la que no tiene ningún tratamiento ( $p < 0.0029$ ).



**Figura 9. Comparación del tamaño de *Candida albicans* ATCC 14053 sin tratamiento y con tratamiento de ketoconazol**

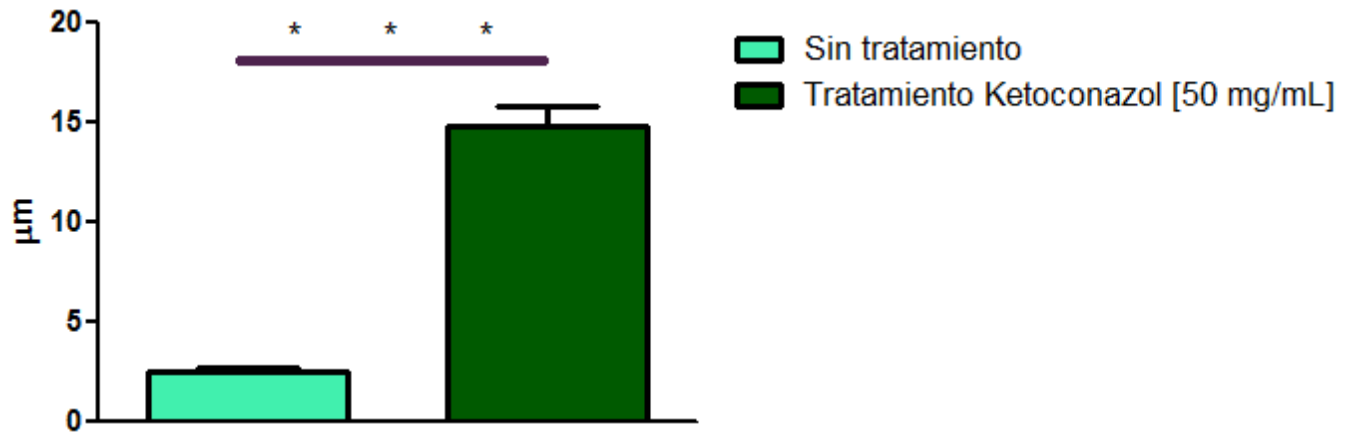


Fig. 9. Comparación del tamaño de *Candida albicans* ATCC 14053 sin tratamiento y con tratamiento de ketoconazol. En el tratamiento con el ketoconazol hay una diferencia aún más significativa en comparación con la que no se sometió a ningún tratamiento ( $p < 0.0002$ ).



## 9 DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antimicótica de propóleo mexicano proveniente de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán sobre *Candida albicans* y observar los cambios producidos en su estructura celular.

La cepa de *Candida albicans* ATCC 14053 es susceptible al EEP de FES Cuautitlán, debido a la concentración de fenoles y flavonoides que se evidenciaron estar presentes en este extracto al realizar estudios químicos conforme a la NOM-003-SAG/GAN-2017 *Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento*, la cual indica que valores por encima de 5% para fenoles y 0.5% para flavonoides, indican que la muestra es de calidad y puede presentar actividad biológica.

En estudios previos, Chee (2002) utilizó propóleo coreano y demostró mediante un ensayo de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y de Concentración Mínima Fungicida (CMF) que *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* eran sensibles a la acción del propóleo aún a concentraciones muy bajas. El estudio que realizó Chee, demostró que el propóleo tenía acción fungicida contra estos microorganismos y, además, observó la ruptura de *C. neoformans* al realizar MEB.

Quintero (2008), midió el efecto sobre el crecimiento de *C. albicans* de cuatro extractos etanólicos de propóleos mexicanos provenientes de Estado de México (Cuautitlán Izcalli y Amatepec), Puebla (Cholula) y Veracruz (Arroyo Colorado) mediante la determinación de la CMI por el método de dilución en agar, además de determinar si el efecto era fungicida o fungistático. Esta investigación demostró que el propóleo de mayor actividad biológica fue el que provenía de Cuautitlán Izcalli, Estado de México.



En la prueba de ICR, al hacer una evaluación comparativa de los halos de inhibición que formaron el EEP de FES Cuautitlán y Ketoconazol, se observó que el EEP causó inhibición de crecimiento, sin embargo, no superó el diámetro de los halos de inhibición del ketoconazol. Por otro lado, se confirma lo que Londoño (2008) observó en uno de sus estudios al realizar una evaluación del efecto biológico del propóleo de FES Cuautitlán al confrontarlo contra *C. albicans*, *C. neoformans* y *Aspergillus fumigatus*, por medio de la técnica de difusión en agar y microdilución en placa, donde demostró el efecto inhibitorio que el EEP de FES Cuautitlán tiene sobre estos microorganismos.

Este estudio contempló la determinación de los cambios morfológicos y/o estructurales de *Candida albicans* mediante la Microscopía Electrónica de Barrido; hasta la fecha no se han encontrado reportes que demuestren cambios estructurales en la levadura producidos por propóleo mexicano, sin embargo, Chee demostró a través de MEB que el propóleo coreano causó ruptura de *C. neoformans*, lo que sugiere la posible respuesta de *C. albicans* al propóleo mexicano. En este estudio, el EEP de FES Cuautitlán provocó la pérdida de la forma celular de *Candida albicans* (ATCC 14053), y un aumento significativo ( $p < 0.0029$ ) de tamaño celular; la superficie se tornó de aspecto grumoso, además de observarse pérdida de la continuidad de la pared celular. Estos cambios también fueron producidos por el ketoconazol. Lo anterior también fue observado por Mello et al. (2006), quienes realizaron un estudio mediante Microscopía Electrónica de Barrido que demostró que un propóleo verde brasileño alteró la superficie celular, además de que inhibió el desarrollo del tubo germinativo en *C. albicans* (ATCC 18804). Los autores especulan que lo anterior se debe a una interacción con los compuestos sulfidrilos celulares tal como lo hacen los imidazoles.

Hasta el momento no se había puesto en evidencia el daño que causa a nivel celular el propóleo mexicano sobre *C. albicans*, es por ello la importancia que



tiene este trabajo, pues da una explicación del efecto del propóleo sobre la levadura, por esto el propóleo puede considerarse como una alternativa de tratamiento en micosis superficiales producidas por *C. albicans*.

Para respaldar lo anterior, se recomienda realizar ensayos de MEB donde se evalúe el posible efecto del DMSO y del alcohol al 70% sobre *C. albicans* con el fin de descartar cualquier alteración en la levadura.





## 10 CONCLUSIONES

1. El propóleo de FES Cuautitlán tiene actividad antimicótica en contra la levadura *Candida albicans* ATCC 14053.
2. El propóleo a concentraciones de 50 mg/mL produjo cambios en la morfología de la levadura diferentes a los producidos por el ketoconazol; éstos fueron comprobados mediante microscopía electrónica de barrido.
3. En la microscopía electrónica de barrido se evidenció un cambio morfológico en la capa más externa de la levadura provocado por el EEP de FES Cuautitlán.
4. Con base en estos resultados, se fundamenta la posible utilización del propóleo como tratamiento alternativo de las micosis causadas por *Candida albicans*.



## 11 BIBLIOGRAFÍA

1. Arenas, R., 2011. *Micología médica ilustrada*. 4a ed. China: McGraw Hill.
2. Bedascarrasbure, E., L. M. A. Á. E. R., 2004. Contenido de fenoles y flavonoides del propóleo argentino. *Acta Farm. Bonaerense*, Volumen XXIII, pp. 369-372.
3. Bonilla Rodríguez, Y., V. M. M. B. M. H. G. P. C., 2012. Adherencia in vitro de *Candida albicans* en tres diferentes acondicionadores de tejidos usados en prostodoncia total. *Revista Odontológica Mexicana. Facultad de Odontología. UNAM.*, Volumen XVI, pp. 40-45.
4. Brooks, G., 2014. *Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología Médica*. China: McGraw Hill.
5. Diario Oficial de la Federación, 2016. *Norma Oficial NOM-003-SAG/GAN2016. Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento*. México, Secretaría de Gobernación.
6. Flores Rodríguez, I., 2015. *Evaluación terapéutica del propóleo en dermatomycosis equina. Tesis de licenciatura*. Estado de México: UNAM.
7. Hee Youn, C., 2002, In vitro evaluation of the antifungal activity of propolis extract on *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*, *Microbiology*, Volumen 2, pp. 93-95.
8. Jean-Prost, P., 2007. *Apicultura. Conocimiento de la abeja. Manejo de la colmena*, 4a ed. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
9. Londoño Orozco, A., J. G. P. C. C. G. G. T., 2008. Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja *Apis mellifera* proveniente del Estado de México. *Tecnología en marcha*, Volumen XXI-I, pp. 49-55.
10. Martínez, F.C, J. C. U. R. D. C. A., 2008. Tratamiento de las micosis profundas. Estado actual.. *Acta Médica*, Volumen 8, pp. 80-85.
11. Mello, A. M., R. T. G. S. R. L., 2006. The effect of Brazilian propolis on the germ tube formation and cell wall of *Candida albicans*. *Pharmacology on line*, Volumen 3, pp. 352-358.
12. Méndez Tovar, L., 2012. *Actualidades en micología médica*. México: Sefirot



13. Nogueira Marmolejo, M., 2014. *Evaluación antimicótica del propóleo sobre cepas de Saprolegnia spp aisladas del Ambystroma mexicanum (Ajolote de Xochimilco) que forman parte de la colección de animales de la DGZVS (Dirección General de Zoológicos y Vida Silvestre)*. Estado de México: UNAM.
14. Quinn, P., 2002. *Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias*. Zaragoza: Acribia.
15. Quintero Mora, M. L., A. L. O. P. H. H., 2008. Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento in vitro de *Candida albicans*. *Revista Iberoamericana de Micología*, Volumen XXV, pp. 22-26.
16. Quintero Mora, M. L., A. L. O. C. G. G. T., 2011. Structural and Genetic Alterations of Fungal Cells Caused by Mexican Propolis. *Formatex Research Center*, pp. 1069-1073.
17. Rebhum, W., C. G. C. R., 1995. *Enfermedades del ganado vacuno lechero*. Zaragoza: Acribia.
18. Rodríguez, F., 2011. *Apicultura para pequeños emprendedores. Manual teórico-práctico para el manejo comercial de la abeja*. Buenos Aires: Continente.
19. Rodríguez Pérez, B., 2015. *Perfil químico de propóleos mexicanos para su aplicación en medicina veterinaria. Tesis de maestría*. Estado de México: UNAM.
20. Root, A., 1978. *El ABC y XYZ de la apicultura. Enciclopedia de la cría científica y práctica de las abejas*. 37a ed. Argentina: Hemisferio Sur.
21. Segundo Zaragoza, C., R. A. C. O. A. E. D. W., 2011. Yeasts isolation from bovine mammary glands under different mastitis status in the Mexican High Plateau. *Revista Iberoamericana de Micología*, Volumen XXVIII-II, pp. 79-82.
22. Silva Rivera, V., 2016. *Análisis químico de una recoleta de propóleo de Zacatecas, México*. Ciudad de México: UNAM.
23. Spanemberg, A., E. A. W. D. I. B., 2008. Etiología de las mastitis bovina producida por levaduras en el sur de Brasil. *Revista Iberoamericana de Micología*, Volumen XXV, pp. 154-156.



24. Stanchi, N., 2005. *Microbiología Veterinaria*. Argentina: Inter-Médica.
25. Tovar Betancourt, N., 2016. *Evaluación antimicótica in vitro del propóleo mexicano sobre Malassezia pachydermatis*. Tesis de maestría. Estado de México: UNAM.
26. Vargas Rivadeneira, M. B., 2016. *Estudio de las propiedades antimicrobianas y antifúngicas de la miel de abeja (Apis mellifera) como tratamiento de infecciones causadas por Clostridium perfringens, Pseudomona aeruginosa, Candida tropicalis y Aspergillus brasiliensis*. Quito: Universidad de las Américas.
27. Vilorio, J. D., J. H. G. D. L. D. C. M. G., 2012. Caracterización fisicoquímica del propóleo de la región del Bajo Cauca Antioqueño (Antioquia, Colombia). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, Volumen X, pp. 77-86.



## 12 ANEXO

### 3er Congreso de Ciencia, Educación y Tecnología

Gómez Palacios R., Tovar Betancourt N., González Gallardo S., Mendoza Saavedra M., Cruz Sánchez T., **Efecto antimicótico de propóleos mexicanos sobre la estructura celular de *Candida albicans***, 2017.

3er CONGRESO DE CIENCIA, EDUCACIÓN Y TECNOLOGÍA

RECONOCIMIENTO

A: Gómez, Palacios Rosa Lilian, Tovar N., González S., MENDOZA M., Cruz, T.

Por su valiosa participación y asistencia en la exposición de cartel:

**“Efecto antimicótico de propóleos mexicanos sobre la estructura celular de *Candida albicans*”**

que se llevó a cabo del 19 al 22 de junio de 2017 en las instalaciones de esta Facultad

**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Cuautitlán Izcalli, Estado de México, junio de 2017

*Alma Luisa Revilla Vázquez*  
Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez  
Jefa de la División de Ciencias Químico Biológicas

3er CONGRESO DE CIENCIA, EDUCACIÓN Y TECNOLOGÍA



## IX Congreso Nacional de Micología Médica

Dr. Cruz Sánchez Tonatiuh Alejandro, Gómez Palacios Rosa Lilián, Tovar Betancourt Nelly, González Gallardo Sofía, Carillo Miranda Liborio, Mendoza Saavedra Marco Antonio, **Evaluación mediante microscopía electrónica de barrido del daño sobre la estructura celular de *Candida albicans* producida por propóleos mexicanos, 2017.**

