



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Efecto del GABA, dos análogos y un agonista en el
crecimiento de *Candida albicans*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Bióloga

P R E S E N T A:

Hokabek Ruiz Miguel

DIRECTORA DE TESIS:

**Dra. en C.B.M. Francisca Hernández
Hernández**



Ciudad Universitaria, CDMX.
2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Hoja de Datos del Jurado

Ruiz
Miguel
Hokabek
55 8354 8322
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología
312343549

2. Datos del Tutor

Dra.
Francisca
Hernández
Hernández

3. Datos del Sinodal 1

Dr.
Sigfrido
Sierra
Galván

4. Datos del Sinodal 2

M. en C.
María de los Ángeles Patricia
Manzano
Gayosso

5. Datos del Sinodal 3

M. en C.
Aurora
Saucedo
García

6. Datos del Sinodal 4

Biól.
Elva
Bazán
Mora

7. Datos del trabajo escrito

Efecto del GABA, dos Análogos
y un Agonista en el crecimiento de
Candida albicans.

80 p.
2019

Agradecimientos

Gracias a la Unidad de Micología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina por abrirme sus puertas durante dos años.

Gracias infinitas a la Dra. Francisca Hernández, por toda su paciencia, el cariño, la confianza, el conocimiento compartido y la atención brindada tanto a nivel profesional y personal. Ha sido totalmente gratificante el trabajar con usted, tuve la oportunidad de aprender demasiado bajo su tutela.

A la QFB. Erika Córdova por su asesoría y todo el apoyo técnico durante el desarrollo del presente trabajo. Gracias por tu compañía, tus consejos y reprimendas cuando fueron necesarios.

Gracias a todos los profesores del taller *Biología de Hongos de Importancia Médica* por las clases y el conocimiento compartido a lo largo de los niveles y seminarios que me ayudaron a crecer académica y profesionalmente, y por toda su disposición y apoyo ante cualquier duda o solicitud expresada.

Gracias a mi familia, por su incondicional motivación, el apoyo, la confianza y por creer en mí durante toda la carrera y principalmente durante la etapa experimental. Gracias por esos pequeños a grandes detalles y toda la paciencia que me han tenido.

Gracias a mis amigos, compañeros y cómplices que siempre tuvieron palabras de apoyo, abrazos y risas, ha sido maravilloso conocerlos y compartir momentos con cada uno.

Gracias al *Sistema de Becas para Estudiantes Indígenas y Afrodescendientes* por el apoyo brindado a lo largo de la carrera, por la motivación y el enseñarme que no hay orgullo más grande que el poder hablar de mis raíces y como éstos, nunca serán sinónimo de limitantes, si no, de lo afortunada que soy por pertenecer y llegar hasta aquí. Sin su apoyo, quizá la oportunidad de presentar este trabajo se hubiese quedado sólo en un sueño.

Y principalmente, quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México. Ha sido un segundo hogar durante tantos años y ha estado sumamente presente en etapas importantes de mi vida, permitiéndome así, conocer a personas, disciplinas y sitios tan maravillosos y especiales, ayudándome a crecer como persona y a formarme como profesionista. Estoy infinitamente agradecida y feliz de pertenecer a esta máxima casa de estudios. Gracias por tanto y por todo.

“Por Mi Raza Hablará El Espíritu”

“Era como un nuevo mundo abierto para mí, el mundo de la ciencia, que por fin se me permitió conocer en toda libertad”
Marie Curie

“La ciencia se compone de errores, que, a su vez, son los pasos hacia la verdad”
Julio Verne

“La mayoría de la gente dice que el intelecto es lo que hace a un gran científico. Están equivocados: es el carácter”
Albert Einstein.

Índice General

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Ácido γ -Aminobutírico	2
Agonistas: Benzodiazepinas	4
Lorazepam	5
Análogos de GABA: Pregabalina y Gabapentina	6
GABA y los microorganismos	9
Género <i>Candida</i>	9
Patologías causadas por <i>Candida spp.</i>	10
Candidosis invasiva	12
Pruebas diagnósticas	13
<i>Candida albicans</i> , el cambio de forma y la patogenicidad	15
ANTECEDENTES	16
HIPÓTESIS	18
OBJETIVOS	19
General	19
Particulares	19
MATERIAL Y METODOLOGÍA	19
Aislado Clínico e Inóculo	19
Preparación de Medio de Cultivo	20
Preparación de solución de fármacos	20
Gabapentina (GBP)	20
Pregabalina (PGB)	20
GABA	21
Lorazepam (LZP)	21
Condiciones de incubación. Efecto de la dosis única de los fármacos	22
Efecto de la adición periódica de los diferentes fármacos	23
Combinación de fármacos	23
Diseño Experimental	24
RESULTADOS	25
Efecto de Gabapentina, Pregabalina, GABA y Lorazepam en dosis única sobre el crecimiento de <i>Candida albicans</i>	25
Densidad Óptica	25
Número de Células (levaduras x mL) y UFCs	27
Efecto de los diferentes medicamentos en la morfología de <i>Candida albicans</i>	28
Análisis estadístico integral de los fármacos	30
Efecto de Gabapentina, Pregabalina, GABA y Lorazepam en dosis periódicas sobre el crecimiento de <i>Candida albicans</i>	31
Densidad Óptica	31
Número de Células (levaduras x mL) y UFC	33
Efecto de los diferentes medicamentos en la morfología de <i>Candida albicans</i>	34
Análisis estadístico integral de los fármacos adicionados periódicamente	37
Efecto de Gabapentina, Pregabalina, GABA en combinación (dosis única) sobre el crecimiento de <i>Candida albicans</i>	37
Densidad Óptica	37
Número de Células (levaduras x mL) y UFCs	39
Efecto de la combinación de medicamentos sobre la morfología de <i>Candida albicans</i>	40
Análisis estadístico integral por combinación de fármacos	41

Efecto de Gabapentina, Pregabalina, GABA en combinación (dosis periódica) sobre el crecimiento de <i>Candida albicans</i> -----	42 -
Densidad Óptica-----	42 -
Número de Células (levaduras x mL), UFC y Análisis Estadístico -----	44 -
Efecto de la combinación de medicamentos sobre la morfología de <i>Candida albicans</i> -----	44 -
Análisis estadístico integral por combinación de fármacos -----	46 -
DISCUSIÓN -----	48 -
CONCLUSIONES-----	52 -
PERSPECTIVAS-----	53 -
BIBLIOGRAFÍA -----	54 -
ANEXOS -----	61 -

RESUMEN

El ácido γ -aminobutírico (GABA), es un aminoácido no esencial presente en distintos organismos. En algunos hongos el GABA es una fuente de nitrógeno y carbono. En el humano este neurotransmisor está localizado en el cerebro, en otros tejidos y en células del sistema inmune. En la práctica médica, medicamentos análogos (como gabapentina y pregabalina) y agonistas (benzodiazepinas como lorazepam) son utilizados para contrarrestar el exceso de Cloro y la deficiencia de Calcio en las neuronas.

Candida albicans forma parte de la microbiota humana. Durante el efecto de diversos factores de riesgo, la levadura cambia su velocidad de crecimiento y su morfología de levadura a hifa, relacionado con la invasión a los tejidos. Se ha descrito que GABA y algunos derivados tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *C. albicans*: la formación del tubo germinativo y de biopelículas. El objetivo de este estudio fue determinar si en nuestras condiciones experimentales el GABA, dos análogos y un antagonista, a diferentes concentraciones, solos o combinados, ejercen un efecto en el crecimiento de *C. albicans in vitro*.

A partir de una suspensión de cultivo reciente, *Candida albicans* fue depositada en medio mínimo sintético (MMS), al cual se le añadió GABA, pregabalina, gabapentina y/o lorazepam, en dosis inicial, periódica o en combinación; se incubó a 37°C en agitación. Posteriormente se tomaron alícuotas por duplicado para medir la Densidad Óptica a las 0, 18, 24, 48 y 72 horas. Se contó el número de levaduras, y se determinó la viabilidad celular por subcultivo en agar dextrosa Sabouraud. Se tomaron 15 μ l del cultivo para la realización de la observación microscópica de su morfología en los mismos tiempos previamente mencionados.

Se realizaron tres pruebas estadísticas (ANOVA, prueba de Tukey y Comparaciones múltiples mediante el Método de Dunnett) para evaluar diferencias significativas en el crecimiento de *Candida albicans* con los fármacos de los cuales, en dosis única y en combinación no hubo diferencias entre estos. Lorazepam fue significativamente distinto entre los fármacos y pruebas ya mencionados, en dosis única fue dosis-dependiente en inhibición y en dosis periódica inhibió el crecimiento y la viabilidad celular de *C. albicans*. En el estudio morfológico se observó que la pregabalina y en menor proporción la gabapentina, indujeron la formación de pseudohifas en las levaduras, bajo la acción de una dosis inicial como durante la adición periódica o combinada de los medicamentos. Se concluye que la pregabalina y gabapentina favorecen la transformación de levadura a pseudohifa, estructura fúngica que es considerada como un factor de virulencia del hongo. Es posible que los análogos de GABA puedan influir en el desarrollo de la candidosis invasiva y el lorazepam inhiba el crecimiento de *Candida albicans*.

INTRODUCCIÓN

Ácido γ -Aminobutírico

El ácido γ -aminobutírico (GABA) es un aminoácido pequeño ($C_4H_9NO_2$), compuesto por un grupo amino y un grupo carboxilo (**Figura 1**), por mucho tiempo fue considerado como un producto del metabolismo de bacterias, hongos y plantas, posteriormente su presencia fue reconocida en el cerebro humano (Reyes-García *et al.*, 2012). En la actualidad se sabe que es el principal neurotransmisor inhibitorio del Sistema Nervioso Central (SNC) y periférico (SNP). Se le encuentra, junto con sus receptores específicos en las neuronas, en tejidos periféricos de testículos, ovarios, páncreas, intestino y células del sistema inmune como macrófagos, células dendríticas y linfocitos (Jin *et al.*, 2013).

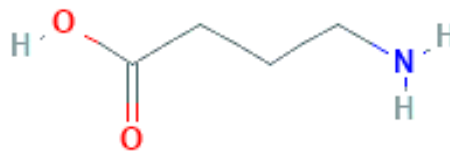


Figura 1. Estructura del ácido gamma aminobutírico. Tomada de: PubChem, 2019.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/119>

En los humanos, el GABA, se produce principalmente en el encéfalo a partir del glutamato, en un proceso conocido como desviación del GABA (GABA shunt), en el que la enzima glutamato-descarboxilasa (GAD; isoformas GAD65 y GAD67) convierte el glutamato en GABA. En el proceso contrario, el GABA se metaboliza en semialdehído succínico por la acción de la GABA transaminasa (GABA-t), que después pasa a ácido succínico, el cual, durante el ciclo de Krebs produce el alfa-cetoglutarato que en presencia de GABA-t, regenera al glutamato (**Figura 2**) (Shelp, *et al.*, 1999; Jin, *et al.*, 2013).

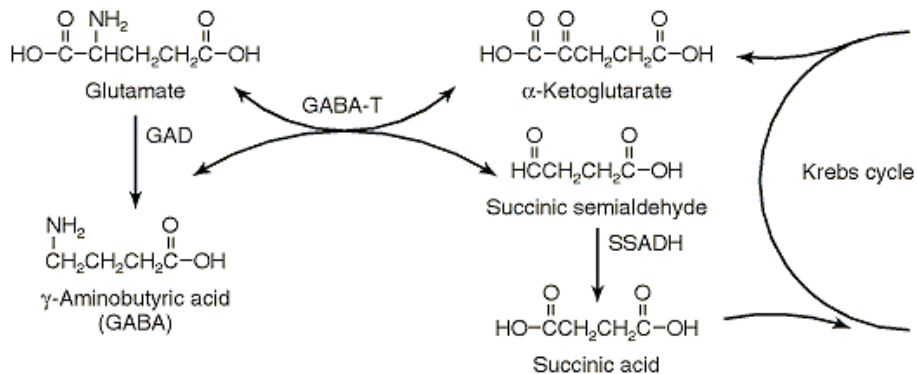


Figura 2. Desviación de GABA. Tomado de Siegel *et al.*, **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 1999.**

El GABA ejerce su acción al unirse a 3 tipos de receptores de superficie: A, B y C. Los receptores de GABA_A (GABA_AR) y GABA_C (GABA_CR) son canales iónicos que se activan por el ligando (ionotrópicos). Los GABA_AR son estructuras heterodiméricas y son codificados por diferentes genes, cuyos productos corresponden a 19 subunidades (α 1–6, β 1–3, γ 1–3, δ , ϵ , θ , π , ρ 1–3) (Prud'homme *et al.*, 2015; Barrargan *et al.*, 2015). Los GABA_CR se forman sólo por las subunidades ρ 1 y ρ 2 y funcionan de manera parecida a los GABA_AR, aunque son distintos estructuralmente. Los receptores de GABA tipo B (GABA_BR) se encuentran acoplados a las proteínas G triméricas (GPCR), por lo que se considera metabotrópicos. Estos receptores se expresan tanto en neuronas como los tejidos periféricos ya mencionados (Bormann, 2000; Versele *et al.*, 2001).

Los receptores de GABA, principalmente GABA_A, pueden interactuar con fármacos de uso clínico como los flavonoides o benzodiazepinas (Estrada-Reyes *et al.*, 2012), en el caso de las benzodiazepinas, éstas se utilizan para el tratamiento de la epilepsia, el insomnio y la depresión, entre otros trastornos. Además, el GABA_AR también se relaciona con el consumo de alcohol; éste actúa sobre dicho receptor reduciendo la tensión y la inhibición en el individuo, provocando bienestar, por lo que interviene junto con otras sustancias y procesos neuronales en la adicción a dicha sustancia (Méndez-Díaz, *et al.*, 2010).

Cuando GABA se une a los GABA_AR, provoca una hiperpolarización de la membrana plasmática dado que genera un cambio conformacional que abre el canal iónico de cloro; este proceso hace a la permeable membrana al ion Cl⁻, inhibiendo la transmisión de impulsos nerviosos y causando efectos tranquilizantes, sedantes o ansiolíticos (Estrada-Reyes *et al.*, 2012). Por otra parte, cuando GABA se une a los GABA_BR se produce una disociación de las subunidades α , β y γ , responsables de la señalización intracelular por segundos mensajeros de las células que los poseen (Heaney and Kinney, 2016).

Los estudios de GABA, se han enfocado a la creación de fármacos, y al papel como posible coadyuvante de la respuesta inmune en humanos en condiciones de estrés (Abdou *et al.*, 2006). En los últimos años GABA también ha sido utilizado como suplemento alimenticio con el objetivo de beneficiar la salud de los individuos, mejorando la calidad del sueño o reduciendo la ansiedad, este uso se ha puesto en duda al no tener claro el mecanismo de acción del GABA; desconociendo si ejercen sus efectos en el SNC atravesando la barrera hematoencefálica o fuera de él, en el sistema nervioso entérico (SNE). Se tiene el concepto de que su participación en este aminoácido no atraviesa la barrera hematoencefálica (Boonstra *et al.*, 2015).

Un ejemplo del papel del GABA, en procesos infecciosos es *Toxoplasma gondii*. Este parásito utiliza el GABA del humano infectado como fuente de carbono en su metabolismo y se ha propuesto que interviene en el desarrollo de las convulsiones en los pacientes con toxoplasmosis como consecuencia de la interferencia en la señalización cerebral. En un estudio reciente en ratones infectados con *Toxoplasma* tipo II ME49, se observó que este parásito altera de manera específica las sinapsis GABAérgicas y tiene una relación con la actividad convulsiva (Brooks *et al.*, 2015).

La alteración en la función GABAérgica se asocia a trastornos como la drogadicción, epilepsia, esquizofrenia, ansiedad, Parkinson, demencia senil, Alzheimer y enfermedades como la Corea de Huntington (Cortes-Romero *et al.*, 2011; Diana *et al.*, 2014; Wong *et al.*, 2003). Se ha sugerido que entre el 30 y 40% de las neuronas utilizan el GABA como neurotransmisor, por lo que de ello deriva su importancia como mensajero químico en el tejido nervioso, y su presencia es de gran importancia en la función sensitiva, motora y cognitiva de los individuos (Cortes-Romero *et al.*, 2011). El estudio de las interacciones GABAérgicas en el sistema inmune se ha centrado en tres aspectos principales: 1) la expresión de GABA y la maquinaria molecular GABAérgica correspondiente; 2) la respuesta *in vitro* de células inmunes; y 3) las aplicaciones terapéuticas en las enfermedades autoinmunes (Prud'homme *et al.*, 2015).

Agonistas: Benzodiazepinas

Las benzodiazepinas son fármacos cuya estructura química se compone de un anillo de siete miembros heterocíclicos unidos a un anillo aromático con cuatro grupos fundamentales, los cuales pueden realizar sustituciones sin pérdida de actividad, por lo que a las benzodiazepinas clásicas se les denomina 1,4-benzodiazepinas debido a que el nitrógeno ocupa la primera y cuarta posiciones del anillo de diazepina (Sankar, 2012).

La primera benzodiazepina fue sintetizada en 1961 en los laboratorios Hoffman la Roche. Sin embargo, su actividad farmacológica fue descubierta en una prueba de detección sistemática convirtiendo a las benzodiazepinas en uno de los fármacos más prescritos por sus importantes efectos como sedantes o ansiolíticos, anestésicos, anticonvulsivos, relajantes musculares e inductores del sueño (Rang, 2008; Singh *et al.*, 2010).

Las benzodiazepinas son agonistas que potencian de forma selectiva los efectos de GABA en los receptores GABA_A. En este receptor existe un lugar accesorio de benzodiazepinas llamado "receptor de benzodiazepinas", por lo que

aumentan la captación de GABA y aumentan su efecto agonista con ayuda de un fármaco adecuado perteneciente a este grupo, por ejemplo, diazepam (**Figura 3**) (Rang, 2008). Las benzodiacepinas no actúan sobre los receptores de otros aminoácidos como el de glicina o el de glutamato. Por lo que esta sustancia forma parte de los agonistas de la molécula de GABA, que, a diferencia de los barbitúricos, tienen el papel de aumentar la apertura de los canales de cloro, facilitando la apertura del canal mediante el neurotransmisor GABA (Rang, 2008).

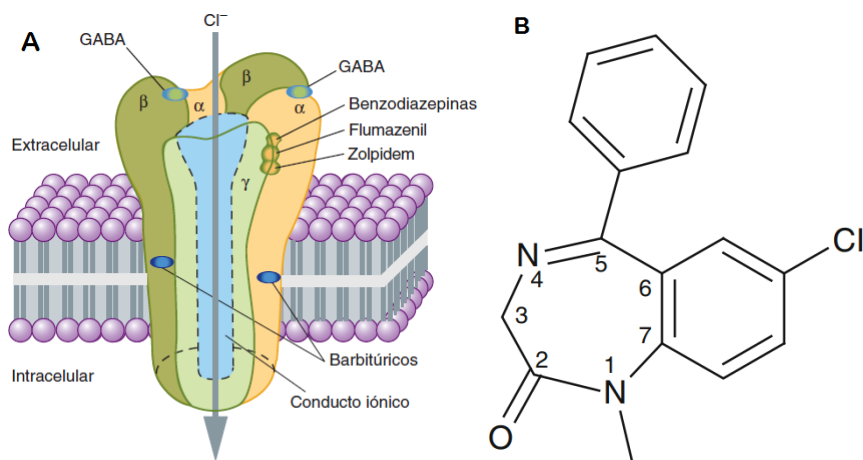


Figura 3. **A)** Receptor GABA_A. Tomada de: Katzung, 2015. “*Farmacología Básica y Clínica*” 13ed. <https://www.accessmedicina.com>. **B)** Estructura química de una 1,4-benzodiacepina (Diazepam) Tomada de: Sankar, 2012. “*GABAA Receptor Physiology and Its Relationship to the Mechanism of Action of the 1,5-Benzodiazepine Clobazam*”.

Sin embargo, se ha demostrado que estos fármacos tienen muchos efectos secundarios, como somnolencia, disminución de habilidades psicomotoras, dependencia, hipersensibilidad, insuficiencia respiratoria, entre otros. Las benzodiacepinas tienen un alto potencial adictivo en caso de abuso crónico y en algunos casos se ha reportado que pueden llegar a intensificar los síntomas, tales como depresión intensa, ansiedad e insomnio como efecto rebote ante la tolerancia a la dosis (Lopez-Vantour *et al.*, 2010; Goodman y Gilman, 2015).

Lorazepam

Un ejemplo de una benzodiacepina es el lorazepam, el cual es un medicamento ansiolítico, hipnótico-sedante, anticonvulsivo y relajante muscular. Es eficaz para el tratamiento contra la ansiedad en pacientes que sufren neurosis ansiolítica y ansiedades a corto plazo, en tensión asociadas con estrés, en premedicación quirúrgica, como coadyuvante en fármacos antieméticos y también es usado para el tratamiento de náuseas y vómito asociado con la quimioterapia para el tratamiento del cáncer. Tiene una duración de acción corta de 12–18 horas y

actúa de manera selectiva en los receptores GABA_A, aumentando la respuesta a esta sustancia (GABA) y con ello la apertura de los canales de cloro. Tiene una buena absorción en la mucosa gastrointestinal y alcanza concentraciones plasmáticas máximas en 30 a 60 min (Rang, 2008; Rodríguez-Carranza, 2013). Químicamente está compuesta por un anillo bencénico y un anillo diazepínico (Figura 4).

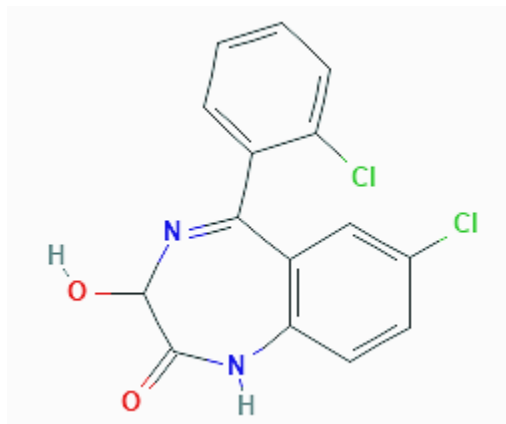


Figura 4. Estructura química de Lorazepam. Tomada de: PubChem, 2019. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lorazepam>

Análogos de GABA: Pregabalina y Gabapentina

Ambos compuestos son derivados y análogos de GABA (Figura 5), los cuales ejercen efectos analgésicos sobre dolores neuropáticos por lo que constituyen los fármacos de primera línea más empleados para el tratamiento de neuropatías (Hewitt *et al.*, 2016). Ambos compuestos tienen un mecanismo de acción similar: se unen a una subunidad de los canales de calcio dependientes de voltaje (α -2- δ) inhibiéndolos, proceso implicado en la etiopatogenia del trastorno bipolar, ansiedad e insomnio (Houghton *et al.*, 2017).

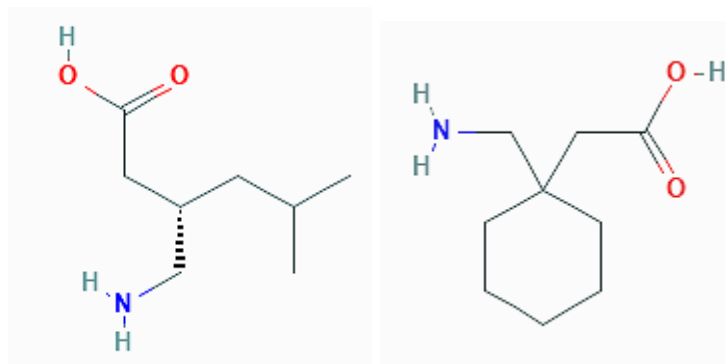


Figura 5. Estructura de los análogos de GABA, pertenecientes a Pregabalina y Gabapentina respectivamente. Tomada de: PubChem, 2019. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/>

Dicho mecanismo los hace eficaces ante las neuropatías debido a que, una vez logrado el bloqueo de los canales de calcio, modulan la liberación de neuropéptidos sensoriales sólo bajo condiciones correspondientes a la sensibilización significativa inducida por inflamación de la médula espinal (Fehrenbacher *et al.*, 2003). La pregabalina también es eficaz ante trastornos de ansiedad generalizada, para el tratamiento adyuvante de la manía aguda, depresión, epilepsia y de mantenimiento del trastorno bipolar refractario. Por su parte, la gabapentina es eficaz en el tratamiento antiepiléptico (Gee *et al.*, 1996), pero se ha discutido su papel en la eficacia total ante trastornos de ansiedad. Caso contrario a Gabapentina, el cual se encontró con mayor eficacia a trastornos de ansiedad pre-operatoria (Berlin *et al.*, 2015). No obstante, frecuentemente ambos son administrados en conjunto.

En un principio la gabapentina fue diseñada como una estructura similar al GABA, de tal modo que funcionara como un fármaco antiespasmódico que actuara sobre los receptores GABA (Houghton *et al.*, 2017). Sin embargo, ni la gabapentina ni la pregabalina se unen a los receptores GABA, si no, que son ligandos para los canales de calcio dependiente de voltaje. Por otro lado, hay evidencia de que sus propiedades antiepilépticas y analgésicas están directamente relacionadas con su interacción de dicho canal (Bian *et al.*, 2006).

La absorción de la gabapentina se lleva a cabo en el intestino delgado por un proceso de transporte activo, mediado por un transportador de aminoácidos, el cual se expresa principalmente en el intestino delgado proximal (Chen *et al.*, 2013) pero la gabapentina no se une a las proteínas plasmáticas y su metabolismo hepático es insignificante, ya que se elimina esencialmente por vía renal (Calandre *et al.*, 2016).

El metabolismo hepático de la pregabalina es igualmente insignificante, pero en comparación con la gabapentina, la excreción renal de la pregabalina es menor que la excreción de creatinina, lo que indica que el fármaco experimenta reabsorción tubular (Bockbrader *et al.*, 2010).

Los estudios en torno a esos dos compuestos análogos están más enfocados a tratamientos contra neuropatías, por lo que se han encontrado y determinado concentraciones fisiológicas eficaces para el tratamiento de estas. Así la dosis mínima efectiva de la pregabalina es de 75 $\mu\text{mol}/\text{kg}$; de la gabapentina es de 146 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ (Hewitt *et al.*, 2016).

Para los dos análogos, las dosis y las concentraciones séricas que se buscan mantener en el tratamiento contra la epilepsia se han establecido en rangos pequeños: en el caso de la pregabalina las dosis de sostén van desde 150 a 600 mg/día con una concentración sérica de 5-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; para la gabapentina es

de 900 a 4800 mg/día con una concentración sérica de 4-16 µg/mL (American Epilepsy Society, 2015). Por lo que al requerirse cantidades menores y tener una vida sérica media más larga, la pregabalina es más eficaz y de más rápida acción que la Gabapentina (Hewitt *et al.*, 2016). Paralelamente para el caso de GABA hay concentraciones séricas submicromolares cuyo intervalo no está bien definido, pero dichas concentraciones están presentes alrededor de las neuronas en el cerebro, dentro de los islotes pancreáticos y en la sangre (Barragan *et al.*, 2015).

Cuadro 1. Características generales de los fármacos incluidos en este estudio.

	Gabapentina	Pregabalina	Lorazepam
Tipo de fármaco	Antiepiléptico	Neuropático, antiepiléptico	Ansiolítico (relajante)
Principales indicaciones	Epilepsia, crisis parciales, ansiedad...	Dolor neuropático periférico y central, epilepsia, trastorno de ansiedad generalizada...	Insomnio, ansiedad, depresión, tensión y neurosis
Sitio de acción	Subunidad α -2- δ de canal de Ca ⁺ dependiente de voltaje		Sitio accesorio del receptor GABA _A
Dosis (min. - máx.)	300 a 3600 mg/día	75 a 600 mg/día	1 a 4 mg/día
Contraindicaciones	Uso de antiácidos (disminuyen su absorción)	Hipersensibilidad	Apnea del sueño, hipersensibilidad, insuficiencia respiratoria
Interacción con otros fármacos	No tiene	Oxicodona, etanol y lorazepam	Alcohol, neurolépticos, antidepresivos, antiepilépticos, anestésicos, antihistamínicos y barbitúricos (aumenta las concentraciones plasmáticas de depresores del sistema nervioso central)
Efectos secundarios	Ataxia, somnolencia, fatiga, mareo, temblor, visión borrosa, diplopía...	Sedación, aumento del apetito, euforia, alteración del equilibrio, letargo, vértigo...	Sedación, reducción del estado de alerta, fatiga, cefalea, somnolencia, ataxia, diplopía, confusión, depresión, mareos, astenia, debilidad muscular, reacciones psiquiátricas y paradójicas...

Fuente: Vademecum.es

GABA y los microorganismos

El papel del GABA ha sido descrito en bacterias y plantas, en estas últimas se sabe que su papel es el de posible mediador en las interacciones animal-planta o microorganismo-planta (Lancien et al., 2006). En los hongos se ha descrito el papel de este aminoácido en algunos hongos ascomicetos como en el género *Aspergillus*, *Cladosporium fulvum*, *Stagonospora nodorum*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida boidinii* (Kumar and Punekar, 1997; Solomon et al., 2002; Mead et al., 2013). En algunas de estas especies, el GABA funciona como un metabolito intermedio en células de crecimiento (mediante poliaminas), procesos de adaptación celular y una fuente de nitrógeno y carbono. Además, el catabolismo del GABA en hongos da como resultado la formación de succinato a través del semialdehído succínico, muy similar al proceso en el encéfalo humano (Kumar and Punekar, 1997).

Género *Candida*

El género *Candida* es un grupo de hongos que tiene más de 200 especies, también es polifilético. Las especies de *Candida* son cosmopolitas y se pueden encontrar en muchas situaciones ecológicas como la superficie de las frutas y otros órganos vegetales, la madera podrida, el suelo, el agua de mar o las asociaciones con mamíferos e insectos (especialmente las abejas), otras viven de forma natural en el cuerpo humano (Webster and Weber, 2007).

Con mucho, la especie más conocida es *C. albicans*, que está asociada con enfermedades humanas. *Candida dubliniensis* es una especie que debido a su similitud ha sido diagnosticada erróneamente como *C. albicans*. Otras especies (*C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*) también pueden causar infecciones oportunistas en el hombre. En contraste, *Candida utilis* (ahora llamada *Pichia jadinii*) se ha utilizado para la producción de alimentos y forrajes durante más de 80 años, y otras *Candida spp.*, también son adecuados para este propósito. *Candida albicans* es un poco diferentes al género ya que no están ampliamente distribuida en el medio ambiente, pero se encuentran como comensal en la piel de los humanos y son patógenos oportunistas, pueden ocasionar micosis cuando las condiciones inmunológicas y/o metabólicas del huésped lo propician (Webster and Weber, 2007; López-Martínez, 2010).

De manera general, las especies de este género tienen principalmente talo levaduriforme, pero también forman pseudomicelio y algunas especies como *C. albicans* pueden formar un verdadero micelio por lo que ésta es considerada un

organismo dimórfico o polimórfico (de Bedout *et al.*, 2010; Lim *et. al.*, 2012). Anteriormente se creía que las especies de este género carecían de reproducción sexual; actualmente se sabe que algunas de ellas sí tienen este tipo de reproducción, lo que ha causado confusión con la nomenclatura de las especies que presentan una fase anamorfa y otra teleomorfa (Calderone and Clancy, 2012).

La clasificación taxonómica del género *Candida* de acuerdo con Mycobank Database e Integral Taxonomic Information System 2019 es la siguiente:

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Saccharomycotina

Clase: Saccharomycetes

Subclase: Saccharomycetidae

Orden: Saccharomycetales

Género: *Candida*

Especies: *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. tropicalis*...

Patologías causadas por *Candida* spp.

Se considera que el primer reporte de una micosis causada por *Candida* fue registrado por Hipócrates, quien describió la presencia de placas blanquecinas en personas enfermas. Desde entonces fue descrita en años posteriores causando diversos padecimientos. En 1842 Gruby describió al hongo causante de infección en su escrito “le vrai muguet des enfants”, y lo clasificó en el género *Sporotrichum*. En años subsecuentes el género fue reportado como agente causal de diferentes formas clínicas de candidosis y se le asignaron nombres diferentes debido a la diversidad en su morfología observada (Rippon, 1988).

En 1980 Zopf nombró al agente causal como *Monilia albicans*. El género *Monilia* incluía ciertos hongos filamentosos aislados de fruta y hojas en descomposición. Fue hasta 1923 que Berkhout observó que las especies de importancia médica de “*Monilia*” diferían morfológica y fisiológicamente de las

especies de *Monilia* de la fruta en descomposición, asignándole el género *Candida*. Sin embargo, durante un par de décadas el nombre de *Monilia* continuó en uso hasta 1954 en el que el género *Candida* finalmente fue aceptado durante el Octavo Congreso de Botánica en París (Rippon, 1988).

De todas las especies conocidas del género, por lo menos 15 causan enfermedades en los humanos; sin embargo, más del 95% de estas son causadas solo por cinco especies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei*. (McCarty and Pappas, 2016). De ellas, *C. albicans* es aislada con mayor frecuencia. Las infecciones por *Candida* spp, pueden afectar mucosas, uñas, piel, y órganos internos. El hongo habita principalmente en las mucosas, el tracto gastrointestinal, el tracto genitourinario y la piel del ser humano (McCarty and Pappas, 2016), por lo que la mayor parte de las infecciones se consideran de origen endógeno.

Las micosis se asocian al desarrollo de una biopelícula (estructura adherente compuesta por levaduras, hifas y pseudohifas en una matriz extracelular) constituida por polisacáridos y proteínas, capaz de resistir antifúngicos y evadir la respuesta inmune (Nett, 2016). El género *Candida* es causante de infecciones que adquieren diversas formas clínicas dependiendo de su localización:

Candidosis intertriginosa: se presenta principalmente en los pliegues (intertrigos) donde se genera humedad creando un ambiente apto de sobrevivencia y colonización: pliegues de la axila, ingle, submamario y suprapúbico; interdigital: entre dedos de manos y pies; área del pañal: pliegue inguinal e interglúteo. Los signos y síntomas a menudo son erupción, exudado, ardor, ligera prurito también pueden presentarse placas blanquecinas que en realidad son colonias de levaduras (Palacios *et al.*, 2011).

Candidosis bucal: se caracteriza por la aparición de placas blanquecinas en las superficies membranosas de la mucosa bucal (lengua, mejillas, paladar). La forma crónica se disemina al esófago y se asocia comúnmente a personas con disfunciones del sistema inmune (VIH, por ejemplo); otros factores predisponentes pueden ser las prótesis dentales y los extremos de edad (recién nacidos-personas mayores) (Mayer *et al.*, 2013).

La candidosis gastrointestinal: se manifiesta por úlceras en la mucosa gástrica, intestino delgado o grueso; mediante la endoscopía se pueden observar además placas blanquecinas (Rubio-Calvo *et al.*, 2001). Esta forma clínica se asocia a un mal pronóstico debido a que *Candida* puede trasladarse al torrente sanguíneo a través de la mucosa gastrointestinal y diseminarse a órganos, lo que puede inducir una candidosis sistémica (Matsubara *et al.*, 2016).

Candidosis vulvovaginal: un alto porcentaje de mujeres la padece por lo menos una vez en su vida. Los factores que intervienen en el desarrollo de este tipo de candidosis no están bien definidos; sin embargo, se asocia al embarazo, diabetes mellitus, uso de anticonceptivos orales, antibióticos y terapias hormonales. Estas infecciones por *Candida albicans* no ponen en riesgo la vida a pesar de tener una alta tasa de morbilidad (Mayer *et al.*, 2013). Algunos síntomas son prurito intenso, flujo vaginal y edema en genitales externos.

Candidosis balanoprepucial: afecta las zonas del glande, surco balano-prepucial y el cuerpo del pene, se presentan placas pseudomembranosas, pápulas, erosiones o pústulas superficiales. Se puede presentar en hombres con diabetes mellitus o que hayan mantenido relaciones sexuales con mujeres que padecen de vulvovaginitis candidósica (Araiza *et al.*, 2011).

Onicomycosis: es más común en las uñas de las manos, este padecimiento está asociado a humedad persistente en la zona, hay un cambio en la coloración y puede presentarse onicólisis o hiperqueratosis. Afecta a personas de cualquier edad y con mayor riesgo en personas diabéticas (Palacios *et al.*, 2011).

Candidosis invasiva

Es una de las formas de candidosis que mayor impacto tiene sobre la salud del ser humano, ya que afecta principalmente mucosas, el tracto gastrointestinal, el tracto genitourinario y la piel del ser humano, diseminando a tejidos profundos (como el hígado, bazo, corazón, ojos, peritoneo, riñón, hueso, meninges y pulmones con o sin candidemia concomitante) frecuentemente conduce a la muerte (Antinori *et al.*, 2016). Tiene una alta tasa de morbilidad y mortalidad. Esta micosis es principalmente de origen nosocomial. Sus reportes de casos se mantienen estables en algunos países como Australia, Canadá y EE. UU., al contrario de países pertenecientes a América Latina, en donde los números de casos están en aumento (Quindós, 2014).

Existen diferencias geográficas en la distribución de las especies de *Candida* causantes de candidosis invasiva: *C. parapsilosis* predomina en Australia, América Latina y los países de la cuenca mediterránea de África, Asia y Europa. Por el contrario, *C. glabrata* se encuentra en los Estados Unidos, en países nórdicos y países de Europa central (Quindós, 2014).

Actualmente, la especie *C. albicans* sigue siendo el agente etiológico más frecuente de esta patología, por lo que se ha descrito que, durante un proceso infeccioso, este hongo tiene un conjunto especializado de sensores ambientales que le permiten adecuarse a su ambiente y proteínas (adhesinas) que median la

adhesión a otras células de *C. albicans* a otros microorganismos, superficies abióticas y a células del huésped favoreciendo la colonización al mismo. Además, la expresión de algunos genes ayuda a favorecer la infección en las células epiteliales de las mucosas orales y vaginales (Mayer *et.al.*, 2013), propiciando un cambio dimórfico que permita la penetración del tejido, la colonización de los órganos (placas blanquecinas o biopelículas en estos) durante las primeras etapas de una infección (hifas y pseudohifas) y la diseminación en el torrente sanguíneo (levaduras) si las condiciones son adecuadas (Sudbery *et al.*, 2004).

La candidosis invasiva causada por otras especies diferentes a *C. albicans* se ha reportado. Algunas especies como *C. glabrata* y *C. krusei*, tienen menor respuesta a antifúngicos como el fluconazol, en comparación con *C. albicans* (Quindós, 2014). La candidosis invasiva se presenta con mayor frecuencia en pacientes con neutropenia, pancreatitis, insuficiencia renal, con tratamiento a base de glucocorticosteroides; antibióticos sistémicos por tiempo prolongado o por instalación de dispositivos médicos (principalmente por catéter venoso central), por nutrición parental o después de una cirugía abdominal mayor (Netea *et al.*, 2015) ya que el sistema inmunosuprimido es favorable para su crecimiento.

Pruebas diagnósticas

El diagnóstico de las formas clínicas antes mencionadas se realiza con procedimientos de laboratorio dependiendo del órgano u órganos afectados. En consecuencia, las muestras útiles pueden ser sangre, exudados, orina, escamas de piel o uñas, o tejido (dependiendo del caso particular). Los procedimientos pueden ser examen directo con hidróxido de potasio (KOH) (Badiie *et al.*, 2019); frotis con tinción de Gram, Giemsa, PAS y Wright; cultivo; histopatología con tinción de hematoxilina-eosina, PAS o Grocott. En el estudio microscópico se busca la presencia de levaduras, pseudohifas y/o hifas, estructuras que muestran indicios de patogenicidad de las especies *C. albicans* y *C. dubliniensis* (Arenas, 2014).

El hongo crece en los medios de cultivo habituales: agar dextrosa Sabouraud, agar sangre, agar extracto de levadura, agar infusión cerebro corazón, en los cuales se pueden apreciar el aspecto levaduriforme; sin embargo, bajo ciertas condiciones *Candida albicans*, *in vitro* puede desarrollar estructuras hifales y pseudohifales, así como clamidoconidios cuando están en medios específicos como el agar harina de maíz con tween 80 (Larone, 2003; Arenas, 2014). *Candida albicans*, crece rápidamente. Este hongo desde las 24 horas de su cultivo a temperatura ambiente, a 28°C o a 37°C, forma colonias de color crema, lisas y de bordes bien limitados (Larone, 2003).

Existen algunos medios específicos para diferenciar tanto género como especies de *Candida*. Por ejemplo, el agar Niger ayuda a discriminar entre *Candida* y *Cryptococcus* ya que el primero forma colonias blancas y el segundo colonias de color marrón gracias a que puede degradar el ácido cafeico del medio a melanina (Mazuelos y García, 2010). Otro medio de cultivo útil para diferenciar algunas especies de *Candida* es el CHROMagarCandida®; la identificación se basa en el color de la(s) colonia ya que el medio contiene un sustrato cromógeno, el cual libera compuestos de diferentes colores, que, al ser degradados por enzimas específicas de la especie, permite diferenciar especies con pocas pruebas de confirmación. Pues *Candida albicans* forma colonias de color verde, *C. krusei*, de color rosa; *C. tropicalis* forma colonias azul metálico. (Becton Dickinson, 2014).

El diagnóstico de candidosis invasiva sigue siendo el hemocultivo; un método diagnóstico utilizado para la detección de microorganismos en sangre y la identificación del agente causal. Se realiza mediante el cultivo de muestras estériles tomadas de sangre, líquido peritoneal y líquido pleural depositadas en botellas de transporte y cultivo. Dichas muestras deben de tomarse en un intervalo de tiempo de al menos 30 minutos durante el pico febril, no obstante, por salud del paciente también se recomienda tomar muestras (2-3) de diferentes sitios de punción y evitar la refrigeración de estas para ser procesadas con prontitud ya sea por métodos tradicionales o en equipo automatizado.

Es importante reconocer las dos presentaciones de las botellas para la realización de hemocultivos: botellas de adultos (niños mayores de dos años y adultos, botellas con una capacidad de 5-10 mL) y botellas pediátricas (recién nacidos, botellas con capacidad de 2-3 mL; lactantes menores a dos años, capacidad de 3-5 mL) (Fernández de Bobadilla, 2003; Ferrete-Morales, 2011; ProLab, 2015). Sin embargo, algunos factores intervienen en la sensibilidad de este método diagnóstico, como el tiempo de crecimiento de algunas especies, la exposición a antifúngicos o la técnica de cultivo. El desarrollo de otros métodos para el diagnóstico oportuno y confiable resulta de vital importancia para incidir en una intervención y tratamiento adecuado debido a la alta mortalidad que esta forma clínica induce (McCarty and Pappas, 2016).

Candida albicans, el cambio de forma y la patogenicidad

Candida albicans es un hongo polimórfico que puede crecer como una levadura ovoide, como alargadas células elipsoides que permanecen unidas con constricciones en los septos (pseudohifa), o como hifas verdaderas de lados paralelos. Además, también puede formar estructuras de resistencia al ambiente llamadas clamidoconidios (Sudbery *et al.*, 2004; Jacobsen *et al.*, 2012).

La transformación de levadura a su fase filamentosa (pseudohifa o hifa) denominada dimorfismo, es un factor determinante de la virulencia de *Candida albicans*. El dimorfismo está estrechamente regulado por una red de vías de transducción de señales en respuesta a estímulos ambientales, como lo son la inanición, la presencia de suero o N-acetilglucosamina, la temperatura fisiológica, el CO₂ y por la detección de quórum (mecanismo de comunicación microbiana), lo cual indica que esta levadura tiene la capacidad de adaptarse a diferentes condiciones ambientales (Sudbery *et al.*, 2004; Jacobsen *et al.*, 2012; Mayer *et al.*, 2013; Quindós, 2014).

Estos cambios generan diferentes vías de señalización que favorecen el cambio de una estructura levaduriforme a una pseudohifa o hifa (Grald *et al.*, 2012). Por ejemplo, en un pH bajo (<6), las células de *C. albicans* crecen predominantemente en forma de levadura, mientras que a pH alto (> 7) se induce el crecimiento de las hifas. Sin embargo, una temperatura de cultivo por encima a los 35°C y pH neutro también induce la formación de hifas y pseudohifas (Sudbery *et al.*, 2004).

Candida albicans cuenta con otros mecanismos de patogenicidad o factores de virulencia además del dimorfismo, tales como: el encendido de genes que codifiquen para la expresión del fenotipo (colonias blancas a opacas), la expresión de adhesinas e invasinas en la superficie celular, la formación de biopelículas, secreción de enzimas hidrolíticas (proteasas, fosfolipasas y lipasas), la medición y regulación al pH, y la respuesta al estrés ambiental, entre otros. Las biopelículas son de gran interés clínico ya que tienen la capacidad para formarse en superficies abióticas (catéteres, las dentaduras postizas) o bióticas (superficies celulares de las mucosas) mediante un proceso de adherencia de las levaduras al sustrato, la proliferación de estas, la formación de hifas en la parte superior de la biopelícula, la acumulación de matriz extracelular y, finalmente, la dispersión de las levaduras de la biopelícula, además de que las biopelículas maduras son mucho más resistentes a los agentes antimicrobianos y a los factores inmunes del huésped (Mayer *et al.*, 2013).

ANTECEDENTES

Kumar y Punekar (1997) describieron el metabolismo de GABA en los hongos y las enzimas involucradas en mismo; en los hongos algunos genes codificaban para semialdehído, sustancia necesaria para catabolizar GABA, de modo que el GABA puede ser una fuente de nitrógeno o carbono. Además, la descarboxilación del L-glutamato durante el proceso metabólico del GABA está asociada con la conidiación/metabolismo de los conidios en los hongos. Los autores reportan que la actividad de la GABA transaminasa ha sido detectada en varios hongos ascomicetos, entre ellos el género *Candida*.

En estudios con hongos fitopatógenos como *Cladosporium fulvum* y *Stagonospora nodorum*, se han generado cepas mutantes en las que se eliminan genes que codifican para las enzimas involucradas en el metabolismo de GABA; las cepas mutadas muestran una disminución de la virulencia y patogenicidad. GABA puede ser una fuente de nitrógeno del hongo durante la infección. En *Stagonospora nodorum*, el GABA se asocia a la respuesta por estrés ambiental al tiempo que estimula el desarrollo asexual (Solomon and Oliver, 2002; Mead *et al.*, 2013).

Bönnighausen *et al.*, (2015) reportaron que en *Fusarium graminearum* (hongo ascomiceto patógeno de cereales) eliminaron dos GABA-transaminasas y lo inocularon en agar adicionado de GABA. El resultado fue que *F. graminearum* disminuyó su crecimiento, por lo que los autores asumen que este hongo redujo su capacidad para utilizar GABA como fuente de nitrógeno, el cual podría ser esencial para el desarrollo del microorganismo patógeno. La utilización de GABA podría estar relacionada con la virulencia de *F. graminearum*. Estos resultados aún no son determinantes sobre la importancia de GABA en el metabolismo de hongos fitopatógenos, debido a que son pocos los estudios que abordan este tema.

Candida albicans posee dos tipos de GPCR: el receptor de feromonas de clase D (Ste3 y Ste2) y el receptor de detección de nutrientes (Gpr1p). Se ha demostrado que GABA puede acoplarse a estos receptores y así la levadura puede metabolizar ese compuesto (Versele *et al.*, 2001).

Reyes-García y cols. (2012) reportaron que el suero humano enriquecido con GABA estimula la formación del tubo germinativo, así como la expresión de mRNA de la fosfolipasa B1 (BPLB1) en dos cepas de *C. albicans*.

Ziegler-Rivera (2013) determinó que GABA aumenta significativamente la cantidad de linfocitos Treg CD4, CD25 y FoxP3 de ratones CD1 inoculados con *C. albicans*; además que los ratones tratados con la asociación GABA – *C. albicans*

inducía la formación de abscesos en hígado, hallazgo corroborado por retrocultivo. La autora sugiere que GABA facilita la invasión por *C. albicans* y que podría actuar como un inmunomodulador.

Para el caso de los agonistas de GABA, en Singh y cols. (2010) describieron que las 1,5-benzodiazepinas tienen un efecto antifúngico en hongos como *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans*.

Skrobik y Laverdiere (2013) reportaron que, en las unidades de cuidados intensivos, al administrar benzodiazepinas y fluconazol en pacientes con Candidemia, la benzodiazepina aumentaba los niveles séricos del fluconazol por inhibición competitiva, aumentando el efecto del fármaco contra la enfermedad.

Paulussen *et al.*, (2014), probaron *in vitro* las 1,4-benzodiazepinas contra dermatofitos, mohos filamentosos y levaduras clínicamente relevantes. Las benzodiazepinas funcionaron como antifúngicos prometedores contra los dermatofitos (*Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum*), por lo que evaluaron la eficacia del agonista *in vivo* en un modelo experimental de dermatitis por *Microsporum canis* en cobayas, reduciendo las lesiones ocasionadas hasta en un 90%.

Por otra parte, Kathwate y cols. (2015) evaluaron cuatro medicamentos agonistas del receptor GABA (lorazepam, diazepam, midazolam y fenobarbitona), y dos bloqueadores del canal de sodio dependiente de voltaje (fenitoína y fosafenitoína) en el crecimiento de *Candida albicans*. Los agonistas del receptor de GABA inhibieron el crecimiento, la transformación de levadura a hifa, la inducción del tubo germinativo y la formación de biopelículas, mientras que los bloqueadores no mostraron ningún efecto en el desarrollo de la levadura.

Severance y cols. (2017), identificaron que el tratamiento para la esquizofrenia altera la microbiota del hospedero humano favoreciendo el crecimiento de *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*. Este desequilibrio propicia la invasión por *Candida* a través de la vía intestino-cerebro. La exposición a estos hongos induce un aumento de los niveles de IgG en los pacientes con esquizofrenia.

Para el caso de los análogos de GABA, sus estudios están más enfocados a respuesta neurológica por separado o en dúo que a estudios de interacción con microorganismos.

JUSTIFICACIÓN

GABA es un aminoácido presente en diversos seres vivos: en las bacterias les confiere resistencia ante medios ácidos; en las plantas, participa en la respuesta al estrés; en los hongos representa una fuente de nitrógeno y carbono – favoreciendo su crecimiento e invasividad. En el ser humano el GABA funciona como neurotransmisor, aunque diversos autores también lo consideran como inmunomodulador, es decir, puede aumentar o disminuir la respuesta inmune (Jin, *et al.*, 2013).

En diversos estudios se ha comprobado que existe una relación entre GABA y *Candida albicans*. Esta levadura posee un transportador de polianiones que introduce GABA, por lo que puede utilizar este aminoácido, al igual que otros hongos, como fuente de nitrógeno (McNemar *et al.*, 2001). Además, en un estudio *in vitro*, se evidenció que GABA favorece la expresión del ARN para 2 factores de virulencia: fosfolipasa B y la inducción de tubo germinativo (Reyes-García *et al.*, 2012).

Respecto a los agonistas de GABA como las benzodiazepinas, se sabe de manera experimental, que en combinación con otros fármacos pueden inhibir el crecimiento de algunos hongos de interés médico (Skrobik and Laverdiere, 2013; Paulussen *et al.*, 2014; Kathwate *et al.*, 2015; Navin *et al.*, 2017).

Por otro lado, se ha reportado que algunos fármacos análogos de GABA utilizados para el tratamiento de la epilepsia, como el topiramato, vigabatrina o el ácido valproico, aumentan la concentración de GABA en cerebro (Tremont-Lukats, *et al.*, 2000; Errante, *et al.*, 2003; van Veenendaal, *et al.*, 2015; Spritzer, *et al.*, 2016; Falco-Walter and Bleck, 2016). Esta condición que implica que en el cerebro se modifique la concentración de GABA, lo que podría influir en la población de *C. albicans* presente en el individuo si esta levadura se encuentra en ese sitio. Por lo anterior, es necesario determinar si GABA, sus análogos o agonistas tienen alguna influencia en el crecimiento y o morfología asociada a virulencia de *C. albicans*.

HIPÓTESIS

Si en algunos hongos ascomicetos se ha demostrado que GABA funciona como una fuente de nitrógeno y los agonistas inhiben el crecimiento de algunos hongos; entonces el compuesto GABA, sus análogos gabapentina y pregabalina, y el agonista lorazepam afectarán el crecimiento y/o morfología de *Candida albicans in vitro*.

OBJETIVOS

General

- ❖ Determinar el efecto que tienen GABA, dos análogos y un agonista en el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans*.

Particulares

- Determinar si GABA, dos análogos (Pregabalina y Gabapentina) y un agonista (Lorazepam) tiene algún efecto en el crecimiento de *Candida albicans*.
- Determinar si el efecto de GABA, Pregabalina, Gabapentina y Lorazepam en el crecimiento de *C. albicans* es dependiente de la concentración.
- Identificar cambios morfológicos en *C. albicans* inducidos por GABA, Pregabalina, Gabapentina y Lorazepam.
- Determinar si la adición periódica de GABA, Pregabalina, Gabapentina y Lorazepam tiene algún otro posible efecto en el crecimiento de *C. albicans*.
- Determinar si las combinaciones de GABA, Pregabalina y Gabapentina tienen algún efecto en el crecimiento de *C. albicans* en comparación con la adición en solitario.

MATERIAL Y METODOLOGÍA

Aislado Clínico e Inóculo

Se utilizó la cepa *Candida albicans* FM905, aislada de un paciente con candidosis bucal. La cepa fue obtenida de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. La levadura fue crecida en agar dextrosa Sabouraud (ADS) durante 24h a 28°C. Se preparó una suspensión a partir únicamente de levaduras de forma ovoide, con un tamaño de 4 µm en su eje mayor y algunas gemantes. Se partió de una suspensión con conteniendo total de 1×10^8 células (levaduras)/mL (Shui-Xiu *et al.*, 2017) en 10 ml de PBS. De esta suspensión se tomaron 5 µL con un total de 1×10^3 levaduras/mL para ser adicionados al medio de cultivo, Medio Mínimo Sintético (MMS).

Preparación de Medio de Cultivo

Se prepararon cinco matraces (M) conteniendo 60 ml de MMS (Fórmula y preparación en Anexo 2), pH 5.0.

Preparación de solución de fármacos

Se prepararon distintas soluciones para cada fármaco, con base en su solubilidad (**Anexo III**). De las soluciones preparadas, se consideraron dos con base en la concentración sérica humana normal (CSHN) reportada en la literatura y dos con las concentraciones extremas iguales para todos los grupos. Se realizaron diferentes pruebas: con los fármacos solos, en combinación, con una sola dosis inicial y con dosis periódicas bajo los mismos métodos de preparación.

Cuatro de las matraces con MMS fueron adicionados con las soluciones del medicamento debidamente etiquetado y se agitaron suavemente para homogenizar. El quinto matraz no contenía medicamento y fue utilizado como control negativo. De cada matraz se extrajeron 10 mL del medio para determinar la densidad óptica (D.O.) A todas se les adicionó el inóculo con levaduras de *C. albicans*.

Gabapentina (GBP)

Se preparó una solución inicial de Gabapentina (marca comercial Aurax; Cronix) conteniendo 10 mg/mL en 30 mL de agua destilada, a pH 7.4. Se distribuyeron en 5 matraces de acuerdo con las siguientes concentraciones:

- a) M1, Control con 5 μ L de suspensión de *C. albicans*.
- b) M2, 5 μ L de suspensión de *C. albicans* + 8 μ g/mL de GBP.
- c) M3, 5 μ L de suspensión de *C. albicans* + 15 μ g/mL de GBP.
- d) M4, 5 μ L de suspensión de *C. albicans* + 50 μ g/mL de GBP.
- e) M5, 5 μ L de suspensión de *C. albicans* + 100 μ g/mL de GBP.

Pregabalina (PGB)

Se preparó una solución de Pregabalina (marca comercial Aurax; Cronix) contenido 10 mg/mL en 7.5 mL de metanol, se emplearon las siguientes concentraciones:

- a) M1, Control con 5 μ L de suspensión de *C. albicans*.
- b) M2, 5 μ L de suspensión de *C. albicans* + 7 μ g/mL de PGB.

- c) M3, 5 μ L de suspensión de *C. albicans* + 10 μ g/mL de PGB.
- d) M4, 5 μ L de suspensión de *C. albicans* + 50 μ g/mL de PGB.
- e) M5, 5 μ L de suspensión de *C. albicans* + 100 μ g/mL de PGB.

GABA

Se preparó una solución de GABA (Sigma, Aldrich) contenido 10 mg/mL en 15 mL de PBS, se emplearon las siguientes concentraciones:

- a) M1, Control con 5 μ L de suspensión de *C. albicans*
- b) M2, 5 μ L de suspensión de *C. albicans* + 5 μ g/mL de GABA.
- c) M3, 5 μ L de suspensión de *C. albicans* + 25 μ g/mL de GABA.
- d) M4, 5 μ L de suspensión de *C. albicans* + 50 μ g/mL de GABA.
- e) M5, 5 μ L de suspensión de *C. albicans* + 100 μ g/mL de GABA.

Lorazepam (LZP)

Se preparó una solución de Lorazepam (marca comercial Ativan; Pfizer) contenido 2 mg/mL en 10 mL de Etanol, para probar este medicamento fue necesario realizar alícuotas a 2 mL con etanol al 45% para las cuatro concentraciones empleadas, asegurándonos que el Etanol no sea agresivo con las levaduras, pero al mismo tiempo se conserve el principio activo en el disolvente.

- a) M1, Control con 5 μ L de suspensión de *C. albicans*
- b) M2, 5 μ L de suspensión de *C. albicans* + 5 μ g/mL de LZP.
- c) M3, 5 μ L de suspensión de *C. albicans* + 25 μ g/mL de LZP.
- d) M4, 5 μ L de suspensión de *C. albicans* + 50 μ g/mL de LZP.
- e) M5, 5 μ L de suspensión de *C. albicans* + 100 μ g/mL de LZP.

Para confirmar el efecto inhibitor del Lorazepam que se ha reportado en un estudio (Kathwate, 2015) se realizaron dos pruebas control del MMS con *C. albicans*: en el primer control al MMS se le añadió solamente etanol a la concentración más alta que se utilizó en este estudio, este fue el control negativo.

En el segundo control se adicionó lorazepam disuelto inicialmente en etanol y aforado posteriormente en agua (no en etanol al 45% como se había preparado en los experimentos iniciales). Fue el control positivo.

La razón por la que se realizaron estos controles es porque al investigar la solubilidad del Lorazepam, en el etanol era más soluble que en otras sustancias, además, accesible, sin embargo en el estudio mencionado anteriormente no

hacían mención del procesamiento del principio activo, de tal modo que buscamos asegurarnos de nuestros posibles resultados.

Condiciones de incubación. Efecto de la dosis única de los fármacos

1. Los matraces anteriormente preparados con los fármacos fueron incubados a 37°C en agitación. A las 0, 18, 24, 48 y 72 horas se tomaron alícuotas de 1 mL por duplicado (salvo LZP, que fue por triplicado) para determinar los siguientes parámetros:

a) Densidad óptica (Absorbancia/tiempo) por espectrofotometría.

La densidad óptica (DO) es utilizada en Microbiología para estimar los indicadores de crecimiento de bacterias o levaduras como una alternativa a los recuentos de las placas tradicionales. Permite evaluar de forma indirecta, la cantidad de microorganismos presentes en una suspensión a través de la turbidez, en donde a mayor número de células, estas absorben mayor cantidad de luz (Tortora *et al.*, 2007; Acebo-González y Hernández-García, 2012) y en consecuencia la DO es mayor.

b) Número de células (levaduras) por mL con ayuda la cámara de Neubauer (también conocida como hemocitómetro).

c) Número de Unidades Formadoras de Colonia (UFC). Se inocularon dos placas de agar Sabouraud (AS) con 3 µL del medio de cultivo inoculado con *C. albicans* y el medicamento respectivo. Fueron incubadas a 37°C por un máximo de 48 horas y se contó el número de UFCs.

La viabilidad celular también interpretado como UFC, nos indica un aproximado de células que son capaces de reproducirse. Por cada colonia formada, el origen es atribuido a un solo microorganismo presente en la muestra (Camacho *et al.*, 2019). Una disminución en este parámetro, indica la inhibición de la reproducción en respuesta a condiciones de estrés, proporcionando información sobre la posible presencia de uno o varios factores inhibidores en el entorno celular (Rodríguez *et al.*, 2018).

2. Comparación de resultados: Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Minitab 18. Se aplicó un análisis de varianza para determinar las diferencias entre los distintos grupos de fármacos y dentro del mismo grupo con las diferentes concentraciones. La prueba de Tukey se aplicó para determinar si había diferencias significativas

entre las concentraciones de todos los grupos. El análisis por el método de Dunnett se utilizó para comparar el control contra todas las concentraciones de todos los medicamentos.

3. Para el análisis de la morfología de *Candida albicans* en los diferentes fármacos y concentraciones:
 - a. Se realizó un examen directo y se observaron al microscopio las estructuras fúngicas.
 - b. Se hizo un registro fotográfico a partir del examen directo.

Efecto de la adición periódica de los diferentes fármacos

En esta fase se adicionaron los diferentes medicamentos en una dosis inicial y después espaciada cada 18 horas, hasta llegar a las 72 horas de incubación. Los parámetros medidos fueron los mismos que en la etapa anterior.

Combinación de fármacos

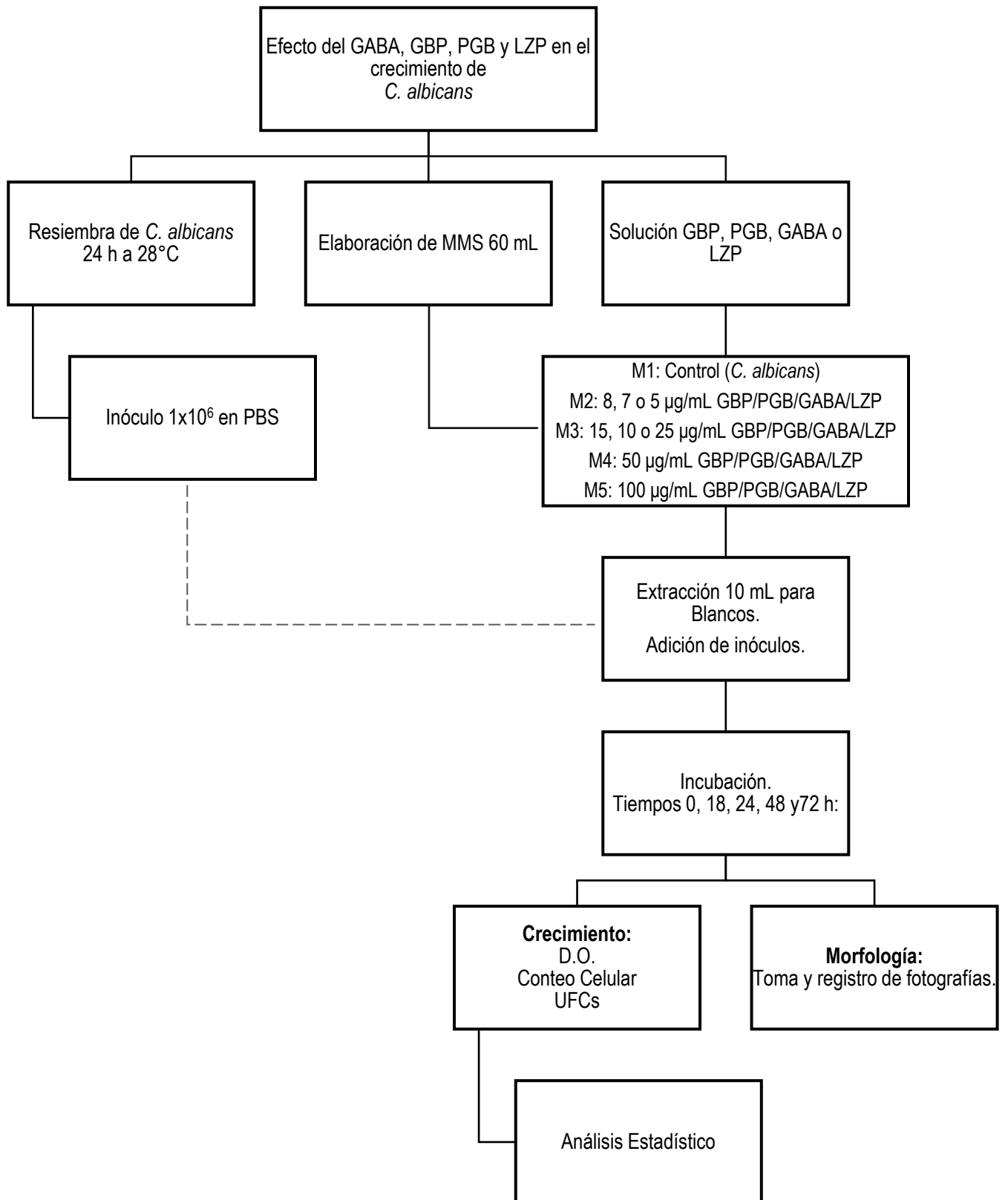
Para esta prueba se adicionaron combinaciones de las tres sustancias (GBP, PGB y GABA) al MMS; se usaron sólo las concentraciones más altas (50 µg y 100 µg), quedando tres combinaciones de la siguiente forma:

- A) GBP-PGB (50 µg y 100 µg)
- B) GBP-GABA (50 µg y 100 µg)
- C) PGB-GABA (50 µg y 100 µg)

Se prepararon 7 matraces conteniendo 60 mL de MMS, se extrajeron 10 mL para medir D.O. quedando 50 mL a los que se les añadió la combinación antes mencionada (el séptimo matraz correspondió al control negativo, sin medicamento, pero inoculado con 5 µL de *Candida albicans*).

Para la determinación de los efectos de los fármacos en combinación sobre *C. albicans* se siguieron los pasos a, b y c del punto 1 antes mencionado.

Diseño Experimental

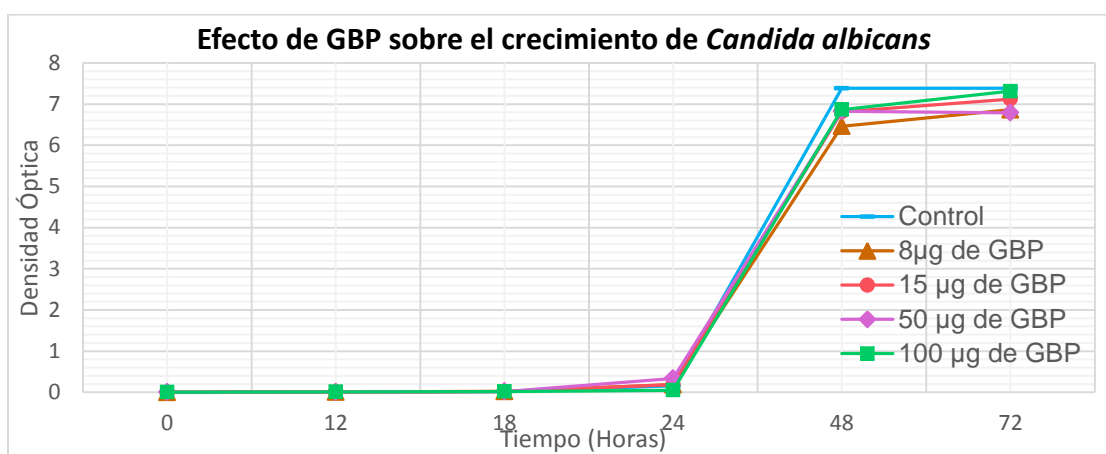


RESULTADOS

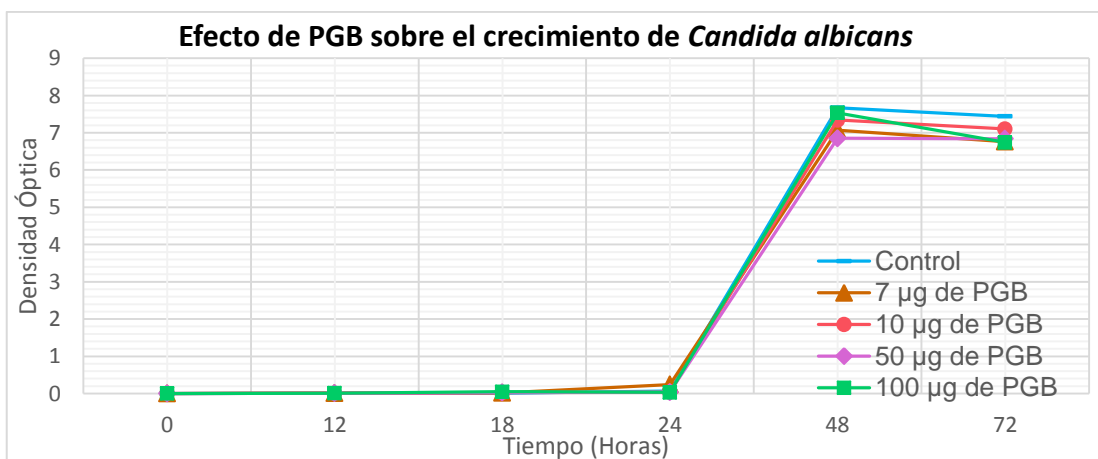
Efecto de Gabapentina, Pregabalina, GABA y Lorazepam en dosis única sobre el crecimiento de *Candida albicans*

Densidad Óptica

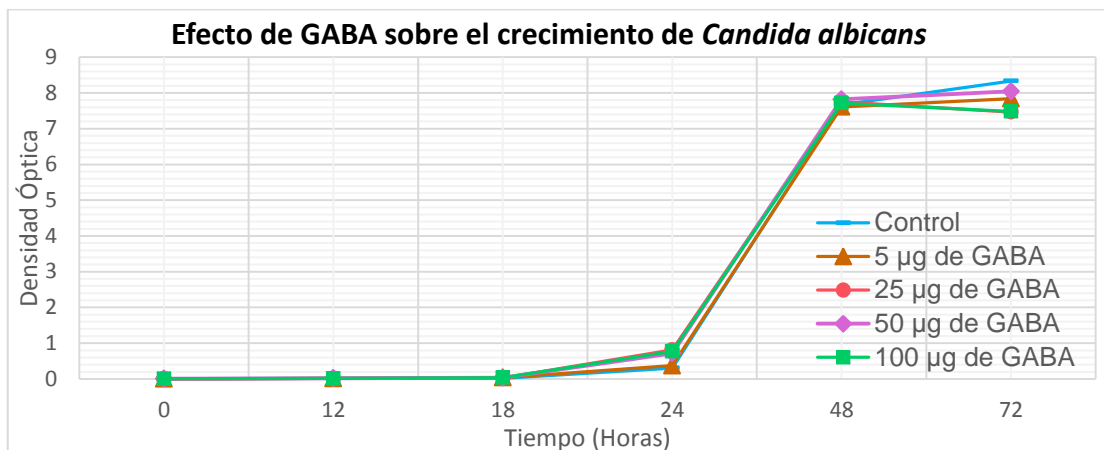
Para todos los grupos de Gabapentina, Pregablina y GABA se observó un patrón en el que el crecimiento se iniciaba a las 24 horas, alcanzaba el pico máximo a las 48 horas y a partir de este tiempo se estabilizaba (**Gráfica 1, 2 y 3**).



Gráfica 1. Evaluación de la densidad óptica con la adición de GBP a diferentes concentraciones. Se observa que el crecimiento de *C. albicans* en el grupo control fue constante, mientras que las concentraciones de GBP tuvieron un menor crecimiento a las 48 horas, sin embargo se igualaron a las 72 horas con el grupo control.



Gráfica 2. Evaluación de la densidad óptica con la adición de PGB a diferentes concentraciones. Se observa que el crecimiento de la levadura en el grupo control y las demás concentraciones crecieron de manera similar y constante. Se observa un ligero decrecimiento de la concentración a 100 µg/mL en los últimos tiempos.

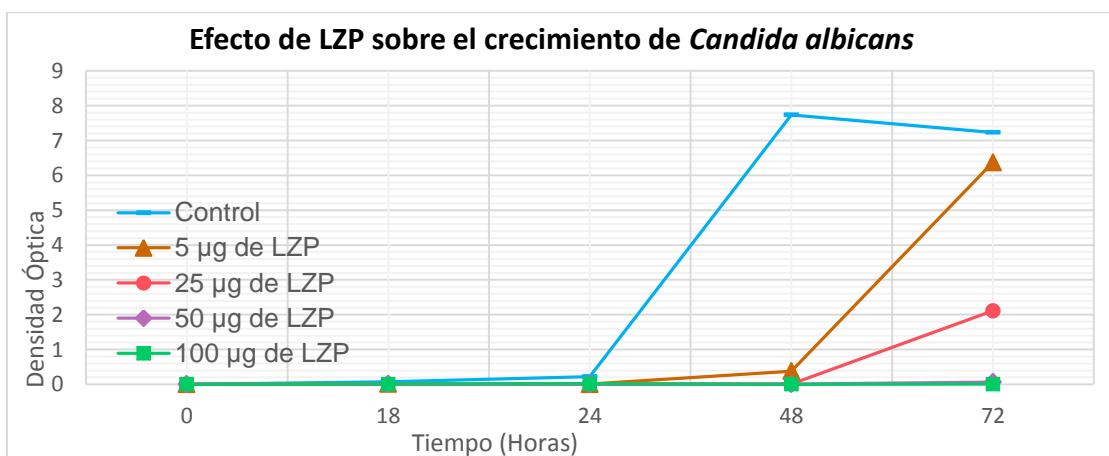


Gráfica 3. Evaluación de la densidad óptica con la adición de GABA a diferentes concentraciones. Se observa que el crecimiento de la levadura en el grupo control y las demás concentraciones cecieron de manera similar.

Análisis estadístico del estudio con gabapentina, pregablina y GABA

El análisis de varianza, la prueba de Tukey y la prueba de comparaciones múltiples mediante el método de Dunnett (estas últimas con P ajustado), arrojaron un valor de $p = 1.00$ para todos los compuestos, con el cual se acepta la hipótesis nula que establece que todas las medias son iguales: no hay diferencia significativa entre las concentraciones.

Para lorazepam a las concentraciones de 5 y 25 µg/mL se observó un crecimiento retardado respecto a los demás fármacos a partir de las 48 h, mientras que a las concentraciones de 50 y 100 µg/mL no hubo crecimiento (**Gráfico 4**).



Gráfica 4. Evaluación de la densidad óptica con la adición de LZP a diferentes concentraciones. Se observa que el crecimiento de la levadura en el grupo control fue elevado y constante a las 72 horas, mientras que en las demás concentraciones a mayor de estas menor fue el crecimiento.

Análisis estadístico del estudio con Lorazepam

El análisis de varianza mostró una $p = 0.204$. La prueba de tukey mostró valores de p ajustado entre 0.241 y 1.00. En la prueba de comparaciones múltiples empleando el método de Dunnett el valor de p ajustado estuvo entre 0.135 y 0.576. El análisis mostró que estadísticamente no hay diferencia significativa entre las concentraciones.

Número de Células (levaduras x mL) y UFCs

Se realizó el conteo de células tomando 10 μL del medio de cultivo conteniendo los diferentes compuestos químicos y se extrapoló al número de levaduras contenidas en 1 mL. Para el conteo de UFCs los resultados fueron incontables, debido a que las colonias eran muy abundantes en todas las concentraciones de gabapentina, pregabalina, GABA y el control a partir de las 18 h (**Tabla 1, 2 y 3**).

Tabla 1. Conteo de células y de UFCs para *Candida albicans* + GBP.

Tratamiento	N° células/mL	UFC/mL
Control	11,158,333	Incontables
8 μg	7,033,333	Incontables
15 μg	13,300,000	Incontables
50 μg	8,025,000	Incontables
100 μg	11,033,333	Incontables

Tabla 2. Conteo de células y de UFCs para *Candida albicans* + PGB

Tratamiento	N° células/mL	UFC/mL
Control	15,775,000	Incontables
7 μg	12,891,667	Incontables
10 μg	14,041,667	Incontables
50 μg	12,166,667	Incontables
100 μg	16,733,333	Incontables

Tabla 3. Conteo de células y de UFCs para *Candida albicans* + GABA

Tratamiento	N° células/mL	UFC/mL
Control	14,725,000	Incontables
5 μg	15,150,000	Incontables
25 μg	17,883,333	Incontables
50 μg	16,116,667	Incontables
100 μg	17,083,333	Incontables

En el matraz que contenía lorazepam (**Tabla 4**), el número de levaduras con todas las concentraciones fue bajo hasta las 48 h, por lo que pudo realizarse el conteo celular. A las 72 h, en todas las concentraciones se observó un efecto inhibitor en el número de células y este fue dependiente de la concentración del medicamento (Tabla 4) .

Tabla 4. Conteo de células y de UFCs para *Candida albicans* + LZP.

Tratamiento	N° células/mL	UFC/mL
Control	19,060,000	Incontables
5 µg	6,870,000	37,000
25 µg	3,710,000	5,000
50 µg	910,000	2,000
100 µg	160,000	3,000

Efecto de los diferentes medicamentos en la morfología de *Candida albicans*

Con la adición de gabapentina se observaron algunos cambios morfológicos; se observaron algunos cúmulos de pseudohifas y levaduras deformadas, globosas (**Figura 6**). Estas estructuras fueron más evidentes a las 72 h de incubación.

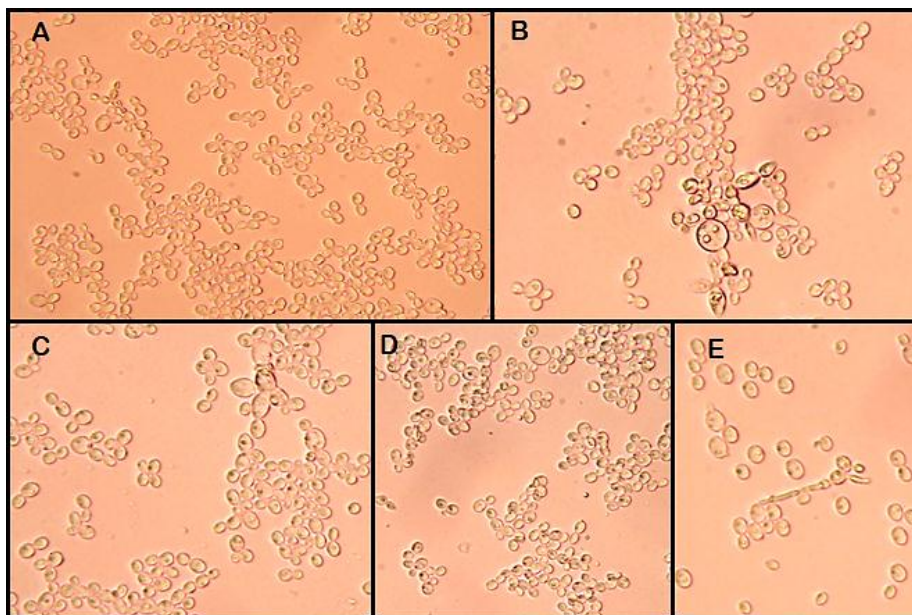


Figura 6. Morfología de *C. albicans* en presencia de GBP (72 h). **A)** Control: levaduras. **B)** 8 µg/mL: algunas levaduras de mayor tamaño (aprox. 8-10 µm de diámetro). **C)** 15 µg/mL: levaduras de mayor tamaño. **D)** 50 µg/mL: sin cambios morfológicos notables. **E)** 100 µg/mL: algunas pseudohifas. (10x).

Durante la etapa final de incubación de *C. albicans* con pregabalina se observó la formación de pseudohifas en todas las concentraciones y a partir de las 24 h. Este efecto fue más notable a las 72 h como se muestran en la **Figura 7**.

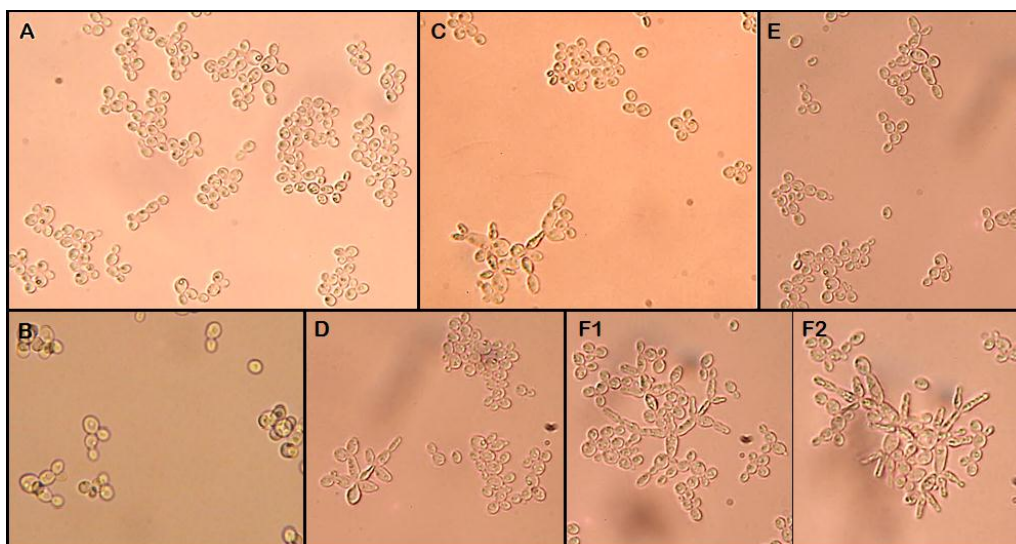


Figura 7. Morfología de *C. albicans* en presencia de **PGB (72 h)**. **A)** Control: levaduras. **B)** Control Metanol (40x). **C)** 7 µg/mL: hay pseudohifas. **D)** 10 µg/mL. **E)** 50 µg/mL. y **F1)** y **F2)** 100 µg/mL. (10x). Se observan pseudohifas en los campos C) a F). En F1 y F2 las pseudohifas fueron más notables. (10x).

En el caso de GABA se observaron escasas pseudohifas y un mayor número de levaduras en cadena, en comparación al control, en el cual sólo se observaron levaduras de forma y tamaño normal (**Figura 8**).

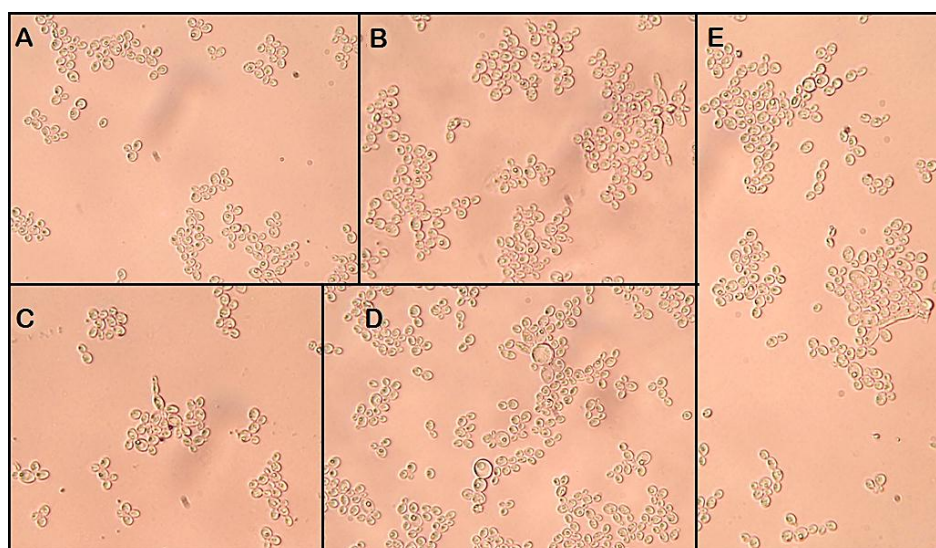


Figura 8. Morfología de *C. albicans* en presencia de **GABA (72 h)**. **A)** Control: levaduras. **B)** 5 µg/mL: pseudohifas; **C)** 25 µg/mL. **D)** 50 µg/mL: hay levaduras de mayor tamaño. **E)** 100 µg/mL: hay pseudohifas. (10x).

En el estudio con lorazepam (**Figura 9**) el hecho más notable fue la disminución de el número de levaduras con las primeras concentraciones (5 y 25 $\mu\text{g/mL}$). La concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ indujo una disminución importante del crecimiento de *C. albicans* y con 100 $\mu\text{g/mL}$ no se observaron levaduras. Para corroborar que este efecto de inhibición de crecimiento de *C. albicans* fue causado por el lorazepam y no por el disolvente (etanol) del medicamento, se incluyó un control conteniendo solamente la concentración de etanol mas alta y la levadura (**Figura 9B**), el cual no mostró efecto alguno.

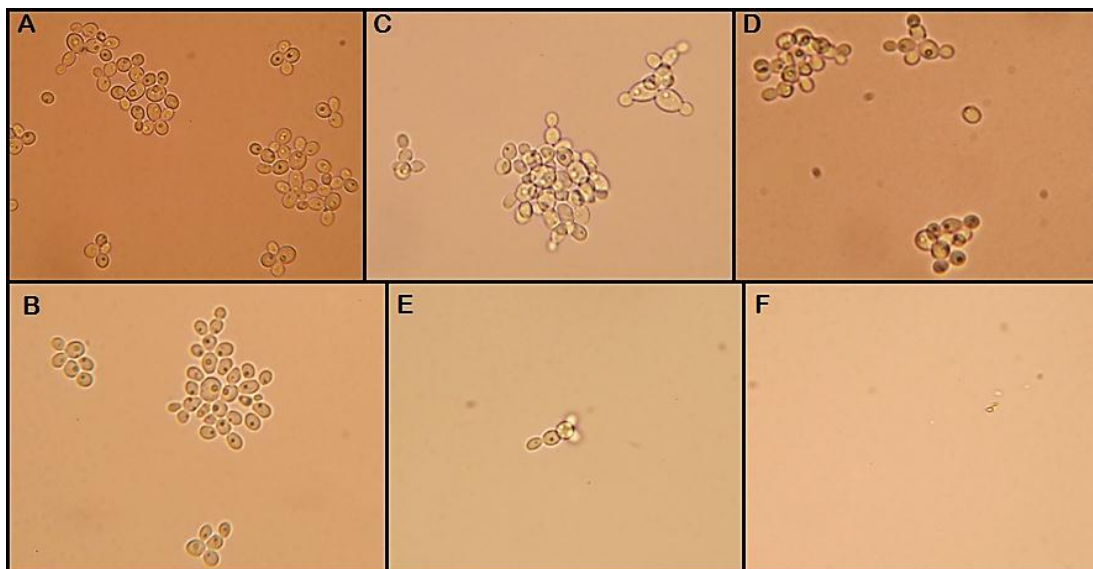
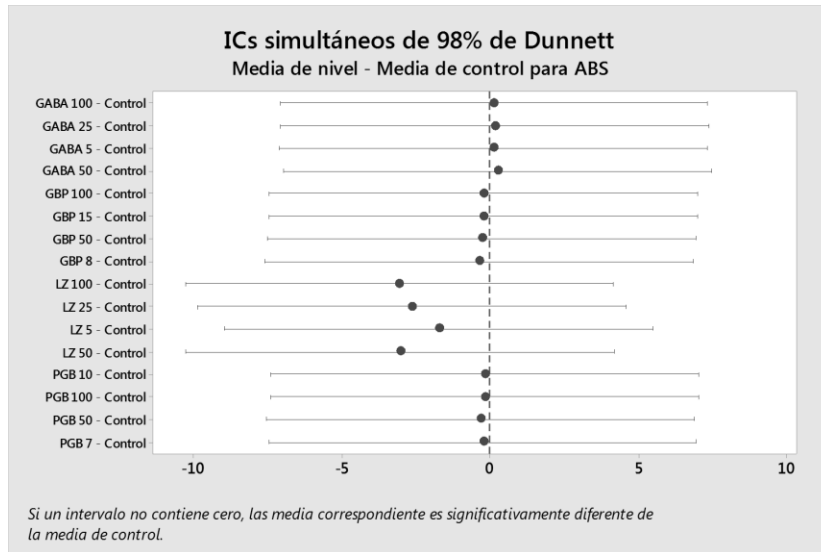


Figura 9. Morfología de *C. albicans* en presencia de LRP (72 h). **A)** Control: levaduras. **B)** Control con Etanol. **C)** 5 $\mu\text{g/mL}$. **D)** 25 $\mu\text{g/mL}$. **E)** 50 $\mu\text{g/mL}$. **F)** 100 $\mu\text{g/mL}$. En C) y D) se aprecia reducción del número de levaduras. En E) las levaduras son escasas y en F) son nulas. En B) el efecto del Etanol en el crecimiento de *C. albicans*.

Análisis estadístico integral de los fármacos

Se realizó un análisis de análisis de varianza, prueba de Tukey y comparaciones múltiples mediante el método de Dunnett en conjunto para conocer el efecto de los cuatro fármacos y observar diferencias estadísticas en la D.O., no obstante, no hay diferencias significativas entre los fármacos: $p = 0.918$.

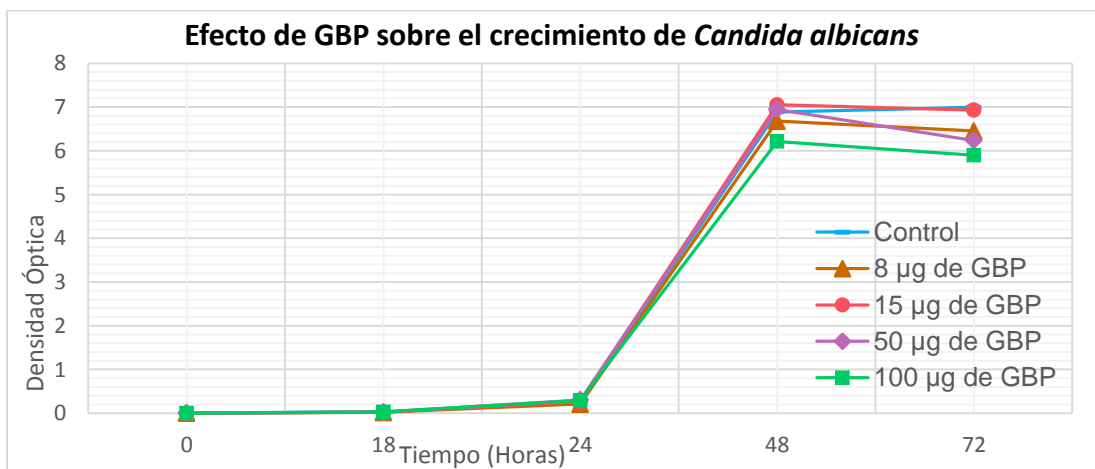


Gráfica 5. Gráfica de Intervalos de confianza empleando el Método de Dunnett para comparaciones múltiples de los fármacos en una dosis inicial. Todos los intervalos establecidos contienen al cero con respecto al control por lo que no hay diferencias significativas entre los fármacos de manera conjunta.

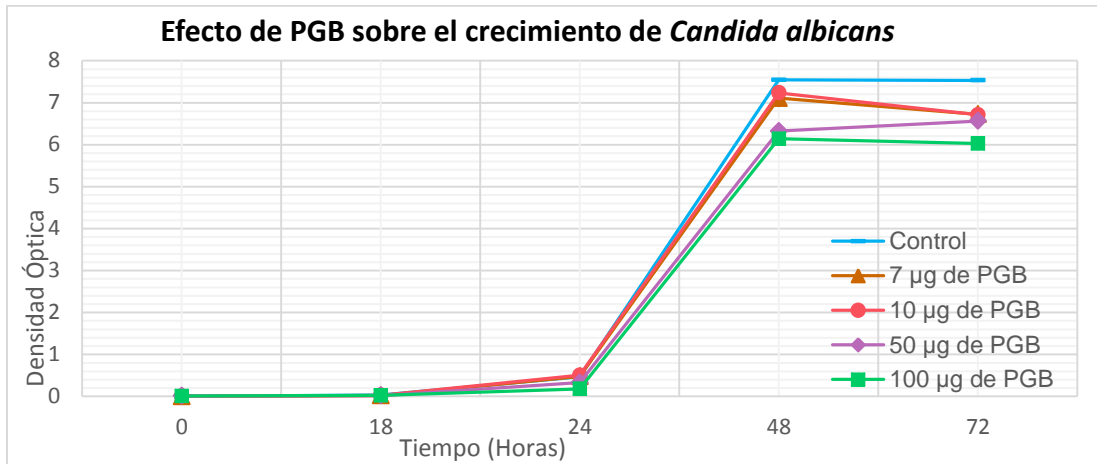
Efecto de Gabapentina, Pregabalina, GABA y Lorazepam en dosis periódicas sobre el crecimiento de *Candida albicans*

Densidad Óptica

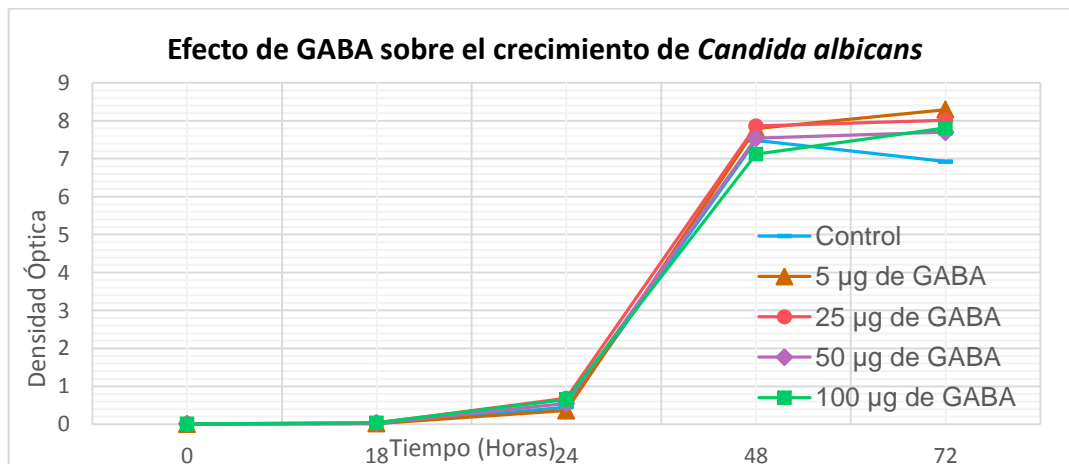
Para todos los grupos de Gabapentina, Pregablina y GABA en adiciones periódicas de cada 18 h, se observó nuevamente que el patrón de crecimiento se iniciaba a las 24 horas, alcanzaba el pico máximo a las 48 horas y a partir de este tiempo se estabilizaba (**Gráfica 6, 7 y 8**).



Gráfica 6. Evaluación de la densidad óptica con la adición de GBP a diferentes concentraciones. Se observa que el crecimiento de la levadura en el grupo control fue similar como se ha descrito anteriormente, mientras que las concentraciones de GBP tuvieron un menor crecimiento a las 48 horas, sin embargo se igualaron a las 72 horas con el grupo control.



Gráfica 7. Evaluación de la densidad óptica con la adición de PGB a diferentes concentraciones. El crecimiento de la levadura en el grupo control y las demás concentraciones crecieron de manera similar. Se observan dos cosas: que el control tuvo el crecimiento más alto y un ligero decrecimiento de la concentración a 100 µg/mL en los últimos tiempos.

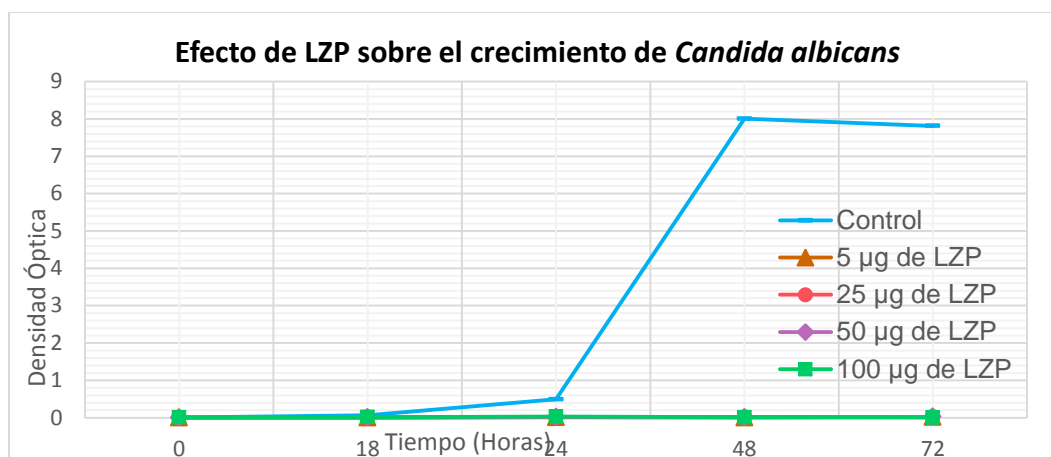


Gráfica 8. Evaluación de la densidad óptica con la adición de GABA a diferentes concentraciones. Se observa que el crecimiento de la levadura en el grupo control y las demás concentraciones crecieron de manera similar. A pesar de que el control tuvo un mayor crecimiento no difiere mucho con las concentraciones de GABA.

Análisis estadístico de gabapentina, pregabalina y GABA

El análisis de varianza mostró una $p = 0.999$, la prueba de Tukey mostró valores P ajustado de $p = 0.999-1.00$ y para la prueba de comparaciones múltiples empleando el método de Dunnett el valor P ajustado fue de $p = 0.997-1.00$, con el cual se acepta la hipótesis nula que establece que todas las medias son iguales: no hay diferencia significativa entre las concentraciones.

Para lorazepam sólo se observó crecimiento en la matraz que contenía al control en el mismo patrón que se ha descrito anteriormente (**Gráfica 9**).



Gráfica 9. Evaluación de la densidad óptica con la adición de LZZP a diferentes concentraciones. Se observa que el crecimiento de la levadura en el grupo control fue elevado y constante a las 72 horas, mientras que en las demás concentraciones no se observó crecimiento.

Análisis estadístico de lorazepam

El análisis de varianza muestra una $P=0.047$, la prueba de Tukey mostró valores P ajustados de $P=0.088-1.00$ y para la prueba de comparaciones múltiples empleando el método de Dunnett el valor P ajustado fue de $P= 0.045$, por lo que estadísticamente hay diferencias significativas entre las concentraciones usadas.

Número de Células (levaduras x mL) y UFC

Se realizó el conteo de células tomando 10 µL del medio de cultivo conteniendo los diferentes compuestos químicos y se extrapolaron al número de levaduras contenidas en 1 mL. Para el conteo de UFCs los resultados fueron incontables, debido a que las colonias eran muy abundantes en todas las concentraciones de gabapentina, pregabalina, GABA y el control a partir de las 18 h (**Tabla 5, 6 y 7**).

Tabla 5. Conteo de células y de UFCs para *Candida albicans* + GBP.

Tratamiento	N° células/mL	UFC/mL
Control	33,233,333	Incontables
8 µg	16,660,000	Incontables
15 µg	16,980,000	Incontables
50 µg	18,580,000	Incontables
100 µg	22,250,000	Incontables

Tabla 6. Conteo de células y de UFCs para *Candida albicans* + PGB.

Tratamiento	N° células/mL	UFC/mL
Control	23,560,000	Incontables
7 µg	22,000,000	Incontables
10 µg	16,470,000	Incontables
50 µg	14,860,000	Incontables
100 µg	15,610,000	Incontables

Tabla 7. Conteo de células y de UFCs para *Candida albicans* + GABA

Tratamiento	N° células/mL	UFC/mL
Control	22,500,000	Incontables
5 µg	20,650,000	Incontables
25 µg	31,020,000	Incontables
50 µg	19,630,000	Incontables
100 µg	19,090,000	Incontables

En el matraz que contenía lorazepam (**Tabla 8**) el número de levaduras se mantuvo bajo durante todo el estudio, por lo que pudo realizarse el conteo celular, cuyos resultados fueron escasos.

Tabla 8. Conteo de células y de UFCs para *Candida albicans* + LZP.

Tratamiento	N° células/mL	UFC/mL
Control	20,670,000	Incontables
5 µg	210,000	2000
25 µg	70,000	2000
50 µg	60,000	1000
100 µg	10,000	0

Efecto de los diferentes medicamentos en la morfología de *Candida albicans*

A lo largo del estudio en adición periódica de gabapentina se observaron algunos cambios morfológicos que refieren se observó a la presencia de pocas pseudohifas y levaduras de mayor tamaño (**Figura 10**), fueron más evidentes a las 72 h de incubación.

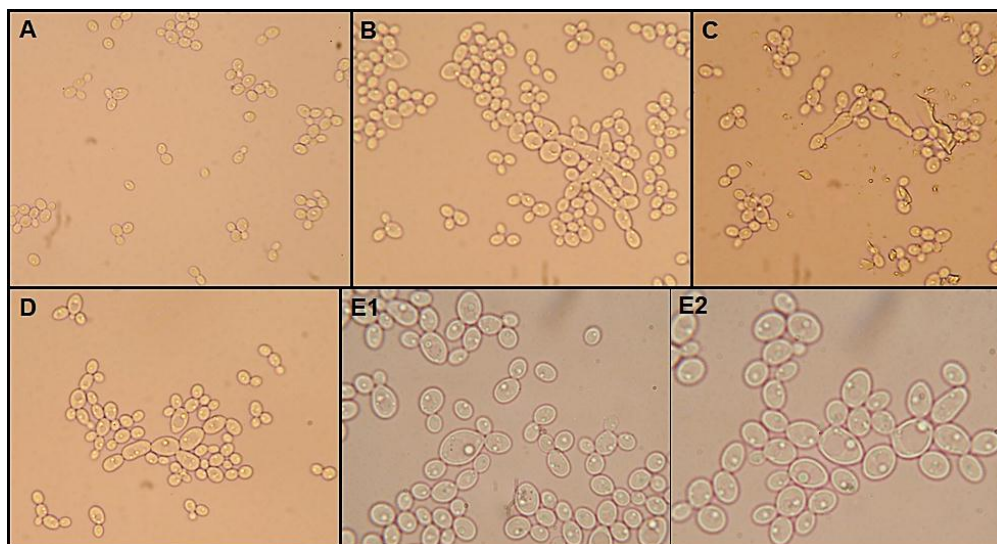


Figura 10. Morfología de *C. albicans* en presencia de **GBP** (72 h). **A**) Control: levaduras. **B**) 8 µg/mL **C**) 15 µg/mL. **D**) 50 µg/mL. En B), C) y D) hay pseudohifas. (40X). **E**) 100 µg/mL: levaduras deformadas, globosas (100x).

El estudio morfológica de *C. albicans* incubada con pregabalina indujo la formación de pseudohifas (**Figura 11**), las cuales estuvieron presentes en todas las concentraciones a partir de las 24 hasta, siendo aún más abundantes y largas a las 72 h.

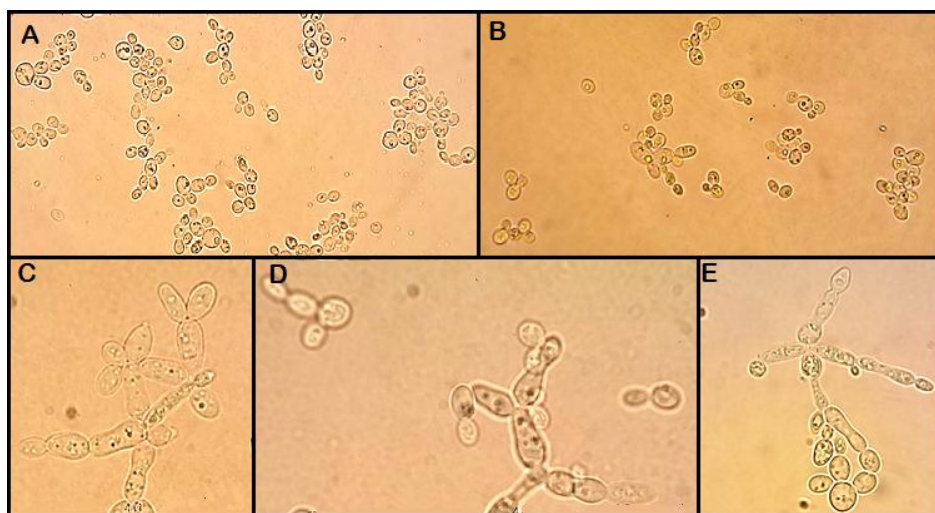


Figura 11. Morfología de *C. albicans* con adición periódica de **PGB** (72 h). **A**) Control: levaduras (40x); **B**) 7 µg/mL (40x). En **C**) (10 µg/mL), **D**) (50 µg/mL) y **E**) (100 µg/mL) se observan pseudohifas. (100x).

La morfología de *C. albicans* frente a GABA (**Figura 12**) consistió en escasas pseudohifas en las concentraciones empleadas y cúmulos de levaduras tanto en el control como en presencia del medicamento.

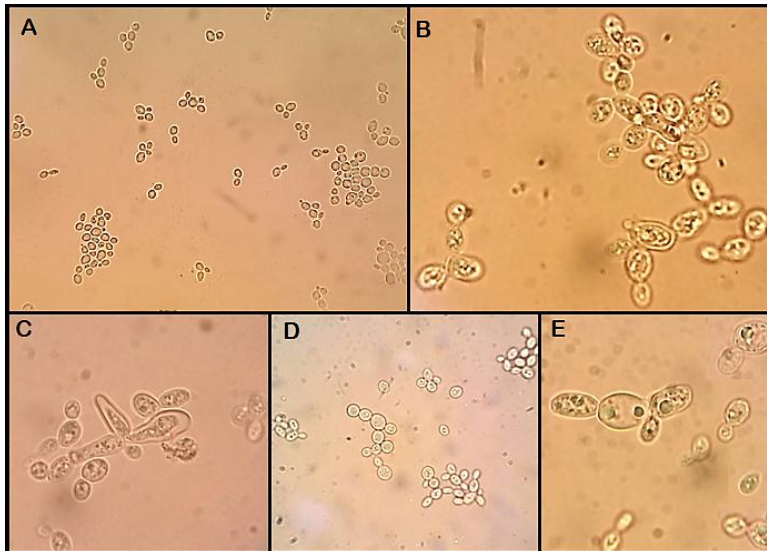


Figura 12. Cultivo de *C. albicans* en presencia de GABA con adición periódica (72 h). **A**) Control: levaduras (10x). **B**) 8 µg/mL: formación de levaduras en cadena. (100x). **C**) 15 µg/mL: pseudohifa. (100x). **D**) 50 µg/mL: hay pseudohifas. (40x). **E**) 100 µg/mL: levaduras de mayor tamaño (100x).

En el control de lorazepam sólo se observan levaduras de aspecto típico. Con las diferentes concentraciones no se observó crecimiento levaduriforme (**Figura 13**).

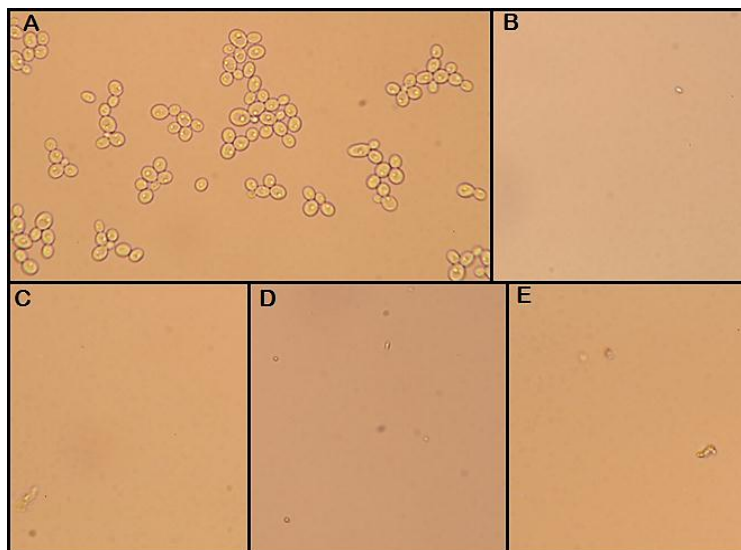
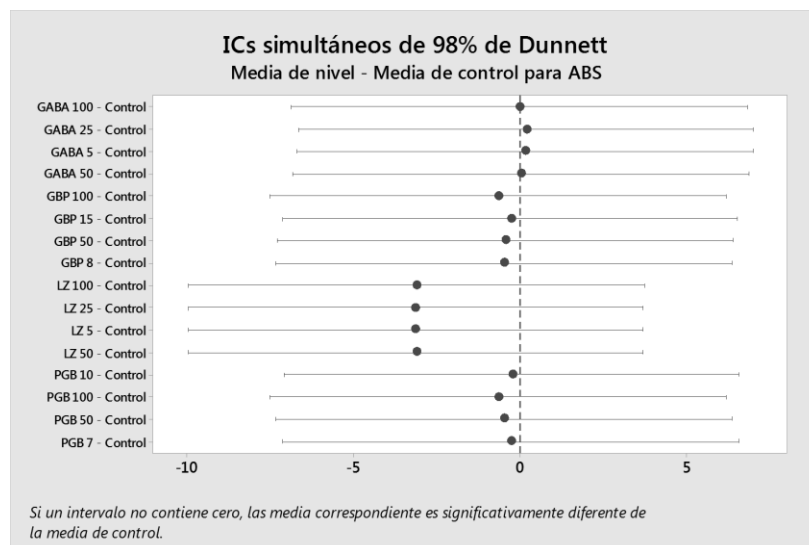


Figura 13. Morfología de *C. albicans* en presencia de LOR con adición periódica (72 h). **A**) Control. Se observan levaduras de aspecto normal. En **B**) (5 µg/mL), **C**) (25 µg/mL), **D**) (50 µg/mL) y **E**) (100 µg/mL) (40x) no se observan levaduras.

Análisis estadístico integral de los fármacos adicionados periódicamente

Se realizó un análisis en conjunto para conocer el efecto de los cuatro fármacos y observar diferencias estadísticas, no obstante, de manera grupal no hay diferencias significativas entre los fármacos: $p = 0.727$, aún cuando el fármaco lorazepam ocasionó diferencias en un análisis individual.



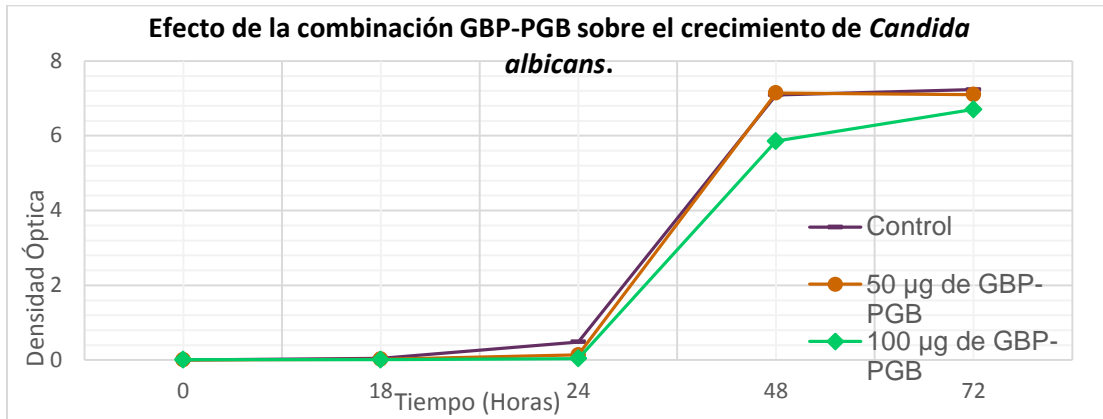
Gráfica 10. Gráfica de Intervalos de confianza empleando el Método de Dunnett para comparaciones múltiples de los fármacos en una dosis inicial. Todos los intervalos establecidos contienen al cero con respecto al control por lo que no hay diferencias significativas entre los fármacos de manera conjunta.

Efecto de Gabapentina, Pregabalina, GABA en combinación (dosis única) sobre el crecimiento de *Candida albicans*

Para esta fase experimental se realizaron combinaciones entre tres fármacos (GBP, PGB y GABA) obtenido un total de tres combinaciones (GBP-PGB, GBP-GABA y PGB-GABA), se emplearon las concentraciones de 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y un control. Se evaluó el crecimiento con una dosis inicial y con dosis periódicas.

Densidad Óptica

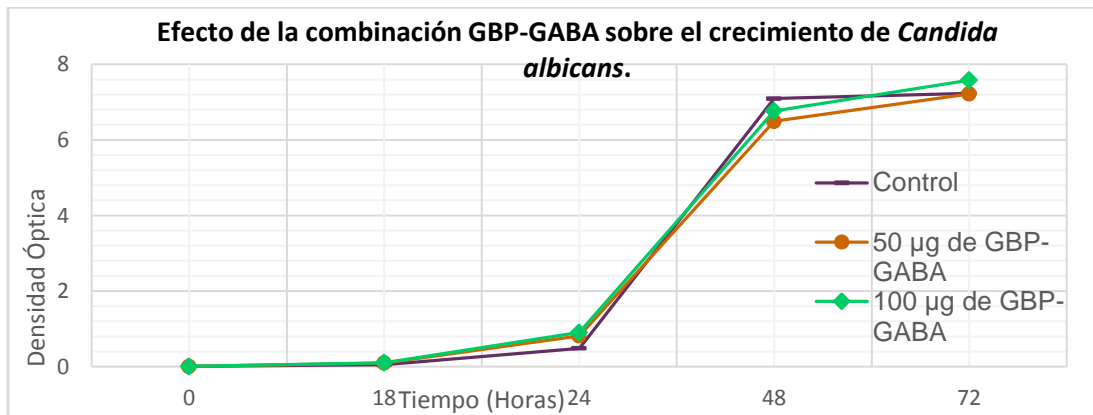
Se observó el mismo patrón: el crecimiento se dispara a las 24 horas, alcanzó el pico máximo a las 48 horas y a partir de este tiempo se estabilizó, de manera general, las combinaciones tuvieron un crecimiento similar (**Gráfica 11, 12 y 13**).



Gráfica 11. Evaluación de la densidad óptica con la adición de GBP-PGB en dos concentraciones. El crecimiento de la levadura en el grupo control y con 50 µg/mL fue constante a las 72 horas, mientras que la concentración más alta tuvo menor crecimiento.

Análisis estadístico de GBP-PGB

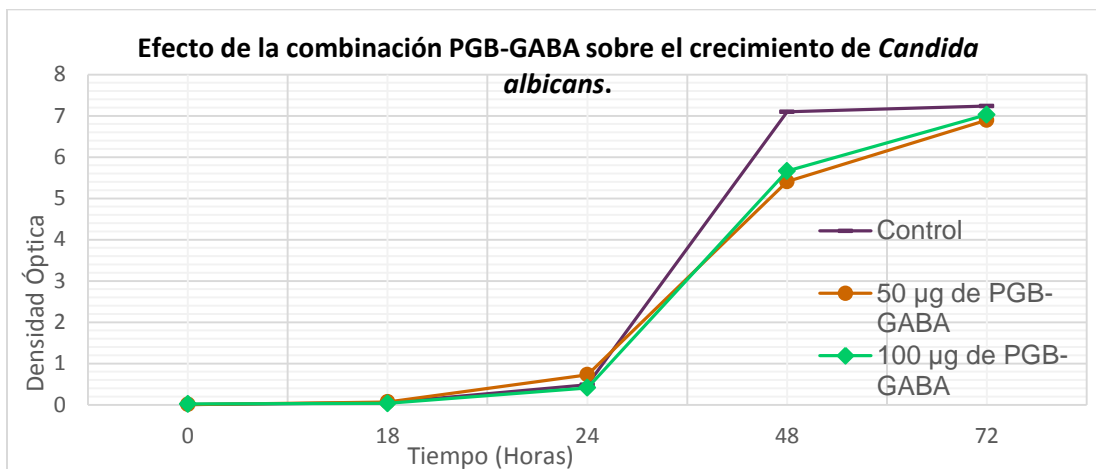
El análisis de varianza muestra una $p = 0.980$, la prueba de Tukey mostró valores P ajustado de $P=0.980-0.999$ y para la prueba de Dunnett el valor P ajustado fue de $P=0.973-0.999$, se concluye que no hay diferencia significativa entre las concentraciones de las combinaciones en D.O.



Gráfica 12. Evaluación de la densidad óptica con la adición de GBP-GABA en dos concentraciones. El crecimiento de la levadura en el grupo control y con 50 µg/mL fue constante a las 72 horas, mientras que la concentración más alta (100 µg/mL) tuvo un ligero incremento.

Análisis estadístico de GBP-GABA

El análisis de varianza muestra una $p = 0.998$, las pruebas de Tukey y de Dunnett el valor P ajustado mostró valores que iban de $P=0.998-1.00$, por lo que no hay diferencia significativa entre las concentraciones de las combinaciones en D.O.



Gráfica 13. Evaluación de la densidad óptica con la adición de GBP-GABA en dos concentraciones. Las concentraciones tuvieron un menor crecimiento con respecto al control.

Análisis estadístico de PGB-GABA

El análisis de varianza muestra una $p = 0.984$, la prueba de Tukey mostró valores P ajustado de $p=0.986-1.00$ y para la prueba Dunnett el valor P ajustado fue de $p=0.982-0.983$, se concluye que no hay diferencia significativa entre las concentraciones de las combinaciones en D.O.

Número de Células (levaduras x mL) y UFCs

Se realizó el conteo de células tomando 10 µL del medio de cultivo conteniendo los diferentes compuestos químicos y se extrapoló al números de levaduras contenidas en 1 mL. Para el conteo de UFCs los resultados fueron incontables, debido a que las colonias eran muy abundantes en todas las concentraciones de las combinaciones A, B, C y en el control apartir de las 18 h (**Tabla 9, 10 y 11**).

Tabla 9. Conteo de células y de UFCs para *Candida albicans* + GBP-PGB

Tratamiento	N° células/mL	UFC/mL
Control	19,920,000	Incontables
50 µg	16,340,000	Incontables
100 µg	10,640,000	Incontables

Tabla 10. Conteo de células y de UFCs para *Candida albicans* + GBP-GABA

Tratamiento	N° células/mL	UFC/mL
Control	19,920,000	Incontables
50 µg	13,950,000	Incontables
100 µg	17,870,000	Incontables

Tabla 11. Conteo de células y de UFCs para *Candida albicans* + PGB-GABA

Tratamiento	N° células/mL	UFC/mL
Control	19,920,000	Incontables
50 µg	18,380,000	Incontables
100 µg	11,190,000	Incontables

Efecto de la combinación de medicamentos sobre la morfología de *Candida albicans*

La adición de GBP-PGB indujo la formación de estructuras pseudohifales y levaduras en gemación las cuales fueron más notorias con 100 µg/mL (**Figura 14**).

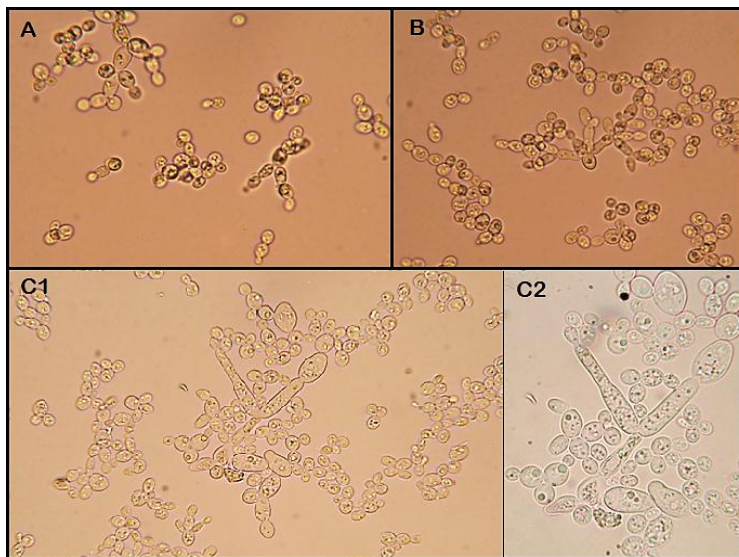


Figura 14. Morfología de *C. albicans* en presencia de **GBP-PGB** (72 h). **A)** Control: levaduras. En **B)** (50 µg/ml). (40x). **C1** y **C2)** 100 µg/ml (40x y 100x) hay presencia de pseudohifas.

Para la combinación B (GBP-GABA) se observó la presencia de pseudohifas y levaduras en mayor tamaño las cuales fueron abundantes en las concentraciones usadas (**Figura 15**).

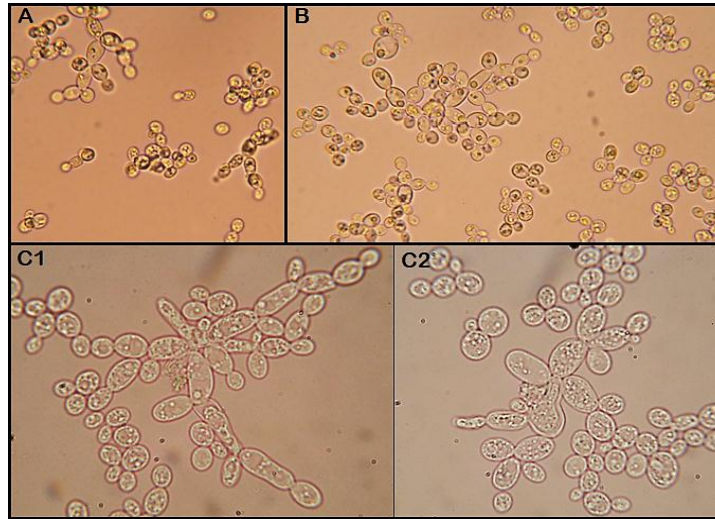


Figura 15. Morfología de *C. albicans* en presencia de **GBP-GABA** (72 h). **A)** Control: levaduras (40x).; **B)** 50 µg/mL: pseudohifas. (40x). y **C)** 100 µg/mL: pseudohifas largas (100x).

En la combinación PGB-GABA se observaron escasas pseudohifas (**Figura 16**).

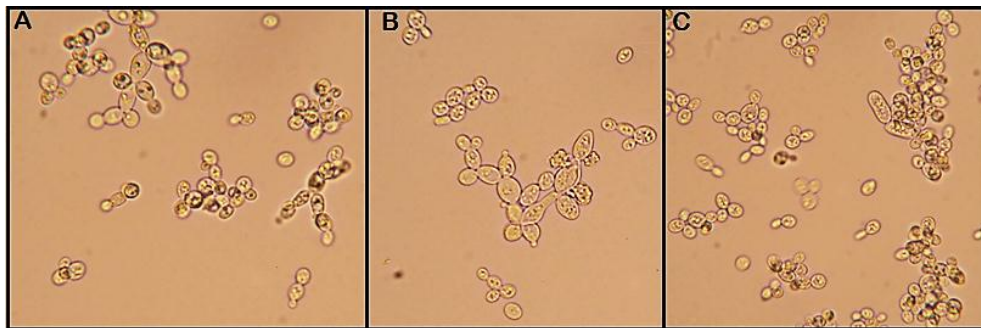
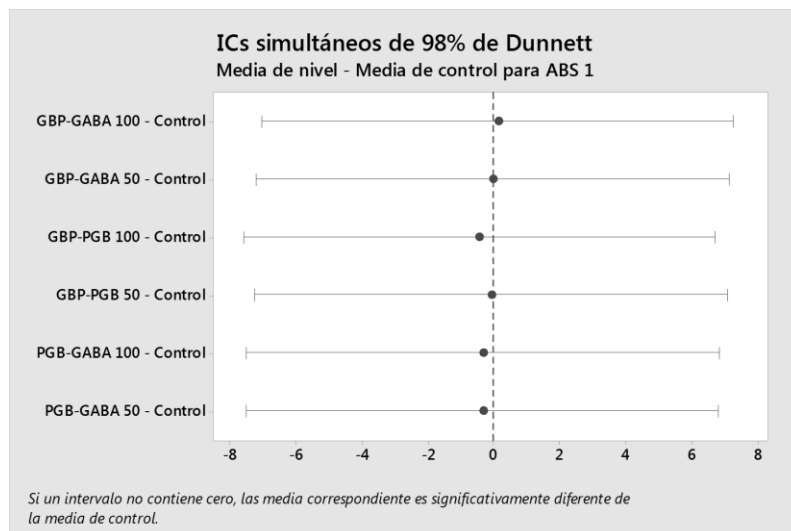


Figura 16. Morfología de *C. albicans* en presencia de **PGB-GABA** (72 h). **A)** Control: levaduras. **B)** 50 µg/mL: hay pseudohifas. **C)** 100 µg/mL: pseudohifas y pequeños cúmulos de levaduras. (40x).

Análisis estadístico integral por combinación de fármacos

Se realizó un análisis en conjunto para conocer el efecto de las combinaciones de los fármacos y así, observar diferencias estadísticas, no se observan diferencias estadísticas: $p = 1.000$

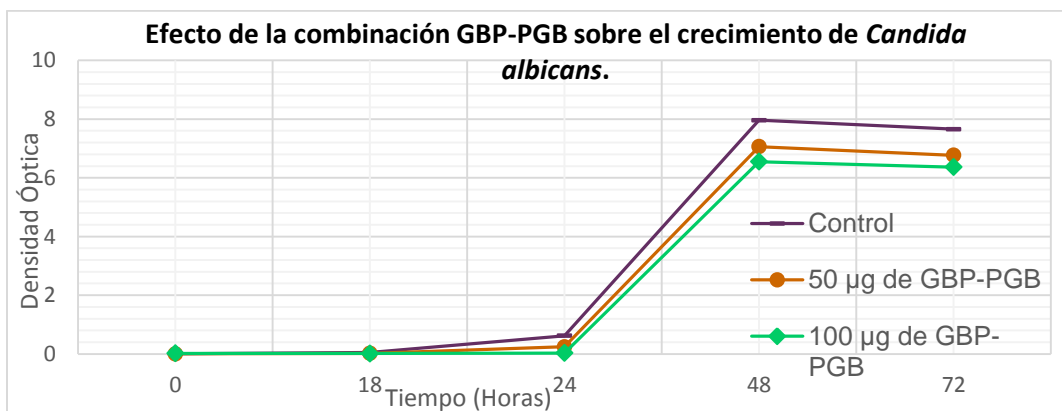


Gráfica 14. Gráfica de Intervalos de confianza empleando el Método de Dunnett para comparaciones múltiples de los fármacos en una dosis inicial. Todos los intervalos establecidos contienen al cero con respecto al control por lo que no hay diferencias significativas entre los fármacos de manera conjunta.

Efecto de Gabapentina, Pregabalina, GABA en combinación (dosis periódica) sobre el crecimiento de *Candida albicans*

Densidad Óptica

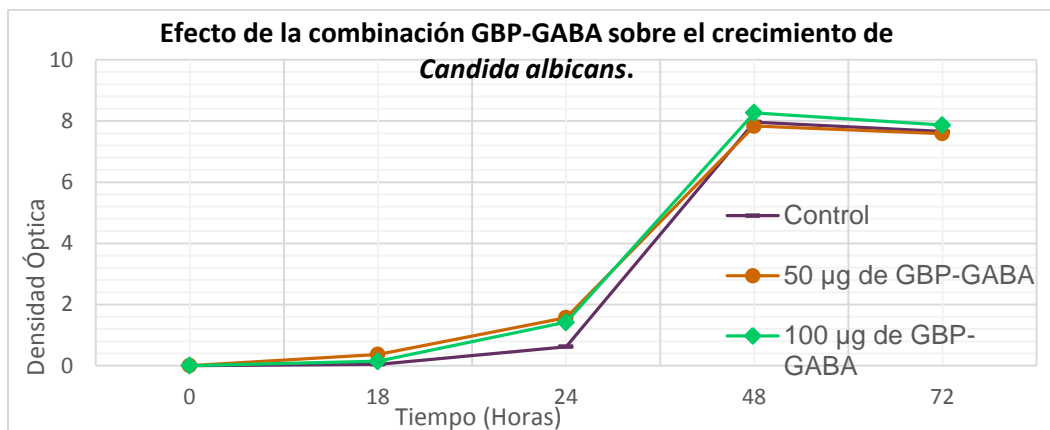
El patrón de crecimiento de *C. albicans* fue similar a los resultados previos. La combinación GBP-PGB mostró una ligera tendencia a inhibir el crecimiento a partir de las 48 h. Sin embargo, no hubo diferencia estadísticamente significativa (Gráfica 15, 16 y 17).



Gráfica 15. Evaluación de la densidad óptica con la adición de GBP-GABA en dos concentraciones. La combinación indujo un ligero crecimiento menor con respecto al control.

Análisis estadístico de GBP-PGB.

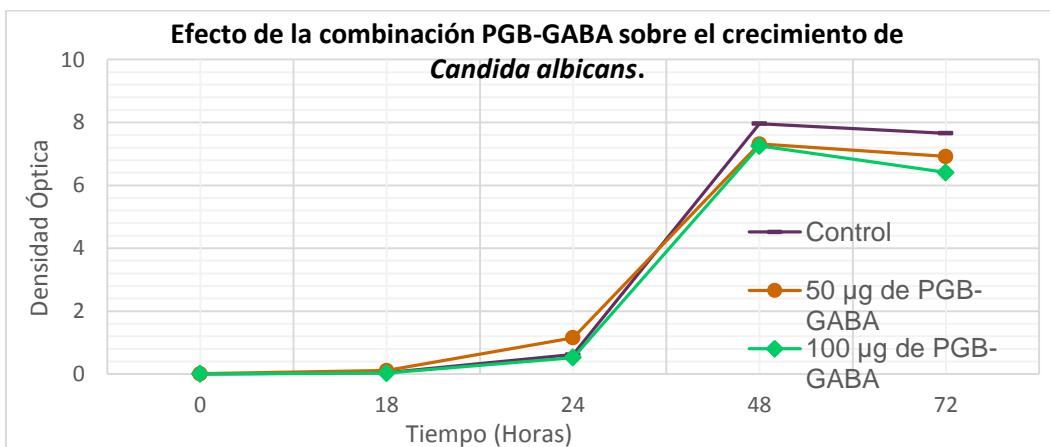
El análisis de varianza arroja una $p = 0.962$, la prueba de Tukey mostró valores P ajustado de $p=0.960-0.995$ y para la prueba de Dunnett el valor P ajustado fue de $p=0.947-0.976$, se concluye que no hay diferencia significativa entre las concentraciones de las combinaciones.



Gráfica 16. Evaluación de la densidad óptica con la adición de GBP-GABA en dos concentraciones. Los medicamentos y el control tuvieron un crecimiento similar.

Análisis estadístico de GBP-GABA

El análisis de varianza muestra una $p = 0.993$, la prueba de Tukey mostró valores P ajustado de $p=0.993-1.00$ y para la prueba de Dunnett el valor P ajustado fue de $p=0.991-0.995$, se concluye que no hay diferencia significativa entre las concentraciones de las combinaciones.



Gráfica 17. Evaluación de la densidad óptica con la adición de GBP-GABA en dos concentraciones. Las concentraciones tuvieron un menor crecimiento con respecto al control.

Análisis estadístico de PGB-GABA

El análisis de varianza muestra una $p = 0.985$, la prueba de Tukey mostró valores P ajustado de $p=0.984-0.998$ y para la prueba de Dunnett el valor P ajustado fue de $p=0.979-0.997$, se concluye que no hay diferencia significativa entre las concentraciones de las combinaciones.

Número de Células (levaduras x mL), UFC y Análisis Estadístico

Se realizó el conteo de células tomando 10 μ L del medio de cultivo conteniendo los diferentes compuestos químicos y se extrapoló al número de levaduras contenidas en 1 mL. Para el conteo de UFCs los resultados fueron incontables, debido a que las colonias eran muy abundantes en todas las concentraciones de las combinaciones A, B, C y en el control a partir de las 18 h (**Tabla 12, 13 y 14**).

Tabla 12. Conteo de células y de unidades formadoras de colonias (UFC).

Tratamiento	N° células/mL	UFC/mL
Control	23,420,000	Incontables
50 μ g	13,910,000	Incontables
100 μ g	15,420,000	Incontables

Tabla 13. Conteo de células y de unidades formadoras de colonias (UFC).

Tratamiento	N° células/mL	UFC/mL
Control	23,420,000	Incontables
50 μ g	28,430,000	Incontables
100 μ g	24,100,000	Incontables

Tabla 14. Conteo de células y de unidades formadoras de colonias (UFC).

Tratamiento	N° células/mL	UFC/mL
Control	23,420,000	Incontables
50 μ g	18,290,000	Incontables
100 μ g	18,510,000	Incontables

Efecto de la combinación de medicamentos sobre la morfología de *Candida albicans*

La morfología observada a la combinación A (GBP-PGB) hace referencia a cúmulos de levaduras principalmente, no obstante también se aprecian levaduras en cadena y levaduras en gemación (**Figura 17**).

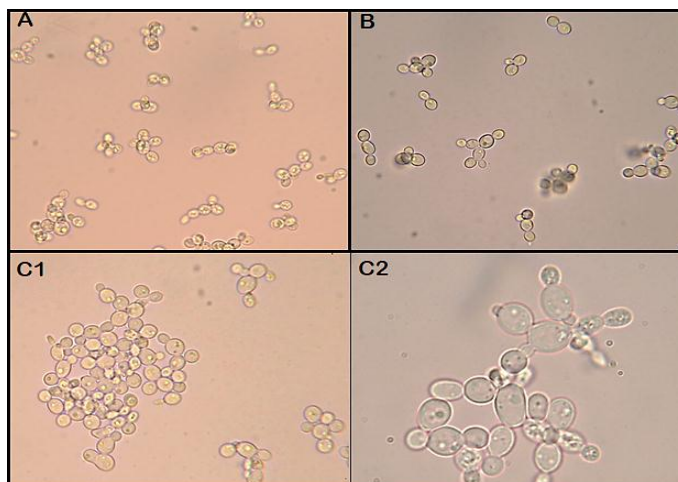


Figura 17. Morfología de *C. albicans* en presencia de **GBP-PGB** con adición periódica (72h). **A)** Control (40x). **B)** 50 µg/mL. (40x). En **C1)** (40x) y **C2)** (100 µg/MI) (100x) se observan principalmente cúmulos de levaduras y algunas pseudohifas.

Bajo la combinación GBP-GABA (**Figura 18**) se observaron levaduras globosas, en cadena, con la concentración más alta.

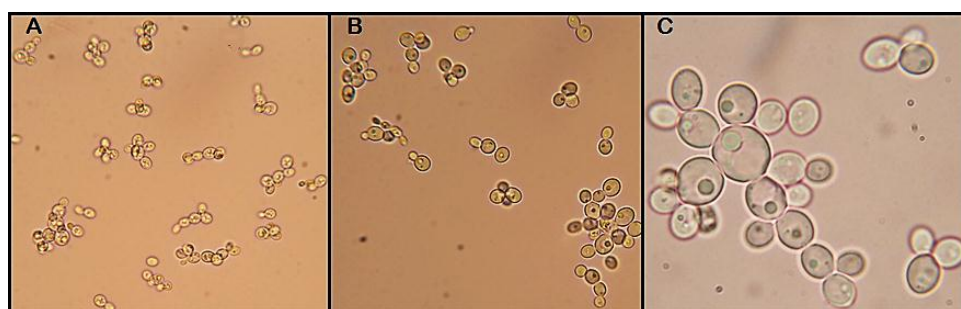


Figura 18. Morfología de *C. albicans* en presencia de **GBP-GABA**, en adición periódica (72 h). **A)** Control: levaduras. **B)** 50 µg/mL. (40x). **C)** 100 µg/mL: levaduras de mayor tamaño y en cadena. (100x).

La combinación PGB-GABA indujo la formación de pseudohifas en las dos concentraciones utilizadas (**Figura 19**).

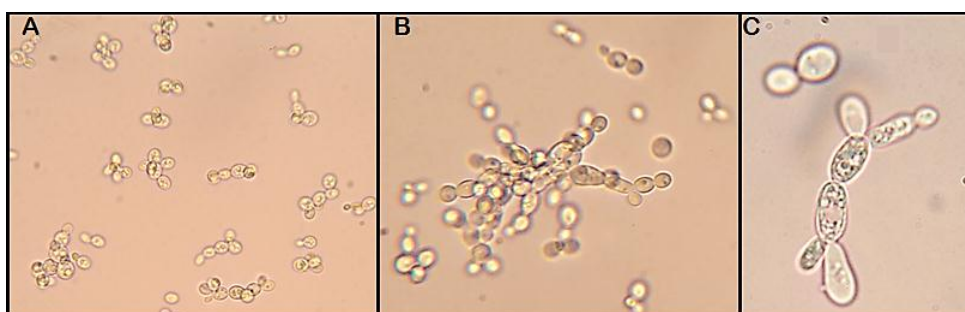


Figura 19. Morfología de *C. albicans* en presencia de **PGB-GABA** en adición periódica (72 h). **A)** Control: levaduras. **B)** 50 µg/MI (40x). **C)** 100 µg/MI (100x). En B y C se observan pseudohifas.

Análisis estadístico integral por combinación de fármacos

El análisis estadístico, sugiere que no hay diferencias estadísticas entre las combinaciones periódicas: $p = 1.000$.

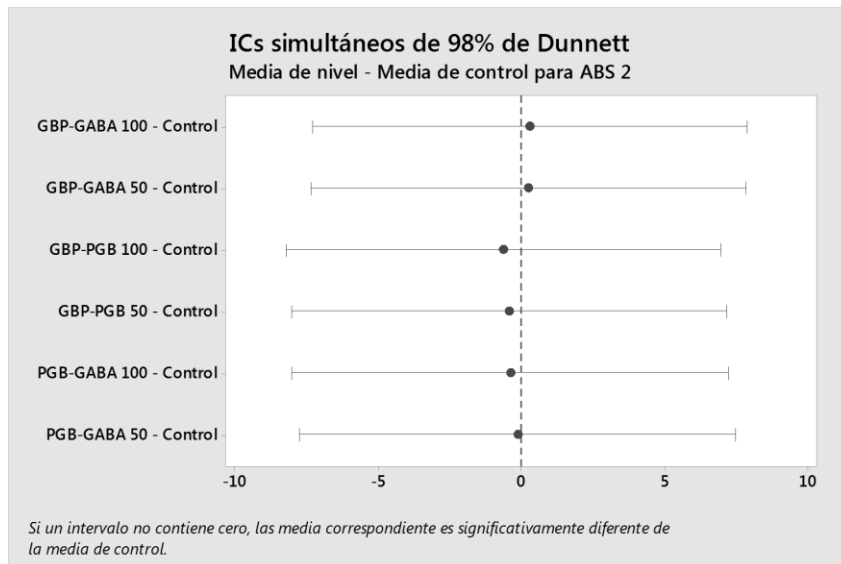


Gráfico 18. Gráfica de Intervalos de confianza empleando el Método de Dunnett para comparaciones múltiples de los fármacos en una dosis inicial. Todos los intervalos establecidos contienen al cero con respecto al control por lo que no hay diferencias significativas entre los fármacos de manera conjunta.

Podemos resumir la morfología obtenida de la siguiente forma:

Cuadro 2. Morfología obtenida a las concentraciones más altas usadas.

Compuesto	Unico		En combinación	
	Dosis única	Dosis periódica	Dosis única	Dosis periódica
Control				
GBP			GBP-PGB 	GBP-PGB
PGB			GBP-GABA 	GBP-GABA
GABA			PGB-GABA 	PGB-GABA
LZP			No se realizó	No se realizó

DISCUSIÓN

El medio mínimo utilizado en este trabajo tiene la característica de ser químicamente definido, por lo que se encuentra clasificado como un medio sintético (Tortora *et al.*, 2007). Este medio en particular contiene la cantidad mínima de nutrientes que permiten el crecimiento de cualquier microorganismo; entre sus componentes se encuentra un medio basal y una fuente de carbono (Negróni, 2009). Para este estudio el medio mínimo estuvo constituido por YNB como medio basal y glucosa como fuente de carbono. El YNB (o base de nitrógeno de levadura) es un medio adecuado para estudiar el efecto metabólico de ciertas vitaminas en las levaduras. En este estudio en lugar de vitaminas, estudiamos el efecto de algunos fármacos, condiciones para las cuales el medio mínimo fue considerado adecuado.

Desde los años 90s, los compuestos análogos a GABA, la gabapentina y la pregabalina han sido utilizados para tratar enfermedades neurológicas, particularmente la epilepsia y la ansiedad; pero también han mostrado efectividad en el trastorno bipolar y diversas neuropatías (enfermedades neuronales) ya mencionadas a lo largo de este estudio. Previamente (en los años 60s), el lorazepam, una benzodiacepina sintética había mostrado efectos como ansiolítico e inductor del sueño.

Por otra parte, GABA es un neurotransmisor inhibitor del SNC, también presente en distintos tejidos y órganos del cuerpo humano; su función es la de activar los canales de cloro y con ello producir efectos sedantes o ansiolíticos mientras inhibe la transmisión de impulsos nerviosos, por lo que GABA no se administra como tal en los pacientes con problemas relacionados, pero sus derivados sí, ya que la alteración en la producción de GABA está fuertemente ligado a enfermedades neuronales como las que se mencionan al principio de este apartado.

Al aplicar los diferentes parámetros (D.O., conteo y viabilidad celulares) observamos que el crecimiento de *C. albicans* en ausencia de cualquier medicamento (control negativo), es evidente a partir de las 24 horas y alcanza un pico máximo a las 48 horas. Este nivel de crecimiento se visualizó como una meseta que se mantiene constante hasta las 72 horas, tiempo máximo de observación en este trabajo. Este patrón de reproducción se observó en presencia de GABA, pregabalina y gabapentina, de modo que, al presentarse tanto en el control como en los fármacos, estos no tienen efecto alguno sobre el crecimiento de *C. albicans*.

En la literatura existen algunos reportes de estudio con GABA, en 2012, Reyes y colaboradores reportaron que, *In vitro*, la adición del compuesto GABA

induce la formación de tubos germinativos en *C. albicans* y la expresión de fosfolipasa B, el cual es un factor de virulencia de la levadura. En este estudio se encontró escasa formación de pseudohifas inducidas por el GABA, fenómeno que podría estar estrechamente relacionado con la formación de tubo germinativo, previamente en 2007, la autora y colaboradores habían probado la expresión de receptores a GABA en macrófagos de ratón, evidenciando su papel en las células.

Cabe mencionar que las concentraciones usadas por Reyes y colaboradores para observar este cambio fueron de 1 a 20 mM, mucho menor a la concentración que en este estudio utilizamos y con una metodología distinta: inoculados en placa, con otro medio y en menor tiempo. En nuestro estudio esperábamos encontrar algún tipo de efecto notorio al aumentar la concentración, así como un efecto que pudiese compararse entre los fármacos a las mismas concentraciones.

Por otra parte, se ha reportado que *C. albicans* posee un transportador de polianiones que introduce GABA, por lo que puede utilizar este aminoácido, al igual que otros hongos, como fuente de nitrógeno (McNemar *et al.*, 2001), sin embargo, en nuestro estudio la formación de pseudohifas fue escasa por lo que suponemos que aun cuando *C. albicans* puede utilizar GABA, es probable que requiera otros factores o estímulos para una mayor expresión.

Kruszewska *et al.* (2004), estudiaron la gabapentina, ellos evaluaron la actividad antimicrobiana de diversos medicamentos no antibióticos (incluida la gabapentina) contra cuatro microorganismos patógenos (*S Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*); las autoras indican que que no hay efecto de GBP contra *C. albicans*. En el presente trabajo, durante la incubación *C. albicans* con gabapentina se observaron pseudohifas; sin embargo, el crecimiento no fue estadísticamente diferente al control; este fármaco no tuvo efecto en el crecimiento, pero sí en la morfología.

Para pregabalina, no se cuenta con información o referencia bibliográfica sobre su efecto en microorganismos. En el presente estudio ninguno de los compuestos evaluados tuvo algún efecto en el crecimiento de *Candida albicans*.

Respecto al agonista, sea descrito que, junto con otras benzodiazepinas, el lorazepam inhibe el crecimiento y el dimorfismo (entre otras características) de *C. albicans* en medio RPMI (Kathwate *et al.*, 2015). En este trabajo pudimos confirmar el efecto en el crecimiento de la levadura. Durante la incubación de *C. albicans* con lorazepam, el comportamiento de la D.O fue diferente en una sola dosis inicial o en dosis periódicas al medio de cultivo: En una dosis inicial de 5 µg/mL, el crecimiento (determinado por D.O.) fue evidenciado hasta las 48 h

(retrasado con respecto al control). Con 25 µg/L, el crecimiento fue mínimo; y con 50 y 100 µg/mL no hubo crecimiento, lo cual se observó en la **Gráfica 4**.

Con la adición de dosis periódica de lorazepam no se detectó crecimiento (ver **Gráfica 8**). Nuestros resultados sugieren que efectivamente el Lorazepam inhibe el crecimiento de *C. albicans*, y este efecto es dosis-dependiente, lo cual también coincide con lo reportado por Kathwate y colaboradores (2015) aunque utilizando otra metodología (microscopía electrónica, formación de biopelículas, pruebas de tubo germinativo y RPMI como medio de cultivo) y concentraciones que iban de los 25-125 µg/mL.

Respecto a los dos controles, el control negativo, el cual contenía sólo Etanol; el crecimiento de *C. albicans* (determinado por D. O.) fue evidente a las 48 h de incubación. En contraste con el segundo control el cual fue diluido en agua y que contenía lorazepam; el efecto inhibitor de este fármaco sobre el crecimiento de *C. albicans* fue evidente, por lo que podemos atribuir que lorazepam tienen un efecto inhibitor contra *C. albicans*.

La viabilidad de *C. albicans* en presencia de lorazepam tanto con una dosis única como con dosis periódicas, fue notablemente afectada: el número de colonias fue muy reducido y de aparición retardada respecto al control. Esta parte fue diseñada de manera original, por lo que no hay antecedentes del empleo de la viabilidad celular en el crecimiento de *C. albicans* con lorazepam.

Durante la incubación de *Candida albicans* con GABA, gabapentina y principalmente con pregabalina en todos los tiempos y todas las concentraciones, se observaron pseudohifas; este cambio morfológico no se vio reflejado en cambios relacionados con el crecimiento (D.O. y número de levaduras) y viabilidad celular. Las pseudohifas son estructuras que se caracterizan por tener una forma elipsoidal, son septadas y en la agrupación celular cada célula cuenta con un núcleo y membrana únicos (Thompson *et al.*, 2011). En casos de infección, estructuras tanto hifa, pseudohifa como levadura son encontradas en un huésped infectado con el hongo (Jacobsen *et al.*, 2012), por lo que podemos atribuir a que el medio, junto con los compuestos generan un estrés ambiental dando lugar al cambio morfológico de la levadura a pseudohifa.

Particularmente para pregabalina, compuesto con el que se observaron abundantes pseudohifas se demostró que el metanol (disolvente del fármaco) no influyó en la formación de pseudohifas, por lo que el efecto se atribuye específicamente a la pregabalina.

En el caso de GABA se observaron escasas pseudohifas y con lorazepam hubo escaso crecimiento, aun así, al igual que en el inóculo sólo se observaron levaduras.

El pH del MMS antes de la incubación fue de cinco (pH 5.0), al terminar la incubación, el pH del control fue de tres (pH 3.0), mientras que el de las concentraciones fue dos (pH 2.0), de acuerdo con lo reportado por Sudbery y colaboradores (2004), a un pH menor a seis (pH <6) se observan generalmente levaduras, lo cual se observó en el control, mientras que a pH más altos (pH >7) se observa pseudohifas e hifas, lo cual fue contrario a las concentraciones que usamos, en los que a pesar de tener un pH muy ácido se observaron pseudohifas.

De acuerdo con los mecanismo de patogenicidad de *Candida albicans* descritos por Mayer y colaboradores (2013) aunque el pH juega un papel importante hay más factores que intervienen en el dimorfismo, como lo es la temperatura y el sensor ambiental (*sensing emviromental*), en este trabajo tuvimos temperaturas elevadas y pH ácidos tanto para el control como las concentraciones, sin embargo, en el control estos factores no indujeron el dimorfismo pero en las concentraciones sí, por lo que se concluye que pregabalina, gabapentina y (en menor medida) el GABA en el medio indujeron el dimorfismo.

CONCLUSIONES

Sobre el crecimiento de *Candida albicans*:

- ❖ En presencia de gabapentina, pregabalina y GABA en medio mínimo sintético, en dosis única y periódicas, *Candida albicans* no mostró modificación en su crecimiento, viabilidad, ni cambios estadísticamente significativos con respecto al control negativo.
- ❖ Las combinaciones de los tres fármacos en dosis única y periódica no mostraron un efecto diferente a los medicamentos evaluados por separado sobre el crecimiento de *Candida albicans*.
- ❖ De los fármacos evaluados, solamente el lorazepam en dosis única y periódica afectó la viabilidad de *Candida albicans* e inhibió el crecimiento de manera dosis-dependiente.
- ❖ Los disolventes empleados no tuvieron efecto alguno en el crecimiento de *Candida albicans*.

Sobre la morfología de *Candida albicans*:

- ❖ Pregabalina, y en menor grado Gabapentina y GABA, indujeron la formación de pseudohifas, estructuras asociadas a virulencia de *Candida albicans* tanto en dosis única y periódicas.
- ❖ En presencia de Lorazepam no se observó un cambio en la forma del talo con respecto a los controles.
- ❖ La combinación gabapentina-pregabalina indujo una mayor formación de pseudohifas que las otras combinaciones empleadas tanto en dosis únicas y periódicas.

PERSPECTIVAS

Hoy en día el uso de biología molecular ha ayudado a conocer con mayor certeza los factores genéticos responsables relacionados con la patogenicidad de los microorganismos. Estudios como la secuenciación masiva, podrían brindar información sobre el efecto que pudieran tener los fármacos incluidos en este estudio en el crecimiento, viabilidad y morfología de *Candida albicans*. Este procedimiento permitiría estudiar de forma integral los cambios genéticos de *Candida albicans* frente a dos o más condiciones experimentales usadas.

Considerando que *Candida albicans* en el hospedero humano se encuentra en un ambiente rico en nutrientes y por tiempo indefinido, el cambio de algunos parámetros de estudio como los componentes del medio de cultivo, tiempos más prolongados (días) y temperatura, ayudaría a observar si se propician cambios en la morfología de *Candida albicans* ante un ambiente más nutritivo y con los fármacos.

Un modelo de estudio in vivo podría fortalecer el efecto inhibitor del lorazepam sobre la viabilidad de *Candida albicans*. Así como la formación de pseudohifas por Pregabalina principalmente.

Lo anterior en conjunto podría ayudarnos a vislumbrar un escenario futuro en donde estos medicamentos puedan influir positiva o negativamente en el desarrollo de la candidosis invasiva en humanos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abdou A M, Higashiguchi S, Horie K, Kim M, Hatta H & H Yokogoshi. Relaxation and immunity enhancement effects of γ -Aminobutyric acid (GABA) administration in humans. *BioFactors*. 2006; 26: 201-208.
2. Acebo-González, D y Hernández-García, AT. Los métodos Turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 2013: 44 (1).
3. Antinori S, Milazzo L, Sollima S, Galli M, Corbellino M. Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. *European Journal of Internal Medicine* 2016; 34: 21–28.
4. Araiza J, Montes de Oca G., Olivera R.M.P. y Bonifaz, A. "Balanitis y balanopostitis candidósica. Comunicación de 20 casos." *Dermatología Revista Mexicana* 55.6 (2011): 342-346.
5. Arenas R. *Micología Médica Ilustrada*. 5ta Edición. McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES; 2014
6. Barragan A, Weidner JM, Jin Z, Korpi ER, Birnir B. GABAergic signalling in the immune system. *Acta Physiologica*. 2015; 213(4): 819–827.
7. Badiee P, Jafarian H, Malek-Hosseini SA, Ghasemmi F. Severe Cutaneous Candidiasis in a Liver Transplant Patient. *Int J Organ Transplant Med*. 2019;10(1):46–50.
8. Becton Dickinson. CHROMagar. Instrucciones de uso – Medios en placa listos para usar. BD. 2014
9. Berlin RK, Butler PM, Perloff MD. Gabapentin therapy in psychiatric disorders: a systematic review. *Prim Care Companion CNS Disord* 2015; 17:5.
10. Bian F, Li Z, Offord J, Davis MD, McCormick J, Taylor CP, Walker LC. Calcium channel α 2-delta type 1 subunit is the major binding protein for pregabalin in neocortex, hippocampus, amygdala, and spinal cord: an ex vivo autoradiographic study in α 2-delta type 1 genetically modified mice. *Brian Res* 2006; 23; 1075(1):68-80.
11. Bockbrader HN, Radulovic LL, Posvar EL. Clinical pharmacokinetics of pregabalin in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*. 2010; 50 (8): 941 – 950
12. Boonstra E, de Kleijn R, Colzato LS, Alkemade A, Forstmann BU, Nieuwenhuis S. Neurotransmitters as food supplements: the effects of GABA on brain behavior. *Front. Psychol*. 2015; 6: 1520.
13. Bormann J. The "ABC" of GABA receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2000; 21 (1): 16–19.

14. Brooks JM, Carrillo GL, Su J, Lindsay DS, Fox MA, Blader IJ. Toxoplasma gondii infections alter GABAergic synapses and signaling in the central nervous system. *mBio*. 2015; 6(6): 1–9.
15. Bönnighausen J, Gebhard D, Kröger C, Haderer B, Tumforde T, Lieberei R, Bergemann J, Schafer W & Bormann J. Disruption of the GABA shunt affects mitochondrial respiration and virulence in the cereal pathogen *Fusarium Graminearum*. *Molecular Microbiology*. 2015; 98(6): 1115-1132.
16. Camacho A, Giles M, Ortegón A, Palao M, Serrano B, Velázquez O. *Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos*. 2ª ed. UNAM, México. 2009
17. Calandre EP, Rico-Villademoros and Slim M. Alpha2delta ligands, gabapentin, pregabalin and mirogabalin: a review of their clinical pharmacology and therapeutic use. *Expert Rev Neurother*. 2016;16(11):1263-1277
18. Calderone RA, Clancy CJ. *Candida and Candidiasis*. 2º ed. Washington, DC: ASM Press; 2012.
19. Chen C, Cowles VE, Sweeney M. The intestinal absorption mechanism of gabapentin makes it appropriate for gastroretentive delivery. *Curr Clin Pharmacol*. 2013; 8(1):67–72.
20. Cortes-Romero C, Galindo F, Galicia-Isasmendi S, Flores A. GABA: ¿dualidad funcional? Transición durante el neurodesarrollo. *Revista de Neurología*. 2011; 52 (11): 665–675.
21. de Bedout C, Gómez BL. *Candida y candidiasis invasora: un reto continuo para su diagnóstico temprano*. *Infectio*. 2010; 14: 159–171.
22. Diana M, Quílez J, Rafecas M. Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: A review. *Journal of Functional Foods*. Elsevier. 2014; 10: 407–420.
23. Estrada-Reyes R, Ubaldo-Suárez D, Araujo-Escalona AG. Los flavonoides y el Sistema Nervioso Central. *Salud Mental*. 2012; 35(5): 375–384.
24. Falco-Walter JJ, Bleck T. Treatment of Established Status Epilepticus. *Journal of Clinical Medicine*. 2016; 5 (49): 1-8.
25. Fatemi SH, Folsom TD, Rooney RJ and Thuras PD. Expression of GABAA α 2-, β 1- and ϵ -receptors are altered significantly in the lateral cerebellum of subjects with schizophrenia, major depression and bipolar disorder. *Translational Psychiatry*. 2013; 3 (9): e303.
26. Fehrenbacher JC, Taylor CP, and Vasko MR. Pregabalin and gabapentin reduce release of substance P and CGRP from rat spinal tissues only after inflammation or activation of protein kinase C. *Pain*. 2003; 105 (1-2):133–141.

27. Ferrete-Morales C. Protocolo para la Extracción de Hemocultivos. Hospital Universitario de VALME. España. [Internet] 2011. Accesado el 17 de Mayo de 2019, disponible en:
https://elenfermerodelpendiente.files.wordpress.com/2016/01/protocolo_extraccion_hemocultivos_2011.pdf
28. Fernandez de Bobadilla EL, Planes-Reig A, Rodríguez-Creixems M. Procedimientos en Microbiología Clínica: 3ª Hemocultivos. SEIMC. España. [Internet] 2003. Accesado el 15 de Mayo de 2019, disponible en:
<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia3a.pdf>
29. Gee NS, Brown JP, Dissanayake VU, Offord J, Thurlow R and Woodruff GN. The novel anticonvulsant drug, gabapentin (Neurontin), binds to the subunit of a calcium channel. *J Biol Chem* 1996; 271:5768–76.
30. Goodman y Gilman. Manual de Farmacología y Terapéutica. 2a ed. McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, 2015.
31. Grald A, Yargosz P, Case S, Shea K, Johnson DI. Small-molecule inhibitors of biofilm formation in laboratory and clinical isolates of *Candida albicans*. *J Med Microbiol*. 2012;61(Pt 1):109-14.
32. Heaney CF, Kinney JW. Role of GABAB Receptors in Learning and Memory and Neuropsychological Disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. Elsevier. 2016; 63: 1-28.
33. Hewitt E, Pitcher T, Rzoska B, Tunblad K, Henderson I, Sahlberg BL, Grabowska U, Classon B, Edenius C, Malcangio M and Lindström E. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2016; 358 (3) 387-396.
34. Houghton KT, Forrest A, Awad A, Atkinson LZ, Stockton S, Harrison PJ, Geddes JR, Cipriani A. Biological rationale and potential clinical use of gabapentin and pregabalin in bipolar disorder, insomnia and anxiety: protocol for a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*. 2017; 27; 7(3):e013433.
35. Jacobsen ID, Wilson D, Wächtler B, Brunke S, Naglik JR, Hube B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2012;10(1):85-93.
36. Jin Z, Kumar Mendu S, Birnir B. GABA is an effective immunomodulatory molecule in the brain and in the periphery. *Nerve-Driven Immunity: Neurotransmitters and Neuropeptides in the Immune System*. 2013; 45: 87-94.

37. Kathwate GH, Shinde RB, Karuppayil SM. Antiepileptic Drugs Inhibit Growth, Dimorphism, and Biofilm Mode of Growth in Human Pathogen *Candida albicans*. *Assay Drug Dev Technol*. 2015;13 (6):307-12.
38. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. "Farmacología básica y clínica". 13ª edición. México. McGraw-Hill Interamericana; 2015. <https://www.accessmedicina.com>.
39. Kruszewska H, Zareba T, Tyski S. Examination of antimicrobial activity of selected non-antibiotic drugs. *Acta Pol Pharm*. 2004; 61:18-21.
40. Kumar S, Punekar NS. The metabolism of 4-aminobutyrate (GABA) in fungi. *Mycological Research*. 1997;101(4):403-409.
41. Lancien M, Roberts MR. Regulation of Arabidopsis 14-3-3 gene expression by GABA. *Plant, Cell and Environment*. 2006; 29(5): 1430–1436.
42. Larone D. *Medically Important Fungi: A Guide to Identification*. 4th edition. Washington. American Society for Microbiology Press; 2003.
43. Lim CS, Rosli R, Seow HF, Chong PP. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(1):21-31.
44. López-Martínez R. Candidosis, a new challenge. *Clin Dermatol*. 2010; 28(2):178-84.
45. López-Vantour A, Aroche-Arzuaga A, Bestard-Romero J, Ocaña-Fontela N. Uso y abuso de las benzodiazepinas. *MEDISAN*. 2010; 14(4).
46. Mayer F.L., Wilson D., and Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* 4.2 (2013): 119-128.
47. Matsubara VH, Bandara HMHN, Mayer MPA, Samaranayake LP. Probiotics as antifungals in mucosal candidiasis. *Clinical Infection Disease*. 2016; 62(9): 1143-1151.
48. Mazuelos EM, García AI. Aspectos microbiológicos de la criptococosis en la era post-TARGA. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28 Suppl 1:40-5.
49. McCarty T P, Pappas P G. Invasive Candidiasis. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2016; 30: 103-124.
50. McNemar MD, Gorman JA, Buckley HR. Isolation of a gene encoding a putative polyamine transporter from *Candida albicans*, GPT1. *Yeast*. 2001; 18(6):555-61.
51. Medios de Diagnóstico Microbiológico (MDM). Inseto Patrón McFarland. Colombia. [Internet]. 2017. Accesado el 27 de mayo de 2019, disponible en: <http://mdmcientifica.com/wp-content/uploads/2017/07/Patr%C3%B3n-McFarland-05072017-O-P.PD-311-INSERTO-05072017-MDM-cient%C3%ADfica.pdf>

52. Mead O, Thynne E, Winterberg B, Solomon PS. Characterising the role of GABA and its metabolism in the wheat pathogen *Stagonospora nodorum*. PLOS ONE. 2013; 8(11): 1-8.
53. Méndez-Díaz M, Ruíz-Contreras AE, Prieto-Gómez B, Romano A, Caynas S, Próspero-García O. The brain and drugs, their neurobiological mechanisms [El cerebro y las drogas, sus mecanismos neurobiológicos]. Salud Mental. 2010; 33(5): 451–456.
54. Navin P, Sarvil P, Amit P, Divyesh P, Dhansukh R, Moo-Puc R, Rivera G. Synthesis and biological evaluation of newer 1,3,4-oxadiazoles incorporated with benzothiazepine and benzodiazepine moieties. Z Naturforsch C. 2017; 1; 72(3-4): 133-146.
55. Negroni M. “Medios de Cultivo” en: Microbiología Estomatológica: fundamentos y guía práctica. 2a edición. Buenos Aires, Medica Panamericana. 2009
56. Netea MG, Joosten LA, van der Meer JW, Kullberg BJ, van de Veerdonk FL. Immune defence against *Candida* fungal infections. Nat Rev Immunol. 2015; 15(10), 630-642.
57. Nett JE. The Host’s Reply to *Candida* Biofilm. Pathogens. 2016; 5(1): 8-10
58. Neuropharmacology of Antiepileptic Drugs. American Epilepsy Society. 2015
59. Palacios CP, Gómez LM, Cardona N. Candidiasis mucocutánea: espectro clínico. Rev Asoc Colomb Dermatol. 2011; 19: 239-244.
60. Paulussen C, de Wit K, Boulet G, Cos P, Meerpoel L, Maes L. Pyrrolo [1,2- α][1,4]benzodiazepines show potent in vitro antifungal activity and significant in vivo efficacy in a *Microsporum canis* dermatitis model in guinea pigs. J Antimicrob Chemother. 2014; 69(6):1608-10.
61. PROLAB. Procedimiento de toma de muestras para Hemocultivo. PROLAB. Colombia. [Internet] 2015. Accedido el 18 de Mayo de 2019, disponible en: http://www.prolab.com.co/pdf/instructivos/instructivo-toma_hemocultivo_clinicas.pdf
62. Prud'homme GJ, Glinka Y, Hasilo C, Paraskevas S, Li X, Wang Q. GABA protects human islet cells against the deleterious effects of immunosuppressive drugs and exerts immunoinhibitory effects alone. Transplantation. 2013; 15:96(7):616-23
63. Prud'homme GJ, Glinka Y, Wang Q. Immunological GABAergic interactions and therapeutic applications in autoimmune diseases. Autoimmunity Reviews. Elsevier. 2015; 14(11): 1048–1056.
64. Quindós G. Epidemiology of candidemia and invasive candidiasis A changing face. Revista Iberoamericana de Micología. 2014; 31(1): 42-48.

65. Rang HP, Dale MM, Ritter JM., Flower RJ. Farmacología. 6ta edición. Elsevier; 2008.
66. Reyes-García MG, Hernández-Hernández F, Hernández-Téllez B, García-Tamayo F. GABA (A) receptor subunits RNA expression in mice peritoneal macrophages modulate their IL-6/IL-12 production. Journal of Neuroimmunology. 2007; 188: 64-68.
67. Reyes-García MG, Hernández-Hernández F, García-Tamayo F. Gamma-aminobutyric acid (GABA) increases in vitro germ-tube formation and phospholipase B1 mRNA expression in *Candida albicans*. Mycoscience. 2012; 56: 36-39.
68. Rippon, J.W. The Pathogenic Fungi and Patho-genic Actionmycetes, 3rd Edition. WB Saunders, Phila-delphia, 1988.
69. Rodríguez-Carranza R. Vademécum académico de medicamentos. 6ta Ed. México: McGraw Hill; 2013
70. Rubio-Calvo MC, Tomás JG, Ruesca RB, Ramírez de Ocáriz Landaberea I, Navarro-Lucía M. Micosis más frecuentes en nuestro medio. Revista Iberoamericana de Micología. 2001.
71. Sankar R. GABA(A) receptor physiology and its relationship to the mechanism of action of the 1,5-benzodiazepine clobazam. CNS Drugs. 2012; 1;26(3):229-44.
72. Severance E.G., Gressitt K.L., Stallings C. R., Katsafanas, E., Schweinfurth L.A., Savage C.L. ... & Dickerson, F. B. Probiotic normalization of *Candida albicans* in schizophrenia: A randomized, placebo-controlled, longitudinal pilot study. Brain, behavior, and immunity. 2017: 62, 41-45
73. Shelp B J, Bown A W & M D McLean. Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. 1999; 4 (11): 446-452.
74. Shui-Xiu Li, † Yan-Jun Song, † Yi-Shan Zhang, † Hao-Tian Wu, Hui Guo, Kun-Ju Zhu, Dong-Mei Li, and Hong Zhang. Mitochondrial Complex V α Subunit Is Critical for *Candida albicans* Pathogenicity through Modulating Multiple Virulence Properties. Front Microbiol. 2017; 8: 285.
75. Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, *et al.*, Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6th edition. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999.
76. Singh B, Maheshwari A, Dak G, Sharma K, Talesara GL. Studies of Antimicrobial Activities of some 4-Thiazolidinone Fused Pyrimidines, [1,5]-Benzodiazepines and their Oxygen Substituted Hydroxylamine Derivatives. Indian J Pharm Sci. 2010; 72(5):607-12
77. Skrobik Y, Laverdiere M. Why *Candida* sepsis should matter to ICU physicians. Crit Care Clin. 2013; 29(4):853-64.

78. Solomon PS, Oliver RP. Evidence that γ -aminobutyric acid is a major nitrogen source during *Cladosporium fulvum* infection of tomato. *Planta*. 2002; 214(3): 414–420.
79. Spritzer SD, Bravo TP, Drazkowski JF. Topiramate for Treatment in Patients With Migraine and Epilepsy. American Headache Society. 2016; 1–5.
80. Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2004;12(7):317-24.
81. Thompson DS, Carlisle PL, Kadosh D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot Cell*. 2011;10(9):1173–1182. doi:10.1128/EC.05085-11.
82. Totorá G, Funke B and Case CL. “Crecimiento Microbiano” Capítulo 6 en: Introducción a la Microbiología. 9a edición. Buenos Aires, Medica Panamericana. 2007
83. Tremont-Lukats I W, Megeff C & B Misha-Miroslav. Anticonvulsants for neuropathic pain syndromes, *Drugs*. 2000; 60 (5): 1029-1052.
84. Van Veenendaal TM, Ijff DM, Aldenkamp AP, Hofman PAM, Vlooswijk MCG, Rouhl RPW, de Louw AJ, Backes WH, Jansen JFA. Metabolic and functional MR biomarkers of antiepileptic drug effectiveness: A review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2015; 59: 92–99.
85. Versele M, Lemaire K and Thevelein JM. Sex and sugar in yeast: two distinct GPCR systems. *EMBO Rep*. 2001; 2(7):574-9.
86. Vialas V, Sun Z, Loureiro y Penha CV, Carrascal M, Abian J, Monteoliva L., Deutsch EW, Aebersold R, Moritz RL, Gil C. A *Candida albicans* PeptideAtlas. *J Proteomics*. 2014 (31); 97: 62–68.
87. Webster J., and Weber R. Introduction to Fungi. 3rd edition. United State of America, Cambridge University Press. 2007
88. Wong CG, Bottiglieri T & O Carter Snead III. GABA, γ -hydroxybutyric acid, and neurological disease. American Neurological Association. 2003; 54(suppl 6): S3-S12.
89. Ziegler-Rivera PKR. Estudio de los Linfocitos T reguladores esplénicos en ratones tratados con GABA e inoculados con *Candida albicans*. Tesis. México, Universidad Nacional Autónoma de México. 2013. 66p.

ANEXOS

I. ELABORACIÓN DE PBS

Concentración 10X

Compuestos	Para 250 mL	Para 500 mL
NaCl	20.15 g	40.3 g
KCl	0.55 g	1.1 g
Na ₂ HPO ₄	2.875 g	5.75 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g	1 g
dH ₂ O	250 mL	500 mL

Una vez obtenido el volumen final:

Tomar 10 ml del PBS a 10X para preparar la concentración a 1X con base de la siguiente formula:

$$C1V1 = C2V2$$

De tal modo que:

$$(10X)(x) = (1X)(100 \text{ ml})$$

Despejamos x:

$$x = \frac{(1X)(100 \text{ mL})}{10 X} = 10 \text{ mL}$$

Se toman 10 mL y se aforan a 70 mL para ajustar pH (a 7.4), después se termina de aforar a 100 mL y se esteriliza.

II. ELABORACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

MEDIO MÍNIMO SINTÉTICO (MMS)

Componentes:

- YNB (Base Nitrogenada de Levadura) 0.04008 g
- Glucosa 1.2 g
- Agua destilada estéril 60 mL

Elaboración

- Vaciar la Glucosa y YNB en un matraz
- Añadir 60 mL de agua destilada y tapar
- Disolver a temperatura ambiente
- Esterilizar a 120°C durante 15 minutos

AGAR DEXTROSA SABOURAUD (ADS)

Componentes:

- Agar ADS
- Agua destilada

Elaboración

- Disolver 60g de Agar en 1000 mL de agua destilada
- Calentar hasta completar la disolución
- Esterilizar a 120°C durante 15 minutos
- Vaciar en cajas Petri

III. SOLUCIONES MADRE EMPLEADAS

Descripción	Gabapentina	Pregabalina	GABA	Lorazepam
Presentación	Cápsulas	Cápsulas	Compuesto	Tabletas
Gramaje	300 mg	75 mg	10 g	1 mg
Cantidad de uso	1 cápsula	1 cápsula	150 mg	10 tabletas
Disolvente	Agua destilada, pH 7.4	Metanol	PBS	Etanol
Cantidad Disolvente	30 mL	7.5 mL	15 mL	5 mL
Concentración final	10 mg/mL	10 mg/mL	10 mg/mL	2 mg/mL

- Cada fármaco fue disuelto en su respectivo disolvente y almacenado en refrigeración dependiendo del mismo hasta el momento de su uso (para sustancias volátiles como Metanol y Etanol).
- Cada disolvente fue elegido con base a la solubilidad del fármaco o compuesto reportado en la literatura de sus propiedades físico-químicas.

IV. TABLAS - ANÁLISIS ESTADÍSTICO

DOSIS ÚNICA

ANOVA de un solo factor: ABS vs. Grupo

* NOTA * No es posible dibujar la gráfica de intervalo para el procedimiento de Tukey. Las gráficas de intervalo para las comparaciones son ilegibles con más de 45 intervalos.

Método

Hipótesis nula: Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna: No todas las medias son iguales
Nivel de significancia $\alpha = 0.02$

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Grupo	17	Control, GABA 100, GABA 25, GABA 5, GABA 50, GBP 100, GBP 15, GBP 50, GBP 8, LZ 100, LZ 25, LZ 5, LZ 50, PGB 10, PGB 100, PGB 50, PGB 7

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Grupo	16	104.9	6.554	0.54	0.918
Error	68	830.8	12.218		
Total	84	935.7			

Resumen del modelo

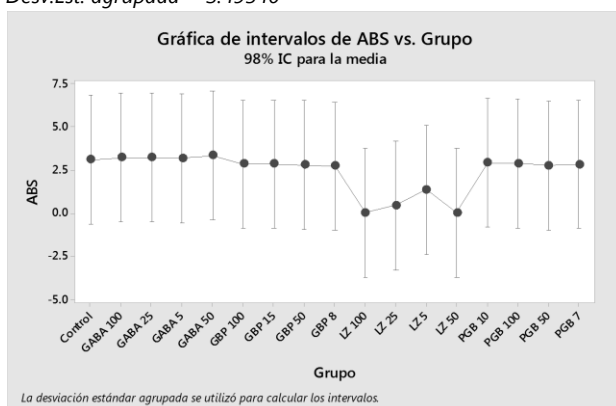
S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
3.49540	11.21%	0.00%	0.00%

Medias

Grupo	N	Media	Desv.Est.	IC de 98%
Control	5	3.09	4.13	(-0.64, 6.81)
GABA 100	5	3.20	4.03	(-0.52, 6.93)
GABA 25	5	3.21	4.03	(-0.51, 6.94)
GABA 5	5	3.17	4.16	(-0.55, 6.90)
GABA 50	5	3.33	4.22	(-0.40, 7.05)
GBP 100	5	2.84	3.85	(-0.89, 6.56)

GBP 15	5	2.83	3.78	(-0.90, 6.55)
GBP 50	5	2.80	3.66	(-0.93, 6.52)
GBP 8	5	2.71	3.61	(-1.02, 6.43)
LZ 100	5	0.00793	0.00471	(-3.71629, 3.73215)
LZ 25	5	0.431	0.940	(-3.293, 4.155)
LZ 5	5	1.36	2.81	(-2.37, 5.08)
LZ 50	5	0.0195	0.0259	(-3.7047, 3.7438)
PGB 10	5	2.90	3.94	(-0.82, 6.63)
PGB 100	5	2.87	3.90	(-0.85, 6.60)
PGB 50	5	2.75	3.74	(-0.97, 6.48)
PGB 7	5	2.82	3.74	(-0.90, 6.54)

Desv.Est. agrupada = 3.49540



La desviación estándar agrupada se utilizó para calcular los intervalos.

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 98%

Grupo	N	Media	Agrupación
GABA 50	5	3.33	A
GABA 25	5	3.21	A
GABA 100	5	3.20	A
GABA 5	5	3.17	A
Control	5	3.09	A
PGB 10	5	2.90	A
PGB 100	5	2.87	A
GBP 100	5	2.84	A
GBP 15	5	2.83	A
PGB 7	5	2.82	A
GBP 50	5	2.80	A
PGB 50	5	2.75	A
GBP 8	5	2.71	A
LZ 5	5	1.36	A
LZ 25	5	0.431	A
LZ 50	5	0.0195	A
LZ 100	5	0.00793	A

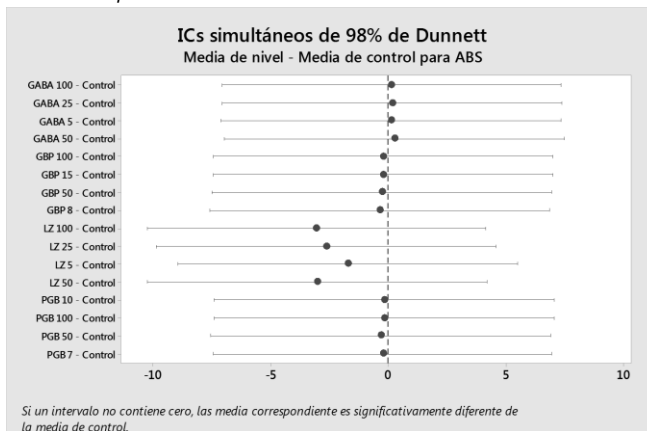
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Comparaciones múltiples de Dunnett con un control

Pruebas simultáneas de Dunnett para la media de nivel – Media de control

<u>Diferencia de niveles</u>	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 98%	Valor T	Valor p ajustado
GABA 100 - Control	0.12	2.21	(-7.12, 7.35)	0.05	1.000
GABA 25 - Control	0.12	2.21	(-7.11, 7.36)	0.06	1.000
GABA 5 - Control	0.08	2.21	(-7.15, 7.31)	0.04	1.000
GABA 50 - Control	0.24	2.21	(-6.99, 7.47)	0.11	1.000
GBP 100 - Control	-0.25	2.21	(-7.48, 6.98)	-0.11	1.000
GBP 15 - Control	-0.26	2.21	(-7.49, 6.97)	-0.12	1.000
GBP 50 - Control	-0.29	2.21	(-7.52, 6.94)	-0.13	1.000
GBP 8 - Control	-0.38	2.21	(-7.61, 6.85)	-0.17	1.000
LZ 100 - Control	-3.08	2.21	(-10.31, 4.15)	-1.39	0.798
LZ 25 - Control	-2.66	2.21	(-9.89, 4.57)	-1.20	0.909
LZ 5 - Control	-1.73	2.21	(-8.96, 5.50)	-0.78	0.997
LZ 50 - Control	-3.07	2.21	(-10.30, 4.16)	-1.39	0.801
PGB 10 - Control	-0.19	2.21	(-7.42, 7.05)	-0.08	1.000
PGB 100 - Control	-0.22	2.21	(-7.45, 7.02)	-0.10	1.000
PGB 50 - Control	-0.34	2.21	(-7.57, 6.90)	-0.15	1.000
PGB 7 - Control	-0.27	2.21	(-7.50, 6.96)	-0.12	1.000

Nivel de confianza individual = 99.83%



DOSIS PERIÓDICA

ANOVA de un solo factor: ABS vs. Grupos (DP)

* NOTA * No es posible dibujar la gráfica de intervalo para el procedimiento de Tukey. Las gráficas de intervalo para las comparaciones son ilegibles con más de 45 intervalos.

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
 Nivel de significancia $\alpha = 0.02$

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Grupos	17	Control, GABA 100, GABA 25, GABA 5, GABA 50, GBP 100, GBP 15, GBP 50, GBP 8, LZ 100, LZ 25, LZ 5, LZ 50, PGB 10, PGB 100, PGB 50, PGB 7

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Grupos	16	132.6	8.286	0.76	0.727
Error	68	745.1	10.957		
Total	84	877.7			

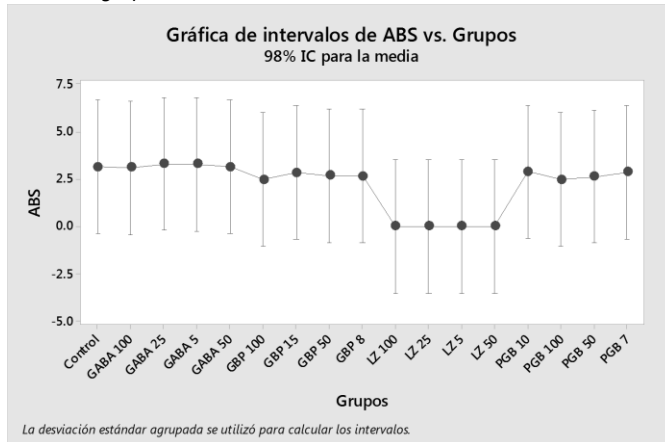
Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
3.31017	15.10%	0.00%	0.00%

Medias

Grupos	N	Media	Desv.Est.	IC de 98%
Control	5	3.15	4.06	(-0.37, 6.68)
GABA 100	5	3.13	3.98	(-0.40, 6.65)
GABA 25	5	3.32	4.22	(-0.21, 6.85)
GABA 5	5	3.29	4.34	(-0.23, 6.82)
GABA 50	5	3.17	4.07	(-0.36, 6.69)
GBP 100	5	2.49	3.26	(-1.04, 6.02)
GBP 15	5	2.86	3.78	(-0.67, 6.38)
GBP 50	5	2.70	3.56	(-0.82, 6.23)
GBP 8	5	2.67	3.55	(-0.85, 6.20)
LZ 100	5	0.01367	0.01024	(-3.51320, 3.54053)
LZ 25	5	0.00907	0.00554	(-3.51780, 3.53593)
LZ 5	5	0.00840	0.00750	(-3.51846, 3.53526)
LZ 50	5	0.01307	0.00852	(-3.51380, 3.53993)
PGB 10	5	2.90	3.73	(-0.63, 6.42)
PGB 100	5	2.48	3.29	(-1.05, 6.00)
PGB 50	5	2.65	3.47	(-0.88, 6.18)
PGB 7	5	2.87	3.70	(-0.66, 6.39)

Desv.Est. agrupada = 3.31017



Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 98%

Grupos	N	Media	Agrupación
GABA 25	5	3.32	A
GABA 5	5	3.29	A
GABA 50	5	3.17	A
Control	5	3.15	A
GABA 100	5	3.13	A
PGB 10	5	2.90	A
PGB 7	5	2.87	A
GBP 15	5	2.86	A
GBP 50	5	2.70	A
GBP 8	5	2.67	A
PGB 50	5	2.65	A
GBP 100	5	2.49	A
PGB 100	5	2.48	A
LZ 100	5	0.01367	A
LZ 50	5	0.01307	A
LZ 25	5	0.00907	A
LZ 5	5	0.00840	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

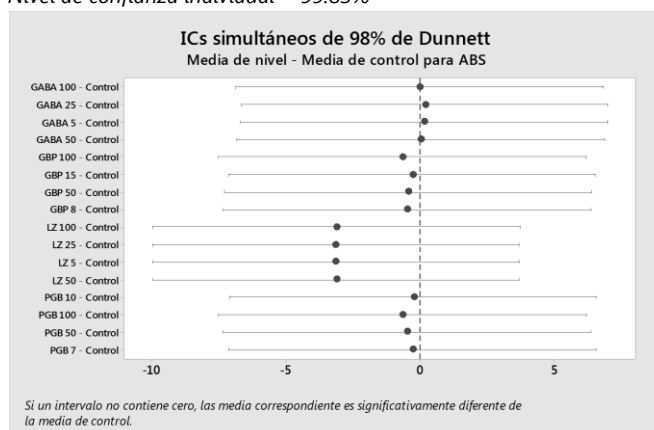
Comparaciones múltiples de Dunnett con un control

Pruebas simultáneas de Dunnett para la media de nivel – Media de control

Diferencia de niveles	Diferencia de medias	EE de diferencia	IC de 98%	Valor T	Valor p ajustado
GABA 100 - Control	-0.03	2.09	(-6.87, 6.82)	-0.01	1.000
GABA 25 - Control	0.17	2.09	(-6.68, 7.02)	0.08	1.000
GABA 5 - Control	0.14	2.09	(-6.71, 6.99)	0.07	1.000

GABA 50 - Control	0.01	2.09	(-6.83, 6.86)	0.01	1.000
GBP 100 - Control	-0.66	2.09	(-7.51, 6.18)	-0.32	1.000
GBP 15 - Control	-0.30	2.09	(-7.14, 6.55)	-0.14	1.000
GBP 50 - Control	-0.45	2.09	(-7.30, 6.40)	-0.21	1.000
GBP 8 - Control	-0.48	2.09	(-7.33, 6.37)	-0.23	1.000
LZ 100 - Control	-3.14	2.09	(-9.99, 3.71)	-1.50	0.722
LZ 25 - Control	-3.14	2.09	(-9.99, 3.70)	-1.50	0.720
LZ 5 - Control	-3.14	2.09	(-9.99, 3.70)	-1.50	0.720
LZ 50 - Control	-3.14	2.09	(-9.99, 3.71)	-1.50	0.722
PGB 10 - Control	-0.26	2.09	(-7.10, 6.59)	-0.12	1.000
PGB 100 - Control	-0.68	2.09	(-7.52, 6.17)	-0.32	1.000
PGB 50 - Control	-0.50	2.09	(-7.35, 6.35)	-0.24	1.000
PGB 7 - Control	-0.29	2.09	(-7.13, 6.56)	-0.14	1.000

Nivel de confianza individual = 99.83%



COMBINACIONES

ANOVA de un solo factor: ABS 1 vs. Comb.

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.02$

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
--------	---------	---------

Comb.	7	Control, GBP-GABA 100, GBP-GABA 50, GBP-PGB 100, GBP-PGB 50, PGB-GABA 100, PGB-GABA 50
-------	---	--

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Comb.	6	1.324	0.2207	0.02	1.000
Error	28	364.998	13.0357		

Total 34 366.323

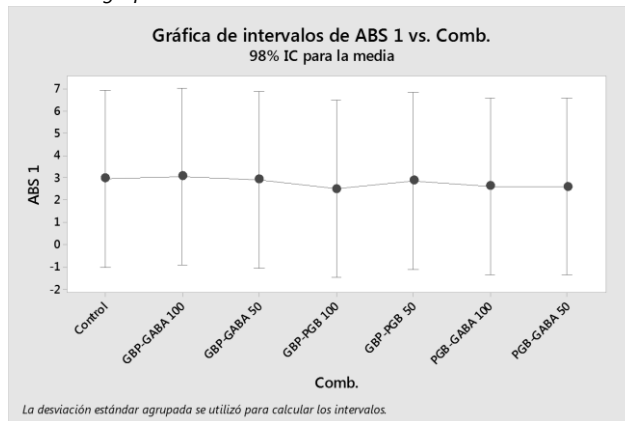
Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
3.61049	0.36%	0.00%	0.00%

Medias

Comb.	N	Media	Desv.Est.	IC de 98%
Control	5	2.98	3.83	(-1.01, 6.96)
GBP-GABA 100	5	3.07	3.77	(-0.91, 7.06)
GBP-GABA 50	5	2.92	3.61	(-1.06, 6.91)
GBP-PGB 100	5	2.52	3.44	(-1.46, 6.51)
GBP-PGB 50	5	2.88	3.87	(-1.10, 6.87)
PGB-GABA 100	5	2.63	3.43	(-1.35, 6.61)
PGB-GABA 50	5	2.62	3.28	(-1.36, 6.60)

Desv.Est. agrupada = 3.61049

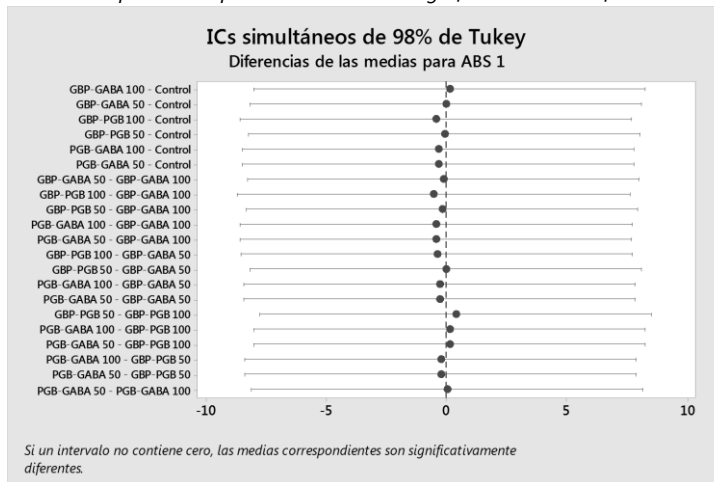


Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 98%

Comb.	N	Media	Agrupación
GBP-GABA 100	5	3.07	A
Control	5	2.98	A
GBP-GABA 50	5	2.92	A
GBP-PGB 50	5	2.88	A
PGB-GABA 100	5	2.63	A
PGB-GABA 50	5	2.62	A
GBP-PGB 100	5	2.52	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

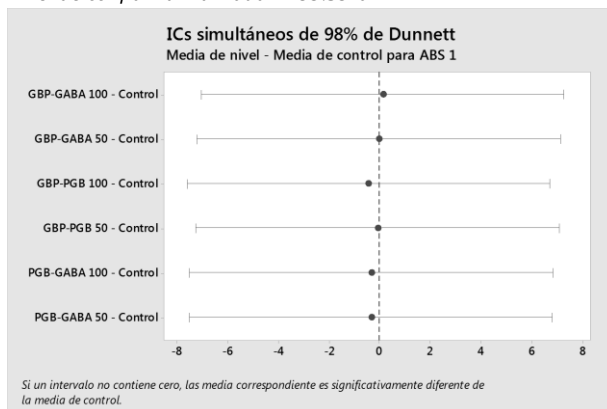


Comparaciones múltiples de Dunnett con un control

Pruebas simultáneas de Dunnett para la media de nivel – Media de control

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 98%	Valor T	Valor p ajustado
GBP-GABA 100 - Control	0.10	2.28	(-7.05, 7.24)	0.04	1.000
GBP-GABA 50 - Control	-0.05	2.28	(-7.19, 7.09)	-0.02	1.000
GBP-PGB 100 - Control	-0.45	2.28	(-7.60, 6.69)	-0.20	1.000
GBP-PGB 50 - Control	-0.09	2.28	(-7.24, 7.05)	-0.04	1.000
PGB-GABA 100 - Control	-0.35	2.28	(-7.49, 6.80)	-0.15	1.000
PGB-GABA 50 - Control	-0.36	2.28	(-7.50, 6.79)	-0.16	1.000

Nivel de confianza individual = 99.59%



ANOVA de un solo factor: ABS 2 vs. Comb. (18h)

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna de significancia	No todas las medias son iguales Nivel $\alpha = 0.02$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Comb. 18h	7	Control, GBP-GABA 100, GBP-GABA 50, GBP-PGB 100, GBP-PGB 50, PGB-GABA 100, PGB-GABA 50

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Comb. 18h	6	3.773	0.6289	0.04	1.000
Error	28	413.891	14.7818		
Total	34	417.664			

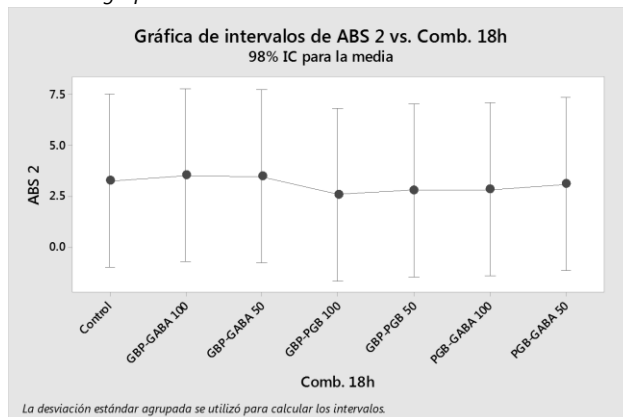
Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
3.84471	0.90%	0.00%	0.00%

Medias

Comb. 18h	NMedia	Desv.Est.	IC de 98%
Control	5	3.26	4.16 (-0.98, 7.50)
GBP-GABA 100	5	3.54	4.17 (-0.70, 7.78)
GBP-GABA 50	5	3.47	3.91 (-0.77, 7.72)
GBP-PGB 100	5	2.60	3.52 (-1.65, 6.84)
GBP-PGB 50	5	2.82	3.74 (-1.42, 7.06)
PGB-GABA 100	5	2.84	3.66 (-1.40, 7.09)
PGB-GABA 50	5	3.10	3.69 (-1.14, 7.34)

Desv.Est. agrupada = 3.84471



Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 98%

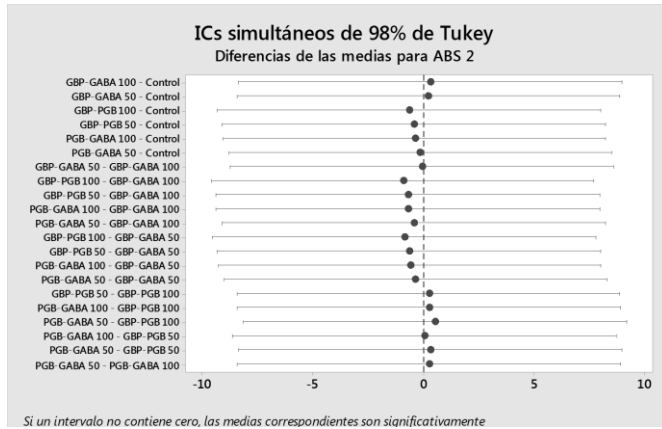
Comb. 18h	N	Media	Agrupación
GBP-GABA 100	5	3.54	A
GBP-GABA 50	5	3.47	A
Control	5	3.26	A
PGB-GABA 50	5	3.10	A
PGB-GABA 100	5	2.84	A
GBP-PGB 50	5	2.82	A
GBP-PGB 100	5	2.60	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 98%	Valor T	Valor p ajustado
GBP-GABA 100 – Control	0.28	2.43	(-8.38, 8.95)	0.12	1.000
GBP-GABA 50 – Control	0.22	2.43	(-8.45, 8.88)	0.09	1.000
GBP-PGB 100 – Control	-0.66	2.43	(-9.33, 8.00)	-0.27	1.000
GBP-PGB 50 – Control	-0.44	2.43	(-9.10, 8.23)	-0.18	1.000
PGB-GABA 100 – Control	-0.41	2.43	(-9.08, 8.25)	-0.17	1.000
PGB-GABA 50 – Control	-0.16	2.43	(-8.82, 8.51)	-0.06	1.000
GBP-GABA 50 - GBP-GABA 100	-0.07	2.43	(-8.73, 8.60)	-0.03	1.000
GBP-PGB 100 - GBP-GABA 100	-0.94	2.43	(-9.61, 7.72)	-0.39	1.000
GBP-PGB 50 - GBP-GABA 100	-0.72	2.43	(-9.39, 7.95)	-0.30	1.000
PGB-GABA 100 - GBP-GABA 100	-0.70	2.43	(-9.36, 7.97)	-0.29	1.000
PGB-GABA 50 - GBP-GABA 100	-0.44	2.43	(-9.10, 8.23)	-0.18	1.000
GBP-PGB 100 - GBP-GABA 50	-0.88	2.43	(-9.54, 7.79)	-0.36	1.000
GBP-PGB 50 - GBP-GABA 50	-0.65	2.43	(-9.32, 8.01)	-0.27	1.000
PGB-GABA 100 - GBP-GABA 50	-0.63	2.43	(-9.30, 8.04)	-0.26	1.000
PGB-GABA 50 - GBP-GABA 50	-0.37	2.43	(-9.04, 8.29)	-0.15	1.000
GBP-PGB 50 - GBP-PGB 100	0.22	2.43	(-8.44, 8.89)	0.09	1.000
PGB-GABA 100 - GBP-PGB 100	0.25	2.43	(-8.42, 8.91)	0.10	1.000
PGB-GABA 50 - GBP-PGB 100	0.51	2.43	(-8.16, 9.17)	0.21	1.000
PGB-GABA 100 - GBP-PGB 50	0.02	2.43	(-8.64, 8.69)	0.01	1.000
PGB-GABA 50 - GBP-PGB 50	0.28	2.43	(-8.38, 8.95)	0.12	1.000
PGB-GABA 50 - PGB-GABA 100	0.26	2.43	(-8.41, 8.92)	0.11	1.000

Nivel de confianza individual = 99.87%



Comparaciones múltiples de Dunnett con un control

Pruebas simultáneas de Dunnett para la media de nivel – Media de control

Diferencia de niveles	Diferencia de medias	EE de	IC de 98%	Valor T	Valor T ajustado
GBP-GABA 100 - Control	0.28	2.43	(-7.32, 7.89)	0.12	1.000
GBP-GABA 50 - Control	0.22	2.43	(-7.39, 7.82)	0.09	1.000
GBP-PGB 100 - Control	-0.66	2.43	(-8.27, 6.95)	-0.27	1.000
GBP-PGB 50 - Control	-0.44	2.43	(-8.04, 7.17)	-0.18	1.000
PGB-GABA 100 - Control	-0.41	2.43	(-8.02, 7.19)	-0.17	1.000
PGB-GABA 50 - Control	-0.16	2.43	(-7.76, 7.45)	-0.06	1.000

Nivel de confianza individual = 99.59%

