

Universidad de Valparaíso
Facultad de Medicina
Escuela de Obstetricia y Puericultura
Casa Central

Efecto antilevaduriforme de los extractos obtenidos de
la *Escallonia illinita* contra la *C. albicans*, *C. krusei* y
C. tropicalis.

Tesis para obtener el Grado de Licenciados en Obstetricia y Puericultura

Profesor Guía: Sebastián San Martín Henríquez

Profesor Coguía: Iván Montenegro Venegas

Tesistas: Fernanda Lagos Cubillos
Margarita Mora Payacán
Valeria Quezada Molina
Jorge Valencia Villarroel
Yazmín Vargas Romero
Montserrat Vásquez Cortés

Valparaíso, 2017

AGRADECIMIENTOS

Deseamos como grupo de tesis agradecer al Dr. Iván Montenegro Venegas, por darnos la oportunidad de trabajar en su proyecto, quién dedico valioso tiempo y espacio físico, para el desarrollo de esta tesis y de su desinteresada colaboración en todo ámbito, reforzando en todas las reuniones nuestra formación en el área clínica. Además destacamos su amabilidad, empatía, paciencia y sabiduría en nuestro trabajo científico. Sobre todo cuando en los momentos más complicado siempre nos expresó palabras de apoyo y de confianza. Honrados estamos de pertenecer a esa lista de personas que han trabajado dentro de su larga trayectoria en el área de la investigación. Gracias totales.

Queremos agradecer también al Dr. Sebastián San Martín Henríquez por aceptarnos como grupo de tesis, también por dedicarnos espacio físico para desarrollar nuestra tesis.

Queremos desatacar a cada una de nuestras familias: Lagos Cubillos – Mora Payacán – Quezada Molina - Valencia Villarroel – Valencia Gamboa – Vásquez Cortés – Lara Vásquez - Vargas Romero, por el amor, la paciencia y por ser el pilar y sostén emocional fundamental en nuestras vidas.

Agradecer a cada una de las personas que integran el Laboratorio Dr. Bruno Günther Schaffeld, quienes nos entregaron las herramientas y materiales experimentales indispensables para desarrollar y completar nuestro proyecto.

Agradecemos enormemente al docente Dr. Patricio Godoy de la Universidad Austral que nos brindo un espacio físico y materiales para comprender la complejidad de los microorganismos utilizados y por su excelente y dedicada docencia.

Cabe destacar, que también queremos agradecer a cada una de las personas que componen este grupo de tesis, ya que tras estos largos meses de apoyo mutuo se debe destacar, la indispensable empatía, buena disposición y eficiente comunicación que nos permitió no rendirnos ante el fracaso ni caer en la desesperación.

Por último dar las gracias a la Universidad de Valparaíso y a la Escuela de Obstetricia y Puericultura quienes nos permitieron realizar nuestra Tesis.

Lo imposible se puede hacer posible, la demostración de esto es la tesis que comenzaras a leer...

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	ii
CONTENIDO	iii
ÍNDICE TABLAS, FIGURAS Y FLUJOGRAMA.....	vii
RESUMEN.....	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. LISTA DE ABREVIATURAS	5
III. GLOSARIO.....	6
IV. MARCO TEÓRICO	9
1. Candidiasis	9
1.1. Definición	9
1.2. Agentes etiológicos.....	9
1.3 Clasificación taxonómica	10
1.4 Fuentes de infección y modo de transmisión	11
1.5 Patogenia	12
1.6 Formas Clínicas de la Candidiasis.	21
1.7 Diagnóstico	33
1.8 Toma de muestras para el diagnóstico de Candidiasis	33
1.9 Pruebas de Diagnóstico	34
1.10 Criterios a seguir para el diagnóstico de Candidiasis	45
2. Género Candida	47
2.1. C. albicans	50
2.2. C. krusei	51
2.3. C. tropicalis	51
3. Tratamiento.....	53
3.1. Tratamiento Clínico.....	53

3.2. Azoles	53
3.3. Polienos.....	57
3.4. Tratamiento Alternativo	58
4. Escallonia illinita (Barraco)	61
4.1 Flavonoides.....	63
4.2 Umbeliferona y cumarinas	64
4.3 β -sitosterol	65
V. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	67
VI. FUNDAMENTACIÓN Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	68
VII. PREGUNTA CENTRAL DE LA INVESTIGACIÓN	70
VIII. HIPÓTESIS	71
IX. OBJETIVOS	72
Objetivo General	72
Objetivos Específicos	72
X. MATERIALES Y MÉTODOS	73
1. Obtención de la <i>Escallonia illinita</i> y sus extractos	73
2. Métodos	74
2.1 Ensayo de inclusión.....	74
2.2 Ensayo de macrodilución en caldo de levadura.	77
2.3 Ensayo de microdilución	80
2.4 Método de difusión en agar con sacabocado con técnica Vicent & Vicent.....	85
3. Variables	86
3.1 Evaluar el efecto del extracto del hexánico y AcOEt contra <i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> y <i>C. tropicalis</i>	86
3.2 Determinar el MIC de extracto hexánico y AcOEt.....	87
3.3 Determinar MFC de extracto hexánico y AcOEt.....	87

3.4 Estudiar el efecto sinérgico del fluconazol con extracto hexánico y AcOEt.....	88
4. Diseño	89
5. Universo y muestra.....	89
5.1 Universo	89
5.2 Población.....	89
5.3 Muestra.....	90
5.4 Mecanismo de determinación de muestra.....	90
6. Fuentes de información	91
6.1 Unidad de estudio o análisis.....	91
6.2 Unidad informante.....	91
6.3 Unidad referencial	91
7. Materiales.....	92
8. Equipos	92
9. Programa	93
10. Reactivos	93
11. Medicamentos.....	93
12. Medios de cultivos	94
12.1 Sabouraud Dextrosa Agar HIMIDIA®	94
12.2 RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute)	94
12.3 RPMI Filtrado.....	94
12.4 Caldo Cultivo amarillo GYIvan	95
13. Recolección de datos	95
XI. RESULTADOS.....	96
1. Ensayo de inclusión	96
1.1 <i>C. albicans</i> - AcOEt:	96
1.2 <i>C. albicans</i> - Hexano:	97

1.3 <i>C.krusei</i> - AcOEt:.....	98
1.4 <i>C.krusei</i> - Hexano:	99
1.5 <i>C.tropicalis</i> - AcOEt:	100
1.6 <i>C.tropicalis</i> - Hexano:	101
2. Resultados ensayo de macrodilución.....	102
3. Ensayo de difusión en agar	119
3.1 Test Antifúngico con extractos obtenidos de la planta <i>Escallonia illinita</i> (AcOEt y hexano)	119
3.2 Resultados medición del halo inhibitorio en tres direcciones; vertical, horizontal y oblicua, promediando las mediciones en las tres direcciones.	120
4. Ensayo de microdilución.....	122
XII. DISCUSIÓN	125
XIII. CONCLUSIÓN	131
XIV. PROYECCIÓN.....	133
XV. BIBLIOGRAFÍA.....	136

ÍNDICE TABLAS, FIGURAS Y FLUJOGRAMA

Contenido	Página
IV. MARCO TEÓRICO	
FIGURA IV-1. Microscopía electrónica de transmisión. Morfología de Candida-	10
TABLA IV-1. Relación de especies de Candida y su localización específica.	11
FIGURA IV-2. Adherencia de las levaduras a las mucosas.	15
FIGURA IV-3. Interleucinas - 1β y neutrófilos durante el proceso de infección de la Candida.	20
FIGURA IV-4. Diferentes mecanismos para la eliminación de Candida.	20
FIGURA IV-5. Lesión por Candida en pliegue inguinal.	22
FIGURA IV-6. Lesión por Candida en pliegue submamario.	23
FIGURA IV-7. Lesión por Candida en pliegues inguinales en un niño.	23
FIGURA IV-8. Candidiasis pseudomembranosa o muguet en pacientes VIH +.	26
FIGURA IV-9. Candidiasis eritematosa en (a) paladar duro y (b) en dorso de la lengua.	27
FIGURA IV-10. Queilitis angular bilateral en paciente anciana sometida a terapia con antidepressivo.	27
FIGURA IV-11. Glositis rómbica.	28
FIGURA IV-12. Candidiasis esofágica.	29
FIGURA IV-13. Vulvovaginitis micótica.	31
TABLA IV-2. Diagnóstico diferencial.	31
FIGURA IV-14. Balanitis.	32
FIGURA IV-15. Levaduras y pseudomicelios en hisopado de mucosa bucal. Gueguen-1000x.	35

FIGURA IV-16. Levaduras y pseudomicelios. Hisopado de mucosa bucal. Fresco-400x.	35
FIGURA IV-17. Levaduras y pseudomicelios - Hisopado de mucosa bucal. Coloración May Grunwald Giemsa (MGG)- 1000x.	36
FIGURA IV-18. <i>C. albicans</i> . Formación de Clamidoconidios en AHM-Gueguen 1000x.	37
FIGURA IV-19. Levaduras y pseudomicelio de <i>C.parapsilosis</i> en AHM-Gueguen 400x.	38
FIGURA IV-20. Levaduras de <i>C. glabrata</i> en AHM-Gueguen 400x.	38
FIGURA IV-21. Levaduras y pseudomicelio- Hisopado de mucosa bucal. Coloración MGG - 1000x. Colonias levaduriformes en ASG.	39
FIGURA IV-22. <i>C. albicans</i> en cultivo Nickerson.	40
FIGURA IV-23. Tubo germinal para identificación de <i>C.albicans</i> .	41
FIGURA IV-24. Placa de CHROMagar con mezcla de levaduras.	42
FLUJOGRAMA IV-1. Proceso de identificación de las especies del género <i>Candida</i> .	45
FIGURA IV-25. L: Hongos levaduriformes; F: Hongos filamentosos.	47
FIGURA IV-26. Crecimiento Hongo Levaduriforme.	48
FIGURA IV-27. Reproducción de Hongos Levaduriforme.	48
FIGURA IV-28: Barraco.	61
FIGURA IV-29. Estructura química de Beta-sitosterol.	62
FIGURA IV-30. Estructura química de Astragalina.	62
FIGURA IV-31. Estructura química de la Pinocembrina.	63
FIGURA IV-32. Estructura química de la Umbeliferona.	63
FIGURA IV-33. Estructura química básica de los flavonoides y sistema de numeración.	63

X. MATERIALES Y MÉTODOS	
FIGURA X-1. Extracción y recolección de barraco. Viaje al sector precordillerano de San Francisco en la ciudad de San Esteban, Chile.	73
FIGURA X-2. Recolección y extracción de Barraco. Viaje a la ciudad de Limache, Chile.	74
FIGURA X-3. Placa micropocillo para ensayo de inclusión.	76
FIGURA X-4. Esquema de placa micropocillo para ensayo de inclusión.	76
FIGURA X-5. Esquema para las diluciones para el método de microdilución.	81
FIGURA X-6. Segundo paso de las diluciones de antifúngicos (método de microdilución).	82
XI. RESULTADOS	
FIGURA XI-1. Ensayo inclusión de <i>C. albicans</i> - AcOEt.	96
FIGURA XI-2. Ensayo inclusión de <i>C. albicans</i> - hexano.	97
FIGURA XI-3. Ensayo inclusión de <i>C. krusei</i> - AcOEt.	98
FIGURA XI-4. Ensayo inclusión de <i>C. krusei</i> - hexano.	99
FIGURA XI-5. Ensayo inclusión de <i>C. tropicalis</i> - AcOEt.	100
FIGURA XI-6. Ensayo inclusión de <i>C. tropicalis</i> - hexano.	101
TABLA XI-1. Ensayo de macrodilución. <i>C. albicans</i> - hexano.	102-104
TABLA XI-2. Ensayo de macrodilución <i>C. tropicalis</i> - hexano.	105-107
TABLA XI-3. Ensayo de macrodilución <i>C. krusei</i> - hexano.	108-110
TABLA XI-4. Ensayo de macrodilución <i>C. albicans</i> - AcOEt.	111-112
TABLA XI-5. Ensayo de macrodilución <i>C. tropicalis</i> - AcOEt.	114-115
TABLA XI-6. Ensayo de macrodilución <i>C. krusei</i> - AcOEt.	116-117
TABLA XI-7. Resultado Ensayo de difusión en agar.	119

TABLA XI-8. Ensayo con extracto AcOEt en <i>C. tropicalis</i> .	120
TABLA XI-9. Ensayo con extracto AcOEt en <i>C. albicans</i> .	120
TABLA XI-10. Ensayo con extracto AcOEt en <i>C. krusei</i> .	121
TABLA XI-11. Concentración Inhibitoria Mínima (MIC ₈₀) levadura patógena oportunista humanas multirresistente (<i>C. albicans</i>) a 24 h.	122
TABLA XI-12. Concentración Inhibitoria Mínima (MIC ₈₀) de los extractos n-hexano y AcOEt de <i>E. illinita</i> contra la levadura patógena oportunista humanas multirresistente (<i>C. albicans</i>) a 48 h.	122
TABLA XI-13. Concentración Inhibitoria Mínima (MIC ₈₀) de los extractos n-hexano y AcOEt de <i>E. illinita</i> contra la levadura patógena oportunista humana <i>C. krusei</i> a 24 h.	123
TABLA XI-14. Concentración Inhibitoria Mínima (MIC ₈₀) de los extractos n-hexano y AcOEt de <i>E. illinita</i> contra la levadura patógena oportunista humana <i>C. krusei</i> a 48 h.	123
TABLA XI-15. Concentración Inhibitoria Mínima (MIC ₈₀) de los extractos n-hexano y AcOEt de <i>E. illinita</i> contra la levadura patógena oportunista humanas multirresistente (<i>C. tropicalis</i>) a 24 h.	124
TABLA XI-16. Concentración Inhibitoria Mínima (MIC ₈₀) de los extractos n-hexano y AcOEt de <i>E. illinita</i> contra la levadura patógena oportunista humanas multirresistente (<i>C. tropicalis</i>) a 48 h.	124

Efecto antilevaduriforme de los extractos obtenidos de la *Escallonia illinita* contra la *C. albicans*, *C. krusei* y *C. tropicalis*.

Nombre Profesor Guía: Sebastián San Martín Henríquez

Nombre Profesor Coguía: Iván Montenegro Venegas

Nombre Estudiantes: Fernanda Lagos Cubillos
Margarita Mora Payacan
Valeria Quezada Molina
Jorge Valencia Villarroel
Yazmín Vargas Romero
Montserrat Vásquez Cortés

Valparaíso, 2017

RESUMEN

- **Antecedentes:** El barraco, cuyo nombre científico "*Escallonia illinita*", es una planta nativa de Chile, popularmente conocida por su uso en enfermedades hepáticas. Se desarrolla en sudamérica, en Chile distribuye geográficamente en las regiones desde Coquimbo a la del Bío Bío al preferir suelos arenosos- pedregosos con algo de humedad creciendo en quebradas, montañas, precordilleras y valle central.
- **Hipótesis:** Los extractos obtenido desde la *Escallonia illinita* presentan efecto antifúngico contra la *C. albicans*, *C. krusei* y *C. tropicalis*.
- **Objetivo general:** Analizar el efecto antilevaduriforme de los diferentes extractos obtenidos de *Escallonia illinita* contra la *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*.
- **Materiales y métodos:** se evaluó el efecto antilevaduriforme de los extractos de hexano y acetato de etilo, además de la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima fungicida en cultivos de cepas de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, expuestos a los extractos anteriormente nombrados.
- **Resultados:** En los objetivos determinados de nuestra investigación podemos evaluar que los extractos AcOEt y hexano de la *Escallonia illinita* reduce en los cultivos el crecimiento de la *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei*. Respecto a los extractos, el AcOEt presenta una capacidad fungistática mayor en comparación al hexano, pero ambos extractos presentan un efecto fungistático y fungicida a altas concentraciones. Se observa que el AcOEt presenta una capacidad fungistática mayor en *C. albicans*, en comparación con las otras especies de *Candida* estudiadas. En cambio el hexano presenta una capacidad fungistática mayor en *C. krusei*.
- **Conclusiones:** En este estudio se logra demostrar que los compuestos extraídos del barraco (*Escallonia illinita*) presentan un efecto antilevaduriforme por lo que en búsqueda de potenciar dicho efecto se combina con fluconazol, se logra establecer una relación clara de sinergia entre ambos antifúngicos, por lo que esperamos proponer una alternativa potente contra la candidiasis. Se establecieron ensayos de micro y macrodilución del compuesto que marcarán precedente para posteriores investigaciones sobre enfermedades producidas por las levaduras.

I. INTRODUCCIÓN

Los tratamientos que ofrecen actualmente los servicios de salud para combatir la candidiasis son estructurados y están predeterminados, sin embargo, muchas veces las personas reinciden en la infección, por lo que cada establecimiento cuenta con diferentes protocolos dependiendo del grado de reincidencia. Esta situación nos hace cuestionar el efecto farmacológico a corto y largo plazo de tratamientos clásicos ¿Cuál es la falla? y ¿Cuál es la solución a la situación?. Es por lo anterior que se han propuesto nuevos tratamientos, distintos a los tradicionales, los cuales básicamente se basan en la medicina de origen vegetal, esto ha probado los diferentes efectos farmacológicos que las plantas pueden llegar a tener en investigaciones científicas, sin embargo, la mayor desventaja de estas investigaciones es que son escasas y poco específicas. Es por ello que nace el planteamiento central de esta tesis.

Una de las propuestas sobre tratamientos nuevos y alternativos son a base de plantas, debido a que a través del tiempo e investigaciones científicas previas se ha demostrado que éstas poseen diferentes efectos farmacológicos, no obstante, muchas de estas investigaciones son escasas y poco específicas. Es por ello que nace el planteamiento central de esta tesis.

A pesar de que las investigaciones se deben basar en un método científico para poder tener más veracidad y ser tomadas en cuenta (más aún si se trata de un tratamiento que implica la salud de las personas), no se debe dejar de lado el conocimiento empírico, mediante el cual las antiguas culturas adquirían a través de simples acciones como la observación. En este caso a pesar de no conocer los mecanismos de acción que las plantas tienen en el organismo, estas culturas reconocían el alivio de algunos síntomas que los aquejaba posterior a la aplicación o administración de extractos naturales que poseen los vegetales, a pesar de esto, a través de los años se han creado e implementado nuevos medios para obtener respuestas científicas más claras y rápidas, sin correr riesgos de experimentar con humanos y provocar posibles efectos adversos.

Debido a la conciencia medioambiental y preocupación por la reincidencia de infecciones, es que se están tomando las medidas necesarias para intervenir lo menos posible con químicos en el cuerpo humano. Es por esta razón que se están tomando en cuenta otras soluciones provenientes de fuentes propuestas naturales anteriormente mencionadas, ya que además de asociarse con menor cantidad de efectos adversos en el organismo se favorece el retorno de la planta al ciclo natural sin perjudicar a otros individuos al ser eliminada. Además, se sabe que el cuerpo genera resistencia a los tratamientos clásicos, es decir, el uso reiterado de fármacos hace que el efecto en nuestro cuerpo comience a disminuir gradualmente, por lo tanto y en conjunto con la nueva conciencia que tiene el ser humano de su cuerpo es que se buscan formas alternativas de tratar esta infección y es allí donde comienza esta investigación.

II. LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt: Acetato de etilo

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ATB: Antibiótico

CO₂: Dióxido de Carbono

Hwp-1 (Hyphal wall protein 1): Proteína de la pared Hifal 1

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

KOH: Hidróxido de potasio

LDL (Low density lipoprotein) : Lipoproteína de baja densidad

MIC: Concentración mínima inhibitoria

MFC: Concentración mínima fungicida

NADPH (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate): Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

PMFN: Polimorfonucleares

SIDA: Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa

VIH: Virus de la inmunodeficiencia Humana

III. GLOSARIO

5-fluorocitosina: Es un fármaco antimicótico actualmente no disponible en Chile que posee una molécula con un átomo de flúor que actúa inhibiendo la síntesis de ADN y ARN en la célula fúngica.

Bacilos de Döderlein: También conocidos como lactobacilos, son aquellas bacterias de carácter benigna que forman parte de la microbiota vaginal, estos bacilos cumplen un papel primordial en el mantenimiento del pH de la vagina, que en las mujeres en edad fértil ronda entre los 4,5 y 5.

Blastosporas: Son “yemas” que se forman sobre las células de levaduras. Esporas sexuales, que se producen por la fusión de dos núcleos, se forman generalmente más tarde y en número menor que las esporas asexuales.

Candidemia: Consiste en el hallazgo del hongo en muestras de hemocultivo, sin cambios inmunológicos en el huésped y en ausencia de compromiso visceral demostrable, exceptuando la localización cutáneo-mucosa.

Clamidoconidios: Es un tipo de espora de paredes gruesas de varias clases de los hongos. Es una etapa del ciclo vital del organismo que sobrevive en condiciones desfavorables, tales como estaciones secas o cálidas. Los clamidoconidios son generalmente de color oscuro, esférica y una superficie lisa y son el resultado de la reproducción asexual.

Disfagia: Dificultad o la molestia al deglutir (tragar).

Factores de virulencia: Son moléculas producidas por un patógeno, que influye específicamente en las funciones del hospedante, para permitir al patógeno crecer.

Fungicida: Son sustancias que se emplean para impedir el crecimiento o eliminar los hongos

Fungistática: Sustancia que inhibe el crecimiento de los hongos.

Genes MDR-1 o gen de resistencia a multidrogas: Es el encargado de producir una proteína transportadora (P-glicoproteína) que representa una barrera funcional de protección para el cerebro contra fármacos y otras toxinas.

Glicocálix: Envoltura constituida por glicoproteínas, glucolípidos y ácido hialurónico, que sobresalen de la membrana celular. Sirve de protección mecánica de las células, permite la adhesión celular e interviene en procesos de identificación celular y recepción hormonal.

Hifa: Son una red de filamentos cilíndricos que conforman la estructura del cuerpo de los hongos multicelulares. Están constituidos por una fila de células alargadas y tubulares, envueltas por una pared celular compuesta de quitina. El conjunto de estas hifas se denomina micelios.

Menopausia: Se define como el cese permanente de la menstruación, es decir, un tiempo de amenorrea de 12 meses.

Neutropenia: Es la reducción del recuento de neutrófilos en el torrente sanguíneo.

Parasitismo: Es un tipo de simbiosis, una estrecha relación en la cual uno de los participantes, (el parásito o huésped) depende del otro (hospedador) y obtiene algún beneficio.

Peróxido de Hidrógeno: También conocido como agua oxigenada, dioxigen o dióxido, es un compuesto químico con características de un líquido altamente polar, fuertemente enlazado con el hidrógeno tal como el agua, que por lo general se presenta como un líquido ligeramente más viscoso que ésta. Es conocido por ser un poderoso oxidante.

Proteína Hwp-1: Es una glicoproteína situado en la superficie de un hongo diploide oportunista llamado *C. albicans*. Esta proteína aparece exclusivamente en la superficie de una proyección llamada hifas que emerge de la superficie de este hongo.

Pseudomicelio: Son células micóticas que resulta de la brotación de un blastoconidio que ha permanecido unido a los demás. Los tabiques que separan las células están completos y no hay conexión citoplasmática, como sí sucede en las hifas verdaderas tabicadas.

Queratinocitos: Son las células predominantes (90%) de la epidermis, la capa más superficial de la piel. Contienen una proteína muy dura que se llama queratina, la cual estimula el crecimiento de células epiteliales en la piel y de las que revisten la superficie de la boca, el estómago y los intestinos.

IV. MARCO TEÓRICO

1. Candidiasis

1.1. Definición

La candidiasis es una infección esporádica y/o crónica, causada por diferentes levaduras del género *Candida* spp, tipo de hongo que es común en el cuerpo de las personas sanas. La patología se presenta con manifestaciones clínicas extremadamente variables de evolución aguda, subaguda, crónica o episódica, en las cuales el hongo puede causar lesiones cutáneas y mucocutáneas. Los procesos de candidiasis se desarrollan generalmente en el tejido mucocutáneo, se puede presentar en diferentes órganos, con mayor frecuencia en ojos (Endoftalmitis), riñones, pulmones, bazo, sistema nervioso central (meningitis) o también alrededor de una prótesis valvular cardiaca y huesos por diseminación sanguínea, recibiendo el nombre de Candidemia [1].

1.2. Agentes etiológicos

Aunque se han reportado más de 17 especies patógenas, el 90% de las infecciones se atribuyen a: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parasilopsis*, *C. tropicalis* [2].

La *C. albicans* es la especie aislada con mayor frecuencia a partir de muestras clínicas y generalmente representa entre un 90% y un 100% de las cepas aisladas de muestras provenientes de la mucosa. En menor porcentaje se encuentra la *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, entre otras [3].

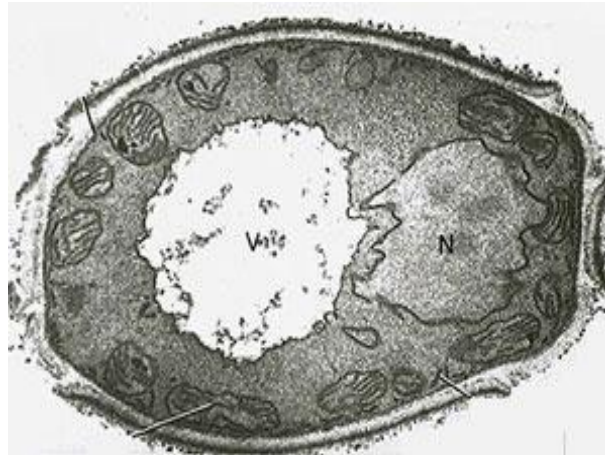


FIGURA IV-1. Microscopía electrónica de transmisión. Morfología de *Candida* sp. [4]

CW = Pared celular,
PM = Membrana plasmática, M = Mitocondria, V = Vacuola,
N = Núcleo

1.3 Clasificación taxonómica

Dominio: Eucarya

Reino: Fungi

División: Eumycota

Subdivisión: Deuteromycotina

Clase: Blastomycetes

Familia: Cryptococaceae

Género: *Candida*

Especies: *C. albicans*; *C. glabrata*; *C. krusei*; *C. parapsilosis*; *C. tropicalis*, entre otros [5].

Especie	Oniquia	Paroniquia	Vaginitis	Endocarditis	Otras
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+
<i>C. parapsiliosis</i>		+		+	
<i>C. tropicalis</i>	+		+		+
<i>C. guilliermondi</i>	+			+	
<i>C. pseudotropicalis</i>			+		
<i>C. kruseii</i>			+	+	
<i>C. stellatoidea</i>				+	

TABLA IV- 1. Relación de especies de Candida y su localización específica [6].

1.4 Fuentes de infección y modo de transmisión

La Candida sp. es un componente de la microbiota normal del sistema digestivo y la vagina en un alto porcentaje de personas sanas. En su hábitat normal la Candida es levaduriforme con brotes; en los tejidos infectados puede producir pseudohifas (filamentos compuestos de células gemantes alargadas, que no se desprendieron de la célula madre). La mayor parte de las infecciones tiene una fuente endógena, producto de algunos estímulos (stress) que tienen como consecuencia una alteración de la microbiota, lo que resulta la proliferación de la Candida spp. Por otra parte, existe una infección de fuente exógena, que se puede transmitir por contacto directo con las secreciones de la boca, piel, vagina y heces de enfermos o portadores. Por ejemplo en los hospitales donde las levaduras pueden ser transmitida a lactante a partir de mamaderas mal esterilizadas, o a pacientes trasplantados e inmunodeprimidos a partir de materiales quirúrgicos, equipos de diálisis o endoscopios mal esterilizados o por transmisión horizontal a partir de la existencia de infecciones por levaduras en manos o uñas del personal que trabaja en unidades de cuidados intensivos (UCI), sin la debida protección [6,7].

1.5 Patogenia

El delicado equilibrio que existe entre comensal (levaduras) y el sistema inmune del hospedero podría romperse y dar lugar al parasitismo o desarrollo de una infección oportunista. El desarrollo de la enfermedad por *Candida sp.* depende de la interacción de ciertos factores:

1.5.1 Factores predisponentes

Son generalmente modificaciones en los mecanismos de defensa del huésped, los cuales, secundariamente, inducen transformaciones en el comportamiento del hongo. Las manifestaciones clínicas y la severidad de la infección están en relación con la naturaleza y el grado de compromiso de las defensas normales del huésped. Los factores pueden ser diversos, donde se encuentran:

- El uso de antibióticos de amplio espectro, o los que actúan sobre bacterias gram positivas, la razón es clínica, ya que estos antibióticos no distinguen entre bacterias normales de la microbiota y las nocivas, eliminando también a los bacilos de Döderlein que son los encargados de mantener el pH de la vagina. Lo anterior provocaría un cambio en el pH, generando un ambiente óptimo para la proliferación de microorganismos patógenos como la *Candida spp.* La otra razón es la inmunodepresión secundaria al uso de antibióticos, que reduce también al propio sistema inmunológico. Específicamente en el caso de las candidiasis y el uso de antibióticos hay que decir que los antibióticos no matan a los hongos, por tanto ante la desaparición de la microbiota bacteriana, los hongos proliferan [8].
- Estados de inmunodepresión originados por diversas enfermedades, elementos tóxicos o stress. hepatitis, parasitosis, inanición, VIH, drogadicción, entre otras.
- Fármacos inmunodepresores y quimioterapia.

- Tratamientos con glucocorticoide, principalmente por su efecto depresivo del sistema inmunológico (especialmente sobre las poblaciones de linfocitos T), también influye por otros efectos, tales como la disminución de la síntesis proteica (que afecta a la formación de tejidos y por tanto, a la formación y desarrollo de las mucosas) y porque disminuye la disponibilidad de azúcar para las células, con lo que aumenta el contenido extracelular de azúcares y por tanto la disponibilidad para los patógenos [8].
- Los anticonceptivos hormonales: La razón, más importante, es el hecho de que produce un cierto grado de atrofia del epitelio vaginal, es decir, disminuye su espesor volviendo a la vagina más vulnerable a la invasión por parte de agentes patógenos y a sufrir daños irritativos. Por último, los progestágenos facilitan la formación de micelios a partir de las formas levaduriformes del contenido vaginal (facilitan el paso de la forma saprofita e inofensiva a la forma dañina) [1,8].
- Deficiencia en los niveles de estrógenos, esta deficiencia disminuye el desarrollo del epitelio y además disminuye las concentraciones de glucógeno, incidiendo en una disminución de los bacilos de Döderlein [8].
- El flujo menstrual alcaliniza la mucosa vaginal, además los lactobacillus sp. se adhieren a los hematíes siendo así eliminados con la sangre y disminuyendo consecuentemente el número de estos [8].
- La humedad y el calor.
- El uso de espermicidas y uso de dispositivo intrauterino.

- Los períodos de lactancia y gestación: Durante el embarazo incrementan significativamente los niveles de estrógenos y progesterona. En las levaduras se encuentran receptores para estrógenos y progesterona, por tal motivo pueden ser estimuladas durante el embarazo. Por otro lado, estas hormonas intervienen en la supresión parcial de la respuesta de los linfocitos T [1,8].
- La menopausia, ya que al disminuir la cantidad de estrógenos, se produce una atrofia de la mucosa vaginal, también disminuyen los niveles de glucógeno en las células de la misma y consiguientemente disminuye la población de bacilos de Döderlein.
- La diabetes por mantener elevados niveles de glucosa en el medio extracelular.
- La obesidad.
- Carencias nutricionales, insuficiencia de hierro, ácido fólico, vitamina B12, azufre o zinc.
- Iatrogénicos, uso prolongado de corticoides, quimioterápicos, inmunosupresores, agentes citotóxicos, alimentación parenteral, trasplantes, cirugía abdominal, utilización de sondas y catéteres, radioterapia, prótesis, hemodiálisis, cateterismo.
- Otros factores son: clima tropical, subtropical, dietas ricas en carbohidratos, hipotiroidismo subclínico.

1.5.2 Patogenicidad intrínseca del microorganismo

El potencial patogénico de las levaduras varía considerablemente. Éstas no son un componente pasivo del proceso infeccioso, sino que poseen una serie de factores de

virulencia. No existe un único factor que pueda ser considerado por sí solo como responsable de la patogenicidad, sino que se ha propuesto una combinación de diferentes factores que contribuyen a una o más etapas de la infección. Los principales factores de virulencia, que han sido estudiados en profundidad para *C. albicans* [7] (aunque algunos de ellos han encontrados en otras especies) son:

1.5.2.1 Capacidad de adherencia de las levaduras a diferentes superficies

La *Candida* sp. en su pared celular está compuesta por manano (50-70%), quitina (20%), proteínas (3-6%), lípidos y carbohidratos (1-5%), los cuales son importante en los procesos de adherencia al epitelio antes de invadirlo (FIGURA IV- 2), además con la obtención de ácidos carboxílicos de cadena corta, producto del metabolismo de los azúcares, logra un ambiente ácido óptimo para su crecimiento. El componente antigénico es una glicoproteína que se encuentra en la pared celular asociado a la producción de fosfolipasa capaz de destruir la membrana celular del hospedero y proteasas que ejercen efecto sobre la superficie celular. Igualmente la pared celular de la *Candida* spp puede inhibir la fagocitosis por neutrófilos, ya que se cuenta con un mecanismo competitivo entre el polisacárido de la pared celular y los receptores de la superficie del neutrófilo [7].

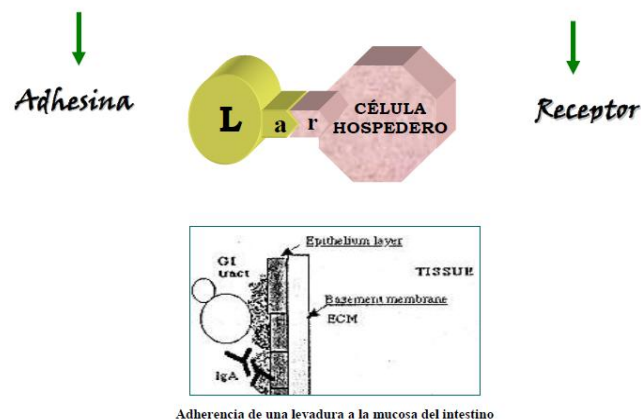


FIGURA IV- 2. Adherencia de las levaduras a las mucosas [6].

1.5.2.2 Producción de enzimas extracelulares

Otro factor de virulencia es la producción de la enzima aspartil-proteinasa que facilita la penetración a los queratinocitos. También son importantes porque permite la degradación de proteínas humanas, la digestión de moléculas para la obtención de nutrientes, la digestión y distorsión de las membranas celulares del huésped para permitir una mayor adhesión e invasión celular.

1.5.2.3 Producción de hifas y pseudohifas

Aumenta de la capacidad invasiva de la levadura y es la causante de la aparición de las manifestaciones clínicas de la candidiasis. Esta posee una proteína la Hwp-1 que ayuda a la adherencia de la hifa al queratinocito. Además las hifas son más difíciles de fagocitar y permiten el escape al romper la membrana citoplasmática del fagocito [7].

1.5.2.4 Variabilidad fenotípica y antigénica

Es un cambio espontáneo, frecuente y reversible entre diferentes fenotipos distinguibles por la morfología de la colonia o por la morfología celular.

1.5.2.5 Biofilm

Biofilm o biopelícula se le denomina a una colonia de microorganismos que crecen unidas a una superficie o matriz polimérica extracelular o glicocálix. Esta matriz está compuesta por grandes cantidades de agua y exopolisacáridos (componentes fundamentales producidos por los propios microorganismos) tales como: el manán, glucán y quitina. Aunque la síntesis de los componentes de la pared celular está dinámicamente influenciada por las condiciones de crecimiento y por los estadios metabólicos. El polisacárido manán representa aproximadamente entre 15,2% y 22,9% del peso seco y poco más del 40% de los polisacáridos de la pared celular del hongo. El D-Glucán β -1-3 y el D-Glucán β -1-6 constituyen entre 47% y 60% del peso seco de la pared celular. La quitina representa entre 0,6% y 9% del peso de la pared celular.

El biofilm puede estar formado por una sola especie bacteriana o fúngica o por una comunidad derivada de múltiples especies microbianas, y tendrá características especiales de crecimiento y una alta resistencia a los antifúngicos. Los biofilms son muy difíciles de eliminar y son fuente de infecciones recidivantes [9]. El 65% de las infecciones humanas están relacionadas con la formación de un Biofilm, como se mencionó anteriormente actúa como un reservorio volviéndose recidivantes como las infecciones urinarias, de placa dental, endocarditis, entre otras.

Las ventajas que ofrece este tipo de asociación son la fuerte unión a superficies vivas o inertes, colonización a tejidos huésped, expresión de características de virulencia y cooperación metabólica.

Los microorganismos que crecen como biopelícula tienen un fenotipo único, comparado con su contraparte planctónica (libre), particularmente en el aumento a la resistencia a los agentes antimicrobianos [9].

1.5.2.6 Candidiasis asociada a biofilm

El análisis de biopelículas de *C. albicans* por microscopía de fluorescencia muestra que están formadas por una capa basal de blastosporas, hifas y pseudohifas ordenadas en una estructura de doble capa, dentro de una matriz extracelular constituida fundamentalmente de polisacáridos y proteínas resistentes a un amplio espectro de antifúngicos que incluye anfotericina B y fluconazol [10].

La adhesión y colonización de las poblaciones fúngicas se favorece por diversos factores como el flujo del medio que los rodea (orina, sangre, saliva y moco) pH, la temperatura y la osmolaridad [10].

Por último los componente de la matriz extracelular del biofilm jugará un papel fundamental a la hora de presentar resistencia al tratamiento, como es el caso en *C. albicans* donde el azúcar principal es la glucosa; sin embargo, en *C. tropicalis* es hexosamina, lo que explica que la composición sea la causa de los distintos grados de penetración de los antifúngicos, por lo que en *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* la difusión sea más lenta del 5-fluocitina y del fluconazol.

1.5.3 Mecanismos de defensas contra *Candida* spp.

1.5.3.1 No inmunes

- Piel y mucosa: el epitelio escamoso estratificado de la piel funciona normalmente como una barrera efectiva contra la invasión microbiana, y es un lugar inhóspito para la colonización por *Candida*. El recambio regular de las células cutáneas representa un mecanismo efectivo para erradicar microorganismo colonizantes, y los lípidos cutáneos parecen inhibir el crecimiento de *Candida*. La ruptura mecánica de la piel, por traumas, quemadura, maceración de la piel, es el factor predisponente más importante para la infección por *Candida*. La piel se defiende relativamente bien de la colonización e infección por *Candida*, sin embargo, las mucosas se defienden peor, y es en estas superficies donde ligeros cambio en el ambiente o en las defensas del huésped, pueden favorecer a los microorganismos. Las mucosas de la boca, intestinal y vaginal, pueden estar colonizadas por *Candida* hasta en un 80% de los individuos normales, y el índice de colonización aumenta en pacientes hospitalizados [11].
- La interacción con otros miembros de la microbiota, por ejemplo, el *Lactobacillus acidophilus* es el encargado de mantener el pH de la vagina entre 4 - 4,5 [8] y de este modo impedir la proliferación de otros componentes de la microbiota vaginal. La integridad funcional del estrato córneo en el caso de la piel. El proceso de descamación debido a la proliferación epidérmica inducida por la inflamación.

1.5.3.2 Inmune

- Factores humorales: Una vez que los microorganismos atraviesan la piel o las mucosas, la siguiente línea de defensa está en el suero. Los factores humorales o del suero tienen menos importancia en la resistencia del huésped a la infección por *Candida* que las células fagocíticas y la inmunidad celular. El suero y el

plasma, aunque contengan anticuerpos y componentes del complemento, no son capaces de destruir a la Candida por sí solos [11].

- Células fagocíticas (FIGURA IV-3): Una vez que el microorganismo invade la dermis o penetra en la sangre, los polimorfonucleares (PMFN) actúan como mecanismo de defensa ya que tiene la capacidad de dañar las pseudohifas y de fagocitar y destruir los blastosporos, mediante la liberación de sustancias fungicidas como derivados reactivos de oxígeno y enzimas lisosómicas. Además de los neutrófilos, los monocitos y eosinófilo también ingieren y destruyen a este microorganismo. In vitro los monocitos son más eficaces que los polimorfonucleares en la destrucción de la Candida. La mieloperoxidasa, el peróxido de hidrógeno y el anión superóxido constituyen un importante mecanismo responsable de la destrucción intracelular de la Candida. Neutrófilos y monocitos carecen de la capacidad de generar peróxido de hidrógeno y el anión superóxido. Otra célula que ayuda a la eliminación de las levaduras es el macrófago que posee receptores que reconocen moléculas de ciertos microorganismos como la manosa [12]. Al tener contacto con el antígeno extraño los macrófagos liberan lisosimas, colagenasas, elastasas, hidrolasas, leucotrienos, prostaglandina, óxido nítrico, interleucinas, TNF α y complemento que ayuda a la destrucción del microorganismo.
- Inmunidad mediada por células: Es el mecanismo más importante de defensa frente las infección fúngica utilizando los linfocitos T CD4+ Y CD8+ que ayudan a la eliminación de las formas fúngica [12]. La importancia de los linfocitos y de la inmunidad celular en la defensa contra Candida puede ser vislumbrada a partir de tres observaciones clínicas. Los pacientes con candidiasis mucocutánea crónica se infectan como consecuencia de una disfunción del sistema linfocitario. El mecanismo por el que los linfocitos pueden controlar la infección por Candida no está bien definido. Sustancias similares a las linfoquinas liberadas por linfocitos activados se han mostrado tóxicas para Candida. La interacción de los

linfocitos con los macrófagos y neutrófilos es importante en el inicio de la respuesta de estos [11].

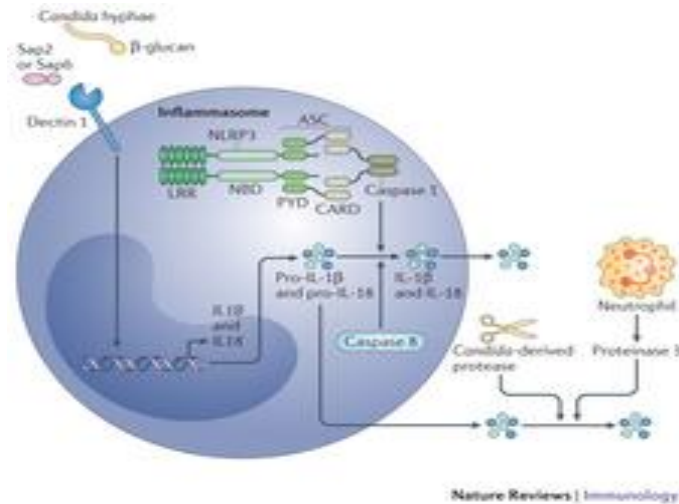


FIGURA IV-3. Interleucinas-1 β y neutrófilos durante el proceso de infección de la Candida [11].

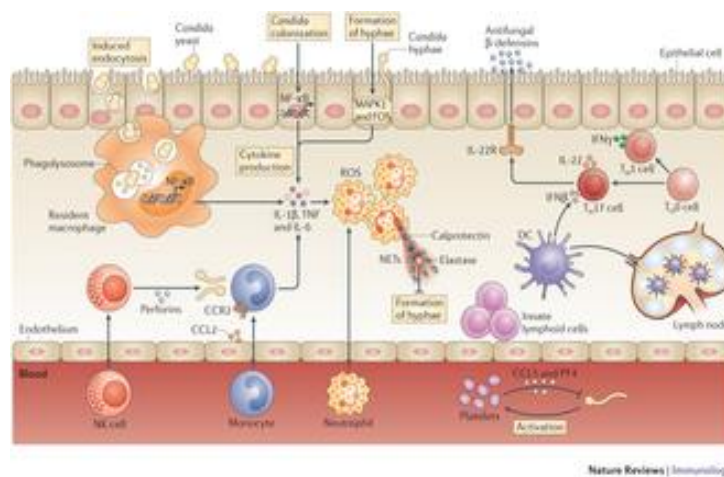


FIGURA IV-4. Diferentes mecanismos para la eliminación de Candida [11].

1.6 Formas Clínicas de la Candidiasis.

Cutánea

- Grandes y pequeños pliegues
- Uñas: Onixis blastomicética
- Granuloma candidiásico

Mucocutánea

- Mucosa oral: pseudomembranosa o muguet, eritematosa, glositis rómbica y queilitis angular.
- Mucosa digestiva: esofagitis, gastritis, enteritis y lesiones perianales.
- Mucosa bronquial
- Mucosa genital: vulvovaginitis micótica y balanitis
- Candidiasis mucocutánea crónica

Candidiasis

- Candidiasis Profunda o Invasiva
- Candidiasis Localizada (en diferentes órganos)
- Candidiasis Sistémica o Diseminada: Aguda - Crónica

Alérgica.

1.6.1 Cutánea

1.6.1.1 Candidiasis de los pliegues (intertrigos blastomicéticos)

Este tipo de Candidiasis afecta cualquier pliegue del cuerpo. Se presenta a cualquier edad, aunque en el adulto es más frecuente en la mujer. Una de las causas predisponentes más frecuentes de esta afección es la diabetes, el calor, la humedad y la maceración de la piel [7].

1.6.1.2 Candidiasis de los grandes pliegues axilar, interglúteo, inguinal, submamario, suprapúbico: (FIGURA IV-5, IV-6 y IV7)

La lesión inicial se caracteriza por la presencia de una o varias vesículas superficiales, que se rompen y dejan al descubierto un fondo rojo erosionado que no sangra. Cuando se abre el pliegue, se observa un fondo más o menos extendido rojo brillante y húmedo; en el fondo se encuentra una grieta que puede estar cubierta por un magma blanquecino de piel macerada. Los pacientes pueden sentir un prurito más o menos acentuado y sensación de ardor o quemazón [7].



FIGURA IV-5. Lesión por Candida en pliegue inguinal [7].



FIGURA IV-6. Lesión por Candida en pliegue submamario [7].



FIGURA IV- 7. Lesión por Candida en pliegues inguinales en un niño [7].

1.6.2 Mucocutáneas

1.6.2.1 Mucosa oral

La candidiasis en mucosa oral fue descrita como enfermedad asociada en el primer caso de SIDA publicado, y constituye la infección fúngica más frecuente en los pacientes VIH (+) y actualmente se presenta en personas que realizan otras prácticas sexuales, como el sexo oral. Se considera que hasta un 90% de los individuos infectados por VIH sufrirán al menos un episodio de candidiasis orofaríngea [13].

Actualmente consideramos las siguientes formas clínicas de candidiasis oral: candidiasis pseudomembranosa (aguda-crónica), candidiasis eritematosa (aguda-crónica), candidiasis hiperplásica (leucoplásica), lesiones asociadas (estomatitis protética, queilitis angular, glositis rómbica, queilitis exfoliativa), candidiasis mucocutáneas (crónicas). Cuando dos o más de estas formas clínicas aparecen juntas se le denomina candidiasis oral multifocal [13].

1.6.2.1.1 Candidiasis pseudomembranosa o muguet.

Es la más común de las afecciones orales. Es frecuente en los lactantes hasta los 3 meses de edad, en el adulto es más rara, su aparición se ve favorecida en los ancianos por el uso de prótesis, el reposo relativo de la boca y la reducción de la secreción salival y en pacientes con tratamientos con antibióticos, quimioterápicos [7].

Se caracteriza por la presencia de grumos o placas blanco-amarillentas de consistencia blanda o gelatinosa, que crecen de manera centrífuga (FIGURA IV-8). Al ser raspadas se desprende fácilmente dejando una zona eritematosa, erosionada o ulcerada, en ocasiones dolorosa, con una mucosa adyacente normal en apariencia. Las lesiones se pueden localizar en cualquier zona de la mucosa oral, pero predominan en la mucosa yugal, orofaringe y márgenes laterales de la lengua. En la mayoría de los casos, la sintomatología es mínima, pero en los casos masivos, los pacientes pueden quejarse de dolor, ardor o disfagia [13].

Histológicamente las pseudomembranas están compuestas por células epiteliales descamadas, fibrina, tejido necrótico, restos de alimentos, células inflamatorias y células candidiásicas con micelio. *C. albicans* no penetra más allá del estrato córneo del epitelio que presenta edema y microabscesos. El tejido conectivo subepitelial presenta un infiltrado inflamatorio mixto con PMFN, linfocitos y macrófagos [13].

1.6.2.1.2 Candidiasis eritematosa

Este tipo de infección mal llamada atrófica, se presenta clínicamente como un área rojiza de bordes mal definidos en la mucosa oral sin la presencia de placas blanquecinas (FIGURA IV-9). Representa en la actualidad la forma clínica más común tanto en los inmunocompetentes como en lo inmunodeprimidos. Es más frecuente identificarla en el dorso de la lengua y en el paladar, en una imagen doble en espejo. En general es una lesión asintomática o que produce un ligero picor, por lo que en muchas ocasiones es un hallazgo casual. Los hallazgos histopatológicos son similares a los encontrados en la pseudomembranosa, con una infiltración de polimorfonucleares en el tejido conectivo, una cierta atrofia epitelial y una vascularización hiperémica [13].

1.6.2.1.3 Candidiasis hiperplásica o leucoplásica

Se define como una lesión oral en placas o pequeños nódulos blancos, que no pueden ser desprendidos por raspado y no pueden ser atribuidos a ninguna patología diagnosticable. Se pueden localizar en cualquier lugar de la mucosa oral, pero aparecen más frecuentemente en la mucosa yugal cerca de las áreas retrocomisurales y en la lengua. En los cortes histopatológicos se reconoce la invasión por hifas que penetran en ángulo recto desde la superficie [13].

1.6.2.1.4 Queilitis angular

Se caracteriza por un enrojecimiento intenso de las comisuras labiales (habitualmente bilateral), con aparición de grietas o fisuras y formación de costras (FIGURA IV-10). Esta lesión no siempre está producida por *Candida* por lo que algunos autores la consideran como una lesión asociada. En muchos casos se trata de una infección mixta en la que intervienen bacterias como el *Staphylococcus aureus* o algunos estreptococos [13].

1.6.2.1.5 Glositis rómbica o romboidal media

Es una patología infrecuente que aún mantiene ciertas controversias respecto a su exacta etiopatogenia. Inicialmente se consideró que era una anomalía del desarrollo por persistencia del tubérculo impar en el centro del dorso de la lengua (FIGURA IV-11). Diversos autores han demostrado que se trata, en muchos casos, de una lesión candidiásica crónica en una zona especialmente proclive a desarrollar esta infección [13]. Este proceso se produce más frecuentemente en los varones, fumadores y diabéticos. Por otra parte es común en personas que realizan otras prácticas sexuales, como el sexo oral.



FIGURA IV-8. Candidiasis pseudomembranosa o muguet en paciente VIH + [13].

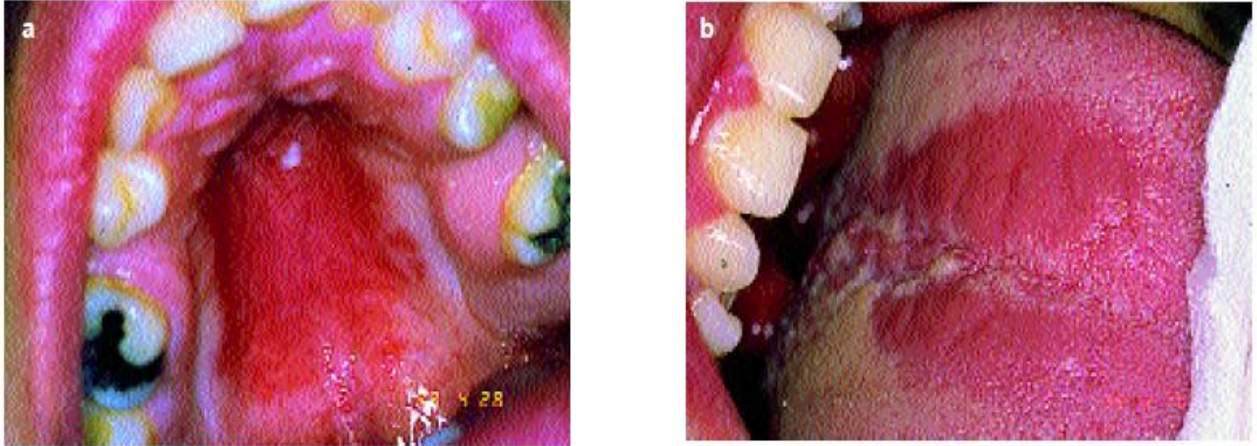


FIGURA IV-9. Candidiasis eritematosa en (a) paladar duro y (b) en dorso de la lengua [13].

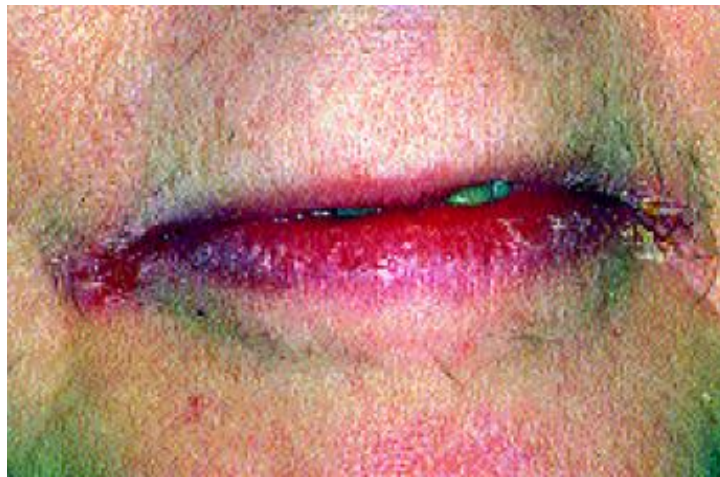


FIGURA IV-10. Queilitis angular bilateral en paciente anciana sometida a terapia con antidepresivo [13].



FIGURA IV-11. Glositis rómbica [7].

1.6.2.2 Mucosa digestiva

Involucra esófago, estómago e intestino.

1.6.2.2.1 Candidiasis esofágica

La afección esofágica puede ser parte del muguet que se inicia en la boca. Clínicamente se presenta con odinofagia, disfagia y dolor retroesternal [14]. Síntomas constitucionales como fiebre también pueden ocurrir. El dolor epigástrico puede ser el síntoma dominante, aunque el cuadro puede ser asintomático. Puede aparecer en pacientes tratados con ATB, corticoides, radiaciones, con diabetes y/o VIH (+).

Se puede clasificar según la apariencia endoscópica de acuerdo a la clasificación de Kodsi [7] en:

Tipo I: placas escasas grises o blanquecinas hasta de 2 cm de diámetro.

Tipo II: placas numerosas y mayores de 2 cm de diámetro.

Tipo III: placas confluentes lineales, nodulares, con hiperemia y franca ulceración.

Tipo IV: mayor friabilidad de la mucosa y ocasional estrechez del lumen.

Se ha demostrado que la candidiasis esofágica puede ocurrir en individuos saludable [15]. El diagnóstico diferencial es amplio, hay que distinguir esta entidad de otras causas de esofagitis como: esofagitis eosinofílica, esofagitis por radiación, esofagitis por reflujo, Citomegalovirus, infección por Herpes. En pacientes con SIDA no es infrecuente encontrar más de una causa que explique la esofagitis [14].

El segundo y tercer sitio más frecuentemente atacado es el estómago e intestino respectivamente. Están predispuestos los pacientes con cáncer o en tratamientos prolongados con aquellos fármacos que produzcan alteración en el pH del jugo gástrico. La infección gástrica puede manifestarse frecuentemente como una úlcera en la mucosa. La mayoría de estos casos son diagnosticados por autopsia.

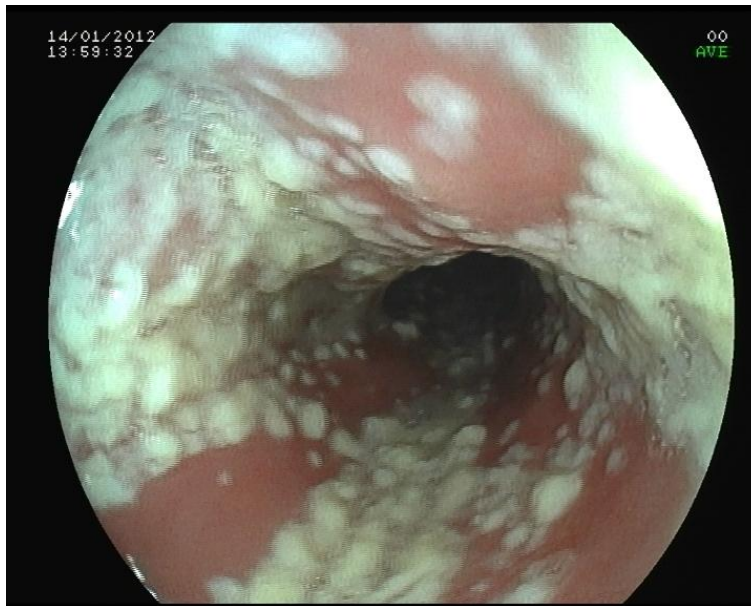


FIGURA IV-12. Candidiasis esofágica.

1.6.2.3 Mucosa vaginal y peneana

1.6.2.3.1 Vulvovaginitis micótica

Es la segunda causa de infecciones vaginales después de la vaginosis bacteriana, causada principalmente por *C. albicans* (60 a 80%), y ocasionalmente por *C. Glabrata* (hasta un 20%) y *C. tropicalis* (6 a 23%) [16]. Más frecuente en la mujer con diabetes, en la gestante o en pacientes tratadas con ATB o anticonceptivos orales. La infección se caracteriza por la presencia de secreción espesa y grumosa, de aspecto lechoso, blanca o blanco-amarillenta (con aspecto de leche cortada) y placas pseudomembranosas de color blanco grisáceo, que se encuentran en la mucosa vaginal (FIGURA IV-13). Toda la zona genital está muy inflamada y por lo general, el prurito es muy intenso [16]. Se pueden presentar como episodio aislado o como episodios recurrentes. Se define como Candidiasis vulvovaginal (CVV) recurrente, cuando se producen 3 o más episodios de CVV en un año. Es importante mencionar que la vulvovaginitis micótica puede ser originada en la gestación debido a las modificaciones hormonales y a los cambios en el pH vaginal que favorecen la presencia de infecciones vaginales que conllevan a la vulvovaginitis si estas no son tratadas oportunamente [17].

La candidiasis en la gestación está dentro de los factores predisponentes para la aparición de vulvovaginitis. Se ha demostrado que la gestante es más susceptible a la candidiasis vaginal; esta situación puede ser explicada por los altos niveles de estrógeno que se presentan durante el embarazo con un aumento del glucógeno vaginal, favoreciendo el crecimiento micótico. Las estadísticas muestran que la *C. albicans* es la primera causa de vulvovaginitis en embarazadas [8].



FIGURA IV-13. Vulvovaginitis micótica.

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL			
SIGNOS Y SÍNTOMAS	CANDIDIASIS	TRICOMONIASIS	VAGINOSIS
LEUCORREA	Blanca, grumosa, viscosa	Amarillo-verdosa, espumosa	Gris homogénea
OLOR	Ninguno	Maloliente	A pescado
PRURITO	Intenso	Leve, intenso	No
MUCOSA VAGINAL	Eritematosa, grumos blancos adherentes	Petequias	Normal
pH	Menor a 4.5	Mayor a 4.5	Mayor a 4.5
ERITEMA VULVAR	Frecuente	Ausente	Normal

TABLA IV- 2. Diagnóstico diferencial [7]

1.6.2.3.2 Balanitis o balanopostitis por Candida

Se define como la inflamación del glande del pene, a menudo con el prepucio (balanopostitis), esto se produce por la presencia de *Candida* sp. y la ausencia de otra etiología infecciosa. La balanitis por *Candida*, presenta manifestaciones clínicas tales como, erosión superficial, con zonas eritematosas o acristalada y pápulas con o sin pústulas erosionado en la zona del glande o en el surco balano-prepucial acompañado de ardor local y prurito, es generalmente adquirida por vía sexual y, a menudo se asocia con la presencia de la diabetes en hombres [17].

El diagnóstico se basa principalmente en el aspecto clínico, pero puede ser confirmada por microscopía y / o cultivo si se consideran otros diagnósticos diferenciales. La cantidad de material que se puede recoger es a menudo pequeña, y por lo tanto el método de muestreo tiene una fuerte influencia sobre la sensibilidad de la microscopía y los cultivos. El uso de un método de "cinta adhesiva" ha demostrado ser más sensible que a través del método de limpiado [17].



FIGURA IV-14. Balanitis.

1.7 Diagnóstico

Dada la ubicuidad de la levadura, el diagnóstico de laboratorio debe hacerse con gran cautela. El examen directo de lesiones de las uñas, de la piel (en hidróxido de potasio) o de las mucosas (en lactofenol-azul de algodón), o la observación microscópica de extensiones teñidas con Gram, tiene significado diagnóstico si se encuentra el microorganismo en un gran número. El examen debe realizarse con muestra fresca. La presencia en las lesiones de la forma de levadura brotando junto a pseudohifas tiene un valor diagnóstico. El aislamiento aséptico de la sangre, líquido pleural, peritoneal, líquido cefalorraquídeo permite diagnosticar la candidiasis diseminada. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que la fungemia puede ser solo pasajera y no siempre indica una infección sistémica.

La *C. albicans* crece bien en medio de agar sangre y Sabouraud a 25°C y 37°C. Otro rasgo característico de esta especie es la producción de tubos germinativos agregando a una pequeña cantidad de suero un poco de cultivo e incubando la mezcla a 37° C por 2 a 4 horas (Cartes y Chengappa, 1991).

Las otras especies de *Candida* se pueden identificar por sus caracteres bioquímicos de fermentación y asimilación de hidratos de carbono. En la actualidad se dispone de la globulina marcada anti *C. albicans* para la prueba de inmunofluorescencia en extensiones de materiales patológicos o de cultivo. También son de utilidad las pruebas de aglutinación en tubo, de inmunofluorescencia indirecta y de hemaglutinación indirecta, si el nivel de anticuerpos que se detecta está por encima del que prevalece en la población normal. En las personas sanas las inmunoglobulinas predominantes o exclusivas son de la clase IgM; en cambio, en la candidiasis sistémica hay un rápido aumento inicial de IgM y luego de IgG, con posterior disminución de IgM y persistencia de la IgG.

1.8 Toma de muestras para el diagnóstico de Candidiasis

Para la identificación de levaduras en el laboratorio se pueden obtener diferentes muestras a partir de las cuales se puede realizar el aislamiento. Estas muestras incluyen:

sangre, orina, frotis rectales, catéteres intravasculares y exudados, hisopados de mucosas y piel, entre otras [12].

1.9 Pruebas de Diagnóstico

1.9.1 Pruebas Microbiológicas

Las pruebas microbiológicas son el conjunto de procedimientos y técnicas complementarias empleadas para determinar si los microorganismos están presentes en una muestra (ausencia/presencia), pruebas para cuantificar el número de microorganismos o el recuento de microorganismos presentes en la muestra y pruebas destinadas a identificar microorganismos.

1.9.1.1 Hemocultivo

Es considerado la prueba *Gold Standard* en la identificación de la candidemia. Este se realiza utilizando un frasco al vacío con medio de cultivo líquido (el cual debe contener los requerimientos nutricionales necesarios para el crecimiento de *Candida spp*), en donde se deposita la muestra de sangre obtenida del paciente [12].

1.9.1.2 Examen directo

Si se trata de material córneo (escamas de piel, raspado de uñas, pelos) se lo examina con una solución de KOH 20% en caliente (para disgregar y clarificar el material). Si se trata de material obtenido de mucosas, heces, etc., el material se examina directamente entre porta y cubreobjetos, puede realizarse en fresco (solución salina, azul de lactofenol), o usando diferentes coloraciones (FIGURA IV-17). En este examen se observan levaduras unicelulares esféricas u ovoides de pared delgada, generalmente gemantes. Este criterio es utilizado en la identificación de levaduras directamente de las muestras en

el laboratorio clínica, ya que es el método sencillo y económico, porque permite la observación directa de la forma de levadura características de las especies de *Candida* [7]. Si la muestra es positiva, se deberían observar elementos levaduriformes, de 3 a 5 de diámetro, con o sin pseudomicelio, y/o hifas verdaderas (FIGURA IV-15 y IV-16).

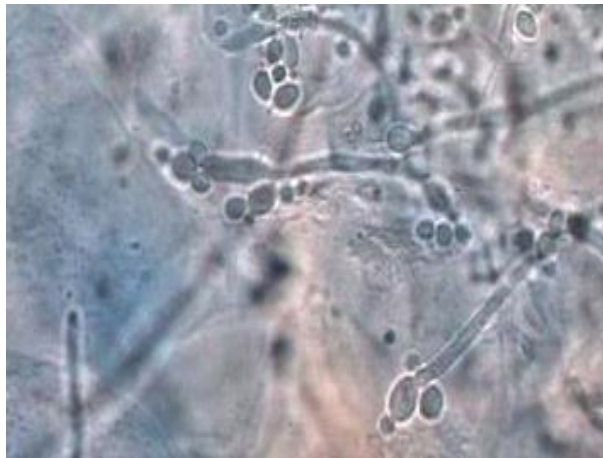


FIGURA IV-15. Levaduras y pseudomicelio en hisopado de mucosa bucal. Gueguén-1000x [7].

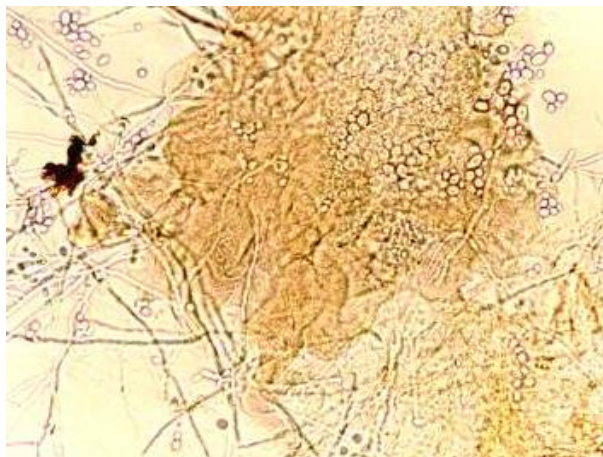


FIGURA IV-16. Levaduras y pseudomicelio. Hisopado de mucosa bucal. Fresco-400x [7].

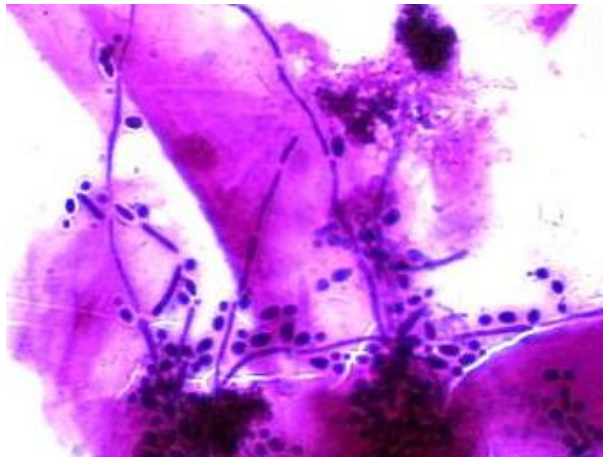


FIGURA IV-17. Levaduras y pseudomicelios- Hisopado de mucosa bucal. Coloración May Grunwald Giemsa (MGG)-1000x [7].

1.9.1.3 Cultivos

Una forma muy útil de poder aislar, identificar y conservar los microorganismos es mediante el uso de medios de cultivo. La forma más sencilla de clasificar los medios de cultivo es por su consistencia, entonces aparecen los medios de cultivo sólidos y los medios de cultivo líquidos o también llamados caldos [18]. En ambos medios debe haber una buena cantidad de nutrientes que faciliten el crecimiento bacteriano, la diferencia entre el cultivo sólido y líquido radica en la presencia de una sustancia que se llama Agar y que es la encargada de darle la solidez y consistencia al medio. Esta sustancia proviene, principalmente, de un alga llamada Gelidium, aunque muchos otros géneros pueden servir como fuente de este polisacárido (es decir, un azúcar grande formado por la unión de azúcares pequeños).

La ventaja fundamental de usar un medio de cultivo líquido, es que permite que crezcan microorganismos que se encuentran en muy poca cantidad, es decir, cuya concentración es muy baja en la muestra. Para el caso del medio de cultivo sólido, la ventaja radica en que permite detectar los diferentes tipos de bacterias que puedan encontrarse en una sola muestra [18].

Los hongos del género *Candida* crecen bien en los medios generales: Agar Sabouraud glucosa (ASG), Czapek, Agar papa dextrosa (APD). Es conveniente sembrar medios con antibióticos, como el cloranfenicol (ASG cloranfenicol) o cicloheximida (Mycosel) (tener en cuenta que *C. krusei*, *C. tropicalis* son sensibles a este ATB) para impedir el desarrollo de bacterias contaminantes.

1.9.1.3.1 Cultivo en Agar Harina de Maíz (AHM)+ Tween 80

Este medio sólido permite diferenciar muestras de *C. albicans* y no *C. albicans*, por ejemplo en estudio de *C. albicans*, se observa, además de blastoconidios (levaduras brotadas) y pseudomicelio, la formación de clamidoconidios terminales a las 48 hs. de incubación. (FIGURA IV-18). La ausencia de clamidoconidios indica que la especie no es *C. albicans* [7]. En estos casos se pueden observar levaduras y pseudomicelio (FIGURA 19) o solo levaduras (FIGURA IV-20) y se debe informar como levadura no *C. albicans* (y no como *Candida* sp.).

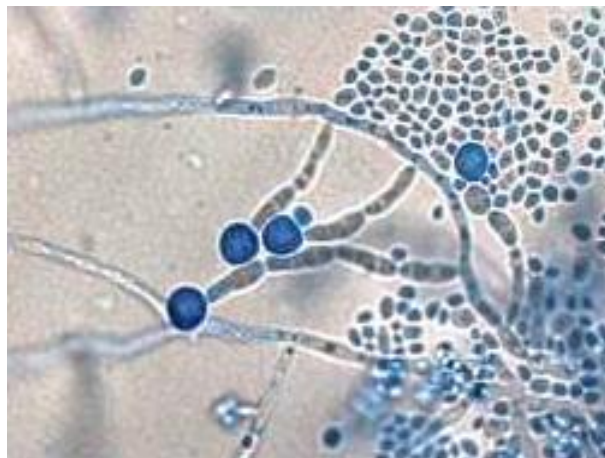


FIGURA IV-18. *C. albicans*. Formación de Clamidoconidios en AHM-Gueguén 1000x [7].



FIGURA IV-19. Levaduras y pseudomicelio de *C. parapsilosis* en AHM-Gueguén 400x [7].

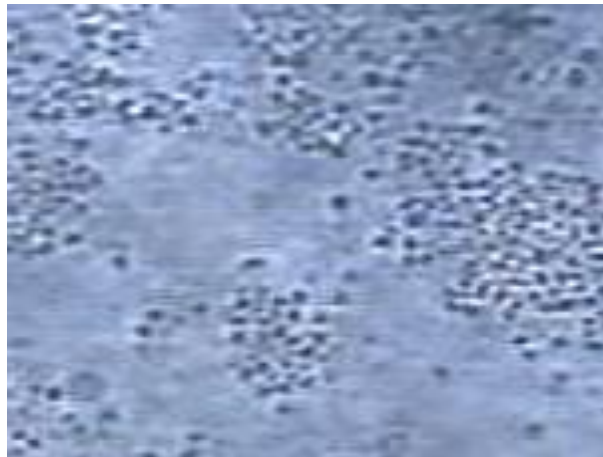


FIGURA IV-20. Levaduras de *C. glabrata* en AHM-Gueguén 400x [7].

1.9.1.3.2 Agar Sabouraud glucosa (ASG)

Este medio sólido contiene peptona como fuente de nitrógeno, glucosa como fuente de carbono, agar y en ocasiones se le adiciona cloranfenicol para inhibir la microbiota acompañante, el cual se incuba a una temperatura entre 35 y 37°C, durante un tiempo aproximado de 24 a 48 horas, donde se obtiene colonias lisas, blandas, de color blanco o beige, que con el tiempo van cambiando su aspecto a colonias plegadas, rugosas o membranosas (FIGURA IV-21). Este cultivo será utilizado en esta investigación.



FIGURA IV-21. Levaduras y pseudomicelios- Hisopado de mucosa bucal. Coloración MGG-1000x.
Colonias levaduriformes en ASG [7].

1.9.1.3.3 Agar de Nickerson

Cultivo sólido adecuado para el aislamiento e identificación de levaduras del género *Candida*. El medio sigue los principios generales del agar de sulfito-bismuto como agente inhibidor y diferencial completando la selectividad la elevada concentración de glicocola. Este medio es altamente inhibidor, no permitiendo el crecimiento de bacterias. *Candida* crece libre y rápidamente [19]. El aspecto colonial sobre este medio, después de una incubación de 48-72 horas a 30-35° C es el siguiente:

C. albicans: Colonias cremosas, muy convexas. circulares con bordes de aspecto ligeramente micelial y color marrón oscuro a negro (FIGURA IV-22). No toma brillo metálico ni difunde pigmento aun después de 72 horas de incubación. Para el mantenimiento de estas características coloniales. es importante que el medio este recién preparado y no se haya recalentado [19].

C. tropicalis: Colonias acuminadas, cremosas, irregulares y bordes ligeramente miceliares, de color marrón oscuro con el centro negro. Después de 72 horas de

incubación. Puede adquirir un brillo metálico característico y puede producir un halo de difusión de pigmento [19].

C. krusei: Colonias grandes y planas. con bordes irregulares de color marrón perlado más oscuro en el centro que en los bordes. en donde aparece un halo amarillento [19].

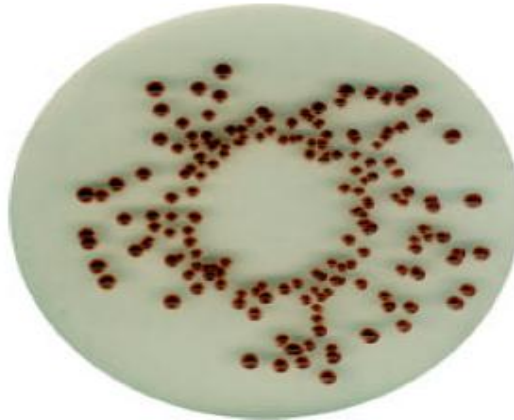


FIGURA IV-22. *C. albicans* en cultivo Nickerson [19].

1.9.1.3.4 Caldo Micológico

Medio de cultivo líquido para la producción masiva y determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) en hongos. El Agar Micológico es un medio ampliamente utilizado para el cultivo de hongos, se obtienen excelentes resultados para el mantenimiento de todo tipo de hongos. La morfología celular así como la cromogénesis se mantienen perfectamente sobre este medio, en el cual la producción de clamidosporas de *Candida* también suele producirse con espontaneidad. El Agar Micológico. es el medio más indicado para llevar a cabo ensayos de sensibilidad de fungistáticas y fungicidas, debido a la simplicidad de su composición y por su reacción neutra [20].

1.9.1.4 Prueba de tubo germinal

Es una extensión filamentosa de la célula, la cual mide la mitad del ancho y de tres a cuatro veces el largo de la célula. Esta prueba de inocular una colonia en un tubo con 0,5 mL de suero, se incuba a 37°C de 2 a 4 horas y luego se observa en microscopio con un aumento de 40x, agregando 2 o 3 gotas de la suspensión en una lámina portaobjeto y luego cubriéndola con una lámina cubreobjetos. Si se observa una estructura elongada unida a la levadura se considera una prueba de tubo germinal positiva. Es una prueba fácil de hacer y se realiza comúnmente en los laboratorios, pero no es una prueba eficiente para la identificación de las especies de *Candida* ya que esta prueba solo permite descartar la presencia de *C. albicans* [12].



FIGURA IV-23. Tubo germinal para identificación de *C. albicans* [12].

1.9.2 Pruebas Bioquímicas

Se evalúa la capacidad de las levaduras para fermentar y asimilar los carbohidratos o la presencia de enzima que reaccionan con sustratos cromogénicos. La importancia de estas pruebas radica en la diferenciación de las especies de *Candida* demostrando una característica particular del metabolismo de la levadura [12].

1.9.2.1 Medios cromogénicos

Existen diferentes medios que utilizan sustratos cromogénicos como CHROMagar Candida, Cromogen *albicans*, CandiSelect, etc. Estos medios de cultivo diferenciales, en su mayoría están compuestos por peptona, glucosa, cloranfenicol y una mezcla de sustratos cromogénicos que producen color al ser degradados por enzimas específicas que permiten la diferenciación de algunas especies de *Candida*. La lectura de la prueba se realiza mediante los colores, texturas o fluorescencia [12].

1.9.2.1.1 CHROMagar Candida

Su principal ventaja es que reduce el tiempo de identificación de especies como la *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. krusei*, a diferencia de los otros medios que sólo son capaces de discriminar la *C. albicans*.

(FIGURA IV-24) *C. albicans* (color verde), *C. tropicalis* (color azul) y *C. krusei* (colonias rosas secas y rugosas) y colonias rosas húmedas (otras especies de *Candida*) [7].

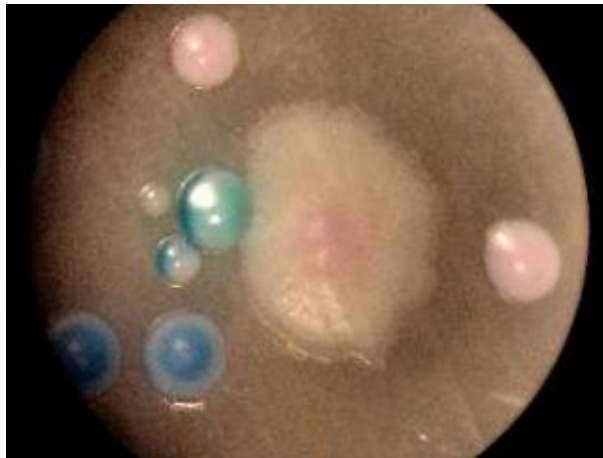


FIGURA IV-24. Placa de CHROMagar™ con mezcla de levaduras [7].

1.9.3 Pruebas inmunológicas

Son necesarias para la detección de antígenos y anticuerpos circulantes contra especie de *Candida*. Para ello existen pruebas como la inmunofluorescencia indirecta, aglutinación en látex, prueba de ELISA, inmunodifusión, etc., las cuales permiten un diagnóstico rápido tanto de candidiasis, como de candidemias [12].

1.9.3.1 Aglutinación en látex

Utiliza partículas de látex recubiertas con anticuerpos monoclonales que reaccionan con antígenos de *C. albicans*. Un ejemplo de esto es la prueba de Bichro-Latex albicans, en donde luego de la formación del complejo antígeno - anticuerpo, se puede evidenciar la reacción por medio del fenómeno de aglutinación, el cual se visualiza en una placa de color como se observa en la figura. Es de fácil reproducibilidad, no requiere de mucho tiempo para su realización y es de sencilla lectura. Se encontró que no es relevante el medio de cultivo, en el cual se aísle la *C. albicans* (agar sangre de oveja, agar glucosado de Sabouraud con cloranfenicol, etc.), la prueba muestra aglutinación para *C. albicans* y no presenta aglutinación para otras especies de *Candida* [12].

1.9.3.2 Prueba de inmunofluorescencia

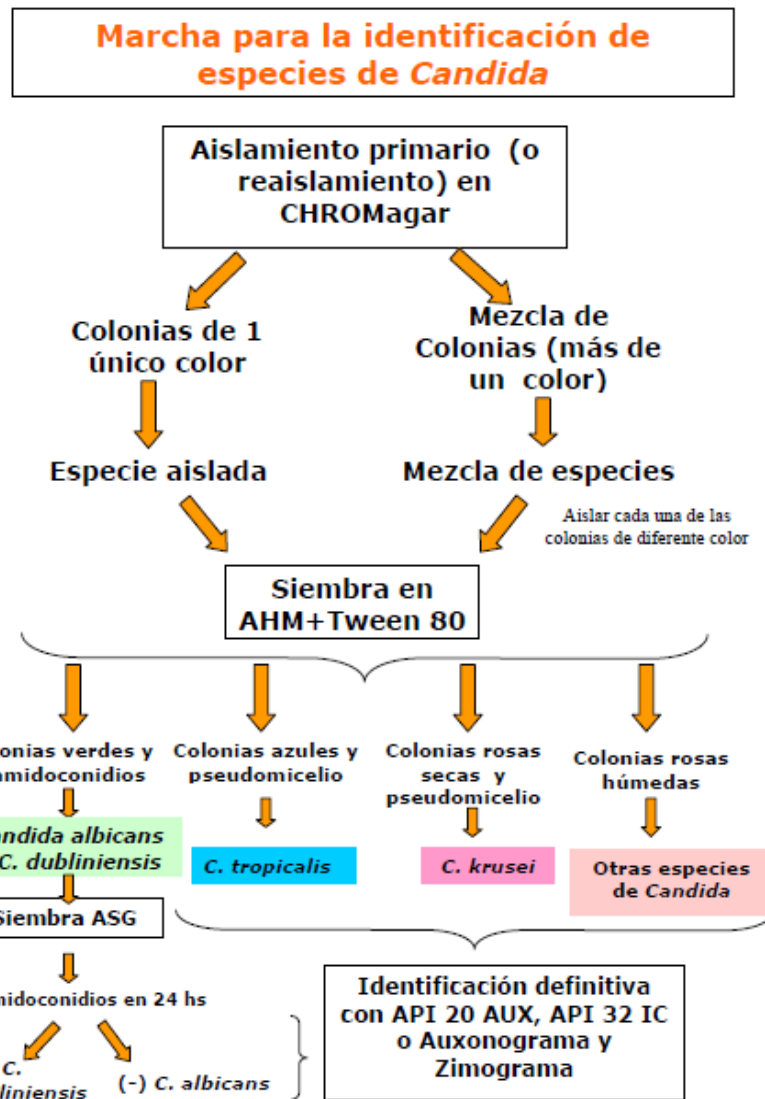
Se utiliza para el diagnóstico de *Candida* por medio de detección de anticuerpo frente al pseudomicelio de *Candida*. Esta técnica es útil para la identificación de candidiasis invasora por *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. dubliniensis*, entre otras [12].

1.9.4 Pruebas moleculares

Generan respuestas más rápidas y confiables, estas técnicas están basadas en el análisis de fragmentos de ácido nucleicos, siendo las más utilizadas la reacción en cadena de la polimerasa [12].

1.9.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Tiene como fundamento la amplificación de secuencias de ADN y ARN de interés. Para esto se debe realizar una serie de pasos: la desnaturalización del ADN, por incubación a altas temperaturas para generar ADN de hebra simple; alineación, donde hay un descenso en la temperatura para los iniciadores u oligonucleótidos se unan a las regiones complementarias blanco de la amplificación; y la extensión, en donde una polimerasa se une a los iniciadores y se realiza la síntesis de la hebra de ADN complementaria. Este tipo de técnica han aumentado su popularidad en la última década. Es por esto que con el fin de desarrollar técnicas rápidas y sensibles para detectar ADN de *Candida* a partir de suero, Dunyach y colaboradores en 2008, utilizaron la prueba de PCR en tiempo real, la cual permite que el proceso sea monitorizado a través de la cuantificación de fluorescencia. Presenta una sensibilidad y especificidad es del 77 y 100% respectivamente mostrando que es una prueba útil para confirmar la presencia de ADN de *Candida* en muestras clínicas [12].



FLUJOGRAMA IV-1. Proceso para la identificación de las especies del género *Candida* [7].

1.10 Criterios a seguir para el diagnóstico de Candidiasis

- Candidiasis cutánea, Candidiasis vaginal, Candidiasis orofaríngea, Candidiasis esofágica, Candidiasis mucocutánea crónica: examen directo positivo (levaduras y/o pseudomicelio) y cultivo positivo para levaduras, con una lesión y signos clínicos compatibles.

- Candidemia (paciente neutropénico): hemocultivo positivo.
- Candidiasis profunda localizada o Candidiasis sistémica (paciente neutropénico): biopsia con examen directo y/o cultivo positivo; orina por punción suprapúbica positiva. (No se considera como criterio diagnóstico de Candidiasis sistémica un examen directo positivo y/o cultivo positivo para levaduras de catéter, retrocultivo, orina por sonda o chorro medio, heces u otras muestras provenientes de sitios no estériles).

2. Género Candida

En las últimas décadas, las infecciones micóticas han ido ganando una mayor importancia médica, dado al aumento sostenido de nuevas infecciones generalmente causadas por hongos oportunistas, siendo el género *Candida* uno de los más importantes. Los hongos se clasifican dentro del reino fungi, son organismos eucariotas y poseen una pared celular formada por proteínas y polisacáridos, siendo el más importante la quitina y el ergosterol en la membrana celular que los distingue de otros organismos. Se pueden clasificar entre ellos por su morfología en filamentosos o levaduriforme. Los hongos filamentosos van a tener un aspecto veloso y es común verlos en frutas, presentan estructuras tubulares que son células, por lo tanto son organismos multicelulares, que conforman hifas y que irán creciendo en los extremos apicales formando un micelio. Los hongos levaduriformes se caracterizan por ser unicelulares que forman colonias similares a las bacterias, se dividen por gemación o fisión, y en algunos casos las células hijas no se separan de las madres formando así un pseudomicelio [3] [21].

Son de especial interés para la micología clínica que tiene un crecimiento levaduriforme. Estos presentan un crecimiento en forma de micelio a 25°C y levaduriforme a 37°C, un representante de este grupo es *C. albicans* [21].

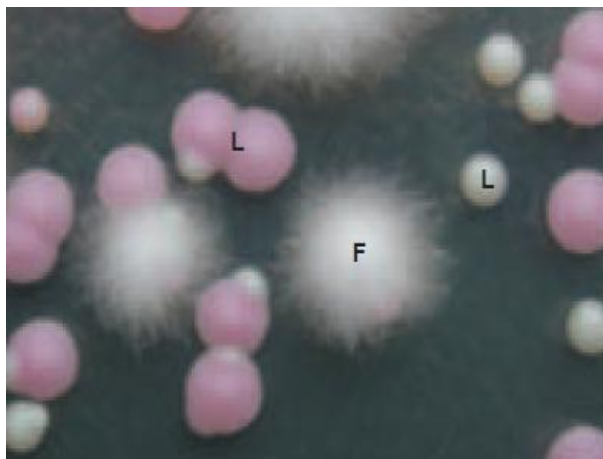


FIGURA IV-25. L: Hongos levaduriformes; F: Hongos filamentosos [21].

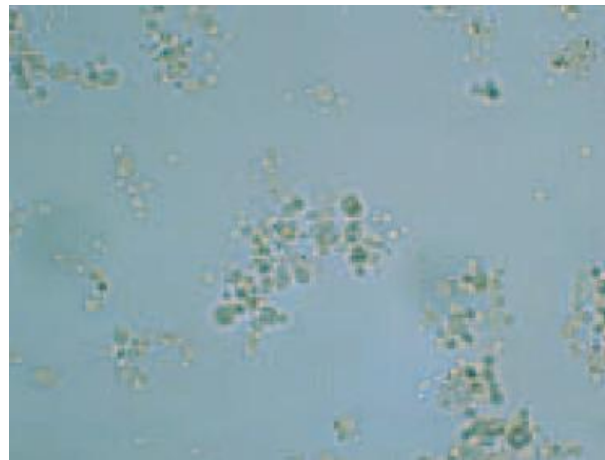


FIGURA IV-26. Crecimiento Hongo Levaduriforme [21].

The same sequence of events is common to most fungal life cycles.

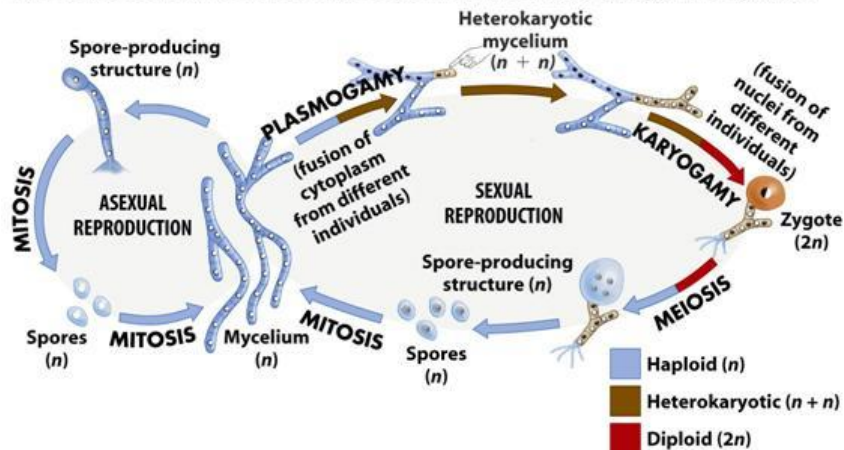


Figure 30-13a Biological Science, 2/e
© 2005 Pearson Prentice Hall, Inc.

FIGURA IV-27. Reproducción de los hongos levaduriforme. [21].

La Candida es una levadura que se reproduce asexualmente mediante gemación de una célula madre. Estos afectan distintos tejidos causando distintos tipos de micosis, por ejemplo:

- Micosis Cutánea: Es una infección de la capa queratinizada de la piel, ya sea pelo, uñas, piel. Sus signos y síntomas incluyen prurito, descamación, uñas decoloradas. (onicomicosis), entre otros.
- Micosis Oportunistas: suelen causar infecciones cuando no hay integridad en la piel o mucosas o cuando la persona se encuentra inmunodeprimida. Cabe destacar que la Candida generalmente se encuentra como parte de la microbiota del ser humano, es un colonizador benigno. [3]

La Candida se encuentra colonizando el tracto digestivo, y este puede pasar al torrente sanguíneo, ya sea por algún método invasivo, como uso de catéter o translocación gastrointestinal y afecta distintos órganos como corazón, hígado, riñón o cerebro [3].

El potencial patógeno de la Candida está dado por sus propiedades biológicas como adherencia, diformismo levadura-micelio, la hidrofobicidad, la secreción de proteínas y cambios de fenotipo que cada especie tendrá y que le dará mayor factor de virulencia.

- La adhesión se relaciona con la capacidad de virulencia de cada especie de Candida, y es importante en las primeras etapas de infección.
- La capacidad de transformación de levadura a forma de micelio, que se va a encontrar relacionado con los cambios de temperatura y pH en el ambiente, le da un mecanismo de adaptación al medio.
- Hidrofobicidad que se relaciona con el tipo y grado de glucosilación de las proteínas que se encuentran en la superficie e inducen esta hidrofobicidad y de esa forma la adherencia a las células epiteliales. Así mismo las glicoproteínas presentes inhiben la respuesta inmunitaria a través de un mecanismo desconocido. [3]
- Secreción de proteínas, las proteinasas secretadas tendrán un efecto en las proteínas del organismo hospedador y así poder atravesar al tejido conjuntivo
- El cambio de fenotipo le permite adaptarse a los cambios del ambiente. [3]

El género de *Candida* presenta más de doscientas especies, en el cual la que tiene mayor importancia médica es *C. albicans*, el cual es uno de los principales agentes causales de la candidiasis.

2.1. *C. albicans*

Principal causante de candidiasis en el mundo, se destaca por ser oportunista y atacar al organismo inmunodeprimido.

Es un hongo dimórfico, es decir, se desarrolla de forma distinta en función de la temperatura de crecimiento, como levadura, normalmente a 37°C en el huésped, y como hongo de aspecto filamentoso, a 25°C en la naturaleza. Perteneció al filo Ascomycota y se reproduce de forma asexual por gemación. En forma de levadura presenta un aspecto de células redondas u ovaladas, de 3-8 x 2-7 micras de tamaño, agrupadas en pequeños grupos, mientras que, en forma de hongo filamentoso, las células se alargan y se diversifican tomando la apariencia de filamentos, pseudohifas o pseudomicelio. El dimorfismo le permite evadir los mecanismos de defensa relacionados con la inmunidad celular del huésped. En forma de levadura se comporta como saprofita, que conviven en simbiosis con el huésped, mientras que, en forma de hongo filamentoso, se comporta como un parásito patógeno produciendo síntomas en el huésped. Macroscópicamente, en cultivo crece formando colonias blancas, blandas, cremosas y lisas.

Es el principal agente productor de candidiasis de la mucosa del tracto gastrointestinal y vaginal y es el agente más aislado en candidemias en la Argentina (40,75 %) (Rodero y col, 2005) y en el mundo, aunque este porcentaje va disminuyendo a expensas del aumento de otras especies consideradas reemergentes (principalmente *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*); está considerada como causante de infecciones de origen endógeno. Su aislamiento ha sido asociado mayormente a pacientes con tumores sólidos, sin neutropenia y que no han sido sometidos a profilaxis con fluconazol.

2.2. *C. krusei*

Esta especie ha adquirido mayor importancia con el tiempo, afecta gravemente a pacientes neutropénicos y diarrea en niños. Esta especie es intrínsecamente resistente al fluconazol y se ve un aumento en la frecuencia de esta especie en pacientes tratados preventivamente con este antifúngico. [22]

La *C. krusei* a diferencia de las otras especies de *Candida* porque tiene una forma más alargada, que asemeja la forma de un grano de arroz largo, una pared celular multicelular. *C. krusei* se puede encontrar en dos formas como levadura o como pseudohifas, se diferencia también con la *C. albicans* porque la primera tiene reproducción asexual mientras que la *C. krusei* se encuentra más cerca de reproducción sexual. [23]

C. krusei se encuentra frecuentemente en la mucosa de individuos sanos, generalmente en la oral. Y se cree que es la quinta causa de infecciones por *Candida*, siguiendo *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*. [23]

En estudios de 1989 en mujeres embarazadas, se encontró que entre 4-5% tenía *C. krusei* [23].

2.3. *C. tropicalis*

El segundo causante principal de candidiasis, incluso superando en algunos países a *C. albicans*. Es el 3º agente en frecuencia de aislamiento (15,84%), tiene gran capacidad invasiva, el 50 - 60% de los pacientes colonizados desarrollan Candidiasis [24].

Según estudios publicados en Oxford Journal entre el 80- 85% de la candidiasis vulvovaginal es causado por la especie *C. albicans*, mientras que entre el 5 – 20% restante es causado por *Candida* no *albicans*, como *C. glabrata* (5-10%), *C. tropicalis* (menos de 5%), y de hecho *C. krusei* es un unusual agente causante de esta infección [23].

La *C. tropicalis* es más comúnmente aislada en la sangre y causante de candidemia en pacientes que sean neutropénico o que se encuentren en UCI y puede llegar a 30% en algunos lugares.[24]

Los test serológicos empleados para diferenciar entre las distintas especies del género *Candida*, que se encuentran basados en las similitudes de los polisacáridos que están presentes en la superficie de las distintas especies de *Candida*, han arrojado resultados que señalan una similitud de los antígenos entre *C. albicans* y *C. tropicalis*. [25]

C. tropicalis es considerado el mayor agente etiológico de candidiasis, no causado por *C. albicans*, la candidiasis causada por *C. tropicalis* ha ido en aumento en una escala global en los últimos años. Este es un organismo resistente al fluconazol. [24]

El uso de antibióticos de amplio espectro, el aumento en el uso de drogas supresoras del sistema inmune son los responsables de que exista un mayor número de personas inmunodeprimidas a nivel global que sean más susceptibles a estas infecciones causadas por hongos oportunistas [25].

En la India la *C. tropicalis* es el agente causante más común de candidemia nosocomial. La epidemiología muestra que entre el 67 – 90% era causado por *Candida* no *albicans* y que *C. tropicalis* era el más dominante [25].

En cuanto a la patogenia de *C. tropicalis* se ha demostrado que es más invasiva que la *C. albicans* en pacientes oncológicos, y su virulencia se encuentra aumentada cuando se encuentra en personas inmunocomprometidas [25].

Algunos estudios experimentales sugieren que luego de la ingestión de células levaduriformes, los fagocitos presentan antígenos para las proteinasas *C. albicans* y *C. tropicalis* que anteriormente se encontraban en la pared celular de *C. tropicalis* [24].

3. Tratamiento

3.1. Tratamiento Clínico

En el tratamiento más utilizado por los servicios de salud en Chile para tratar la Candidiasis tanto en atención primaria, como secundaria y terciaria utilizan antifúngicos por vía oral, vaginal o tópica según el grado de diseminación del hongo. A dichos fármacos los denominaremos como tratamiento “clásico”.

Los antimicóticos utilizados pueden pertenecer al grupo de azoles o polienos, dentro de los que encontraremos diferencias tanto generales, a nivel molecular como por su mecanismo de acción. También se presentará los tratamientos alternativos más utilizados que ofrece la industria homeopática chilena.

3.2. Azoles

3.2.1. Características Generales

Los Azoles son antifúngicos de origen sintético, los cuales se clasificaron en imidazoles y triazoles, dependiendo del número respectivo de átomos - dos o tres- de nitrógeno en el anillo azólico de cinco elementos.

Los imidazoles se dividen en antifúngicos de uso sistémico (miconazol) o tópico (clotrimazol). El principal representante de los triazoles es el Fluconazol.

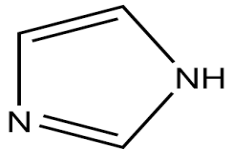
3.2.2. Mecanismo General de Acción

El principal mecanismo de acción de los azoles es inhibir o bloquear el ergosterol, esteroide principal de la membrana celular de los hongos. Estos fármacos presentan actividad fungicida y fungistática, que ejercen su actividad bloqueando la síntesis del ergosterol a través de la interacción con la 14 α -lanostenol-desmetilasa, la que es una enzima

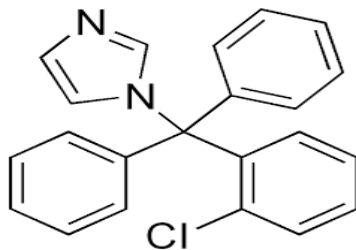
dependiente del citocromo P-450. Esta enzima se encarga de la desmetilación del lanosterol a ergosterol. La depleción del ergosterol lleva a una alteración de la membrana, asociada a un incremento de la permeabilidad y de la inhibición del crecimiento celular y replicación del hongo.

3.2.3 Fármacos Antifúngicos- Azoles

3.2.3.1. Imidazoles

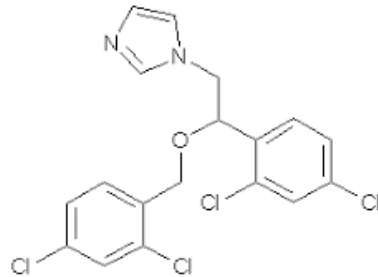


3.2.3.1.1 Clotrimazol



- Indicaciones: Candidiasis
- Vía de administración: vía vaginal y vía tópica
- Dosificación:
 - ◆ Un óvulo vaginal 100 mg en la noche por 6 días.
 - ◆ Un óvulo vaginal 500 mg en la noche, dosis única.
 - ◆ Clotrimazol al 1% en crema 2 veces al día, por 6 días.

3.2.3.1.2. Miconazol



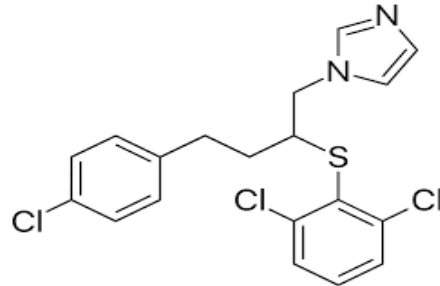
- Indicaciones: Candidiasis de la cavidad orofaríngea y del tracto gastrointestinal
- Vía de administración: Vía tópica
- Dosificación:
 - ◆ Aplicar $\frac{1}{4}$ cuchara de medida, 4 veces al día. El gel no debe ser digerido inmediatamente, sino que debe mantenerse en la boca el mayor tiempo posible.

3.2.3.1.3. Butoconazol

- Indicaciones: Candidiasis
- Vía de administración: Vía tópica
- Dosificación:
 - ◆ Aplicar crema de butoconazol al 2% por vía vaginal, durante 3 días en adultos y 6 días en gestantes que cursan el segundo o tercer trimestre.

3.2.3.2 Triazoles

3.2.3.2.1. Fluconazol



- Indicaciones: Vulvovaginitis micótica persistente
- Vía de administración: Vía oral
- Dosificación:
 - ◆ Una cápsula 150 mg dosis única

3.2.3.3 Resistencia a los azoles

Los azoles son la familia más amplia de fármacos antifúngicos y comprenden los imidazoles y los triazoles. El espectro de acción está restringido a la mayoría de las especies de *Candida* y *Cryptococcus*. [26]

Actualmente, existen varias familias de antifúngicos disponibles en el mercado siendo una de los más comunes los azoles, que inhiben la enzima 14 α -lanosterol-desmetilasa, afectando la biosíntesis de ergosterol, un importante componente de la membrana plasmática fúngica. En Chile se han encontrado cepas con susceptibilidad disminuida a azoles, especialmente de pacientes ambulatorios, probablemente asociado al uso frecuente de antifúngicos para el tratamiento de infecciones superficiales, como la candidiasis vulvovaginal.

Los mecanismos moleculares descritos en la resistencia de los azoles son:

- La sobreexpresión de bombas eflujos (proteínas transmembranales de tipo antiporte codificadas por los genes MDR o CDR), que utiliza un gradiente de protones (H^+) para translocar moléculas no permite la acumulación del fármaco en el compartimiento intracelular. Probablemente uno de los mecanismos más importantes de resistencia a los azoles sea el fallo en la acumulación intracelular del fármaco mediante la sobreexpresión de los genes que codifican las bombas. La expresión heteróloga de los genes CDR1 y CDR2 en *Saccharomyces cerevisiae* confiere resistencia a varios azoles (fluconazol, itraconazol y ketoconazol) y a otros antifúngicos e inhibidores metabólicos. [27]

- Mutaciones puntuales en el gen que codifica para la enzima blanco de estos fármacos (gen ERG11). La sobreexpresión de los genes que codifican para la enzima diana lanosterol 14 α -lanosterol-desmetilasa (ERG 11) inducen resistencia al tratamiento con azoles. Las mutaciones en gen ERG11 originan sustituciones en aminoácidos, disminuyendo con ello la afinidad de la enzima por los azoles.

- Alteración en otras enzimas de la ruta biosintética del ergosterol (por ejemplo la D desaturasa [*erg3*]).[28]

3.3. Polienos

3.3.1. Características Generales

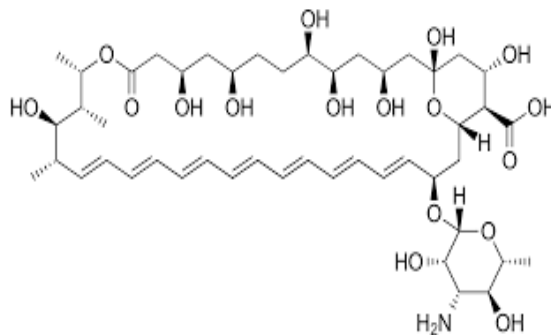
Se han desarrollado muchos antifúngicos de los polienos, de los cuales uno de los más importantes es la nistatina. La nistatina, es un derivado de la fermentación del *Streptomyces noursei*.

3.3.2. Mecanismo General de Acción

Los polienos se unen al ergosterol de la membrana plasmática del hongo, resultando en la producción de poros acuosos consistentes de un anillo de ocho moléculas de anfotericina B, unidos a los esteroides de la membrana. Esta configuración afecta la permeabilidad de la membrana con la salida de los componentes celulares y la consecuente muerte del microorganismo.

3.3.3. Fármacos Antifúngicos- Polienos

3.3.3.1. Nistatina



- Indicaciones: Candidiasis
- Vía de administración: Vía vaginal y vía tópica
- Dosificación:
 - ◆ Un óvulo vaginal 100.000 UI cada 12 horas, por 6 días
 - ◆ En ungüento 2 veces al día, por 6 días

3.4. Tratamiento Alternativo

3.4.1 Aceite esencial de *Eugenia caryophyllata*

El aceite esencial de hojas de *Eugenia caryophyllata* Thunb, conocido como el “Clavo de la India”. Es ampliamente utilizado y muy conocido por sus propiedades medicinales en la

C. tropicalis. Posee innumerables actividades entre ellas, antiséptica, analgésica, antibacteriana, antifúngica, anestésica y antimutagénica, entre otras.

3.4.1.1. Mecanismo de Acción

El clavo de la India está compuesto por diferentes constituyentes, siendo el eugenol el principal, variando de 49-87%, β -cariofileno (4–21%) y acetato de eugenol (0.5– 21%) en pequeñas cantidades de α -humuleno, junto con otros componentes de este aceite esencial se logra desestabilizar la membrana citoplasmática, derivando en una pérdida y coagulación de su citoplasma, e, incluso, inhibiendo la respiración celular de los hongos. [29]

3.4.2. *Caléndula officinalis*

La Caléndula, *Calendula officinalis*, también conocida como flor de difunto, maravilla o flamenquilla. Es una planta bastante conocida por sus propiedades medicinales en la Candidiasis vaginal recurrente, pudiendo así cuidar la salud de una forma natural.

A la Caléndula se le atribuyen distintas propiedades actuando como antiinflamatorios, antieméticos, antisépticos, antiespasmódico, antibacteriano, fungicidas, cicatrizantes, antiulcerosa, emoliente, entre otras.

3.4.2.1 Mecanismo de Acción

Entre los componentes químicos más abundantes en la caléndula se encuentran flavonoides y carotenoides, polisacáridos, saponinas, triterpenos, ácidos fenólicos, cumarinas y taninos.

Dentro de las propiedades que se atribuyen a los flavonoides se incluyen acciones antibacterianas, antialérgicas, hepatoprotectoras, y como inhibidores de la biosíntesis de prostaglandinas, entre otras. Por otra parte, los flavonoides también poseen propiedad

antioxidante y su mecanismo de acción es probable que sea similar al que se postula para la vitamina E y los antioxidantes. [30]

3.4.3. Kolorex

Es un extracto de Horopito obtenido mediante tecnología punta de extracción de CO₂ preservando de la oxidación el ingrediente activo. Está compuesto por Polygodial: sesquiterpeno dialdehído con actividad antifúngica, 9-desoximuxigadial: con actividad antimicrobiana, aceites esenciales: antioxidantes, antiinflamatorios y antisépticos y flavonoides como quercetina, antioxidantes, anti inflamatorios.

3.4.3.1. Mecanismo de Acción

Kolorex actúa desnaturalizando y destruyendo la membrana de la Candida, invierte la bomba sodio-potasio por un mecanismo similar al de antifúngicos clásicos como el miconazol. Además puede ingresar a la célula, a través de la membrana plasmática por difusión masiva, esto tiene como consecuencia la apoptosis de los elementos intracelulares.

3.4.3.2. Indicaciones

Para candidiasis activa: Un comprimido diario Vía oral por 2 meses

Para candidiasis persistente: Dos comprimidos al día vía oral durante 2 meses. Cuando los niveles de Candida son muy elevados es recomendable al menos la primera semana solo 1 capsula para evitar la llamada reacción de Jarisch Herxheimer (reacción febril aguda) debido a la destrucción masiva de Candidas y liberación de muchas endotoxinas.

Recidivas: Un comprimido diario vía oral, por un mes, con una repetición de cuatro veces al año. [31]

4. Escallonia illinita (Barraco)

El barraco, cuyo nombre científico es "*Escallonia illinita*", es una planta nativa de Chile, popularmente conocida por su uso en enfermedades hepáticas. Taxonómicamente se clasifica en la familia Escalloniaceae, género Escallonia, la cual está constituida por 50 especies sudamericanas, de las cuales 23 se encuentran en Chile. Se distribuye geográficamente en las regiones desde Coquimbo a la del Bío Bío al preferir suelos arenosos- pedregosos con algo de humedad creciendo en quebradas, montañas, ambas precordilleras y valle central. Macroscópicamente se describe como arbusto verde, al tacto impresiona con una sustancia adherente, puede llegar a medir hasta 3 metros con hojas ovaladas de hasta 7 por 3 centímetros con bordes brillantes y dentados, tallos flexibles, inflorescencia en racimos terminales desde fines de primavera a comienzos del verano con corola tubular constituida por 5 pétalos blancos y un fruto aquenio (fruto seco con una sola semilla) cubierto por hojas que madura en verano. [32]



FIGURA IV-28: *Escallonia illinita* (Barraco)

Su uso popular en enfermedades hepáticas, ha motivado el desarrollo de varios estudios sobre esta planta en busca de una posible alelopatía para así otorgarle un efecto

farmacológico científicamente comprobado. Por esto es que ya se han descubierto metabolitos secundarios de *Escallonia illinita* como **β -sitosterol** (FIGURA IV-29), **Kaempferol 3-O- glucósido (Astragalina)** (FIGURA IV-30), **Para- cumarato de metilo**, **Pinocembrina** (FIGURA IV-31) y **Umbeliferona** (FIGURA IV-32). El conocer la composición ha favoreciendo el desarrollo de hipótesis de posibles acciones biológicas al vincular el efecto que estos mismos compuestos tienen en otras sustancias como el propóleo, el cual también contiene Pinocembrina. [33]

La pinocembrina así como la Astragalina corresponden a un grupo denominado flavonoides (Figura IV-33), un conjunto de compuestos polifenólicos (metabolitos secundarios de plantas que contienen al menos un anillo aromático en su estructura química al que se le une uno o más grupos hidroxilos), los cuales al 2012 contaban con más de 6000 tipos, cifra que no ha dejado de aumentar. [34]

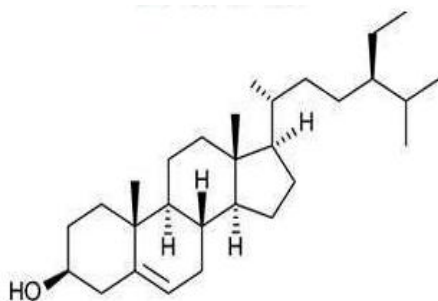


Figura IV-29.: Estructura química de β -sitosterol.

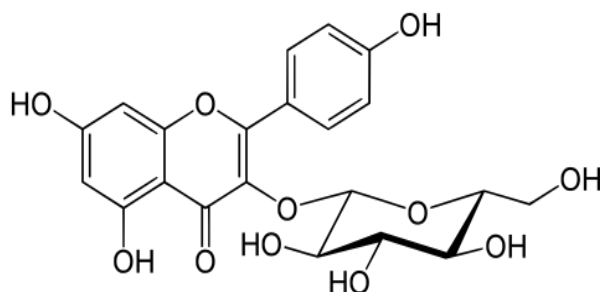


FIGURA IV-30. Estructura química de la Astragalina

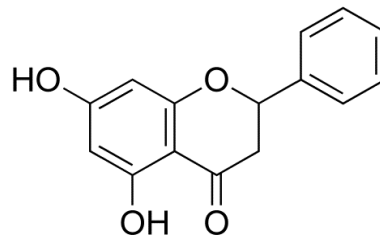


FIGURA IV-31. Estructura química de la Pinocembrina

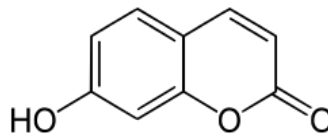


FIGURA IV-32. Estructura química de la Umbeliferona

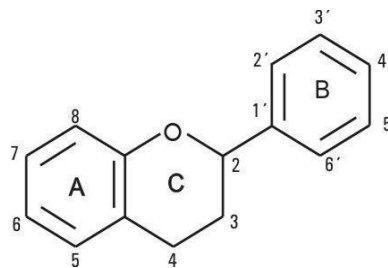


FIGURA IV-33. Estructura química básica de los flavonoides y sistema de numeración.

Cuentan con dos anillos aromáticos unidos por una cadena de tres átomos de carbono (C6C3C6)

4.1 Flavonoides

Los flavonoides cuentan con propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas, antimicrobianas, anti alérgicas, anti tumorales, anti asmáticas, inhibidoras de enzimas (Transcriptasa reversa, Proteína quinasa C, Tirosina quinasa C, Calmodulina, Ornitina decarboxilasa, Hexoquinasa, Aldosa reductasa, Fosfolipasa C y Topoisomerasa II) y por último, la de mayor interés popular, la propiedad antioxidante [37].

El proceso de oxidación corresponde a la última etapa de la respiración celular por lo que es esencial, sin embargo, crea radicales libres (átomos con una cantidad impar de

electrones o que cuentan con un electrón libre), los que aceleran el proceso de envejecimiento, pueden dañar y producir efectos adversos en proteínas, lípidos o ácidos nucleicos e incluso pueden desencadenar mutaciones espontáneas. Es por esto que la presencia de radicales libres estimula la producción de antioxidantes para así mantener el equilibrio entre estas dos especies reactivas, que son el hidrógeno y el oxígeno, y así evitar desencadenar un estrés oxidativo, que se define como el desequilibrio intracelular debido a un aumento en los radicales libres y/o una disminución en los antioxidantes, sin embargo, el proceso depende de cada individuo y su contexto, por ejemplo aumenta la síntesis de antioxidantes durante el ejercicio físico, la exposición a la contaminación ambiental, el uso de medicamentos, cigarrillos, estrés y enfermedades [35-36]. Sumado a lo anterior, los flavonoides inhiben la producción y propagación de radicales libres por las propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de los mismos; interrumpe especies reactivas del oxígeno por la inhibición de oxidasas (lipooxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa, NADPH oxidasa y xantina oxidasa); inhibe enzimas indirectamente relacionadas a procesos oxidativos (Fosfolipasa A2) y estimula reconocidas enzimas antioxidantes (Catalasa y superóxido dismutasa). Es por lo anterior, que también se les atribuye acción hepatoprotectora, como en intoxicaciones por xenobióticos (tetracloruro de carbono, bromobenceno), los cuales son mediados por radicales libres.

Cabe mencionar, que también existen estudios sobre efectos prooxidantes producto de flavonoides al estar implicado en actividad mutagénica y genotóxica, lo cual está sujeto a ciertas condiciones como el pH ambiental, la concentración efectiva del flavonoide, el grado de estabilidad del radical del flavonoide y la lipofilicidad de éstos para ser captados por la membrana. [38-39]

4.2 Umbeliferona y cumarinas

La umbeliferona (7- hidroxí cumarina), otro componente del barraco, es una cumarina, una clase de sustancias benzo (α) pirona- fenólicas, las cuales químicamente son compuestos hetero-cíclicos oxigenados. Su estructura química (Figura IV-32) fácil de modificar hace que este grupo cuente con más de mil compuestos descritos, encontrados en plantas y

aceites vegetales, en donde las más simples (como la umbeliferona) presentan menos acción tóxica que las más complejas y a la vez mayor acción biológica.

Así como los flavonoides, las cumarinas cuentan con acción antioxidante al inhibir la producción de radicales libres y por lo tanto se comportan como agentes protectores contra el desarrollo de estrés oxidativo, atribuyéndole a la vez actividad hepatoprotectora en intoxicaciones hepáticas mediadas por radicales libres, favorecido a su vez por su efecto estimulante de glutatión, un captador de los mismos.

Por otro lado, las cumarinas se han vinculado con diversos efectos cardiovasculares, pudiendo la umbeliferona inhibir el desarrollo de angina a través de su acción antiespasmódica y vasodilatadora. También, contienen propiedades antihistamínicas, anticoagulantes, antipiréticas, antitumorales y las de mayor interés en cuanto a la actual investigación a pesar de existir escasa evidencia, antimicótica y antibacteriana (específicamente para combatir la brucelosis, una enfermedad infecciosa que aparece con síntomas pseudogripales producto de la bacteria brúcela [40]). [41-42-43]

4.3 β -sitosterol

Otro constituyente de *E. illinita* es el β -sitosterol (FIGURA IV-29), un esteroles vegetal proveniente de plantas (fitoesteroles) como frutas, vegetales, nueces y semillas. Su estructura química es muy similar al colesterol por lo que ambos compuestos compiten a nivel de receptor, sin embargo, beta- sitosterol actúa más eficientemente que el colesterol al tener origen vegetal, por lo que favorece en la disminución del colesterol total y LDL (lipoproteínas de baja densidad) y por consiguiente, de enfermedades cardiovasculares.

También, se le ha vinculado con acción antiinflamatoria, colaborando principalmente en el tratamiento paliativo de la hiperplasia benigna de próstata, cefalea, alergias, asma, psoriasis, fibromialgia y prevención de hiperplasias en general.

En contraste a lo anterior, el incremento exagerado de β -sitosterol puede desencadenar efectos adversos como: náuseas, constipación, indigestión y disminución del apetito sexual. Además, la acumulación de fitoesteroles en sangre (fitoesterolemia) como en la sitosterolemia, una enfermedad autosómica recesiva, aumenta las probabilidades de que

estas personas padezcan enfermedades cardiovasculares, pudiendo presentar aterosclerosis prematura, además de xantoma (acúmulo de grasas bajo la superficie de la piel [44]) y artralgia. Su tratamiento consta en la administración oral de ezetimiba, un inhibidor de la absorción selectiva de colesterol y esteroides vegetales, logrando una disminución del colesterol total de aproximadamente un 15% y de los niveles de LDL en un 18%. [45-46-47-48]

Por último, la propiedad del barraco más relevante para este estudio, es el efecto que ejerce contra organismos vivos para poder utilizarlo con fines terapéuticos. Con respecto a esto, se ha descubierto acción biológica de *Escallonia illinita*, con diferentes grados de efectividad en distintas especies, siendo menor la acción antibacteriana, principalmente contra *Staphylococcus aureus*, y mayor la antifúngica, contra Saprolegnias y levaduras en general [49].

V. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Resistencia de los azoles en el tratamiento clásico frente a la Candidiasis.

VI. FUNDAMENTACIÓN Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

En el surgimiento de los azoles en la década de los setentas y los triazoles, con su representante más importante, el fluconazol, a partir del año ochenta, ha permitido el uso de los azoles de una forma generalizada, entre otras razones porque coincidió con la pandemia del SIDA y las indicaciones terapéuticas derivadas de ésta. Además, las ventajas farmacocinéticas de los azoles en relación a su posología, también la disponibilidad en el mercado facilitó su uso, sin embargo, como consecuencia de su uso tan generalizado, se ha desarrollado en levaduras del género *Candida*, el riesgo potencial de resistencia.

En la actualidad, la resistencia a los azoles en especies de *Candida* es cercana al 3%, con variaciones regionales y locales notorias. Hasta el 10% de pacientes con SIDA y candidiasis mucocutánea presentaba resistencia a los azoles [51]. En países de extrema pobreza se siguen reportando porcentajes significativos de *Candida sp.* Resistente a azoles aisladas en orofaringe de pacientes con VIH, con informes de *C. albicans* resistente a fluconazol hasta en el 9,5% de los casos. En Colombia, Gutiérrez y colaboradores [51], en muestra de orofaringe de 56 pacientes con candidiasis oral pseudomembranosa con infección por VIH, encontraron resistencia al fluconazol del 20,8% para *Candida sp.* No menos importante es la frecuencia de *Candida sp.* Como causante de otras infecciones comunes como la vulvovaginitis micótica, que se reportan con resistencia a azoles en un alto porcentaje.

En Chile se calcula que el 75% de las mujeres adultas y un 43% de las adolescentes han tenido en su vida al menos una infección vaginal producida por un hongo llamado *Candida* (Vulvovaginitis micótica). En algunos casos estas infecciones son recurrentes y muy molestas, ya que producen un flujo espeso, grumoso y que puede provocar prurito, ardor e inflamación.

El principal responsable de la vulvovaginitis micótica es un tipo de levadura conocida como *Candida*, siendo la especie más frecuentemente aislada la *C. albicans*, que forma

parte de la microbiota (es un hongo comensal), que se encuentra presente en forma asintomática en un porcentaje significativo de las mujeres. El problema se produce cuando hay un desequilibrio entre los microorganismos que habitan en la vagina, debido a un deterioro en el sistema inmunológico, lo que permite que la *C. albicans* prolifere. Esto puede ocurrir por el uso de antibióticos, el embarazo, la diabetes y el empleo de ciertos jabones, entre otras causas.

En un estudio se observó que aproximadamente el 30% de las pacientes que habían sido tratadas por candidiasis vaginal en realidad no tenían el hongo. Esto ocurre porque frente a los síntomas, que son tan característicos, muchos profesionales deciden no tomar las muestras de cultivo correspondientes y simplemente recetan el clotrimazol o fluconazol. Esto redundaría en que la persona que tiene otra fuente de infección genera mayor resistencia a los antifúngicos en las levaduras comensales favoreciendo, en algunos casos, la aparición de especies que son más difíciles de manejar, es decir, que no responden apropiadamente a los antimicóticos disponibles en el mercado, como *C. tropicalis* o *C. krusei*.

Por último, la guía Perinatal del 2015, describe que el tratamiento para la Vulvovaginitis micótica pueden ser: el clotrimazol, el fluconazol, miconazol, entre otros (tópico u oral).

Claramente, ante el aumento significativo de la resistencia de la *Candida Sp.* frente a los medicamentos del tratamiento clásico, por lo anterior, creemos que es necesario que aumente la investigación y la evaluación de la actividad antilevaduriforme de los diferentes extractos de plantas, para que puedan existir nuevas alternativas en el tratamiento contra la candidiasis.

VII. PREGUNTA CENTRAL DE LA INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto antilevaduriforme de los extractos obtenidos de la *Escallonia illinita* contra la *C. albicans*, *C. krusei* y *C. tropicalis*?

VIII. HIPÓTESIS

“Los extractos obtenidos desde la *Escallonia illinita* presentan efecto antifúngico contra *C. albicans*, *C. krusei* y *C. tropicalis*”

IX. OBJETIVOS

Objetivo General

- Analizar el efecto antilevaduriforme de los diferentes extractos obtenidos de *Escallonia illinita* contra la *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*.

Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto antilevaduriforme del extracto del hexánico y AcOEt contra *C. albicans*, *C. krusei* y *C. tropicalis*.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) del extracto hexánico y AcOEt.
- Determinar concentración mínima fungicida (MFC) del extracto hexánico y AcOEt.
- Estudiar el efecto sinérgico del fluconazol con extracto hexánico y AcOEt.

X. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención de la *Escallonia illinita* y sus extractos

La *Escallonia illinita* o barraco fue extraída entre los meses de Diciembre del año 2016 y Enero del año 2017, por tesisistas y profesores desde las plantaciones ubicadas en la ciudad de Limache y en el sector de San Francisco en San Esteban, ambas localidades se encuentran en la Región de Valparaíso, Chile. Posteriormente, se entregó el barraco envuelto en sacos a temperatura ambiente al Dr. Iván Montenegro para su almacenamiento, procesamiento y extracción de los diferentes extractos de la *Escallonia illinita* que utilizaremos durante los experimentos. Lo anterior fue llevado a cabo en las dependencias del Laboratorio de extracción de la Universidad Federico Santa María de Valparaíso por el Dr. Montenegro. Una vez listo el proceso en el laboratorio de extracción, Dr. Iván hace entrega de los extractos de barraco AcOEt y hexano en pequeños recipientes de vidrio, estos son almacenados en el Laboratorio Bruno Günther de la Universidad de Valparaíso en un freezer a una temperatura máxima de congelamiento de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, para preservar los componentes de los extractos.



FIGURA X-1. Extracción y recolección de barraco. Viaje al sector precordillerano de San Francisco en la ciudad de San Esteban, Chile.



FIGURA X-2. Recolección y extracción de barraco. Viaje a la ciudad de Limache, Chile.

2. Métodos

2.1 Ensayo de inclusión

El ensayo de inclusión permite obtener la MIC y MFC de manera cualitativa, pues se basa en la observación. Directamente, las podemos distinguir de la siguiente manera: la MIC será la concentración mínima de extracto/fluconazol en la que habrá crecimiento del inóculo en colonias que se puedan distinguir de otras; por el contrario, la MFC será en la que prácticamente no se observa crecimiento de la misma.

Se procederá de la siguiente forma:

- A. Se preparó el medio de cultivo agar. Luego, se esterilizó y cuando se procedió a realizar el ensayo de inclusión, se expuso a calor nuevamente para lograr la fusión del agar ya solidificado.
- B. Se preparó el extracto: Una vez iniciada la fusión del medio de cultivo, se pesó 0,05 gramos (50 miligramos) de hexano / AcOEt. de extracto de barraco en un tubo Eppendorf y se agregó 1 cc. de DMSO. Luego, se procedió a agitar la mezcla con aparato Vortex.
- C. Se preparó la mezcla del antifúngico tradicional (fluconazol): Se pesó 0,01 gramos (10 miligramos) de fluconazol en un tubo Eppendorf y se agregó 1 mL. de DMSO. Nuevamente se agitó la mezcla con aparato Vortex.
- D. Se vertió 2 mL. de Agar líquido en cada pocillo de la placa. (48 mL. En total por placa). Inmediatamente, se siguieron los siguientes pasos antes de que se solidifique el medio de cultivo (la especificación de cada pocillo se menciona de acuerdo a la FIGURA X-3 para permitir la ubicación correcta de éstos):
 - a. Se vertió 100 μ L del extracto en pocillos 1b, 1c y 1d.
 - b. Se vertió 50 μ L del extracto en pocillos 2b, 2c y 2d.
 - c. Se vertió 25 μ L del extracto en pocillos 3b, 3c y 3d.
 - d. Se vertió 12,5 μ L del extracto en pocillos 4b, 4c y 4d.
 - e. Se vertió 25 μ L de mezcla de fluconazol en pocillos 1e, 2e, 3e y 4e.
- E. Se esperó a que se solidifique unos minutos el contenido. Mientras tanto, se procedió a rotular la placa con fecha de creación, nombre del extracto, nombre de la levadura e iniciales de la persona que realizó el procedimiento (nombre- apellido- apellido), además se señalaron los controles positivos, los pocillos con extracto a concentraciones de 100 μ L, 50 μ L, 25 μ L, 12,5 μ L, con fluconazol a concentración de 25 μ L y controles negativos como se muestra en la FIGURA X-4.
- F. Preparación del inóculo: Se deben aislar 4-5 colonias de al menos 24 horas, deben ser inoculadas en 5 mL en un medio líquido . Posteriormente con un espectrofotómetro se mide la transmitancia y se ajusta para obtener un valor de 0.5 McFarland esto se realiza en cultivos de *C. albicans*, *C. krusei* y *C.tropicalis*.

- G. Una vez solidificada la mezcla, se pincela con una tórula estéril el inóculo sobre cada uno de los contenidos de todos los pocillos, excepto los 1f, 2f, 3f y 4f, ya que corresponden a los controles negativos.
- H. Se selló la placa con Parafilm
- I. Se incubó la placa en incubadora a 37,0 ° C.
- J. Se repitió el experimento por cada inóculo y a su vez, con cada extracto. (6 experimentos en total).
- K. Se observó y analizó a las 48 horas a través de la observación el desarrollo o no de las levaduras en los distintos pocillos, logrando determinar la MIC, MFC y corroborando que los controles negativos estén libres de contaminación.

1a	1b	1c	1d	1e	1f
2a	2b	2c	2d	2e	2f
3a	3b	3c	3d	3e	3f
4a	4b	4c	4d	4e	4f

FIGURA X-3. Esquema de placa micropocillo para ensayo de inclusión.

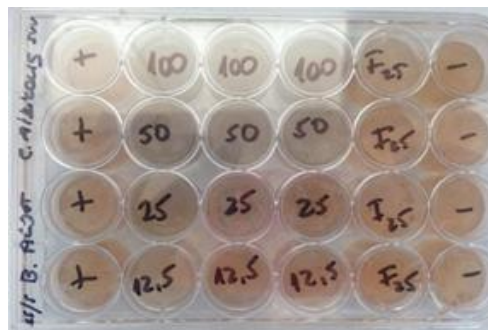


FIGURA X-4. Placa micropocillo para ensayo de inclusión.

2.2 Ensayo de macrodilución en caldo de levadura.

Se realizará de la siguiente forma:

- A. Preparación de la solución stock de agentes antimicrobianos: Se preparará soluciones de 5 mg de extracto de barraco (con AcOEt o Hexano) más 1000 μ L de Dimetil Sulfoxido (DMSO).
- B. Preparación del inóculo: Se deben aislar 4-5 colonias de al menos 24 horas, deben ser inoculadas en 5 mL en un medio líquido. Posteriormente con un espectrofotómetro se mide la transmitancia y se ajusta para obtener un valor de 0.5 McFarland, esto se realiza en cada uno de los cultivos de *C. albicans*, *C. krusei* y *C. tropicalis*.
- C. Se deben rotular trece tubos Eppendorf del n° 1 al 10, además de un control positivo (+), un control negativo (-) y un control fúngico. Los tubos numerados del n° 1 al 9 se utilizarán concentraciones de extracto hexano o AcOEt en concentraciones que van en 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 μ g/mL respectivamente.
- D. Preparación de los controles:
 - a. Control negativo (-): agregar 900 μ L de caldo GYIvan.
 - b. Control positivo (+): agregar 100 μ L de inóculo más 900 μ L de caldo.
 - c. Control Fúngico: agregar 800 μ L de caldo, 100 μ L de Fluconazol y 100 mL de inóculo.
- E. El tubo Eppendorf n° 1 se prepara agregando 100 μ L de agente antimicrobiano, más 800 μ L de caldo GYIvan (un volumen total de 900 μ L), revolver mezcla utilizando Vortex VELP®

- F. Los tubos Eppendorf del n° 2 al 9 se prepararon agregando 450 μ L caldo GYIvan a los tubos con concentraciones del 128 μ g/mL a 1 μ g/mL respectivamente.
- G. Extraer del tubo Eppendorf n° 1 (concentración de 256 μ g/mL) 450 μ L y verter en el tubo Eppendorf n° 2, una vez vertido se debe mezclar. Del tubo Eppendorf n° 2 extraer 450 μ L y verter en el tubo Eppendorf n° 3, una vez vertido se debe mezclar, realizar el mismo procedimiento hasta llegar al tubo Eppendorf n° 9.
- a. Una vez que se llega al tubo Eppendorf n° 9, se deben extraer 450 μ L de éste y se vierten en el tubo Eppendorf n°10, el cual llamaremos tubo de desecho.
- H. Agregar 450 μ L de caldo GYIvan a todos los tubos Eppendorf desde el n° 1 al 10, quedando así cada uno con un volumen de 900 μ L.
- I. Inoculación: extraer 100 μ L de inóculo anteriormente preparado y agregar a los tubos Eppendorf del n° 1 al 9
- a. El inóculo debe ser agregado suavemente bajo la superficie del medio de cultivo que contiene los agentes microbianos. Se deben evitar salpicaduras
- b. Revolver cada tubo Eppendorf.
- J. Rotular placas Petri con n° del 1 al 9, además de rotular el control positivo, control negativo y control fúngico.
- K. Luego del tubo Eppendorf n°1 extraer 10 μ L y verter en placa Petri rotulada con el n°1 y así sucesivamente cada tubo con su placa Petri hasta llegar al tubo Eppendorf n°9 que se vierte en la placa Petri n° 9, luego el tubo Eppendorf control positivo se debe verter en placa Petri rotulada control positivo y así sucesivamente el control negativo y fungicida. Luego de verter en placas Petri, se esparce en

todas las direcciones (horizontales, verticales, oblicuas) con asa de Drigalsky. Realizar dos repeticiones por concentración.

- L. Incubar las placas Petri y tubos Eppendorf a una temperatura de 26 - 28°C.
- M. Al primer día de experimento lo llamaremos "día 0". El punto "K" se debe repetir con nuevas placas Petri a las 24 horas de iniciado el experimento a este tiempo lo llamaremos "día 1", nuevamente se debe repetir el punto "K" con nuevas placas Petri a las 48 horas de iniciado el experimento a este tiempo lo llamaremos "día 2". Se va a observar las placas Petri tomando fotografías a cada una de las placas pasada 48 horas de cada uno de los días.

2.3 Ensayo de microdilución

La última técnica realizada en esta tesis, fue el método de microdilución para levaduras, el cual fue tomado como referencia de diferentes laboratorios a nivel mundial para determinar el método más adecuado para el estudio y sensibilidad de las levaduras del género *Candida*. Se utilizó concentraciones de 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 $\mu\text{g/mL}$ de extracto de Barroco tales como AcOEt y Hexano para lograr diferenciar la sensibilidad de los inóculos de los diferentes tipos de *Candida* a estas concentraciones.

Basándonos en el método descrito en la guía de el “Clinical Laboratory Standard Institute”, conformada por científicos a nivel mundial para establecer métodos estandarizados para la investigación sobre las levaduras en cuestión, elaboramos los siguientes pasos: (50)

- A. Se vertió 4.9 mL de RPMI en tubos Falcon, los cuales fueron rotulados como CE (Control Estéril), CC (Control *Candida*) y tubos Falcon del n° 2B al 11B,
- B. Preparación de los controles:
 - a. Control estéril (CE): constituido por 4,9 mL de RPMI.
 - b. Control *Candida* (CC): constituido por 4,9 mL de RPMI más 100 μL de inóculo.
- C. En un tubo Falcon rotulado como “X” se vertió 10 μL del inóculo más 9,9 mL de RPMI que luego fue homogenizado en un Vortex.
 - a. Preparación del inóculo: Se deben aislar 4-5 colonias de al menos 24 horas, deben ser inoculadas en 5 mL en un medio líquido . Posteriormente con un espectrofotómetro se mide la transmitancia y se ajusta para obtener un valor de 0.5 McFarland, esto se realiza en cada uno de los cultivos de *C. albicans*, *C. krusei* y *C. tropicalis*.
- D. Preparación del extracto:

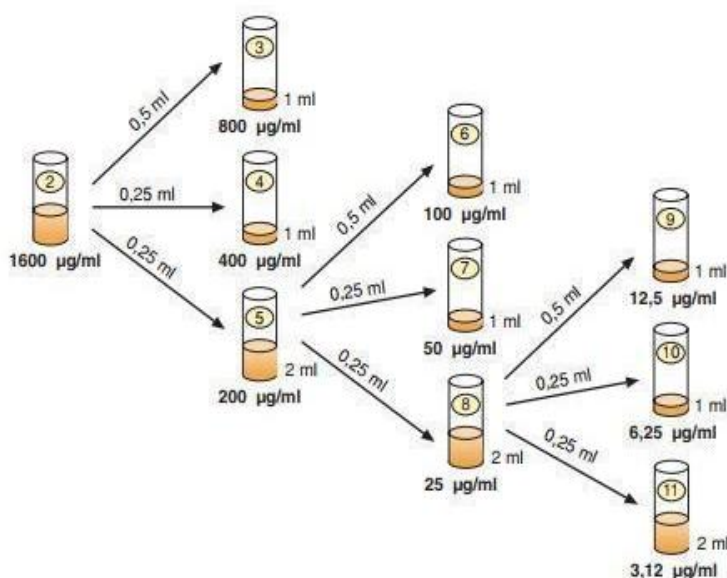


FIGURA X-5. Esquema para las diluciones para el método de microdilución. [50]

- i. Se rotulan tubos eppendorf del n° 2 al 11.
- ii. En un tubo eppendorf rotulado n°2 se vierte 1,6 mg de extracto (AcOEt o hexano) y se diluye en 1 mL de DMSO, correspondiendo al tubo. Se prepararon dos tubos n° 2 iguales con la misma concentración de extracto, ya que un tubo se ocupará en las diluciones.
- iii. Se extraen 0,5 mL del tubo n°2 y se vierte para el tubo n° 3. del tubo n° 2 se extrae 0,25 mL y se vierte para el n° 4, y se extrae 0,25 mL del tubo n°2 y se vierte para el n° 5 con pipeta.
- iv. Del tubo n° 5 se extrajeron 0,5 mL y se vierte en el tubo n° 6, se extraer 0,25 mL del tubo n°5 y se vierte para el n° 7 y, 0,25 mL se extrae del n°5 y se vierte para el n° 8.
- v. Del tubo n° 8 se extraen 0,5 mL para el tubo n° 9, se extraen 0,25 mL del tubo n°8 y se vierte en el tubo n° 10 y se extraen del tubo n°5 0,25 mL y se vierte en el tubo n° 11.
- vi. A los tubos 3, 6 y 9 se les adiciona 0,5 mL de DMSO. Luego a los tubos n° 4, 7 y 10 se les adiciono 0,75 mL de DMSO y a los tubos n° 5, 8 y 11 se le agregaron 1,75 mL de DMSO.

- E. Luego de los tubos Eppendorf del n° 2 al 11 con las diferentes concentraciones de extracto se extraen 100 μ L de cada uno para verterlos en los tubos Falcon 2B al 11B respectivamente, con una concentración (0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 mg/ μ L)
- F. En una placa Elisa previamente rotulada con fecha, extracto y cepa de Candida utilizada se colocan 100 μ L extraídos de los tubos falcon del 2B al 11B rellenando las columnas de la placa del 2 al 11 respectivamente. En la columna 1 se vierten 200 μ L del tubo Falcon CE y en la columna 12 se vierten 200 μ L del tubo Falcon CC.
- G. En los orificios de la columna 2 al 11 se vierten 100 μ L del tubo Falcon rotulado como "X".
- H. Por último se sella la placa con film y se colocó en la incubadora a 37 °C.

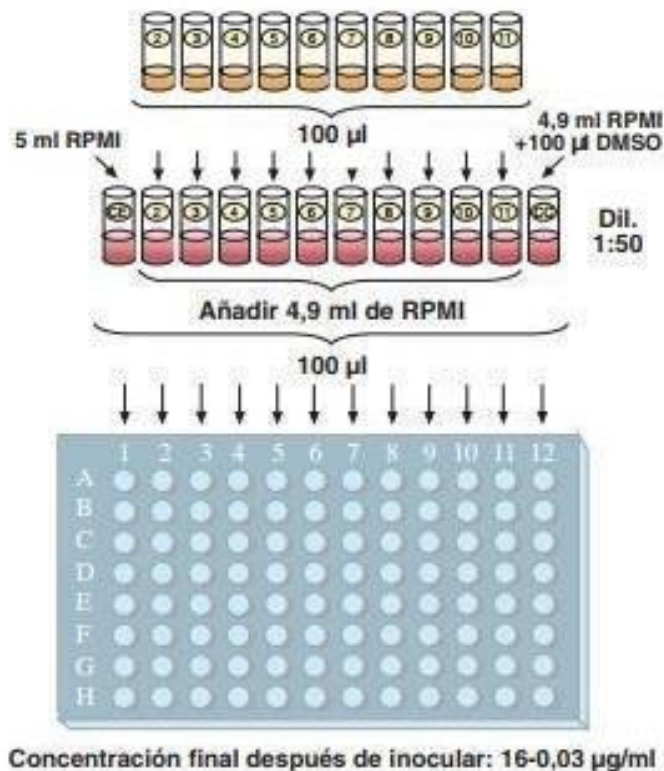


FIGURA X-6. Segundo paso de las diluciones de antifúngicos (método de microdilución) [50].

Primero se realizó todo este procedimiento con una muestra de extracto de *Escallonia illinita* preparado con Hexano y otra con AcOEt, este frente inóculos que contenían *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* por separado, las cuales fueron analizados a las 24 y 48 horas.

Luego se siguió con Fluconazol evaluando su acción frente a *C. albicans*, *C. tropicalis*, y *C. krusei* por separado que fueron analizadas a las 24 y 48 horas.

Finalmente se estudió la sinergia entre el fluconazol y preparado de AcOEt del extracto de *E. illinita* y su efecto en *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*. del cual cambia la preparación del paso 4, en el cual se extraen 1.6 mg de Fluconazol el cual se diluyó 1 mL de DMSO en tubo eppendorf y se extrajo 1.6 mg de extracto que se diluyó en 1 mL de DMSO en tubo Eppendorff ambos se homogenizan en Vortex. Luego se extrajo 0.5 mL de cada uno de los tubos Eppendorff y se colocó en un nuevo tubo Eppendorff que fue rotulado 2 (este procedimiento se debe realizar dos veces). El resto de los pasos se mantienen. Y serán leídos a las 24 y 48 horas.

Para la lectura de las placas se ocupó el lector de placa *EL 808 Biotek* y el programa *Gen5 1.07* y se siguieron los siguientes pasos:

- Encender notebook en el cual se encuentra el programa
- Encender lector de placa y esperar 10 minutos
- Introducir placa en el lector, asegurarse que quede bien colocada *.
- Una vez pasado el tiempo abrir el programa y seleccionar opción “Experiment” en la cual automáticamente se abre una ventana que dice “Create new Experiment”.
- Seleccionar opción “PROTOCOL NFKB 630 mm.pdf”
- Hacer click en el icono “↩”
- Click en “READ”
- Seleccionar opción “GUARDAR EXPERIMENT” y click en “OK”

- Click en el siguiente icono (BUSCAR ICONO EN ALGUNA PARTE), el cual convertirá a Excel los datos y se abrirá automáticamente una ventana del programa Excel.
- Rotular en la casilla “1A” el nombre de la Candida utilizada y el extracto.

*La lectura en las 24 y 48 horas es el mismo procedimiento, excepto que para las 24 hrs se realizó la lectura con la tapa de la placa puesta y en la lectura de las 48 hrs sin la tapa puesta en la placa.

2.4 Método de difusión en agar con sacabocado con técnica Vicent & Vicent

Esta técnica fue creada por James G. Vicent & Helen Whitgrove Vicent quienes propusieron que las zonas de inhibición obtenidas en los discos son más consistentes y sensibles a variaciones de concentraciones de los extractos. Debido a ello el contacto de la solución con el agar es más uniforme.

2.4.1 Objetivo

Determinar el diámetro de la zona de inhibición alrededor de una placa con agar con extractos hexano y AcOEt de *Escallonia illinita* a distintas concentraciones.

2.4.2 Indicaciones

Método simplificado que aproxima un resultado semicuantitativo e interpretativo con la MIC. Dependiendo del tamaño de la zona se puede determinar si existe una relación inversa con la CIM.

2.4.3 Descripción

Con una tórula de algodón estéril se inoculó en la placa de agar en toda su superficie por tres veces en distintas direcciones. Se dejaron secar las placas por 10-15 minutos antes de hacer los pocillos con sacabocado. Estos fueron colocados con una separación mínima de 24 mm entre ellos con una pinza estéril presionando levemente sobre el agar se midió con una regla el diámetro de la zona de inhibición del crecimiento en mm.

3. Variables

3.1 Evaluar el efecto del extracto del hexánico y AcOEt contra *C. albicans*, *C. krusei* y *C. tropicalis*.

NOMBRE	DEFINICIÓN	DIMENSIÓN	INDICADORES	SUBINDICADORES
Efectividad del extracto hexánico.	Efectos del extracto hexánico sobre el crecimiento de la <i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> y <i>C. tropicalis</i> .	Acción frente al hongo.	Fungistático Fungicida	SÍ - NO SÍ - NO

NOMBRE	DEFINICIÓN	DIMENSIÓN	INDICADORES	SUBINDICADORES
Efectividad del extracto AcOEt.	Efectos del extracto hexánico sobre el crecimiento de la <i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> y <i>C. tropicalis</i> .	Acción frente al hongo.	Fungistático Fungicida	SÍ - NO SÍ - NO

3.2 Determinar el MIC de extracto hexánico y AcOEt

NOMBRE	DEFINICIÓN	INDICADORES	SUBINDICADORES
MIC del extracto hexánico.	Concentración más baja del extracto hexánico que inhibe el crecimiento de la Candida.	- Alta - Media - Baja	mg/mL

NOMBRE	DEFINICIÓN	INDICADORES	SUBINDICADORES
MIC del extracto AcOEt.	Concentración más baja del extracto AcOEt que inhibe el crecimiento de la Candida.	- Alta - Media - Baja	mg/mL

3.3 Determinar MFC de extracto hexánico y AcOEt

NOMBRE	DEFINICIÓN	INDICADORES	SUBINDICADORES
MFC del extracto hexánico	Mínima concentración del extracto hexánico que disminuye en 99,9% las colonias a partir de un inóculo Candida.	- Alta - Media - Baja	mg/mL

NOMBRE	DEFINICIÓN	INDICADORES	SUBINDICADORES
MFC del extracto AcOEt.	Mínima concentración del extracto AcOEt que disminuye en 99,9% las colonias a partir de un inóculo de Candida.	- Alta - Media - Baja	mg/mL

3.4 Estudiar el efecto sinérgico del fluconazol con extracto hexánico y AcOEt

NOMBRE	DEFINICIÓN	DIMENSIÓN	INDICADORES	SUBINDICADORES
Efecto sinérgico del fluconazol con el extracto hexánico.	Incremento de la acción del extracto hexánico en conjunto con el Fluconazol, para erradicar la Candida.	- Menor - Igual - Mayor	- Presenta - No presenta	- mg/dL

NOMBRE	DEFINICIÓN	DIMENSIÓN	INDICADORES	SUBINDICADORES
Efecto sinérgico del fluconazol con el extracto AcOEt	Incremento de la acción del extracto AcOEt en conjunto con el Fluconazol, para erradicar la Candida.	- Menor - Igual - Mayor	- Presenta - No presenta	- mg/dL

4. Diseño

El tipo de estudio de investigación es de tipo experimental, se ha realizado como ensayo preclínico, ya que durante la investigación se estudiarán los efectos que producen los extractos naturales de la *Escallonia illinita*, sobre *C. albicans*, *C. krusei* y *C. tropicalis*. Se realizará en comparación con el tratamiento estándar, el Fluconazol, el sinergismo presentado en el extracto con el Fluconazol, para finalmente completar nuestros objetivos y obtener la confirmación de nuestra hipótesis.

5. Universo y muestra

5.1 Universo

Se incluye aquel hongo perteneciente al género de la *Candida*.

5.2 Población

Se utilizarán cepas estándar código 9618, 9983 Y 9841 del Centro de Referencia en Micología, Facultad de Medicina de la Universidad Austral de Chile, Isla Teja s/n Valdivia, Chile.

Cada cepa se cultivó en una placa Petri con 20 mL de agar Sabouraud Dextrosa con técnica de estrías, manteniéndolas a 37 °C en incubadora por 48 hrs. antes de ser utilizada. Después de la incubación, se extraerán colonias o microcolonias de cada cepa que crecieron en su respectiva placa Petri con un hisopo para cada uno, luego se dispondrá de un tubo de fondo cónico con 10 ml de agua bidestilada estéril, para cada una de las cepas, se suspenderán el hisopo con la colonia o microcolonia de la cepa. Por último, se preparará cada *Candida*, *C. albicans*, *C. krusei* y *C. tropicalis* en 0,5 McFarland.

5.2.1 Mecanismo de determinación de la población

Se utilizarán las cepas comerciales, referenciales o estándar de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, cuyo código corresponde al 9983, 9841 y 9618 respectivamente, provenientes

del Centro de Referencia en Micología, de la Facultad de Medicina de la Universidad Austral de Chile, ya que estas cepas representan un estudio universal, que no presentan sesgos investigativos, ni manipulación extrema de la cepa, comparable a cualquier estudio internacional.

5.3 Muestra

Será seleccionada las cepas del tipo:

C. albicans 9983

C. krusei 9841

C. tropicalis 9681

5.4 Mecanismo de determinación de muestra

Las cepas del tipo *C. albicans* 9983, *C. krusei* 9841 y *C. tropicalis* 9618 es una muestra estándar a nivel nacional y mundial, que cumple las características necesarias para este tipo de investigación, esto se debe a que presentan una menor susceptibilidad a los cambios del medio.

Para seleccionar estos tipos de cepas, se utilizarán los siguientes criterios de inclusión y exclusión.

5.4.1 Inclusión

- Muestras de cepas *C. albicans* 9983
- Muestra de cepas *C. krusei* 9841
- Muestra de cepas *C. tropicalis* 9618
- Muestra de referencia.
- Conservación de las cepas de *C. albicans* en agua bidestilada estéril.
- Conservación de las cepas de *C. krusei* en agua bidestilada estéril.
- Conservación de las cepas de *C. tropicalis* en agua bidestilada estéril.
- Conservación a temperatura de 4°C.
- Cultivado en agar Sabouraud Dextrosa.

5.4.2 Exclusión

- Cepas diferentes a *C. albicans*
- Cepas diferentes a *C. krusei*
- Cepas diferentes a *C. tropicalis*
- Cepas contaminadas antes que se inicie el experimento.
- Muestras obtenidas de manera clínica.
- Cepas que no conservadas en agua bidestilada estéril.
- Cepas conservadas a una temperatura distinta a 4°C.
- Cepas cultivadas en un agar distinto al Agar Sabouraud Dextrosa.

6. Fuentes de información

6.1 Unidad de estudio o análisis

Son las Placas de Petri y placas de micropocillos en los cuales se encuentran cultivados cepas de *C. albicans* 9983, *C. krusei* 9841 y *C. tropicalis* 9618.

6.2 Unidad informante

Datos obtenidos de cada una de estas placas de Petri y las placas de micropocillos definidas como unidad de estudio y análisis.

6.3 Unidad referencial

Laboratorio perteneciente al Edificio Bruno Gunther, Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso. Hontaneda 2664, Valparaíso.

7. Materiales

- Tubos de fondo cónico Biologix ® de 15 mL
- Botellas de vidrio con tapa Duran Schott® de 200, 500 y 1000 mL
- Micropipeta Biopette®, modelos p10, p100, p200 y p1000
- Pipeta graduada HGB® de 10 mL
- Papel Parafilm® 75m x 5 cm
- Placas de Petri de vidrio 60 y 150 mm
- Probeta de 10 mL Duran®
- Repipeteador Handy Step®
- Guantes de procedimiento Top Glove ®
- Mascarilla Face Mask®
- Alcohol 70%
- Puntas para micropipetas desechables de 10, 100 y 1000 µL
- Placas de micropocillos para cultivo celular de 96 pocillos Corning Costar®
- Placas de micropocillos para cultivo celular de 24 pocillos Corning Costar®
- Bisturi n° 23 E.D.L.A.B
- Hisopos de Laboratorio
- Tubos para microcentrífuga de 1 y 2 mL Eppendorf®
- Cubetas de cuarzo 1 mL
- Agua bidestilada

8. Equipos

- Asa de Drigalsky
- Asa en argolla o anillos
- Mechero Bunsen
- Mechero tipo Fishen
- Trípode
- Tubos en T
- Espectrofotómetro GENESYS 10 UV. Thermo Spectronic®

- Vernier Calipus 150 x 0.02 mm (6" x 1 / 1000 IN)
- Incubadora FOC 225E VELP® Científica
- Refrigerador PROGRESS 3100 Fenza®
- Freezer CVU27 Consul®
- Lector de microplacas EL808 BIOTEK®
- Balanza analítica ML204 Mettler Toledo
- Notebook HP 530
- Pendrive HP 8GB V165W
- Vortex VELP® Científica
- Estufa Mermut MERCK®
- Autoclave JSAC60®

9. Programa

- Software GEN 5 1.07
 - El Software para Lectores de Microplacas y Sistemas de Captura de Imágenes Gen5 es una herramienta integrada para la recolección y análisis de datos e imágenes, con el fin de asistir en la recolección de datos, análisis y creación de informes a partir de la información recopilada. Es compatible con todos los sistemas de captura de imágenes, lectores multi-modales y lectores de absorbancia de BioTek.

10. Reactivos

- Dimetil Sulfoxido (DMSO)
- Acetato de Etilo (AcOEt)
- Hexano

11. Medicamentos

- Fluconazol

Se adiciona 10 mg de medicamento deshidratado en 1 mL de DMSO, o 16 mcg. en 1 mL de DMSO en un tubo de microcentrífuga Eppendorf®. Se almacenará en Freezer para su mejor conservación.

12. Medios de cultivos

12.1 Sabouraud Dextrosa Agar HIMIDIA®

- Agar 15 gr/L
- Peptona micológica 10 gr/L
- Dextrosa 40 gr/L

Se adiciona 13 gr de medio de deshidratado a 200 mL de agua destilado, o 26 gr de medio de deshidratado a 400 mL de agua destilado y se calentara hasta su completa disolución. Se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 minutos. Se distribuye en placas estériles y/o a otro material y se almacena refrigerado para su mejor conservación.

12.2 RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute)

- Medio de cultivo líquido compuesto por una mezcla enriquecida en aminoácidos, sales y otros componentes esenciales para el crecimiento celular.

12.3 RPMI Filtrado

- Medio de cultivo líquido compuesto por una mezcla enriquecida en aminoácidos, sales y otros componentes esenciales para el crecimiento celular.

12.4 Caldo Cultivo amarillo GYIvan

- 1 L de agua bidestilada estéril
- 4.50 gr de extracto de malta.
- 2.50 gr de extracto de levadura YEAST.
- 6.00 gr Tryptone.

Se mezclarán todo sobre un mechero bajo campana hasta su hervor y posteriormente se esterilizó en botella en el autoclave a 121 °C por 15 minutos y se almacena refrigerado para su mejor conservación.

13. Recolección de datos

Para facilitar la recopilación y comprensión de los resultados, se utilizara como instrumento de recolección de los datos tablas y gráficos especialmente diseñados para cada uno de los métodos utilizados en este experimento.

Los gráficos y tablas hacen que los datos expuestos en estos instrumentos y las consultas sean más fácil de comprender, porque se presentan en un diseño visualmente llamativo y simple, además permite levantar información en base a las variables y objetivos ya definidos.

XI. RESULTADOS

1. Ensayo de inclusión

Para poder interpretar lo observado, se considerarán los conceptos MIC y MFC, los cuales se explicaron anteriormente.

A las 48 horas de incubación, observamos los siguientes ensayos de inclusión:

1.1 *C. albicans*- AcOEt:

- En todos los pocillos con extracto AcOEt se observó crecimiento de *C. albicans*, por lo que a 2,38 mg/ μ L de extracto, no se observó MIC.
- Por otro lado, no se logró identificar colonias en los pocillos con fluconazol, por lo que a 25 μ L del mismo se obtuvo una MFC de 0,12 mg/mL.
- No hubo desarrollo fúngico en los controles negativo.

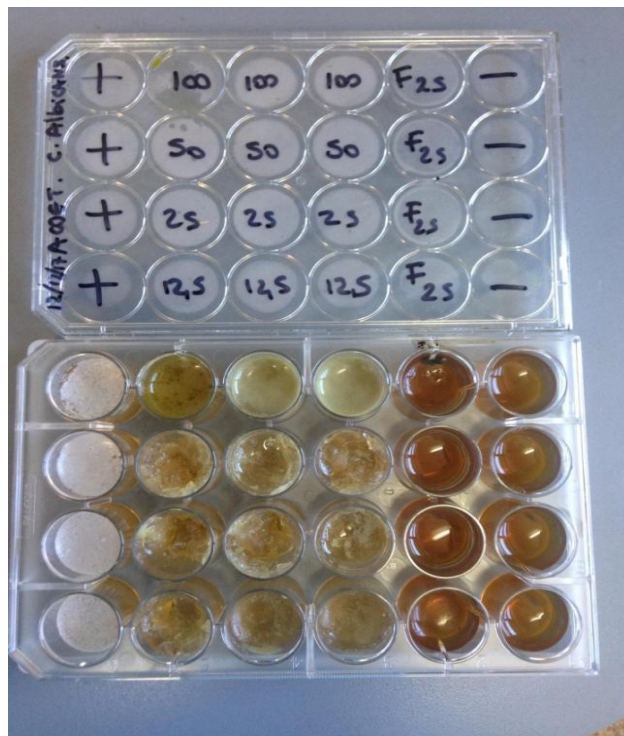


FIGURA XI-1. Ensayo inclusión de *C. albicans* - AcOEt.

1.2 *C.albicans*- Hexano:

- Similar al ensayo anterior, se observó crecimiento de *C. albicans* en todos los pocillos con extracto hexano, aunque en una película mucho más densa. No se puede determinar la MIC en el extracto hexano frente a la *C. albicans*.
- De la misma forma, no se logró identificar colonias en los pocillos con fluconazol a 0.09 mg/μL. obteniendo la misma MFC (0,12 mg/ mL)
- No hubo desarrollo fúngico en los controles negativo.



FIGURA XI-2. Ensayo inclusión de *C. albicans* – hexano

1.3 *C.krusei*- AcOEt:

- Se observó crecimiento de *C. krusei* en todos los pocillos con extracto AcOEt, no se puede determinar MIC.
- De la misma forma, se percibió crecimiento del inóculo en los pocillos con fluconazol, por lo que tampoco se obtuvo MIC.
- No hubo desarrollo fúngico en los controles negativo.



FIGURA XI-3. Ensayo inclusión de *C. krusei* - AcOEt.

1.4 *C.krusei*- Hexano:

- A 100 μ L de extracto hexano no se apreciaron colonias de *C. krusei* , encontrando MFC de 2,38 mg/ μ L.
- A 50 μ L de extracto hexano se observó MIC correspondiente a 1,22 mg/mL.
- No hubo desarrollo fúngico en los controles negativo.



FIGURA XI-4. Ensayo inclusión de *C. krusei* - hexano.

1.5 *C. tropicalis*- AcOEt:

- A 100 μ L de extracto se observó MIC, calculada en 2,38 mg/ μ L.
- Se aprecia crecimiento de *C. tropicalis* en todos los pocillos con fluconazol.
- No hubo desarrollo fúngico en los controles negativo.



FIGURA XI-5. Ensayo inclusión de *C. tropicalis* - AcOEt.


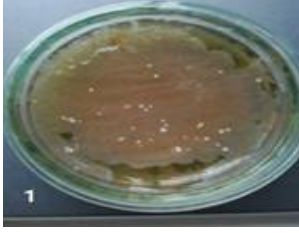

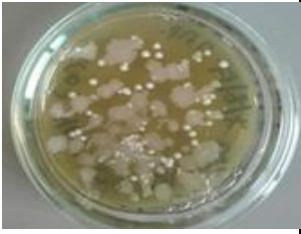

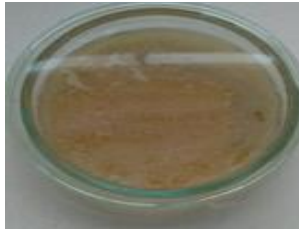
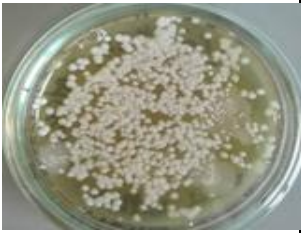

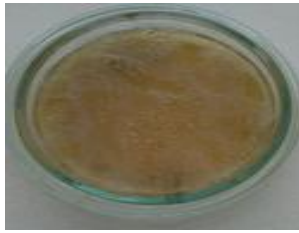
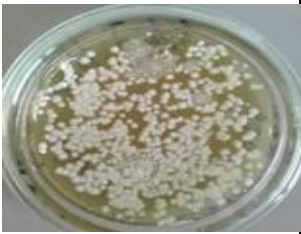

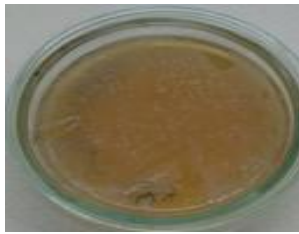
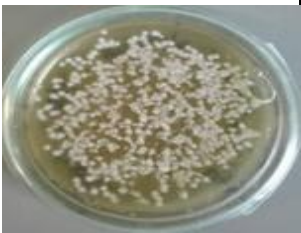


1.6 *C. tropicalis*- Hexano:

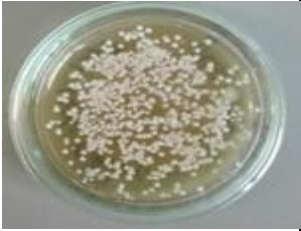

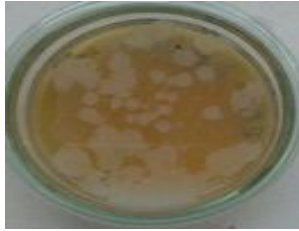
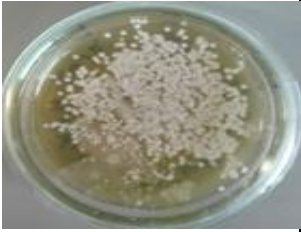
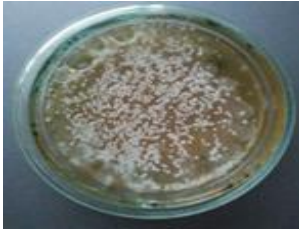
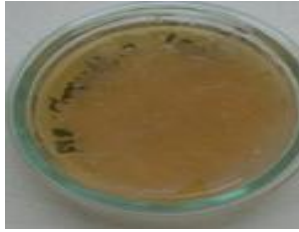









- A 100 μ L se observó MIC de 2,38 mg/ μ L.
- Se observó crecimiento de *C. tropicalis* en todos los pocillos con fluconazol.
- No hubo desarrollo fúngico en los controles negativo.



FIGURA XI-6. Ensayo inclusión de *C. tropicalis* - hexano.

2. Resultados ensayo de macrodilución

<i>C. albicans</i> Barraco Hexano	Día 0	Día 1 (24 hrs)	Día 2 (48 hrs)
Dilución 1 256 µg/mL			
Dilución 2 128 µg/mL			
Dilución 3 64 µg/mL			
Dilución 4 32 µg/mL			
Dilución 5 16 µg/mL			

Dilución 6 8 $\mu\text{g/mL}$			
Dilución 7 4 $\mu\text{g/mL}$			
Dilución 8 2 $\mu\text{g/mL}$			
Dilución 9 1 $\mu\text{g/mL}$			
Control (+)			

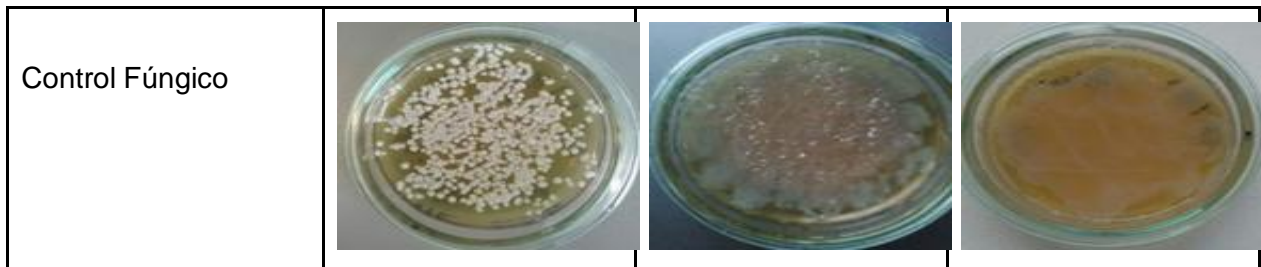

















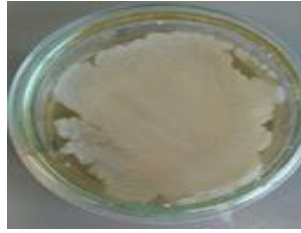
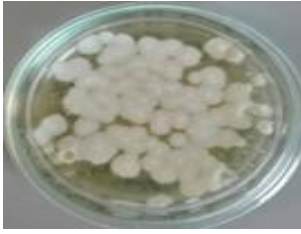

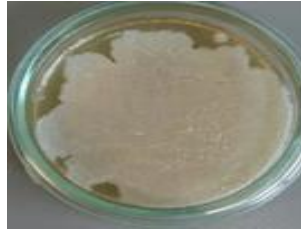











TABLA XI-1. Ensayo de macrodilución *C. albicans* - hexano.

En la TABLA XI-1 se observan los resultados del experimento de macrodilución en *C. albicans* con extracto de barraco hexano se observa que en la dilución 1 con 256 $\mu\text{g}/\text{dL}$ es donde hay menor crecimiento fúngico de la *Candida*, siendo este el MFC, y el MIC corresponde a la dilución 2 con 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

A su vez se aprecia que desde la dilución 3 en adelante hay un crecimiento más uniforme de la levadura, en el tiempo 0 y 24 horas, cabe destacar que desde la dilución 1 (256 $\mu\text{g}/\text{mL}$) hasta la 9 de 1 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) no se aprecia crecimiento en el tiempo de 48 hrs.

<i>C. tropicalis</i> Barraco Hexano	Día 0	Día 1 (24 hrs)	Día 2 (48 hrs)
Dilución 1 256 µg/mL			
Dilución 2 128 µg/mL			
Dilución 3 64 µg/mL			
Dilución 4 32 µg/mL			
Dilución 5 16 µg/mL			

Dilución 6 8 $\mu\text{g/mL}$			
Dilución 7 4 $\mu\text{g/mL}$			
Dilución 8 2 $\mu\text{g/mL}$			
Dilución 9 1 $\mu\text{g/mL}$			
Control (+)			

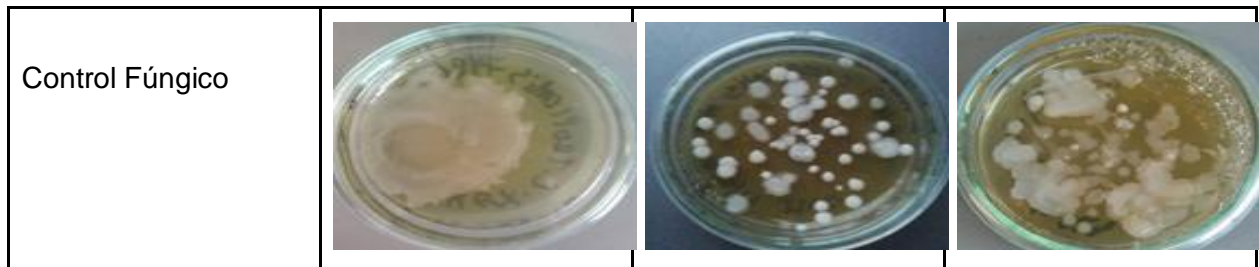
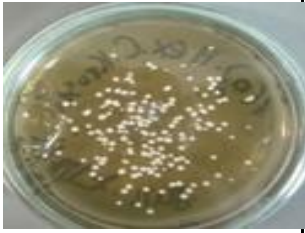
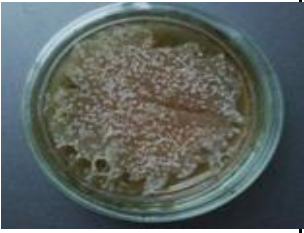
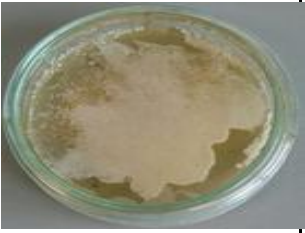





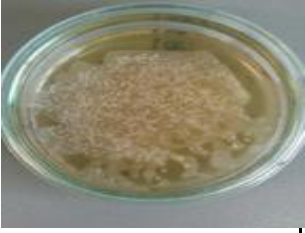
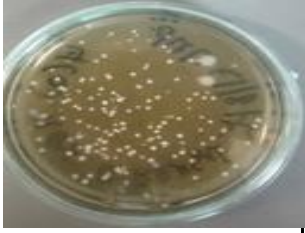







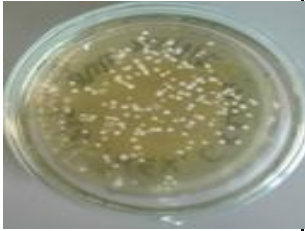
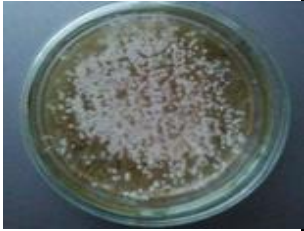

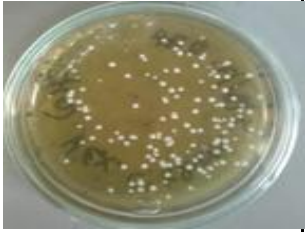

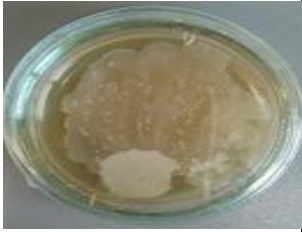

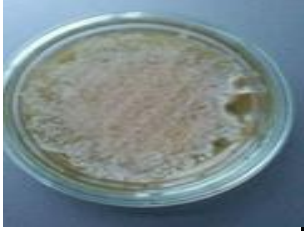







TABLA XI-2. Ensayo de macrodilución *C. tropicalis* - hexano.

En la TABLA XI-2 se aprecia *C. tropicalis* con extracto de barraco hexano, en este experimento se observa crecimiento de la levadura desde la dilución 1 a una concentración de 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta la dilución 9 de concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, por lo tanto, es evidente por este método la resistencia de la *C. tropicalis* a este extracto.

Además a diferencia del resultado con *C. albicans* acá se visualiza que a mayor tiempo transcurrido, hay un aumento del crecimiento de la levadura en cuestión. Es importante destacar que en el tiempo 0 del control fúngico no hubo crecimiento de colonia, apareciendo éste en el tiempo 24 y 48 hrs.

Cabe destacar, que en el tiempo 1 del control fúngico es cuando se aprecia mejor el crecimiento de la levadura, mostrándose de forma clara las colonias.

<i>C. krusei</i> Barraco Hexano	Día 0	Día 1 (24 hrs)	Día 2 (48 hrs)
Dilución 1 256 µg/mL			
Dilución 2 128 µg/mL			
Dilución 3 64 µg/mL			
Dilución 4 32 µg/mL			
Dilución 5 16 µg/mL			

Dilución 6 8 µg/mL			
Dilución 7 4 µg/mL			
Dilución 8 2 µg/mL			
Dilución 9 1 µg/mL			
Control (+)			

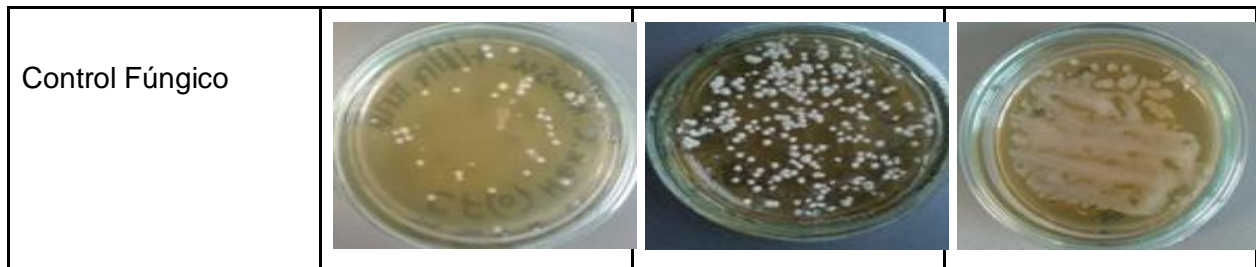




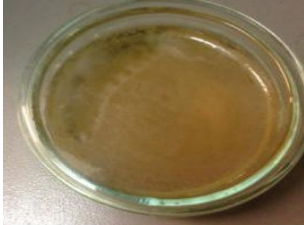


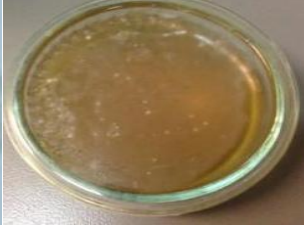


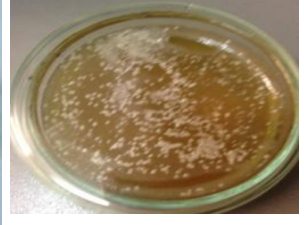









TABLA XI-3. Ensayo de macrodilución *C. krusei* - hexano.

En la TABLA XI-3 en donde se evalúa el comportamiento de *C. krusei* con el extracto de barraco hexano, se visualiza que en la dilución 1 de 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sólo hay crecimiento de colonia correspondiendo a MIC. Además desde la dilución 1 en adelante hubo crecimiento de la levadura, por lo que MFC es resistente. Cabe destacar que el momento donde más se aprecia crecimiento de *C. krusei* es en el día 1 a las 24 horas, descendiendo o manteniéndose dependiendo de la dilución en el tiempo de 48 horas.

Tanto en el control (+) como en el fúngico tenemos un crecimiento mínimo a las 0 horas y ya en el día 1 se observa gran crecimiento de las colonias, el cual no se aprecia en el tiempo de las 48 hrs.

<i>C. albicans</i> Barraco AcOEt	Día 0	Día 1 (24 hrs)	Día 2 (48 hrs)
Dilución 1 256 µg/MI			
Dilución 2 128 µg/mL			
Dilución 3 64 µg/mL			
Dilución 4 32 µg/mL			
Dilución 5 16 µg/mL			
Dilución 6 8 µg/mL			

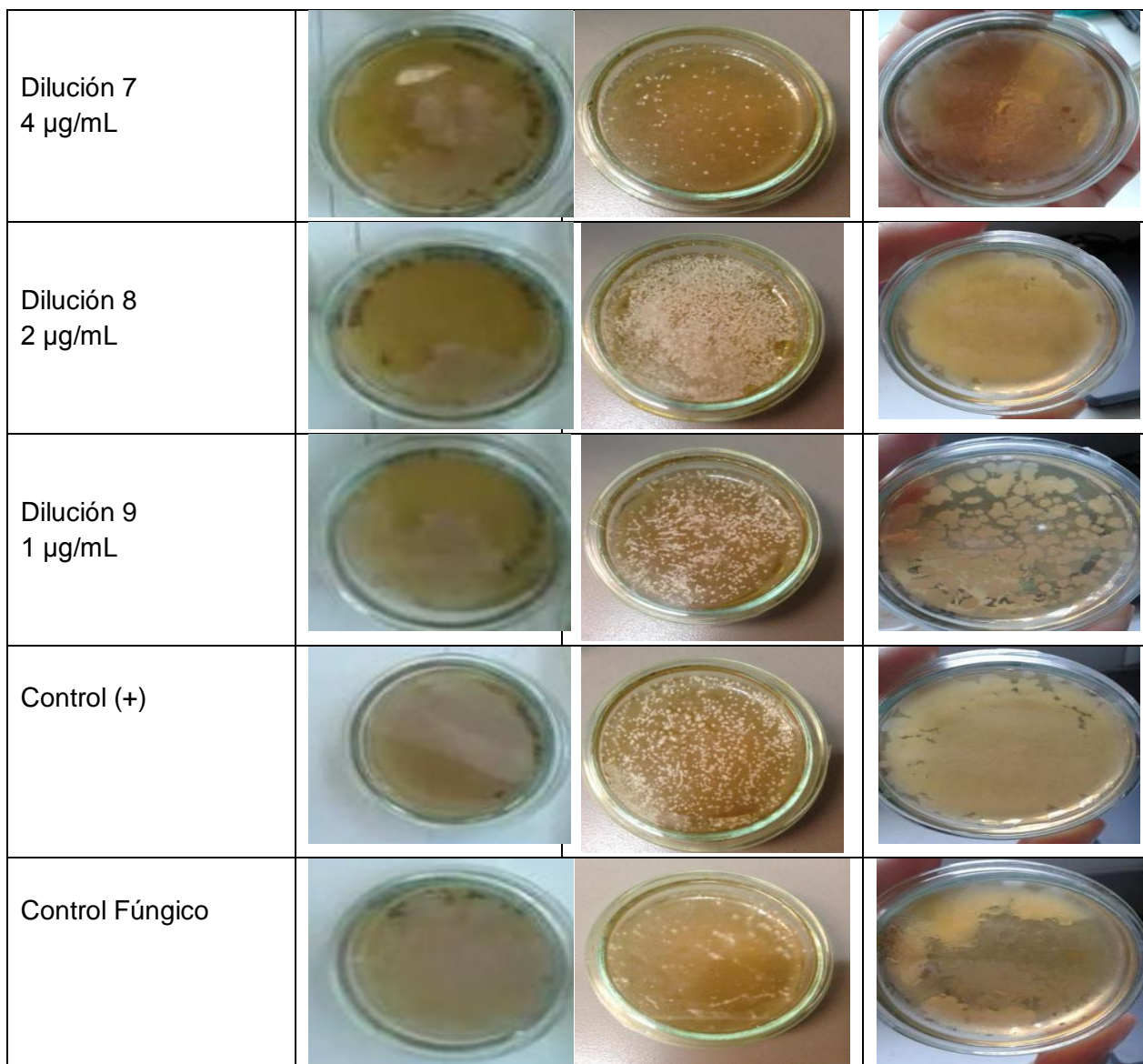










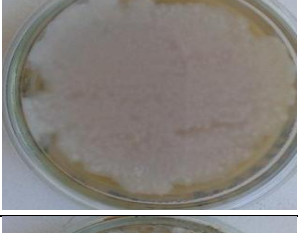


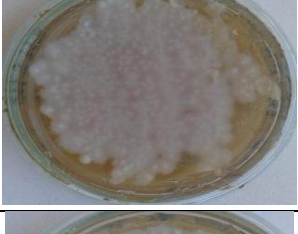
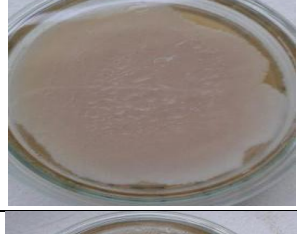





TABLA XI-4. Ensayo de macrodilución *C. albicans* - AcOEt.

En la TABLA XI-4 se evalúa el comportamiento de *C. albicans* con extracto de barraco AcOEt, se puede observar que tanto en la dilución 1 como la 2 no hay crecimiento de la levadura, siendo MFC 128 µg/mL. Por otro lado se observa que en la dilución 3 correspondiente a 64 µg/mL se identifica solo el crecimiento de colonias aisladas precisamente en las 24 horas, correspondiendo a MIC. El mayor crecimiento de colonias

se identifica en el tiempo 24 en las diferentes diluciones. Cabe destacar que el crecimiento de colonias es significativamente menor si se compara con *C. albicans* en hexano.

<i>C. tropicalis</i> Barraco AcOEt	Día 0	Día 1 (24 hrs)	Día 2 (48 hrs)
Dilución 1 256 µg/mL			
Dilución 2 128 µg/mL			
Dilución 3 64 µg/mL			
Dilución 4 32 µg/mL			
Dilución 5 16 µg/mL			
Dilución 6 8 µg/mL			

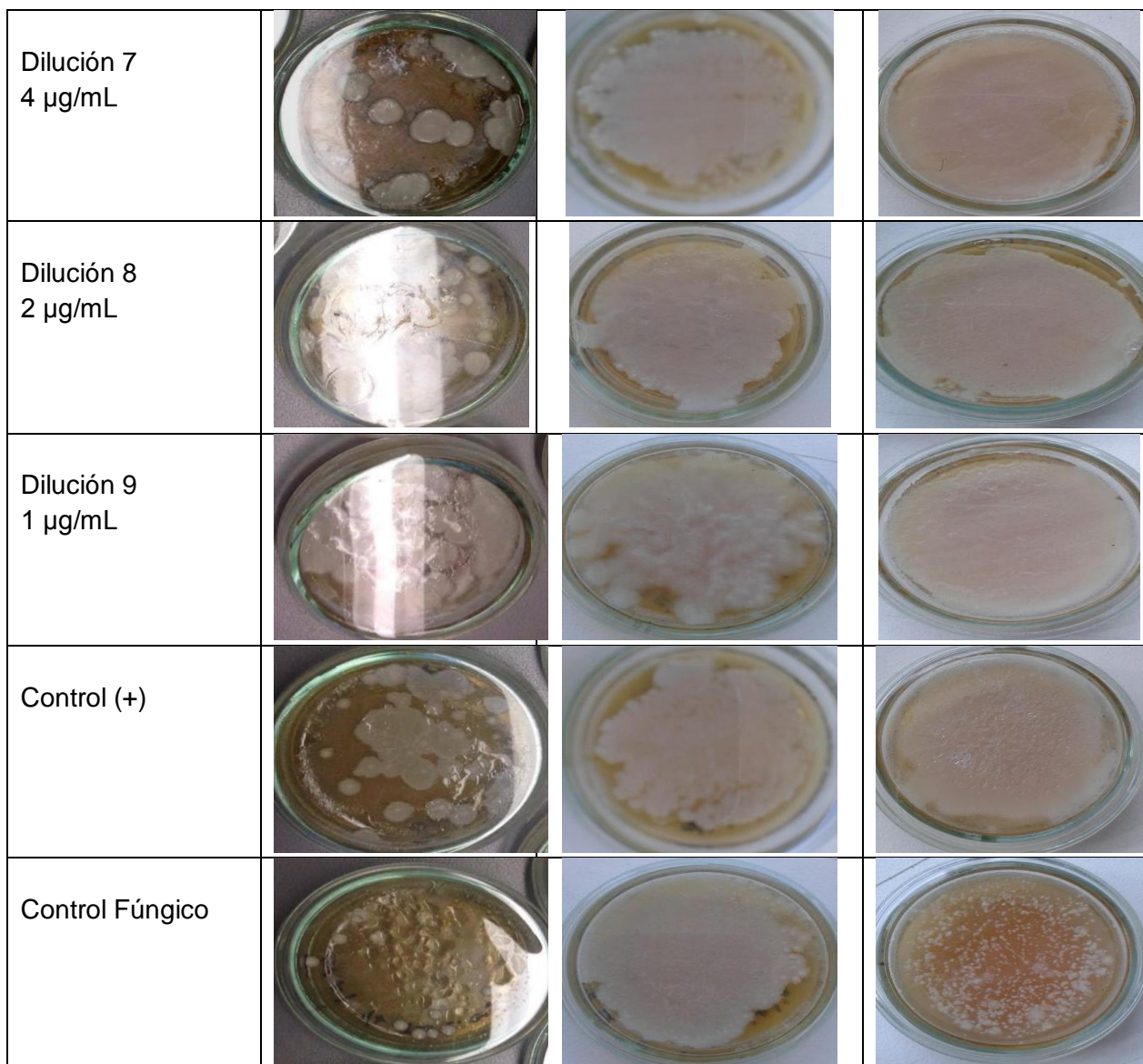


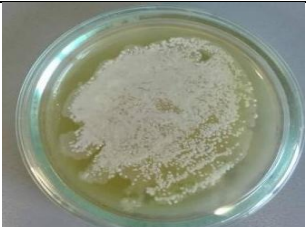
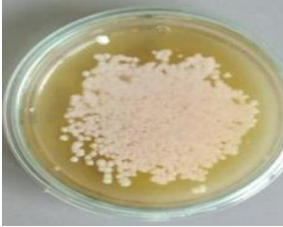
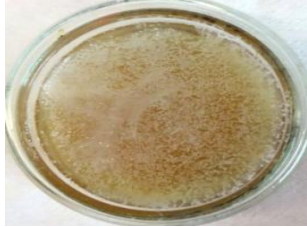















TABLA XI-5. Ensayo de macrodilución *C. tropicalis* - AcOEt.

En la TABLA XI-5 se observa el crecimiento de *C. tropicalis* con extracto de barraco AcOEt. Se puede visualizar que la levadura está presente en todas las diluciones, presentando colonias más aisladas en los primeros niveles, (256 µg/mL)

<i>C. krusei</i> Barraco AcOEt	Día 0	Día 1 (24 hrs)	Día 2 (48 hrs)
Dilución 1 256 µg/mL			
Dilución 2 128 µg/mL			
Dilución 3 64 µg/mL			
Dilución 4 32 µg/mL			
Dilución 5 16 µg/mL			
Dilución 6 8 µg/mL			

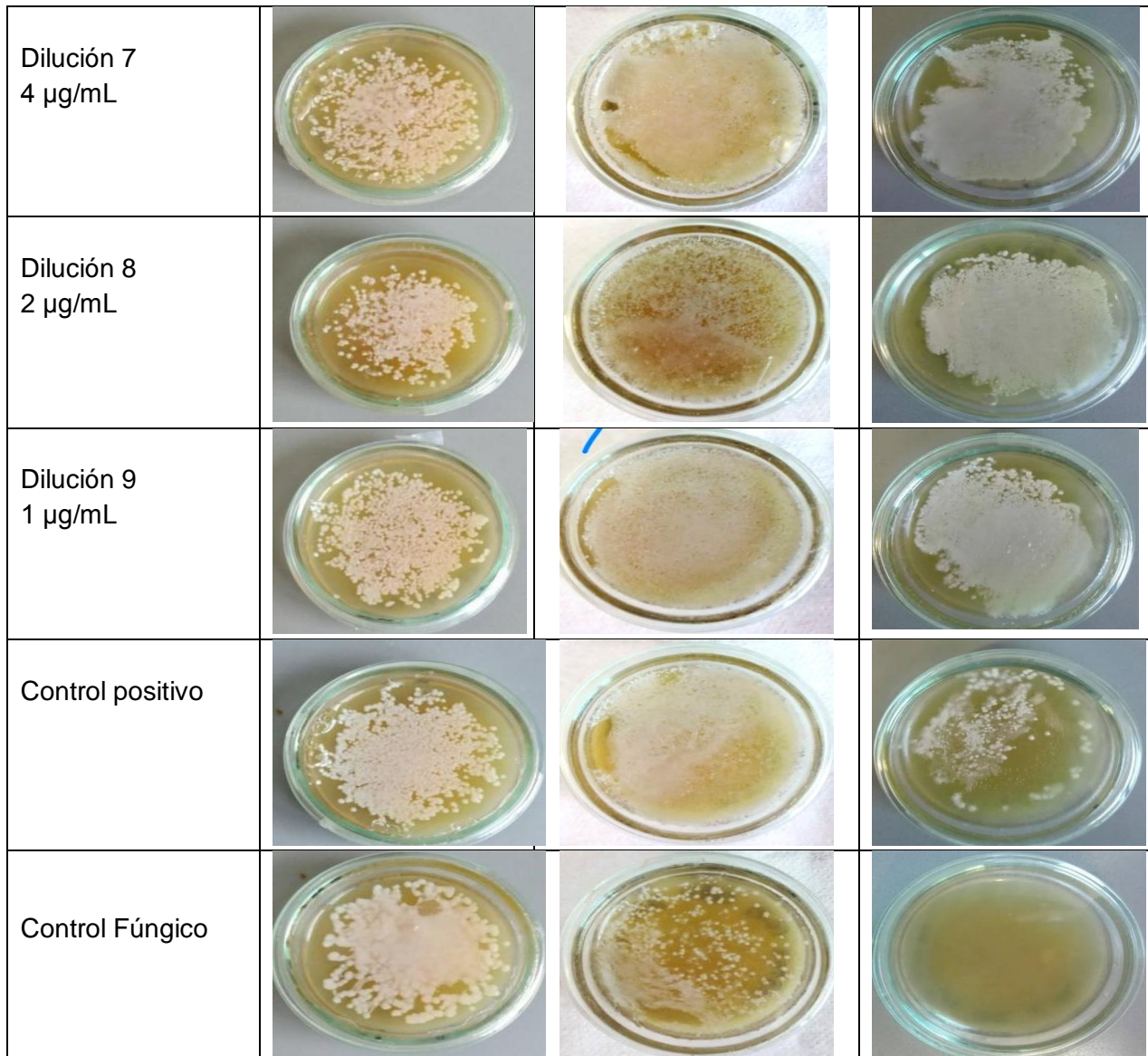


TABLA XI-6. Ensayo de macrodilución *C. krusei* - AcOEt.

En la TABLA XI-6 se observa el crecimiento de la levadura *C. krusei* con extracto de barraco AcOEt. En este experimento se visualiza un incremento similar tanto en el día uno, como dos o tres, en la dilución 3 de 64 µg/mL se observa que en el tiempo 3 es menor la presencia de colonias, no así en los demás niveles. Es importante señalar, que

si se compara el comportamiento de la misma levadura con hexano, el crecimiento en AcOEt es mayor. Debido a que se presenta crecimiento en todos los niveles MFC es resistente, por otro lado la MIC se evidencia en la dilución 256 $\mu\text{g/mL}$ precisamente en el tiempo de 24 horas.

3. Ensayo de difusión en agar

3.1 Test Antifúngico con extractos obtenidos de la planta *Escallonia illinita* (AcOEt y hexano)




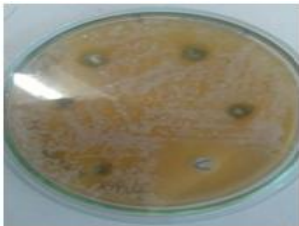
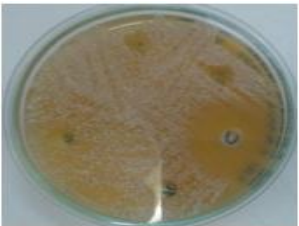
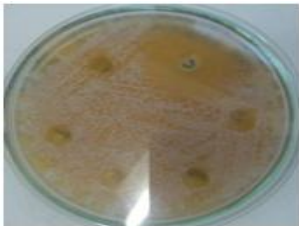
	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>
Hexano			
AcOEt			

TABLA XI-7. Resultado Ensayo de difusión en agar.

En la TABLA XI-7 se observa el crecimiento de las levaduras *C. krusei*, *C. albicans* y *C. tropicalis* con extracto de barraco AcOEt. Se visualizó que el crecimiento de la Candida fue uniforme en la placa y que el tamaño de los halos de inhibición de crecimiento es directamente proporcional a las concentraciones de los distintos extractos.

3.2 Resultados medición del halo inhibitorio en tres direcciones; vertical, horizontal y oblicua, promediando las mediciones en las tres direcciones.

<i>C. tropicalis</i> AcOEt	Diámetro en mm vertical	Diámetro en mm Horizontal	Diámetro en mm Oblicuo	Promedio
C µg/mL	0.8	0.7	0,7	0.73
5 µg/mL	0.7	0.75	0.7	0.716
10 µg/mL	0.7	0.65	0.7	0.683
15 µg/mL	0.7	0.7	0.65	0.683
20 µg/mL	0.7	0.7	0.7	0.7
25 µg/mL	0.7	0.7	0.5	0.63

TABLA XI-8 Ensayo con extracto AcOEt en *C. tropicalis*.

<i>C. albicans</i> AcOEt	Diámetro en mm vertical	Diámetro en mm Horizontal	Diámetro en mm Oblicuo	Promedio
C µg/mL	0.8	0.7	0.7	0.73
5 µg/mL	0.75	0.75	0.8	0.76
10 µg/mL	0.65	0.65	0.65	0.65
15 µg/mL	0.7	0.7	0.7	0.7
20 µg/mL	0.7	0.8	0.7	0.73
25 µg/mL	0.7	0.8	0.7	0.73

TABLA XI-9. Ensayo con extracto AcOEt en *C. albicans*.

<i>C. krusei</i> AcOEt	Diámetro en mm vertical	Diámetro en mm Horizontal	Diámetro en mm Oblicuo	Promedio
C µg/mL	1.4	2.0	1.5	1.6
5 µg/mL	0.65	0.6	0.6	0.616
10 µg/mL	0.65	0.65	0.65	0.65
15 µg/mL	0.6	0.6	0.5	0.56
20 µg/mL	0.6	0.6	0.6	0.6
25 µg/mL	0.8	0.3	0.5	0.53

TABLA XI-10. Ensayo con extracto AcOEt en *C. krusei*.

NOTA: No se tomaron en cuenta las colonias de pequeño o mediano tamaño dentro de la zona de inhibición.

4. Ensayo de microdilución

En la TABLA XI-11 y la TABLA XI-12 se observan los resultados del experimento de microdilución en *C. albicans* con extracto hexano (Hex) y acetato de etilo (AcOEt). La TABLA XI-11 muestra los resultados a 24 horas, el extracto hexano inhibe el crecimiento de las colonias de *C. albicans* en una concentración de 16 µg/mL, por otro lado el extracto AcOEt inhibe el crecimiento de colonias de *C. albicans* en una concentración mayor a 16 µg/mL. En la Tabla XI-12 se muestran los resultados a 48 horas, podemos ver que tanto el extracto hexano como el AcOEt inhiben el crecimiento de las colonias de *C. albicans* en una concentración mayor de 16 µg/mL. Los extractos tienen actividad de inhibir el crecimiento de las colonias a altas concentraciones en comparación con los fármacos, por ejemplo, el fluconazol actúa a una concentración de 0.25 µg/mL.

Extractos	Test Antifúngico (MIC ₈₀ , µg/mL) a 24 hrs						
	CC	Hex	AcOEt	Fluconazol*	Ketoconazol*	Itraconazol*	DMSO
	-	>16	16	0.25	1.0	4.0	i

TABLA XI-11. Concentración Inhibitoria Mínima (MIC₈₀) levadura patógena oportunista humanas multirresistente (*C. albicans*) a 24 h.

Extractos	Test Antifúngico (MIC ₈₀ , µg/mL) a 48 h						
	CC	Hex	AcOEt	Fluconazol*	Ketoconazol*	Itraconazol*	DMSO
	-	>16	>16	0.25	1.0	4.0	i

TABLA XI-12. Concentración Inhibitoria Mínima (MIC₈₀) de los extractos n-hexano y AcOEt de *E. illinita* contra la levadura patógena oportunista humanas multirresistente (*C. albicans*) a 48 h.

* Controles positivos

En la TABLA XI-13 y la TABLA XI-14 se observan los resultados del experimento de microdilución en *C. krusei* con extracto hexano (Hex) y acetato de etilo (AcOEt). La TABLA XI-13 muestra los resultados a 24 horas, el extracto hexano inhibe el crecimiento de las colonias de *C. krusei* en una concentración de 16 µg/mL, por otro lado el extracto AcOEt inhibe el crecimiento de colonias de *C. krusei* en una concentración de 8 µg/mL. En la TABLA XI-14 se muestran los resultados a 48 horas, podemos ver que tanto el extracto hexano inhiben el crecimiento de las colonias de *C. krusei* en una concentración mayor a 16 µg/mL, por otro lado el extracto AcOEt inhibe el crecimiento de colonias de *C. krusei* en una concentración de 16 µg/mL. Los extractos tiene actividad de inhibir el crecimiento de las colonias a altas concentraciones en comparación con los fármacos, por ejemplo, el ketoconazol actúa a una concentración de 1.25 µg/mL.

Extractos	Test Antifúngico (MIC ₈₀ , µg/mL) a 24 h						
	CC	Hex	AcOet	Fluconazol*	Ketoconazol*	Itraconazol*	DMSO
		16	8	8.0	1.25	8.0	i

TABLA XI-13. Concentración Inhibitoria Mínima (MIC₈₀) de los extractos n-hexano y AcOEt de *E. illinita* contra la levadura patógena oportunista humana *C. krusei* a 24 h.

Extractos	Test Antifúngico (MIC ₈₀ , µg/mL) a 48 h						
	CC	Hex	AcOet	Fluconazol*	Ketoconazol*	Itraconazol*	DMSO
		>16	16	8.0	1.25	8.0	i

TABLA XI-14. Concentración Inhibitoria Mínima (MIC₈₀) de los extractos n-hexano y AcOEt de *E. illinita* contra la levadura patógena oportunista humana *C. krusei* a 48 h.

* Controles positivos

En la TABLA XI-15 y la TABLA XI-16 se observan los resultados del experimento de microdilución en *C. tropicalis* con extracto hexano (Hex) y acetato de etilo (AcOEt). La TABLA XI-15 muestra los resultados en 24 horas y la TABLA XI-16 muestra los resultados en 48 horas, podemos ver que los resultados en 24 horas como en 48 horas son semejantes, el extracto hexano en ambas horas inhiben el crecimiento de colonias de *C. tropicalis* en una concentración mayor a 16 µg/mL, por otro lado el extracto AcOEt en ambas horas inhiben el crecimiento de colonias de *C. tropicalis* en una concentración de 16 µg/mL. Los extractos tiene actividad similar tanto en la evaluación de 24 horas y de 48 horas, en los dos tiempo inhibe el crecimiento de las colonias a altas concentraciones en comparación con los fármacos, por ejemplo, el fluconazol actúa a una concentración de 0.25 µg/mL.

Test Antifúngico (MIC ₈₀ , µg/mL) a 24 h							
Extractos	CC	Hex	AcOet	Fluconazol*	Ketoconazol*	Itraconazol*	DMSO
		>16	16	0.25	1.0	4.0	i

TABLA XI-15. Concentración Inhibitoria Mínima (MIC₈₀) de los extractos n-hexano y AcOEt de *E. illinita* contra la levadura patógena oportunista humanas multirresistente (*C. tropicalis*) a 24 h.

Test Antifúngico (MIC ₈₀ , µg/mL) a 48 h							
Extractos	CC	Hex	AcOet	Fluconazol*	Ketoconazol*	Itraconazol*	DMSO
		>16	16	0.25	1.0	4.0	i

TABLA XI-16. Concentración Inhibitoria Mínima (MIC₈₀) de los extractos n-hexano y AcOEt de *E. illinita* contra la levadura patógena oportunista humanas multirresistente (*C. tropicalis*) a 48 h.

* Controles positivos

NOTA: los datos obtenidos del fluconazol, itraconazol y ketoconazol presentados en las Tablas XI-11, XI-12, XI-13, XI-14, XI-15, XI-16 son entregados por el Dr. Iván Montenegro, para la comparación de los resultados, entre extractos y fármacos.

XII. DISCUSIÓN

El género *Escallonia*, está constituido por unas 50 especies Sudamericanas, 23 de las cuales se encuentran en Chile donde es conocido coloquialmente como “barraco”, esto se debe por su olor característico semejante al del cerdo no castrado. En la medicina popular es usado para las enfermedades hepáticas, pero actualmente a través de diversos estudios científicos se busca comprobar su efecto antilevaduriforme, hepatoprotector y antimicrobiano, empíricamente comprobados [33].

Este género presenta comúnmente diversos metabolitos secundarios como la pinocembrina, astragalina, esteroides, cumarinas y aceites esenciales, estos son obtenidos desde distintos extracto, como por ejemplo:

- Pinocembrina es obtenida desde el extracto clorofórmico, eluída en columna de gel sílice con (cloroformo/Acetato de etilo 1:1).
- Para-cumarato de metilo es obtenido desde el extracto acetato de etilo, eluído con acetato de etilo/metanol 5%.
- Beta-sitosterol es obtenido desde el extracto etéreo, eluído con cloroformo/acetato de etilo.
- Umbeliferona es obtenida desde el extracto acetato de etilo, eluida con cloroformo/acetato de etilo 20%.
- Astragalina es obtenido desde el extracto metanólico [33].

También ha sido reportado el uso de plantas pertenecientes al género *Escallonia* (*E. rubra* y *E. revoluta*) para curar heridas y quemaduras. Pero lo más importante desde el punto de vista micológico es que este género *Escallonia* poseen efecto antimicótico como es el caso *E. rubra* var. *macrantha* contra *Botrytis cinérea* y *Gloeosporium limetticum* (Martin et al,1966) [56].

(Canepa, 1988), demostraron que el extracto etéreo de hojas de *E. illinita* tenía acción inhibitoria contra *Acremonium falciforme* a una concentración de 20 µg/mL.

Uno de los metabolitos más estudiados es la pinocembrina, un metabolito descubierto en diversas plantas silvestres, tales como en la *Escallonia illinita* anteriormente descrita, pero además existen estudios de su evidencia en el propóleo. Mediante estudios científicos se ha comprobado que la pinocembrina posee una actividad antibacteriana y antimicótica. Al estudiar la actividad antibacteriana frente a algunos microorganismos (*S. aureus* y *E. coli*), antifúngica (*C. albicans*) y antiviral (*Avia influenza*) de los propóleos de diferente origen geográfico, se comprueba que todos son activos frente a algunos hongos y cepas bacterianas Gram (+), e incluso al virus de la influenza. Los resultados de esta actividad se atribuyen a sus contenidos en ésteres y ácidos fenólicos y carbono del ácido p-cumárico. En el área de la gastroenterología, se ha observado que el propóleo brasileño, rico en pinocembrina y galangina, inhibe la actividad glucosiltransferasa y el crecimiento del *Streptococcus mutans*. Las flavanonas, algunos dihidroflavonoles, son agentes antibacterianos que inhiben el crecimiento del *Streptococcus mutans* y del *Streptococcus sobrinus* en la cavidad oral [52]. (Carrillo, 2011) describe que el efecto antimicrobiano sobre distintos géneros como Gram positivo y en menor grado frente a Gram negativo, en particular con *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp* y *Streptococcus sp*. *Micrococcus sp*, *Bacillus sp*, *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*. Los principales responsables son los flavonoides: galangina y pinocembrina. Además (Huayhua, 2009), incluye a microorganismos como *Bacillus larvae*, *B. subtilis*, *Bacilo de Koch*, *Shigella*, *Giardia lamblia*, incluso contra algunos resistentes a los antibióticos, como el *Streptococcus pyogenes* [53].

(Montenegro, 2006) mediante su estudio experimental sobre el efecto biológico de diversas plantas nativas en termitas, bacterias y hongos, concluye presencia de actividad antilevaduriforme en los extractos de barraco y de aceite de canelo, así como también en los aceites esenciales de Tepa y Laurel. Las 52 cepas de levaduras tratadas con el aceite de canelo fueron inhibidas con 25 microlitros de una concentración de 11 mg/mL en un 100% y con la concentración 1.1 mg/mL en un 50% de los ensayos. El halo promedio para la mayor concentración fue de 19 mm de diámetro, tal como se muestra contra *C. glabrata* y *C. krusei*. El extracto de barraco en ciclohexano tuvo acción fungicida contra todas las

cepas tratadas .Estas fueron inhibidas en un 100% con 25 microlitros de una concentración 286 mg/mL, a concentración 28.6 mg/mL, en un 70% y con la concentración 2.86 un 30%, la cantidad en miligramos contenidas en los 25 μ L, es la masa crítica que posee la acción biológica. Ejemplo: Los 286 mg/mL contienen 7,15 mg en 25 μ L para el extracto AcOEt de corteza de Laurel. Los dos tratamientos anteriores con barraco y canelo tuvieron acción fungicida en las concentraciones ya expuestas, en cambio el Laurel tuvo efecto fungistático, debido a que los microorganismo eran capaces de crecer sobre el halo de inhibición a concentraciones menores a 286 mg/ml. Esto último se repitió con las 52 cepas en estudio [49].

En los objetivos que en primera etapa se plantearon en nuestra investigación logramos evaluar como los extractos AcOEt y hexano de la *Escallonia illinita* reducen el crecimiento de las cepas *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* en los cultivos. Como conclusión el extracto AcOEt presenta una capacidad fungistática mayor en comparación al hexano, pero ambos extractos presentan un efecto fungistático y fungicida a altas concentraciones.

Se puede observar que el AcOEt presenta una capacidad fungistática mayor en *C. albicans*, en comparación con las otras especies de *Candida* estudiadas. En cambio el hexano presenta una capacidad fungistática mayor en *C. krusei*.

Un segundo y tercer objetivo dentro de nuestra investigación era determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima fungicida (MFC) de los extractos AcOEt y hexano con mayor efecto beneficioso sobre la *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei*. Nuestra investigación arrojó que el método de inclusión el AcOEt tiene una mayor actividad fungistática frente a la *C. albicans* con una MIC DE 2,38 mg/ μ L, no se pudo determinar la MIC del extracto hexano, ya que no hubo inhibición del crecimiento de la *C. albicans*, en ambos extractos la MFC no puede ser determinada. Por otro lado, la *C. krusei* tiene un crecimiento en todas las diluciones del extracto AcOEt, en cambio, frente al extracto hexano se puede determinar una MIC de 1,22 mg/ μ L y una MFC de 2,38

mg/ μ L. Por último, la *C. tropicalis* frente al extracto AcOEt y hexano presenta una MIC de 2,38 mg/mL, no pudiendo determinar la MFC.

Tras el análisis del método de microdilución, se concluye que en las concentraciones de extractos utilizadas, se destacó la gran acción antilevaduriforme frente a *C. tropicalis*, ya sea con extracto hexano como AcOEt. A la vez, en ambos casos el fluconazol fue ineficaz contra la cepa, por lo que el ensayo podría favorecer enormemente para el tratamiento de una candidiasis de este tipo.

Por otro lado, extracto hexano también presentó acción antilevaduriforme para *C. krusei*, e incluso con una MIC menor a la encontrada en el ensayo de inclusión con *C. tropicalis*. Sin embargo, para el mismo caso, fluconazol fue muy eficaz, obteniendo incluso un MFC menor a la MIC obtenida con extracto. En contraste, extracto AcOEt fue ineficaz para *C. krusei*, no logrando obtener la MIC.

Finalmente, todo cambia en los ensayos con *C. albicans*, ya que con ningún extracto de *Escallonia illinita* se logró obtener la MIC, sin embargo, fluconazol fue muy eficaz contra esta cepa no así el extracto AcOEt.

Analizando el ensayo de difusión en agar se puede demostrar acción antifúngica con los compuestos AcOEt y hexano frente a las cepas *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei*, concluyendo así que a mayor concentración de los extractos mayor es su poder inhibitorio. Así fue el caso de *C. albicans* que en la medición del halo inhibitorio con mayor promedio de inhibición mostró que a mayor concentración de los extractos mayor era su poder antifúngico. No fue así el caso en *C. tropicalis* que alcanzó el mismo promedio de halo de inhibición a menor concentración de los extractos.

Al comparar nuestro estudio frente a otras publicaciones, podemos encontrar que en distintos países existen publicaciones que estudian el comportamiento de distintas especies de la Candida frente a diversas plantas, por ejemplo, un estudio en México, sobre la actividad de los extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento in vitro de *C. albicans*. El objetivo del trabajo fue evaluar la actividad

antifúngica de cuatro extractos etanólicos de propóleos de tres diferentes Estados del país, y de cuatro extractos comerciales sobre el crecimiento de *C. albicans*. Se emplearon una cepa de referencia (ATCC 10231) y 36 aislamientos clínicos de origen humano de *C. albicans*. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) por el método de dilución en agar. Se realizaron curvas de crecimiento en caldo glucosado de Sabouraud solo y con diferentes concentraciones de los extractos etanólicos de propóleos; además se determinó si el efecto era fungicida o fungistático. El extracto obtenido en Cuautitlán Izcalli, Estado de México presentó la mayor actividad biológica, inhibiendo el 94,4% de los aislamientos clínicos a una concentración de 0,0008 mg/ μ L; la cepa de referencia fue inhibida a una concentración de 0,0006 mg/ μ L. El efecto fue fungistático a bajas concentraciones y fungicida a concentraciones superiores a la MIC. El extracto etanólico de propóleos mexicano podría ser investigado como un tratamiento alternativo en algunas infecciones causadas por *C. albicans* [54].

En Brasil, Juliana Moura Mendes y colaboradores (2011) investigaron sobre la “Actividad antifúngica del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* (clavo) sobre cepas de *C. tropicalis* de aislados clínicos”, La MIC y MFC del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* fueron 0,0005 y 0,001 mg/ μ L, respectivamente.

En Perú, existe un estudio de Huamaní Achata, María Elena y Ruiz Quiroz, Julio Reynaldo (2005), “Determinación de la actividad antifúngica contra *C. albicans* y *Aspergillus niger* de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú”; La MIC de los extractos que presentaron actividad consistente frente a *C. albicans*, fue de 0,00025 mg/ μ L para *Hypericum laricifolium* L. (Plantas Nativas de la Hoya de Quito), *Juglans neotropica* Diels (Nogal), *Psidium guajava* L. (guayaba) y *Schinus molle* (Pirul) y de 0,0005 mg/ μ L para Piper spp. Al comparar los resultados obtenidos con los nuestros para *C. albicans* con un MIC de 2,38 mg/ μ L con respecto al extracto AcOEt y hexanos del barraco.

Los estudios mencionados y la actual tesis reafirman que el efecto antilevaduriforme de un tipo de planta depende de los variados principios activos que la componen y que

muchos de ellos actúan sinérgicamente por lo que su acción biológica no depende solamente de un compuesto aislado. De la misma forma, el barraco no es una excepción y el estudio profundizado de sus características químicas colabora enormemente para considerarlo como una alternativa terapéutica eficaz contra candidiasis producidas por el género *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei*, o en su defecto, según la evidencia mencionada anteriormente, contra infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*, levaduras en general y Saprolegniasis. Cabe destacar que esta última infección es de gran relevancia, pues la saprolegniasis es uno de los problemas más grandes que enfrenta la industria salmonera, generando un daño en el área de la acuicultura de nuestro país Chile, ya que esta micosis no sólo afectan a la la industria de la pesca y acuicultura, en la disminución de la cantidad del producto, sino también por la mala calidad de los individuos infectados, que no son aptos para los tratamientos de conservación (Kinkelin, 1985). Actualmente se utiliza para el tratamiento un compuesto denominado “Bronopol”, sin embargo, sigue la búsqueda de compuestos alternativos, adecuados (Marking y col.,1994; Schreier y col., 1996; Branson, 2002). Por ello, son necesarios estudios de susceptibilidad de nuevos fármacos dirigidos a cada especie patógena, en particular, para avanzar en este problema [55]. (Montenegro, 2006) analiza diferentes extractos semipolares del aceite de canelo y barraco mostrando una similar actividad antifúngica contra la saprolegnia y las levaduras en general. Los experimentos con saprolegnia demostraron que existen productos naturales extraídos del barraco y del canelo, los cuales poseen actividad antifúngica como se mencionó contra las levaduras al principio de esta discusión. Estos metabolitos son diferentes a los fenilpropanoides (eugenol y metileugenol) y no hay reportes bibliográficos de su acción sobre este hongo acuático [49].

Por último, afirmamos que se requieren estudios aún más específicos para su utilización con fines terapéuticos en humanos.

XIII. CONCLUSIÓN

La resistencia que han presentado a los antifúngicos en el tratamiento de la Candidiasis; y las múltiples mutaciones que sufren los diversos géneros de *Candida* nos hace reflexionar sobre nuevas alternativas que permitan combatir de forma eficaz la infección.

Es necesario reformular nuestra mirada frente a la patogenicidad de la *Candida*, debemos enfocarnos en entregar un tratamiento efectivo para evitar reincidencias creando nuevos fármacos y opciones para las usuarias o usuarios ya que el tratamiento convencional no es suficiente o no responde de manera eficaz.

El Barraco (*Escallonia illinita*) es nuestra alternativa a la problemática de resistencia (debido en parte al desarrollo de Biofilm) que enfrentan actualmente fármacos como el fluconazol o clotrimazol. Creemos que sus propiedades antilevaduriforme entregarán una solución certera, puesto los microorganismos no han desarrollado mecanismo de resistencia al compuesto extraído del barraco.

En este estudio se logra demostrar que los compuestos extraídos del barraco (*Escallonia illinita*) presentan un efecto anti levaduriforme por lo que en búsqueda de potenciar dicho efecto se combina con fluconazol, se logra establecer una relación clara de sinergia entre ambos antifúngicos, por lo que esperamos proponer una alternativa potente contra la micosis que no solo contemple un fármaco sintético sino más bien establecer una propuesta más natural. Se establecieron ensayos de micro y macrodilución del compuesto que marcará un precedente para las posteriores investigaciones del género *Candida* y de alternativas que den solución a candidiasis y otras enfermedades producidas por las levaduras, ya que los métodos son estandarizados podrán ser comparados en un futuro y así ver y establecer alguna relación que permita un avance en nuevas investigaciones.

Es por ello que a través de la revisión bibliográfica que presentamos es que asentamos nuestra investigación sobre la *Escallonia illinita* y así poder integrar aspectos que no puede enfrentar el tratamiento clásico, la información nos permite conocer y abordar la investigación desde un punto de vista más integral. Por último esperamos poder formular

una solución eficaz y amigable con el medio ambiente comprendiendo la importancia de éste en el desarrollo de nuevos fármacos y soluciones ante problemas de distinta índole.

XIV. PROYECCIÓN

El presente trabajo busca en diversas formas trascender en el tiempo, entregar una base sólida a los siguientes investigadores que buscan en las plantas nativas de nuestro país una alternativa frente la resistencia de los microorganismos a los tratamientos clásicos. Este estudio sobre el efecto antilevaduriforme de los extractos obtenidos la *E. illinita* frente a tres especies del género *Candida*, entregan datos claros y concisos que fueron extraídos de métodos validados universalmente, esto permite realizar múltiples estudios sobre el efecto antilevaduriforme o antimicótico de los extractos de plantas nativas sobre levaduras.

A raíz de esta investigación se pueden desprender varias proyecciones que colaboraría enormemente a la ciencia.

- La *Escallonia illinita* tienen una gran cantidad de usos en la medicina folclórica, desde problemas renales hasta infecciones gástricas y úlceras. Una de las posibilidades es analizar su acción a nivel hepático, gástrico y antimicótico, ya que tradicionalmente la gente del campo la utiliza para estos fines y comprobar si estas aseveraciones tienen una base científica.
- Dentro de las proyecciones académicas de esta investigación, se propone que este estudio se utilice como base para realizar corroboraciones científicas más amplias con respecto a la actividad antilevaduriforme de la *Escallonia illinita*.
- Habría que intentar elucidar el mecanismo de acción de él o los metabolitos puros de cada extracto, analizar si hay sinergismo al agregar dos o más productos en conjunto.
- Además se espera que esta tesis pueda ser un complemento con futuros estudios más extensos sobre el efecto en del género *Candida* y sus diferentes especies.
- Realizar diferentes investigaciones que se demuestre científicamente el efecto antimicótico de la *E. illinita* frente a otros hongos patógenos de importancia clínica incluso más allá del área de la ginecología.

- En esta tesis se demostró la sinergismo en la actividad antilevaduriforme presente entre la *E. illinita* y el fluconazol, quedando abierta la posibilidad de realizar estudios que comprueben la compatibilidad entre la *E. illinita* con otros medicamentos antimicóticos que actualmente se comercializan en el mercado para el tratamiento de la candidiasis.
- Este estudio sirva de base para comprobar científicamente el efecto fungicida de los extractos obtenidos de la *E. illinita* frente a hongos filamentosos.
- Se espera que esta investigación marque un precedente para el estudio en humanos, que sea la base con la cual investigadores puedan trabajar en el desarrollo de un fármaco que entregue soluciones frente a la candidiasis.
- De acuerdo a los extractos específicos utilizados en el actual documento, se propone que se realicen estudios más amplios con otros extractos obtenidos de la *Escallonia illinita* y evaluar su efecto como fungicida y fungistático.
- Analizar si hay sinergismo frente a la candidiasis, al agregar dos o más extractos en conjunto obtenidos de plantas nativas chilenas,.
- Por último nuestra investigación apunta a la realización de futuros ensayos clínicos, obteniendo así una alternativa a tratamientos de aquellas patologías producidas por hongos del género *Candida*.

Lo más importante de la investigación, es la aplicación de los conocimientos en la vida cotidiana, pues las candidiasis son muy recurrentes principalmente en la atención primaria de salud. Éstas habitualmente son manejadas con tratamientos clásicos o el usuario se automedica, por lo que se ha generado gran resistencia a los fármacos utilizados universalmente. Es por esto que una de las principales proyecciones sería que esta tesis sea complementada con otras que sigan su dirección a la utilidad en la población, partiendo por realizar ensayos con presentaciones farmacológicas aptas para humanos, encontrar la dosis ideal para el tratamiento de las distintas micosis y posteriormente lograr que el fármaco se encuentre disponible como tratamiento formal de estas patologías.

Para finalizar, este trabajo científico está enfocado directamente en el área productiva, entregando una alternativa comprobada mediante métodos aprobados bajo estándares

universales, por esto queremos incentivar a los estudiantes, profesionales e investigadores a establecer un nexo con la generación de las nuevas ideas sin dejar de lado la parte científica lo que hace a este tipo de investigación doblemente interesante. Los temas generados en esta tesis se podrían profundizar más aún modificando y mejorando los actuales métodos utilizados.

XV. BIBLIOGRAFÍA

1. Vásquez, M.S., Sacsquispe-Contreras, S. Presencia de hifas de *Candida* en adultos con mucosa oral clínicamente saludable. *Rev Estomatológica Hered.* 2014;15.
2. Vazquez, J.A., Sobel, J.D. Candidiasis. Chapter. *Essentials of Clinical Mycology*, 2011; 167-206.
3. Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Pfaller, M.A. *Microbiología médica*. 7ª ed. Barcelona: Elsevier, 214; 617.
4. Castañón, L. Universidad Autónoma de México [INTERNET]. México: Unidad de micología; 2016 [consulta el 29 de Septiembre de 2016]. Disponible a: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/candidosis.html>
5. Dabas, P.S. An approach to etiology, diagnosis and management of different types of candidiasis. *Journal of Yeast and Fungal Research*. 2013 Aug 31;4(6): 63-74.
6. Núñez-Velasco S, Jiménez-Cornejo MC. Candidiasis. *Hipócrates Rev Médica*. 2011;6(24):12–15.
7. Biasolia, M.S. Candidiasis. *CEREMIC Unv Nacional de Rosario*, 2013; 3-26.
8. Murillo, S.E. Incidencia de candidiasis vaginal en mujeres gestantes entre las edades comprendidas de 20 a los 35 años de edad atendidas en el Hospital Verdi Cevallos Balda de la ciudad de Portoviejo durante septiembre del 2012 a febrero del 2013, propuesta de protocolo de atención. 2013; 14-20.
9. Rivera, L.E.C., Ramos, A.P., Desgarenes, C.P. Biopelículas fúngicas. *Dermatol Rev Mex*. 2013;57(5): 350–361.
10. Merino, G., Cedillo, L., Silva, F., Muñoz, A.A., Roldán, C., Iracena, E. Análisis morfológico de biopelículas de *C. albicans* producidas en diferentes condiciones de pH y temperatura analizadas por microscopía óptica y de fuerza atómica. *Revista mexicana de micología*. 2011;33: 1-8.
11. Netea, M.G., Joosten, L.A.B., Van der Meer JW, Kullberg B-J, van de Veerdonk FL. Immune defence against *Candida* fungal infections. *Nature Reviews Immunology*, 2015; 15: 630–642.
12. Sánchez, E.A. Diagnóstico de candidiasis y candidemias en neonatos, 2009; 20-53.

13. Urizar, J.A. Candidiasis orales. Rev Iberoam Micol. 2002;19: 17–21.
14. Pavez, C. Candidiasis esofágica. Gastroenterol Latinoam. 2010;21(2):302–304.
15. Kliemann, D.A., Pasqualotto, A.C., Falavigna, M., Giaretta, T., Severo, L.C. *Candida esophagitis*: species distribution and risk factors for infection. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo. 2008 Oct;50(5): 261-263.
16. Gannoni, B.G., Bórquez, R.S. Vulvovaginitis e infecciones de transmisión sexual en la adolescencia. Rev Médica Clínica Las Condes. 2011;22(1): 49–57.
17. Achkar, J.M., Fries, B.C. Candida Infections of the Genitourinary Tract. Clin Microbiol Rev. April 2010;23: 253-273.
18. Casado, C., Torrico, G., Medina M. Medios de cultivo en un laboratorio de microbiología. Rev Internet. 2012; 8-9.
19. Microbiology Manual 12th [Internet]. Estados unidos de américa: EMD; 2015 [consulta en página web el día 3 de octubre del año 2016]. Se encuentra disponible en la URL: http://www.vitus.by/userfiles/file/Products_MERCK/Microbiology.pdf.
20. Bridges, A.E, Olivo, J.P., Chandler, V.L. Relative Resistances of Microorganisms to Cathode Rays: II. Yeasts and Molds. Applied microbiology. 1956 May;4(3): 147-149.
21. El reino de los hongos [Internet]. Venezuela: Revista Iberoamericana de Micología; 2002 [consulta el 29 de Septiembre de 2016]. Disponible a: <http://hongos-alergicos.reviberoammicol.com/files/001.PDF>
22. Singh, S., Sobel, J.D., Bhargava, P., Boikov, D., Vázquez, J.A. Vaginitis due to *C. krusei*: epidemiology, clinical aspects, and therapy. Clinical infectious diseases. 2002 Nov 1;35(9): 1066-1070.
23. Samaranayake, Y.H., Samaranayake, L.P. *C. krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. Journal of medical microbiology. 1994 Nov 1;41(5): 295-310.
24. *Candida tropicalis* [Internet]. Estados Unidos: Leading International Fungal Education; 2015 [consulta el 29 de Septiembre de 2016] Disponible en: <http://www.life-worldwide.org/fungal-diseases/Candida-tropicalis1>

25. Kothavade, R.J., Kura, M.M., Valand, A.G., Panthaki, M.H. *C. tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. *Journal of Medical Microbiology*. 2010 Aug 1;59(8): 873-880.
26. Requejo, S.J.I., Gómez, P.A.M. Evaluación de la actividad antifúngica del extracto del romero más extracto de orégano frente a *C.Albicans* 2011: 4-9.
27. Fuentes, M., Hermosilla, G., Alburquenque, C., Falcone, M.A., Amaro, J., Tapia, C. Caracterización de los mecanismos de resistencia a azoles en aislados clínicos chilenos de *C. albicans*. *Rev Chil Infectol*. 2014;31(5): 511–517.
28. Perea, S. Resistencia de *C. albicans* a los azoles. Resistencia de *C. albicans* a los azoles. *Revista española de quimioterapia*. 2000;13(3).
29. Moura, J., Sarmento, F.Q., De Oliveira Pereira, F., Pereira de Sousa, J., Nogueira, V., De Oliveira, E. Actividad antifúngica del aceite esencial de *Eugenia caryophyllatasobre* cepas de *C. tropicalis* de aislados clínicos. *BLACPMA* 2012; 11(3): 208-217.
30. Milián, P.M., Seife, J.M., Morales, R.,Vázquez, L., Martín, C., Quirós, M. *Calendula officinalis* en el tratamiento tópico de la candidiasis vaginal recurrente. *BLACPMA* 2010; 9(5): 343-352-.
31. Farmacia Principal 124, de Vilanova i la Geltrú [INTERNET] Barcelona; 2016 [consulta el 06 de octubre de 2016] Disponible a : <http://farmaciaprincipal124.com/farmacia-principal124>
32. Riedemann, M.M., Teillier, A.S., Aldunate, N.G. Arbustos nativos ornamentales del centro sur de Chile. 1ª Ed. Concepción: Corporación chilena de la madera; 2014.
33. García, R., Erazo, S., Canepa, A., Lemus Gutiérrez I. Metabolitos secundarios de *Escallonia illinita* Presl. 1990.
34. Mercado, G., Carrillo, R., Wall-Medrano, A., López, J.A., Álvarez, E. Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutr Hosp*. 2013;28(1): 36-46.
35. Community Outreach and Engagement Core. What is oxidative stress.2012.
36. Sociedad argentina de medicina biológica y homotoxicología. Radicales libres y los procesos oxidativos del ser humano. Sistemas de medición.

37. Pérez, G. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. Rev Cuba Investigation Bioméd. 2003;22(1).
38. Menéndez, C. Efectos vasculares de la quercetina y la catequina: interacciones y papel de los procesos de conjugación y desconjugación metabólica. 2012.
39. Jiménez-Arellanes M.A., García-Martínez I, Rojas-Tomé S. Potencial biológico de especies medicinales del género Cnidioscolus (Euphorbiaceae). Rev Mex Cienc Farm. 2014;45(4): 1-6.
40. Brucelosis. MedlinePlus [revista en línea]. 2015. [consultado el 28/09/2016] Disponible en <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000597.htm>
41. Vanaclocha, B.V. Folcara SC. Fitoterapia: vademécum de prescripción. Masson Barcelona; 2003.
42. Martín-Aragón Álvarez, S. Cumarinas en la prevención de estrés oxidativo dependiente de la edad. 2012.
43. López, J.S. García Herrera V, Aguilar Cázares D, Medina Morales F, Cervera Mendieta I, Rivera Rosales RM, et al. Efecto citostática de la cumarina y la 7-hidroxicumarina en tres líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar humano. Rev Inst Nac Enfermedades Respir. 1998;11(4):261-7.
44. Xantoma. MedlinePlus [revista en línea]. 2015. [consultado el 01/10/2016] Disponible en <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/001447.htm>
45. Healthwise staff. Beta sitosterol Plant extract. 2015.
46. Merkens, L.S. Myrie SB, Steiner RD, Mymin D. Sitosterolemia. 2013.
47. Find a vitamin or supplement Beta - sitosterol. L. WebMD [revista en línea]. 2009. [consultado el 31 de Septiembre del 2016] Disponible en <http://www.webmd.com/vitamins-supplements/ingredientmono-939-beta-sitosterol.aspx?activeingredientid=939&activeingredientname=beta-sitosterol>
48. Hospital Ramón y Cajal. Informe técnico para la evaluación de los medicamentos. Madrid; 2005.
49. Montenegro, V. I. Estudio preliminar del efecto biológico de productos naturales en termitas, bacterias y hongos [tesis]. Valdivia: Universidad austral de Chile. Facultad de ciencias; 2006.

50. E. Cantón Lacasa, E. Martín Mazuelos, A. Espinel-Ingroff. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). Asociación Española de Micología. (Extraído de revista Iberoamericana de micología, 2007).
51. Gutiérrez, C. Bedout C, Tobon AM, Cano LE, Arango M, Tabares AM, et al. Sensibilidad a fluconazol y voriconazol de aislamientos de *Candida spp.*, obtenidos de mucosa oral de pacientes con sida. *Infectio* 2007; 11(4): 183-189.
52. Mayta-Tovalino, Frank, Sacsquispe Contreras, Sonia, Ceccarelli Calle, Juan, Alania Mallqui, Jorge, Propóleo Peruano: Una nueva alternativa terapéutica antimicrobiana en Estomatología.. *Revista Estomatológica Herediana* [en línea] 2012, 22 (Enero-Marzo) : [Fecha de consulta: 10 de junio de 2018] Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/4215/421539367009.pdf>
53. Rueda Jácome, María Fernanda. (2015). Estudio comparativo in vitro del efecto antibacteriano del extracto de propóleo Ecuatoriano vs gluconato de clorhexidina contra *Streptococcus mutans*. Proyecto de Investigación como Requisito previo para la Obtención del Grado Académico de Odontología. Carrera de Odontología. Quito: UCE. 86 p. [Fecha de consulta: 10 de junio de 2018] Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/4573/1/T-UCE-0015-154.pdf>
54. Quintero-Mora ML, Londoño-Orozco A, Hernández-Hernández F, Manzano-Gayosso P, López-Martínez R, Soto-Zárate CI, et al. Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento in vitro de *C. albicans*. *Rev Iberoam Micol.* 1 de marzo de 2008;25(1):22–6.
55. Montaña, J., Avendaño, F. (2004). Saprolegnia parasitica en salmones y truchas del sur de Chile. *Arch. Med. Vet.* 36(1). [Fecha de consulta: 11 de junio de 2018] Disponible en: <http://mingaonline.uach.cl/pdf/amv/v36n1/art08.pdf>
56. Martin, J.T., Baker, E.A. y Birde, R.J.W. *Ann. Appl. Biol.* 57(3) , 501 - 508 (1966). En C.A.65, 14354h (1966).