

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



FACULTAD DE ENFERMERÍA Y NUTRICIÓN



LICENCIATURA EN ENFERMERÍA

TESIS

Que para obtener el grado de licenciado en enfermería

PRESENTA

PLESS. Cristian Mendoza Hernández

**“EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE
Chrysactinia mexicana Gray EN AISLADOS
CLINICOS DE *Candida albicans* DE MUJERES
CON NEOPLASIA INTRAEPITELIAL
CERVICAL”**

Directora de tesis

PhD. Verónica Gallegos García

Co-Directora de tesis

PhD. Yolanda Terán Figueroa

Co-Directora de tesis

MSc. Ma. de Lourdes Zúñiga Martínez

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P., MÉXICO DICIEMBRE DEL 2016



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE ENFERMERÍA Y NUTRICIÓN
LICENCIATURA EN ENFERMERÍA



“EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Chrysactinia mexicana* Gray EN AISLADOS CLINICOS DE *Candida albicans* DE MUJERES CON NEOPLASIA”

Tesis

Que para obtener el grado de:

LICENCIADO EN ENFERMERÍA

Presenta:

PLESS. Cristian Mendoza Hernández

Directora:

PhD. Verónica Gallegos García

Co-Directora

PhD. Yolanda Terán Figueroa

Co-Directora

MSc. María de Lourdes Zúñiga Martínez

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE ENFERMERÍA Y NUTRICIÓN
LICENCIATURA EN ENFERMERÍA



“EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Chrysactinia mexicana* Gray EN AISLADOS CLINICOS DE *Candida albicans* DE MUJERES CON NEOPLASIA”

Tesis

Que para obtener el grado de:

LICENCIADO EN ENFERMERÍA

Presenta:

PLESS. Cristian Mendoza Hernández

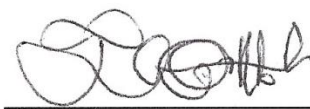
Sinodales

Firma

Lic.Enf. Luis Antonio Martínez Gurrión


Presidente

EECC. Fernando Cortès Mendoza


Secretario

PhD. Verónica Gallegos García


Vocal

SAN LUIS POTOSÍ, MÉXICO

DICIEMBRE DEL 2016

INDICE

I.-INTRODUCCIÓN.....	1
II.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
III.-MARCO TEORICO	6
3.1.-Taxonomía y generalidades de <i>Candida albicans</i>	6
3.2.-Mecanismos de patogenicidad de <i>Candida albicans</i>	7
3.3.-Características morfológicas y bioquímicas de <i>Candida albicans</i>	9
3.4.-Tratamiento de la candidiasis y su resistencia antimicótica.....	10
3.5.-Epidemiología de <i>Candida albicans</i>	12
3.6.-Neoplasia intraepitelial cervical como factor predisponente de candidiasis	13
3.7.- Neoplasia intraepitelial cervical.....	14
3.8.-Características generales de los aceites esenciales	16
3.8.1.-Método de extracción de aceites esenciales	17
3.9 Generalidades de <i>Chrysactinia mexicana</i> Gray.....	20
3.10.- Investigaciones realizadas con <i>Chrysactinia mexicana</i> Gray	22
IV.-OBJETIVOS.....	25
4.1.-GENERAL	25
4.2.-ESPECIFICOS	25
V.-HIPOTESIS	26
VI.-METODOLOGIA.....	27
6.1.- Tipo de estudio.....	27
6.2.-Obtención de la materia vegetal.....	27
6.3.-Obtención de aceite esencial.....	27
6.4.- Cepas utilizadas.....	28
6.5.- Caracterización del aislado clínico de referencia.....	29
6.6.-Condiciones de crecimiento de <i>Candida albicans</i>	29
6.7.- Determinación de concentración mínima inhibitoria y letal del aceite esencial sobre <i>Candida albicans</i>	29
6.8.- Confrontación de la concentración mínima inhibitoria y letal del aceite esencial de <i>Chrysactinia mexicana</i> Gray en aislados clínicos de <i>Candida albicans</i> de mujeres con neoplasia intraepitelial cervical.....	30
6.9.- Efecto del aceite esencial de <i>Chrysactinia mexicana</i> Gray sobre la morfología de <i>Candida albicans</i>	31

6.9.1.- Obtención del plasma	31
6.9.2.- incubación de <i>Candida albicans</i> con el aceite esencial	31
6.9.3.- Cuantificación de levaduras e hifas.....	32
VII.-RESULTADOS.....	33
7.1.-Caracterización del aislado clínico	33
7.2.-Aceite esencial obtenido de las extracciones por arrastre de vapor.....	33
7.3.-Ensayos de control de crecimiento de <i>Candida albicans</i> con DMSO y agua floral	34
7.4.- Concentración mínima inhibitoria y letal del aceite esencial de <i>Chrysactinia mexicana</i> Gray sobre <i>Candida albicans</i>	35
7.5.- Efecto del aceite esencial de <i>Chrysactinia mexicana</i> Gray sobre aislados clínicos de <i>Candida albicans</i> de mujeres con neoplasia intraepitelial cervical.....	36
7.6.- Efecto del aceite esencial de <i>Chrysactinia mexicana</i> Gray sobre la morfología de <i>Candida albicans</i>	38
VIII.-DISCUSIÓN	39
IX.-CONCLUSIONES.....	44
X.-PERSPECTIVAS.....	45
XI.- REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.....	46

INDICE DE TABLAS

Tabla1.- Clasificación taxonómica de <i>Candida albicans</i>	6
Tabla 2.- Frecuencia en aislamiento de diferentes especies de <i>Candida</i> en mujeres con neoplasia cervical.....	14
Tabla 3.-Actividad antimicrobiana de extractos contra cepas bacterianas y aislados de levadura usando un ensayo de microdilución.....	24
Tabla 4. Aislados clínicos de <i>Candida albicans</i> de mujeres con neoplasia cervical utilizados.....	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Mecanismos de patogenicidad de <i>Candida albicans</i>	8
Figura 2.- Diagrama esquemático de la pared celular de <i>Candida albicans</i>	10
Figura 3.- Mecanismo de acción de los antifúngico que actúan en la vía de síntesis de ergosterol.....	12
Figura 4.-Clasificación de Neoplasia intraepitelial cervical.....	16
Figura 5.- Destilación por arrastre de vapor.....	20
Figura 6.- Técnica de separación por densidades.....	20
Figura 7.- Distribución de <i>Chrysactinia mexicana</i> Gray en México.....	21
Figura 8.- <i>Chrysactinia mexicana</i> Gray.....	22
Figura 9.- Composición química del aceite esencial de <i>Chrysactinia mexicana</i> Gray.....	23
Figura 10.- <i>Chrysactinia mexicana</i> Gray recolectada en etapa de floración.....	27
Figura 11.- Sistema de extracción de aceite esencial por arrastre de vapor.....	28
Figura 12.- Técnica de separación del aceite esencial por densidades.....	28
Figura 13.-Cámara de Neubauer: Cuadro grande central.....	32
Figura 14.-Ejemplo de recuentos por grupos en cámara de Neubauer.....	32
Figura 15 .Producción de tubo germinal o filamentación precoz por <i>Candida albicans</i>	33
Figura 16. Crecimiento de la cepa en CHROmagar <i>Candida</i>	33
Figura 17. Crecimiento de <i>Candida albicans</i> en presencia de DMSO a 1.25%.....	34
Figura 18.- Crecimiento de <i>Candida albicans</i> en presencia de diferentes concentraciones de agua floral.....	34
Figura 19.- Efecto fungicida del aceite esencial de <i>Chrysactinia mexicana</i> Gray sobre <i>Candida albicans</i>	35

Figura 20.-- Disminución de crecimiento de <i>Candida albicans</i> a partir de una concentración 30µl de aceite esencial de <i>Chrysactinia mexicana</i> Gray.....	35
Figura 21.-Crecimiento de <i>Candida albicans</i> en las concentraciones utilizadas del aceite esencial de <i>Chrysactinia mexicana</i> Gray.....	36
Figura 22.-Crecimiento de aislados clínicos en presencia de aceite esencial de <i>Chrysactinia mexicana</i> Gray.....	36
Figura 23.-Crecimiento de aislados clínicos en presencia de aceite esencial de <i>Chrysactinia mexicana</i> Gray.....	37
Figura 24.-Crecimiento de tubo germinal en presencia de aceite esencial de <i>Chrysactinia mexicana</i> Gray.....	38

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: Los aceites esenciales tienen una gran cantidad de agentes fungicidas, que en últimos años se han considerado como una fuente valiosa para el desarrollo de tratamientos que permitan el control de diversas infecciones. *Cándida albicans* es parte de la flora normal y es considerada como una levadura patógena de importancia médica y que en ciertas patologías como NIC, cáncer y SIDA por mencionar algunas cobra gran importancia ya que puede ocasionar infecciones superficiales o sistémicas. **OBJETIVO:** Evaluar el efecto fungicida de *Chrysactinia mexicana* Gray sobre aislados clínicos de *Candida albicans* de mujeres con neoplasia cervical. **METODOLOGÍA:** Se extrajo el aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray mediante la técnica de arrastre de vapor. Se utilizó la técnica de microdilución en placa de 96 pozos para conocer la concentración mínima inhibitoria y letal del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray sobre *Candida albicans* y posteriormente se observó el crecimiento en placas de YPD agar por 48 horas. En los aislados clínicos de pacientes con NIC se probó la concentración mínima inhibitoria y letal calculada en la cepa de referencia. **RESULTADOS:** Se observa un efecto sobre el crecimiento de *Candida albicans* a los 40µl en la cepa de referencia y no así en los aislados clínicos. La cepa de referencia de *Candida* muestra inhibición del cambio morfológico de levadura a hifa a la concentración mínima inhibitoria y mínima letal del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray. **CONCLUSIÓN:** El aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray tiene efecto fungicida para la cepa de referencia de *Candida albicans* en contraste con la resistencia mostrada por los aislados clínicos de pacientes con NIC.

Palabras Clave: *Candida albicans*, Aceite esencial, *Chrysactinia mexicana*, NIC.

I.-INTRODUCCIÓN

Antes del descubrimiento y la implementación de los antimicrobianos, las enfermedades infecciosas eran la principal causa de muerte del ser humano; sin embargo el uso indiscriminado de estos tratamientos representa una problemática en la actualidad dado que esto supone un factor de riesgo para el desarrollo de microorganismos resistentes a los tratamientos convencionales (OMS) tal es el caso de *Candida albicans*¹¹.

La levadura *Candida albicans* es un patógeno oportunista versátil que causa una gran variedad de infecciones que van desde la colonización inocua de las superficies mucosas hasta estados infecciosos asociados con la invasión y destrucción de los tejidos, tales como la candidiasis orofaríngea, vulvovaginal y candidiasis diseminada¹².

El oportunismo de *Candida albicans* es favorecido por un gran número de factores ligados principalmente a procedimientos terapéuticos, como el uso indiscriminado de antibióticos y esteroides, citotóxicos, trasplantes de medula ósea y órganos sólidos, instalación de catéteres venosos, nutrición parenteral, sumando a esto la drogadicción, virus de inmunodeficiencia adquirida, el embarazo, la terapia de drogas inmunosupresoras, el uso de anticonceptivos orales e intrauterinos, colagenopatías, prematurez, diabetes mellitus, neoplasias y el Virus del papiloma humano (VPH), entre otros^{13, 14}. Las características de las mujeres con diagnóstico de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) cuyo factor causal es el VPH, las hace más susceptibles a una infección por *Candida albicans*, debido a que se crean condiciones que ayudan a este microorganismo a proliferar fácilmente, aunado a esto la mayoría de las mujeres están expuestas a candidiasis esporádica así como recurrente por los factores de riesgo antes mencionados¹⁵.

La prevalencia de candidiasis, así como la susceptibilidad presente en las pacientes con un diagnóstico de NIC y el surgimiento de la resistencia de *Candida albicans* al tratamiento de elección nos llevan a la búsqueda de nuevas

alternativas para el tratamiento y control de esta infección. Los países latinoamericanos como Brasil, Cuba, Perú y México¹⁶ que gozan de una gran diversidad de plantas, están enfocados en desarrollar tratamientos derivados de estas, que sean eficientes y con efectos secundarios menores a los que se generan por los medicamentos actuales.

Los extractos y aceites esenciales derivados de plantas resultan ser una excelente propuesta terapéutica, aunque un punto importante a considerar es el uso de plantas endémicas de la región, que favorecen la realización de ensayos *in vitro* e *in vivo*, por el fácil acceso a la materia vegetal. En este estudio se contempló a la planta *Chrysactinia mexicana* Gray, también conocida como Damianita, falsa damiana, garañona por mencionar algunos de sus nombres de uso popular.

Chrysactinia mexicana Gray ha sido ampliamente estudiada en diferentes sistemas y se encontró que posee diferentes atributos tales como: insecticida, antidiarreico, expectorante, anticolinérgico, afrodisíaco y antifúngico contra diferentes especies del género *Candida*. Sin embargo en los estudios publicados a la fecha, no existen ensayos realizados con el aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray sobre *Candida albicans*.

Debido a esto la presente investigación se centró en evaluar el efecto fungicida de *Chrysactinia mexicana* Gray sobre los aislados clínicos de *Candida albicans* de mujeres con neoplasia intraepitelial cervical.

II.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La candidiasis es una micosis causada por diferentes especies del género *Candida*, siendo la especie más importante *Candida albicans* a nivel mundial, con una prevalencia mayor del 50% en México^{14, 17} y cuyo aislamiento es cada vez mayor que el de otras especies; generalmente secundarios a condiciones fisiológicas alteradas que determinan disminución de la inmunidad local así como el uso indiscriminado de antibióticos y antifúngico. Esta micosis es favorecida por diversos factores predisponentes entre los cuales destaca la NIC y el VPH por mencionar algunos¹⁵.

En las pacientes con NIC hay alteraciones del epitelio vaginal como el cambio en la morfología, la disminución del pH, contenido rico en glucógeno en las células escamosas, por mencionar algunas características que las hacen más susceptibles a una infección por microorganismos oportunistas, entre los cuales destaca *Candida albicans* que puede proliferar rápidamente e infectar el epitelio dañado, siendo la candidemia la manifestación más grave de esta infección cuya mortalidad de los pacientes con este padecimiento puede ser alrededor del 40%¹⁸.

Las infecciones causadas por *Candida albicans* son tratadas con fluconazol, el cual inhibe la biosíntesis de ergosterol, que es el principal esteroide que compone las paredes fúngicas. El fluconazol es un medicamento fungistático que inhibe el crecimiento de la levadura, pero no la erradica, proporcionando de esta manera la oportunidad para el desarrollo de resistencia, especialmente durante el tratamiento a largo plazo o episodios recurrentes. La resistencia farmacológica por parte de *Candida albicans* hacia su tratamiento de elección ha sido observado¹¹ y el costo del tratamiento puede ascender a \$32,810.00 según lo reportado en 2010 por Moran y colaboradores¹⁷.

Ante este panorama, la resistencia que presenta *Candida albicans* a los azoles cobra gran importancia y es así como surge la necesidad de generar nuevas alternativas terapéuticas como lo son los derivados de las plantas medicinales.

Las plantas medicinales han constituido el eje central de la medicina tradicional para el tratamiento de distintas enfermedades desde hace mucho tiempo¹⁹ en donde los aceites esenciales producidos por ellas son parte importante de algunos efectos curativos reportados, éstos aceites están constituidos por una mezcla de compuestos orgánicos volátiles caracterizados por un aroma fuerte y natural. La función de estos compuestos son metabolitos secundarios que cumplen roles de defensa, atracción de polinizadores, mensajeros químicos, por mencionar algunas funciones²⁰.

En general, los aceites esenciales son conocidos por sus actividades antifúngicas, tal como el aceite extraído de *Origanum* (Orégano) y el *Thymus* (tomillo), que han demostrado ser particularmente eficaces y cuya actividad se ha evaluado ampliamente en varios microorganismos²¹⁻²⁴. Estos aceites esenciales mostraron eficacia contra *Candida* particularmente el de orégano que es capaz de inhibir la germinación de *Candida albicans* y el desarrollo *in vitro* de la forma filamentosa²¹,²⁵,²⁶ de igual manera, aceites esenciales extraídos de *Satureja montana* y *Melaleuca alternifolia* (árbol del té) también fueron eficaces en la inhibición del crecimiento de *Candida*; sin embargo algunas de estas plantas mencionadas no son endémicas de México, por lo que es pertinente conocer el efecto terapéutico de plantas del estado de San Luis Potosí y probar que efecto tienen sobre aislados clínicos de *Candida albicans*.

Entre las plantas de San Luis Potosí una propuesta terapéutica podría ser el uso de *Chrysactinia mexicana* Gray, que es un pequeño arbusto aromático con propiedades curativas que crece en el centro y noreste de México, esta planta es utilizada por la población como tratamiento de enfermedades respiratorias e infecciones de la piel por mencionar algunas de sus aplicaciones conocidas. Se ha probado con *Candida albicans* por Salazar-Aranda y cols. en 2011 que los extractos metanólicos de esta planta tienen efecto fungicida sobre algunas especies del género *Candida*⁹. Por todo lo antes mencionado, en esta investigación surge el interés de evaluar el efecto fungicida del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray sobre aislados clínicos de *Candida albicans* de

mujeres con neoplasia intraepitelial cervical, con la finalidad de contribuir en la generación de conocimiento científico para una nueva terapia complementaria para el tratamiento contra la candidiasis vaginal en beneficio de la sociedad.

III.-MARCO TEORICO

3.1.-Taxonomía y generalidades de *Candida albicans*

Candida albicans es una levadura Gram positiva, diploide, comensal, saprofito, dimorfo, presente en el organismo humano como parte de la microbiota normal, considerado un hongo patógeno oportunista que puede causar varias formas de candidiasis, desde infecciones superficiales en mucosas hasta enfermedades sistémicas que comprometen la vida. La clasificación taxonómica de *Candida albicans* se puede observar en la tabla 1.

Reino	<i>Fungi</i>
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Subphylum	<i>Ascomycotina</i>
Clase	<i>Ascomycetes</i>
Orden	<i>Saccharomycetales</i>
Familia	<i>Saccharomycetaceae</i>
Genero	<i>Candida</i>
Especie	<i>albicans</i>

Tabla1 .- Clasificación taxonómica de *Candida albicans*

Candida albicans es una célula oval levaduriforme de 2 a 4 micras con paredes finas, en tejidos se han identificado formas filamentosas de longitud variable, con extremos redondos de 3 a 5 micras de diámetro y pseudohifas, que son células alargadas de levadura que permanecen unidas entre sí^{27, 28}.

Las levaduras o blastospora son microorganismos eucarióticos, se reproducen por un proceso específico de división celular conocido como gemación. Este proceso de división implica la producción de nuevo material celular proveniente de la superficie de la blastospora. Cuando el brote ha crecido y se encuentra en su

tamaño óptimo, se suscita la división celular y se forma un tabique o septo entre las dos células²⁸.

La forma filamentosa del hongo (hifa), es una estructura microscópica tubular, la cual contiene múltiples unidades celulares divididas por septos y puede surgir a partir de blastosporas o de hifas existentes. Esta crece continuamente por extensión apical^{28, 29}.

Candida albicans tiene una marcada tendencia a formar esporas grandes de pared gruesa, denominadas clamidosporas, sobre todo cuando se cultivan en un medio especial como Agar Harina de maiz; la clamidospora tiene un diámetro de 7 a 8 micras y casi siempre se origina en el extremo del pseudomicelio. Es una importante característica morfológica en la identificación de *Candida albicans*. Asimismo, tiene la capacidad para producir tubos germinales (filamentación en suero) cuando las colonias son inoculadas en suero a temperatura de 37°C observándose los resultados después de 2 o 3 horas^{30, 31}.

Un tubo germinal se define como una extensión filamentosa de una célula levaduriforme que mide alrededor de la mitad del ancho y tres a cuatro veces el largo de la célula^{30, 31}, sin constricción en el punto de origen³².

3.2.-Mecanismos de patogenicidad de *Candida albicans*

La capacidad de *Candida albicans* para infectar al hospedero esta favorecida por la implementación de diferentes mecanismos de patogenicidad que le proporcionan su capacidad infectiva. Estos mecanismos son la transición morfológica entre las formas de levadura y de hifa (dimorfismo), la expresión de adhesinas e invasinas en la superficie celular, tigmotropismo, la formación de biofilms, la conmutación fenotípica y la secreción de enzimas hidrolíticas. Adicionalmente, atributos que incluyen una rápida adaptación a las fluctuaciones de pH, flexibilidad metabólica y mecanismos robustos de respuesta al estrés (Figura 1).

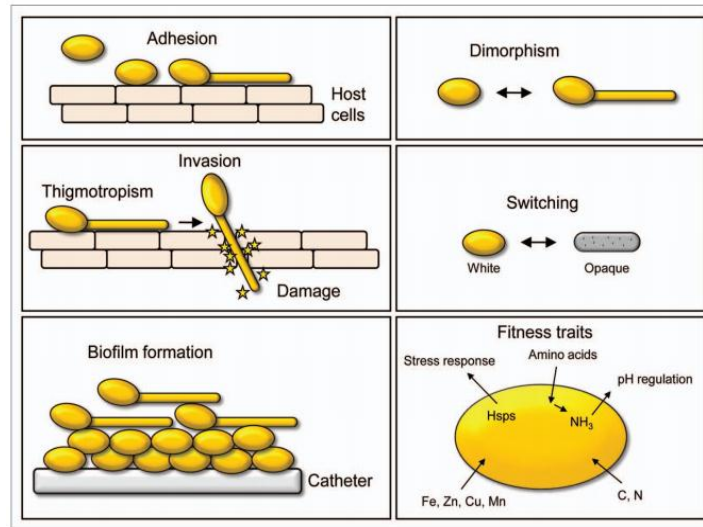


Figura 1.- Mecanismos de patogenicidad de *Candida albicans*⁴

Analizando los mecanismos de patogenicidad mencionados de *Candida albicans* podemos decir que las células de levadura se adhieren a las superficies de las células huésped mediante la expresión de adhesinas, el contacto con las células huésped desencadena la transición de la levadura a hifa y el crecimiento dirigido a través del tigmotropismo. La expresión de invasinas media la captación del hongo por la célula huésped a través de la endocitosis inducida.

Se ha propuesto la adhesión, las fuerzas físicas y la secreción de hidrolasas fúngicas para segundo mecanismo de invasión, es decir, penetración activa impulsada por hongos en las células huésped por descomposición de barreras. La unión de células de levadura a abióticos (por ejemplo catéteres) o bióticas (células hospedadoras) puede dar lugar a la formación de biofilms con células de levadura en la parte inferior y células hifas en la parte superior del biofilm. Se ha propuesto la plasticidad fenotípica (conmutación) para influenciar la antigenicidad y la formación de biofilm de *Candida albicans*.

Además de estos factores de virulencia, varios rasgos de aptitud influyen en la patogenicidad fúngica. Incluyen una fuerte respuesta al estrés mediada por proteínas de choque térmico (Hsps); Auto-inducción de la formación de hifas por

absorción de aminoácidos, excreción de amoníaco (NH₃) y la alcalinización extracelular concomitante; flexibilidad metabólica y absorción de diferentes compuestos como fuentes de carbono (C) y nitrógeno (N); y captación de metales traza esenciales, por ejemplo, hierro (Fe), zinc (Zn), cobre (Cu) y manganeso (Mn)⁴

3.3.-Características morfológicas y bioquímicas de *Candida albicans*

La composición química de *Candida albicans* está representada por 20-40% de proteínas y 30-50% de polisacáridos, mientras que la proporción de lípidos es variable³³. La fracción lipídica va a depender de la cepa, edad del cultivo, condiciones ambientales y del origen de la fuente de carbono³².

La pared celular de *Candida albicans* está compuesta principalmente por los polisacáridos manana, glucana 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 manana representa aproximadamente entre 15,2% y 22,9% del peso seco y poco más de 40% de los polisacáridos de la pared celular del hongo. El D-Glucano β-1-3 y el D-Glucano β-1-6 constituyen entre 47% y 60% del peso seco de la pared celular³⁴. Otros componentes han sido reportados, tales como proteínas en cantidades que oscilan entre 6% y 25%, lípidos entre 1% y 7% y Quitina entre 0,6% y 9% del peso de la pared celular.

El número de capas y su morfología varían, esta variación está relacionada con varios factores tales como: la etapa de crecimiento celular, la forma de crecimiento (como levadura o como tubo germinal). La mayoría de los investigadores han descrito cinco capas dentro de la pared celular, las cuales son: Manoproteínas, β-Glucana-Quitina, β-Glucana, Manoproteínas y fibrillas (Figura 2).

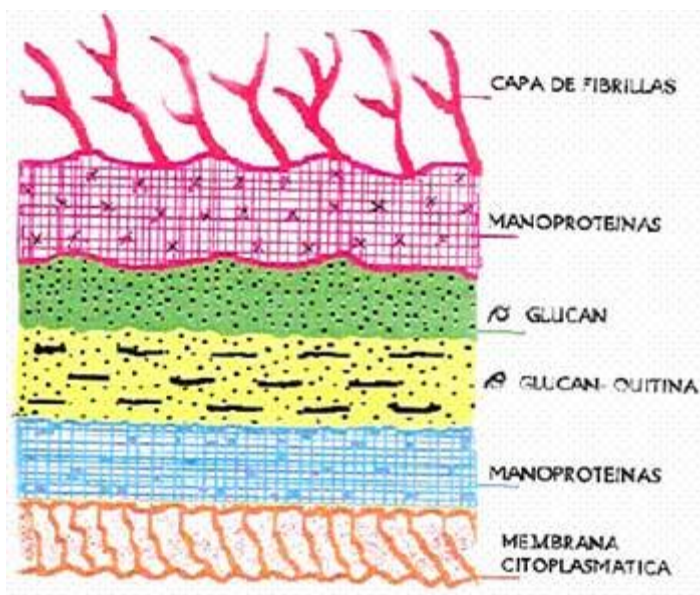


Figura 2.- Diagrama esquemático de la pared celular de *Candida albicans*⁶

La membrana citoplasmática es una estructura que reviste gran importancia, ya que los antimicóticos actúan a nivel de la misma, además de contener las enzimas responsables de la síntesis de la pared celular. Esta presenta una doble capa compuesta por lípidos y posee invaginaciones, que se observan como surcos de 200 a 300 nanómetros de longitud, por 35 a 40 nanómetros de espesor. Además de los lípidos, la membrana citoplasmática está compuesta por grandes cantidades de proteínas y carbohidratos en menor proporción

En el citoplasma, al igual que otras células eucarióticas, *Candida albicans* presenta: ribosomas, mitocondrias con doble capa, gránulos de glucógeno y vacuolas que contienen en algunas ocasiones cuerpos lipídicos y gránulos de polifosfato. El núcleo es típico de una célula eucariótica, con membrana nuclear limitante, uno o varios nucléolos, ADN y ARN y varios cromosomas⁶.

3.4.-Tratamiento de la candidiasis y su resistencia antimicótica

El tratamiento para combatir la candidiasis puede ser tópico o sistémico según el tipo de infección; los antimicóticos pueden ser fungistáticos o fungicidas según inhiban el crecimiento o produzcan lisis de los hongos. Los más utilizados son los

derivados imidazólicos que actúan en un componente importante de la membrana del hongo, el ergosterol, el cual es un lípido de la familia de los esteroides que actúa dándole fluidez, simetría e integridad; además de contribuir en funciones propias de muchas enzimas como la quitinsintetasa, que es importante para el crecimiento y división de la propia célula (Figura 3)³⁵⁻³⁷. Los derivados imidazólicos inhiben las enzimas oxidativas asociadas al citocromo P450 [CYP 3A4 y CYP 2C9] (lanosterol 14- α desmetilasa), bloqueando la conversión de lanosterol en ergosterol, lo que produce una alteración en la permeabilidad de la membrana de las células fúngicas. Además, promueven la acumulación de peróxido de hidrógeno capaz de lesionar la estructura de los organelos intracelulares del hongo^{38, 39}

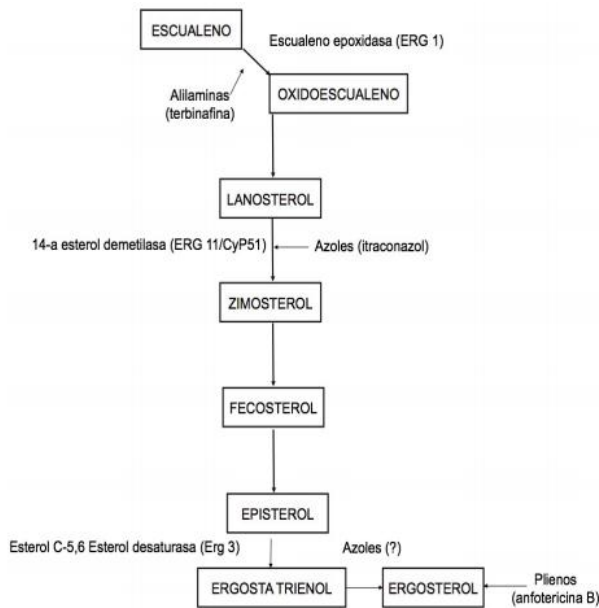


Figura 3.- Mecanismo de acción de los antifúngicos que actúan en la vía de síntesis

En la actualidad ha sido ampliamente reportada una disminución en la efectividad de estos medicamentos, un fenómeno de resistencia de parte del microorganismo a estos fármacos, esto debido principalmente, al surgimiento de levaduras resistentes, a la aparición de nuevas especies patógenas, a la prescripción irracional de antimicóticos como profilaxis y al aumento de las dosis terapéuticas.

La resistencia es un cambio de sensibilidad o susceptibilidad al antifúngico que puede medirse *in vitro* por métodos de laboratorio apropiados⁴⁰. Los mecanismos

de resistencia antifúngica se clasifican en dos categorías, resistencia microbiológica y resistencia clínica^{40, 41}. La resistencia microbiológica se define como el crecimiento del microorganismo a dosis normales del antifúngico, sin embargo, éste puede ser inhibido a una concentración más alta. La resistencia clínica se define como el crecimiento del microorganismo a pesar de la administración de un agente antifúngico lo que se asocia con una alta probabilidad de falla terapéutica. En otras palabras el patógeno no se puede inhibir a dosificaciones normales pero si a concentraciones más altas las cuales podrían ser no seguras para el paciente.

Existen dos mecanismos por los que *Candida* puede adquirir resistencia a un azol; el primer mecanismo se debe a mutaciones moleculares de la enzima diana del antifúngica, como la alteración de las enzimas relacionadas en la síntesis del ergosterol; el segundo mecanismo se debe a la formación de barreras de permeabilidad o sistemas de bombeo del antifúngico fuera de la célula, como la alteración en las bombas de expulsión: ATP-bindingcassette (ABC) y facilitadores mayores (MF)⁸

3.5.-Epidemiología de *Candida albicans*

La conversión de *Candida albicans* en un agente patógeno depende principalmente de la alteración del equilibrio entre la microbiota y el sistema inmunitario del huésped ya que el estado fisiológico del huésped es el primer factor que gobierna la etiología de las candidiasis, variaciones de este estado pueden desencadenar que las levaduras comensales se conviertan en patógenas, causando infecciones⁴².

La candidiasis causada por *Candida albicans* está asociada y favorecida por varios factores predisponentes como lo son procedimientos terapéuticos, el uso indiscriminado de antibióticos y esteroides, citotóxicos, trasplantes de medula ósea y órganos sólidos, instalación de catéteres venosos, nutrición parenteral, las enfermedades autoinmunes, diabetes mellitus, el VIH, drogas inmunosupresoras, VPH y neoplasias.^{13, 15}

La mayoría de los casos de candidiasis son causados por *Candida albicans*, (tabla 2) ésta puede ser asintomática y tener diversas localizaciones, pero se aíslan con mayor frecuencia de la boca, el conducto gastrointestinal y la vagina. Los síntomas se manifiestan solo cuando el crecimiento de *Candida* es desmedido en estas zonas y se origina el padecimiento¹⁴.

Microorganismo	%
<i>Candida albicans</i>	53
<i>Candida Krusei</i>	41
<i>Candida tropicalis</i>	6

Tabla 2.- Frecuencia en aislamiento de diferentes especies de *Candida* en mujeres con neoplasia cervical¹⁵

3.6.-Neoplasia intraepitelial cervical como factor predisponente de candidiasis

En pacientes con NIC existen alteraciones del epitelio vaginal normal, que hacen más susceptible a una infección por diversos microorganismos oportunistas que forman parte de la microbiota normal de la vagina, tal es el caso de *Candida albicans*; el más mínimo cambio en el pH, la inmunosupresión local o cambios hormonales son suficientes para que este patógeno cuente con las condiciones necesarias para proliferar rápidamente y causar infección en el epitelio dañado.¹⁵

Las neoplasias presentan un continuo espectro de alteraciones morfológicas con patrones no bien delimitados, es decir cambios precoces en el tamaño, y números de células que forman la superficie del cuello uterino. Esto puede estar relacionado con el proceso de la misma neoplasia y de su asociación a infección por el VPH.

Frecuentemente se observan coilocitos en las lesiones de bajo grado y en los de alto grado son ocasionales, la cavitación puede observarse en degeneración vacuolar relacionada con la atrofia, en infecciones e incluso en epitelio escamoso rico en glucógeno, de igual manera se observa fisuras mitóticas, estas se

encuentran ausentes en las lesiones de bajo grado y frecuentemente en las de alto grado⁴³. El contenido rico en glucógeno contenido en las células escamosas, proveen de una fuente de carbono a *Candida albicans* que favorece su germinación y adherencia las células epiteliales vaginales, haciéndoles capaces de penetrar la pared vaginal.⁴⁴ Por todo ello existe una mayor prevalencia de colonización de *Candida albicans* en pacientes con diagnóstico de NIC.

3.7.- Neoplasia intraepitelial cervical

La NIC es una lesión precursora del cáncer del cuello uterino que ha sido ampliamente estudiada. Esto se caracteriza microscópicamente por una serie de manifestaciones que van de la atipia celular a diversos grados de displasia o neoplasia intraepitelial cervical (NIC o CIN, según sus siglas en inglés) antes de progresar a carcinoma invasor⁴⁵.

El principal agente causal para el desarrollo de esta patología es el VPH del cual se cuentan con más de 180 genotipos, desprendiéndose de estos los virus de bajo riesgo y de alto riesgo oncogénico

- a) **Bajo riesgo oncogénico:** Se relacionan con mayor frecuencia en la producción de verrugas genitales externas y lesiones intraepiteliales de bajo grado. Los más comunes son: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y 89. Los tipos 6 y 11 son responsables de la producción del 90% de las verrugas genitales.
- b) **Alto riesgo oncogénico:** Estos se relacionan con la génesis de carcinomas. Los más comunes son: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68. Los tipos 16 y 18 son responsables de alrededor del 70% de los carcinomas cervicales en el mundo⁴⁶.

Las alteraciones uterinas generadas van desde una lesión escamosa intraepitelial en el cuello uterino que varía de un crecimiento anormal mínimo (bajo grado) hasta un progreso en el espesor que llega a la capa más superficial del epitelio (alto grado)

Los cambios epiteliales cervicales incluidos en el término NIC se inician con la displasia leve grado I (NIC I); en esta etapa la atipia celular es mínima y afecta el tercio inferior del epitelio. Éstos cambios pueden observarse en el epitelio cervical habitual o en el epitelio aplanado notable por cambios coilocitóticos (condiloma plano). La coilocitosis constituye una angulación nuclear rodeada por vacuolización perinuclear producida por un efecto viral citopático, en este caso el VPH.

Con el avance a NIC II la displasia se hace más grave y afecta a la mitad inferior del epitelio, se acompaña de cierta variación en el tamaño de la célula y del núcleo y con mitosis de apariencia normal por arriba de la capa basal, estos cambios se designan displasia moderada, la capa superficial de las células aún está bien diferenciada, pero ciertos casos muestran los cambios coilocitóticos descritos.

En el caso más severo es la displasia grave (NIC III), notable por la mayor variación en el tamaño de la célula y del núcleo, orientación desordenada de las células y mitosis normales o anormales, estos cambios afectan casi todas las capas del epitelio, la diferenciación de las células de la superficie y los cambios coilocitóticos por lo general han desaparecido, en la figura 4 se muestran los distintos grados de neoplasias⁴⁶.

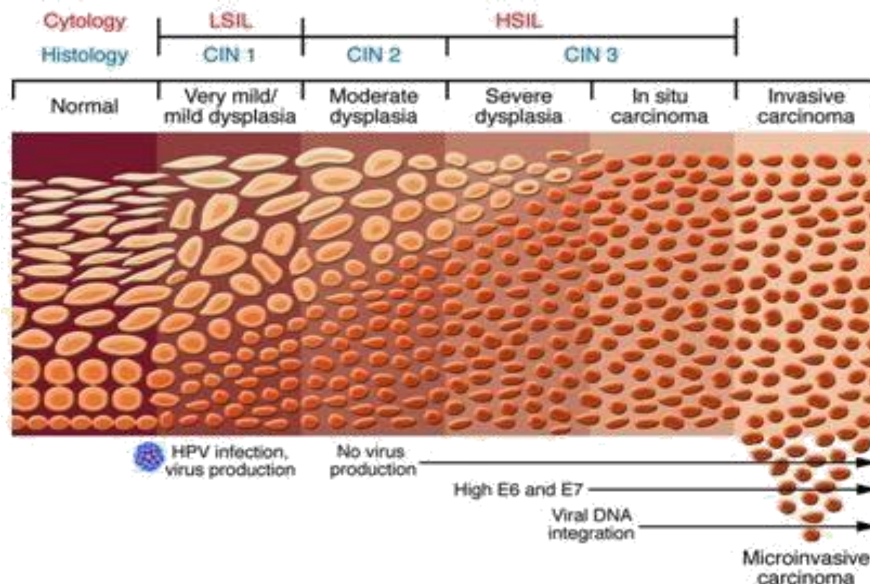


Figura 4.- Clasificación de neoplasia intraepitelial cervical ¹

El 30-70% de las neoplasias cervicales necesitan entre 10-12 años para progresar desde NIC a carcinoma invasor, sin embargo, hay un 10% que evolucionan en sólo 1 año, una vez que el tumor es capaz de invadir, progresa por contigüidad manifestándose como una úlcera superficial, un tumor exofítico dependiente del exocérnix o infiltrando de forma extensa el endocérnix .En su progresión puede alcanzar los fornix vaginales, parametrios (también por vía linfática), vejiga y recto (en casos muy evolucionados). Puede extenderse hacia el segmento uterino inferior y la cavidad endometrial en el 10-30% de los casos¹.

3.8.-Características generales de los aceites esenciales

Los aceites esenciales son sustancias aromáticas de base lipídica constituidos por componentes heterogéneos de terpenos, sesquiterpenos, ácidos, ésteres, fenoles y lactonas encontradas prácticamente en todas las plantas como producto de su metabolismo secundario y están ampliamente distribuidos en las distintas partes de la planta: raíces, tallos, hojas, flores y frutos. Los aceites esenciales se caracterizan por sus propiedades físicas, como densidad, viscosidad, índice de refracción y actividad óptica. La mayoría de los aceites esenciales tienen una densidad menor que la del agua excepto los aceites de almendras, amarga, mostaza, canela, perejil o clavo. El índice de refracción es una característica de cada aceite esencial y cambia cuando este se diluye o mezcla con otra sustancia⁴⁷.

Los aceites esenciales se han utilizado desde hace mucho tiempo para obtener aromas y sabores, sin embargo en los últimos años se han estudiado desde un enfoque funcional; en busca de su capacidad antimicrobiana, antioxidante o nutritiva lo cual ha revelado las diversas aplicaciones que los aceites esenciales poseen. Las propiedades funcionales de los aceites esenciales varían de acuerdo a la proporción de los compuestos o el número de ellos presentes en el aceite esencial. Su composición química está relacionada con muchos factores, principalmente la ubicación geográfica de las plantas, su ecotipo o variedad, la

propiedad biológica y físico-química del suelo, el clima, la nutrición, el estrés durante el crecimiento, el uso de fertilizantes y las variaciones estacionales.⁴⁸

Los aceites esenciales son conocidos por sus actividades antibacterianas, antifúngica, antivirales, antioxidantes, anticancerosas e inmunomoduladoras, pero también se usan como analgésicos, antiinflamatorios, espasmolíticos y anestésicos locales. En general aquellos aceites esenciales que contienen altas concentraciones de fenoles son conocidos por sus actividades antifúngica.⁴⁸

3.8.1.-Método de extracción de aceites esenciales

En la actualidad existen una gran variedad de técnicas para la obtención de los aceites esenciales como los son la destilación por arrastre de vapor, extracción con disolventes, extracción por fluidos supercríticos y extracción por microondas los cuales han sido ampliamente utilizados y evaluados⁴⁷ demostrando algunos ser más eficaces que otros y dejando en claro que la elección del método de extracción dependerá de la finalidad para la que los aceites esenciales serán utilizados.

Los métodos de obtención de los aceites esenciales determinan el uso de los mismos, por ejemplo al usar la extracción con disolventes, el tipo de disolvente utilizado puede contaminarlos o limitar su uso, dependiendo de la toxicidad del disolvente y de las técnicas utilizadas para su eliminación. Diversas investigaciones reportan que la composición de los aceites esenciales puede variar de acuerdo al método de extracción utilizado, estas variaciones radican en diferencias en la proporción de los compuestos e incluso en el número de estos.⁴⁷

En el presente trabajo la obtención del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray se llevó a cabo mediante la utilización de la destilación por arrastre de vapor ya que es un método sencillo y de bajo costo, por lo que no centraremos únicamente este método de extracción.

3.8.2 Destilación por arrastre de vapor

La destilación por arrastre con vapor es una técnica usada para separar sustancias orgánicas insolubles en agua y ligeramente volátiles, de otras no volátiles que se encuentran en la mezcla, como resinas o sales inorgánicas, u otros compuestos orgánicos no arrastrables.

Los vapores saturados de los líquidos inmiscibles sigue la Ley de Dalton sobre las presiones parciales, que dice que: cuando dos o más gases o vapores, que no reaccionan entre sí, se mezclan a temperatura constante, cada gas ejerce la misma presión que si estuviera solo y la suma de las presiones de cada uno, es igual a la presión total del sistema. Su expresión matemática es la siguiente:

$$P_T = P_1 + P_2 + \dots + P_n$$

Al destilar una mezcla de dos líquidos inmiscibles, su punto de ebullición será la temperatura a la cual la suma de las presiones de vapor es igual a la atmosférica. Esta temperatura será inferior al punto de ebullición del componente más volátil. Si uno de los líquidos es agua (destilación por arrastre con vapor de agua) y si se trabaja a la presión atmosférica, se podrá separar un componente de mayor punto de ebullición que el agua a una temperatura inferior a 100°C. Esto es muy importante cuando el compuesto se descompone a su temperatura de ebullición o cerca de ella.

En general, esta técnica se utiliza cuando los compuestos cumplen con las condiciones de ser volátiles, inmiscibles en agua, tener presión de vapor baja y punto de ebullición alto.⁴⁹

En la destilación por arrastre de vapor de agua se lleva a cabo la vaporización selectiva del componente más volátil de una mezcla formada por este y otros no volátiles. Esto se logra por medio de la inyección de vapor de agua directamente en el seno de mezcla, denominándose este “vapor de arrastre” cuya función será condensarse formando otra fase inmiscible que cederá su calor latente a la mezcla a destilar para lograr su evaporación. En este caso se tendrá la presencia de dos

fases inmiscibles a lo largo de la destilación (orgánica y acuosa), por lo tanto cada líquido se comportara como si el otro no estuviera presente. La condición más importante para que este tipo de destilación pueda ser aplicado es que tanto el componente volátil sea insoluble en agua ya que el producto volátil formara dos fases al condensarse, lo cual permitirá la separación del producto fácilmente⁴⁷(Figura 5).



Figura 5.- Destilación por arrastre de vapor³

El vapor de agua condensado acompañante del aceite esencial es llamado "agua floral", este producto obtenido pasara por un proceso de separación para obtener finalmente el aceite esencial, el método de separación utilizado en esta investigación fue la separación por densidades el cual es utilizado para separar líquidos que no son solubles entre sí y presentan diferentes densidades. Para ello se vertió la mezcla en un embudo de decantación, en el que se puede regular el paso del líquido mediante una llave. Se deja reposar la mezcla hasta que ambos líquidos se separan y se abre la llave para permitir el paso del líquido más denso a otro recipiente; cuando este ha pasado, se cierra la llave. El líquido menos denso queda retenido en el embudo y se puede obtener por la parte superior (Figura 6).

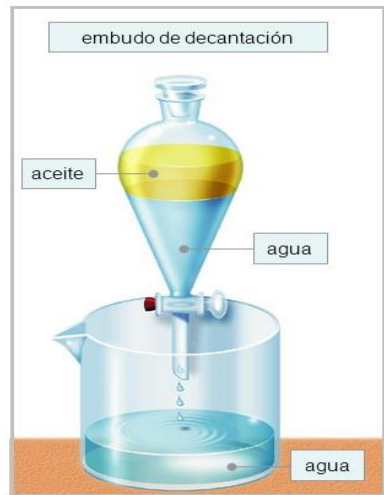


Figura 6.- Técnica de separación por densidades ²

3.9 Generalidades de *Chrysactinia mexicana* Gray

El género *Chrysactinia* está constituido por 6 especies de las cuales 5 de ellas son endémicas de México y se distribuyen principalmente en el centro y noreste de México, una de ellas alcanza el suroeste de los Estados Unidos. De ellas la especie *mexicana* Gray presenta la más amplia distribución, ya que se ha registrado en 16 estados (Figura 7) se le conoce comúnmente como damianita, falsa damiana, garañona, hierba de san nicolas, romerillo, yeyepaxtle.⁷

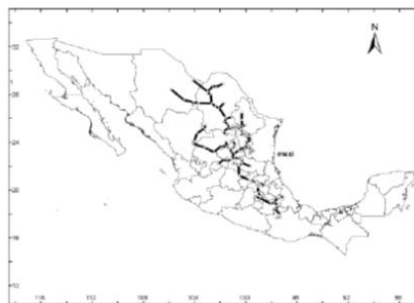


Figura 7.- Distribución de *Chrysactinia mexicana* Gray en México ⁷

Chrysactinia mexicana Gray se encuentra como arbustos, 20-40 cm alto. Tallos glabros a pubescentes. Hojas alternas, simples, lineares, 5-10(-23) mm largo, 1-2 mm ancho. Pedúnculos glabros a pubescentes, con 1-5 bractéolas. Involucro

turbinado a hemisférico, 3.5-5.0 mm largo, 1-2 mm ancho. Brácteas involucrales por lo general 13 (-14), lineares o lanceoladas, con 1 glándula pelúcidasubapical y 2-4 glándulas pelúcidas basales. Receptáculo con unas cuantas páleas delgadas y deciduas. Flores radiadas (8-)13, amarillas, en ocasiones amarillo-verdosas; flores del disco 25-40, amarillas. Aquenios 3-4 mm largo, cilíndricos, negros. Cerdas del vilano 30-40, 3.5-5.0 mm largo (Figura 8).

Habita en bosque de encino, bosque de Juniperus, bosque de pino, bosque de pino-encino, bosque tropical caducifolio, chaparral, matorrales xerófilos, pastizal, vegetación halófila, vegetación riparia y como ruderal en ambientes perturbados, en altitudes que van desde los 750 a los 2 875 m con floración en todos los meses del año.⁷

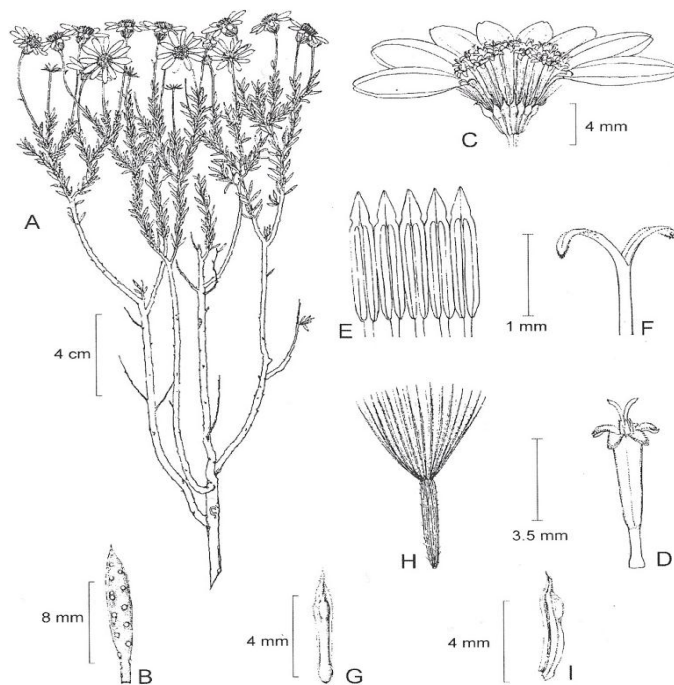


Figura 8.- *Chrysactinia mexicana* Gray. A. Rama con hojas y cabezuelas; B.- hoja mostrando las glándulas; C.-cabezuela con algunas lígulas removidas; D.-corola de la flor del disco; E. Anteras; F.-ramas del estilo; G.-bráctea del involucre en vista abaxial; H.-aquenio; I.-bráctea del involucre en vista lateral.⁵

3.10.- Investigaciones realizadas con *Chrysactinia mexicana* Gray

Las propiedades de *Chrysactinia mexicana* Gray han sido ampliamente estudiadas en diferentes sistemas, sus efectos reportados van desde su acción insecticida de extractos ligeramente polares; ligera acción estrogénica por cetosteroides; acción antidiarreica por taninos gálicos (astringentes) y pectinas (absorbentes); acción expectorante por eucaliptol hasta su acción antioxidante de los flavonoides (hepatoprotectores), amebicida y la acción antibacteriana de los flavonoides como flavan, 3-oles, ácido gálico y taninos Gálicos y su acción antifúngica por compuestos tales como piperitona⁵⁰ siendo estos últimos de gran importancia para el área médica, existen investigaciones que analizan la aplicabilidad de *Chrysactinia mexicana* Gray como tratamiento contra infecciones por diferentes microorganismo fúngicos, tal es el caso de nuestro patógeno de interés *Candida albicans*.

En la investigación de Cárdenas-Ortega en 2005¹⁰ se analizó el aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray mediante cromatografía de gases y espectrofotometría de masas y reportaron la composición de *Chrysactinia mexicana* Gray se determinó comparando la cantidad relativa de tiempos de retención y los espectros de masas de los componentes de muestras auténticas y espectros de masas de la biblioteca de datos.

Diecisiete componentes del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray se identificaron; no obstante, se observó el predominio de dos sustancias, eucalyptol (41,3%) y piperitona (37,7%) pero el análisis reveló alrededor de 30 constituyentes adicionales. Entre ellos se detectaron los siguientes: linalyl Acetato (9,1%); R mirceno (1,2%); R - tuyona (1,2%); y 3,7 - Dimetil - 1,6 - octadien - 3 - ol (1,4%). Los 24 compuestos restantes Detectados por GC-MS estaban presentes en proporciones muy bajas (<1%). En la figura 9 se observan los 17 compuestos con una concentración mayor al 1%.

retention time (min)	compound	composition (%)
11.58	α -phellandrene	0.25
13.07	α -myrcene	1.20
13.46	α -thujone	1.17
15.22	1-methyl-4-(1-methylethenyl)cyclohexanol acetate	0.63
17.51	eucalyptol	41.30
19.34	2-ethyl-6-methylbenzenamine	0.47
43.02	3,7-dimethyl-1,6-octadien-3-ol	1.39
46.11	trans-limonene	0.69
49.55	4-methyl-1-(1-methylethyl)-3-cyclohexen-1-ol	0.10
52.58	cis-limonene	0.44
57.05	S-(tetrahydro-2H-pyran-3-yl)ethanethioic ester	0.04
59.23	linalyl acetate	9.08
62.06	piperitone	37.74
63.43	exo-2-hydroxy cineole acetate	0.11
67.14	exo-2-hydroxy cineole	0.87
71.59	phenol	0.06
75.37	3-phenyl-2-propenyl ethyl ester	0.29

Figura 9.- Composición química del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray¹⁰

Cardenas-Ortega y cols trabajaron con los tres compuestos en mayor concentración encontrados en el aceite esencial (piperitona, linalyl acetato y eucalyptol) como tratamiento a la infección fúngica causada por *Aspegillus flavus* encontrando que solo la piperitona inhibió efectivamente el crecimiento micelial y una completa inhibición se observó a una concentración de 0.6 mg/mL, dejando evidencia del potencial antifungico de alguno de los compuestos contenidos en el aceite esencial.

En otra investigación realizada por Salazar-Aranda y cols analizo la eficacia antifúngica, antibacteriana y antioxidante de plantas utilizadas en medicina tradicional en el noreste de México. Se probaron un total de 39 extractos metanolicos de 17 especies de plantas diferentes pertenecientes a 11 familias, entre ellos 3 extractos metanolicos de *Chrysactinia mexicana* Gray obtenidos de flores, hojas y raíz (Tabla 3) reportando un efecto de estos tres extractos contra *Candida glabrata* a una concentración de 31.25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y sobre *Candida tropicalis* solo del extracto metanolic de las flores a una concentración de 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$, caso contrario fue el efecto encontrado de estos 3 extractos contra 3 aislados clínicos de *Candida albicans* en donde el efecto fue nulo en todas las concentraciones trabajadas en sus ensayos⁹.

Plant	Part	S. a. ATCC	S. a. Rsist.	E. f.	C. a. 498	C. a. 53	C. a. 501	C. g. 84	C. t. 166	C. k. 168	C. p. 96
<i>Ceanothus coeruleus</i>	L	—	1000	—	62.5	250	125	31.25	250	62.5	62.5
	F	125	—	—	1000	1000	—	31.25	1000	1000	125
	R	—	1000	—	125	31.25	31.25	31.25	250	125	31.25
<i>Chrysactinia mexicana</i>	L	1000	—	—	—	—	—	31.25	—	—	—
	F	1000	—	—	—	—	—	31.25	1000	—	—
	R	1000	—	—	—	—	—	31.25	—	—	—
<i>Colubrina greggii</i>	L	1000	—	250	250	125	250	31.25	500	125	62.5
	F	1000	—	250	250	125	250	31.25	500	125	125
	R	—	—	—	250	250	125	31.25	500	1000	500
<i>Cordia boissieri</i>	F	62.5	125	—	—	—	—	125	—	—	—
<i>Cyperus alternifolius</i>	L-S	125	—	1000	500	1000	500	31.25	1000	—	1000
	R	250	250	125	500	1000	500	31.25	500	500	1000
<i>Schinus molle</i>	L	125	250	1000	125	125	125	31.25	500	500	250
	F	62.5	125	1000	62.5	62.5	125	31.25	250	62.5	62.5
	B	125	125	125	250	500	250	62.5	125	1000	1000
Cephalotin		15.6	31.25	31.25							
Fluconazole					4	4	4	8	0.5	31.25	1

Tabla 3.- Actividad antimicrobiana de extractos contra cepas bacterianas y aislados de levadura usando un ensayo de microdilución ⁹

Los valores de CMI en $\mu\text{g ml}^{-1}$; MIC > 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$; L: hojas; F: flores; B: corteza; R: raíz; S: tallo; S. a. *Staphylococcus aureus*; E. f. *Enterococcus faecalis*; C. a. *Candida albicans*; G. *Candida glabrata*; C. t. *Candida tropicalis*; C. k. *Candida krusei*; C. p. *Candida parapsilosis*.

Los reportado por Salazar-Aranda y cols del efecto encontrado de *Chrysactinia mexicana* Gray contra aislados clínicos de *Candida albicans* es contrario al encontrado en esta investigación lo que concuerda por lo reportado por sefidkon F y Cols en 2006; Guan W y Cols en 2007; Da Porto y Cols en 2009 en donde podemos resaltar que las propiedades funcionales de extractos varían con la proporción de los compuestos presentes de igual manera demuestran que la composición de los aceites esenciales y los extractos pueden variar de acuerdo al método de extracción utilizado, estas variaciones radican en diferencias de proporción de los compuestos e incluso en diferencias en el número de compuestos⁴⁷.

IV.-OBJETIVOS

4.1.-GENERAL

Evaluar el efecto fungicida de *Chrysactinia mexicana* Gray sobre aislados clínicos de *Candida albicans* de mujeres con neoplasia intraepitelial cervical.

4.2.-ESPECIFICOS

- Caracterizar el aislado clínico de referencia.
- Identificar la concentración mínima inhibitoria y letal del aceite esencial en el aislado clínico de referencia.
- Conocer el efecto del aceite esencial sobre la morfología del aislado de referencia.
- Probar la concentración mínima inhibitoria y letal en los aislados clínicos de *Candida albicans* de mujeres con neoplasia intraepitelial cervical.

V.-HIPOTESIS

Ho.-El aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray no tiene un efecto fungicida sobre los aislados clínicos de *Candida albicans* de mujeres con neoplasia intraepitelial cervical.

H₁.-El aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray tiene efecto fungicida sobre los aislados clínicos de *Candida albicans* de mujeres con neoplasia intraepitelial cervical.

VI.-METODOLOGIA

6.1.- Tipo de estudio

Investigación de tipo experimental.

6.2.-Obtención de la materia vegetal

Chrysactinia mexicana Gray en etapa de floración se recolecto en el mes de Julio a las 10:30 am en Guadalcázar municipio de San Luis Potosí entre el kilómetro 5 y 6. (Figura 10) La materia vegetal fue autenticada por el taxónomo José García Pérez con el código SLPM37571 depositado por Isidro Palacios herbolario del instituto de zonas desérticas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.



Figura 10.- *Chrysactinia mexicana* Gray recolectada en etapa de floración.

6.3.-Obtención de aceite esencial

La materia vegetal se secó bajo sombra por 72 horas, posteriormente se trituro y se cernió obteniendo un tamaño de partícula de 1750 micras para la homogenización de la muestra, con un peso total obtenido de 1.8 kilogramos.

El aceite esencial fue extraído mediante la técnica de arrastre de vapor (figura 11), se colocó 50grs de materia vegetal en cada ciclo de 8 horas, repitiendo el proceso hasta terminar el total de la materia vegetal y se recuperó aceite esencial del agua floral por la técnica de separación por densidades en un embudo de separación florentino (Figura 12). El aceite esencial fue almacenado a 4°C en frasco ámbar.



Figura 11.- Sistema de extracción de aceite esencial por arrastre de vapor.

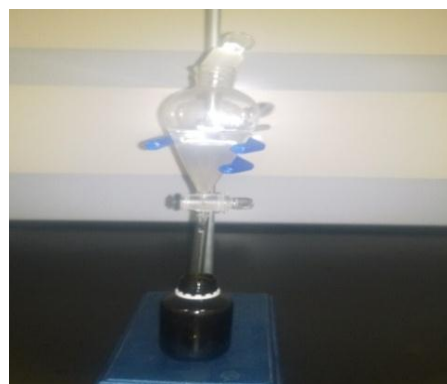


Figura 12.- Técnica de separación del aceite esencial por densidades.

6.4.- Cepas utilizadas

Las cepas utilizadas fueron 11 aislados clínicos de pacientes con diagnóstico de candidiasis vaginal y NIC (Tabla 4)

Numero	Numero interno de cepa
1	1
2	5
3	7 (cepa de referencia)
4	8
5	10
6	11
7	12
8	13a
9	16
10	17
11	18

Tabla 4.- Aislados clínicos de *Candida albicans* de mujeres con neoplasia intraepitelial cervical utilizados

6.5.- Caracterización del aislado clínico de referencia

Para la caracterización del aislado clínico de referencia se realizó la prueba de tubo germinal en plasma fresco. Se tomó una colonia de *Candida albicans* que fue crecida previamente en medio YPD solido por 24 horas a 37°C , la colonia se inoculo en 1ml de plasma fresco que se incubo a 37°C durante 3 horas (Incubadora Wiseven[®] modelo: WOF-105); Posteriormente las células se observaron en un microscopio de campo claro con un aumento de 40x. (Microscopio Carl Zeiss[®] modelo: Primo star)

Se realizó una prueba enzimática en CHROMagar Candida[®] en donde se estrieron de manera independiente cada aislado clínico y se incubaron a 37°C durante 48 horas, posteriormente se observó y registro el cambio de color de las colonias. El color esperado para *Candida albicans* fue verde claro a mediano, azul verdoso a azul metálico para *Candida tropicales*, rosado claro con borde blancuzco para *Candida krusei* y color crema, rosado o malva de claro a oscuro para *Candida glabrata*.

6.6.-Condiciones de crecimiento de *Candida albicans*

Las cepas se crecieron en medio YPD líquido por 48 horas a una temperatura de 28°C a 120 revoluciones por minuto (RPM) para obtener cultivos en fase estacionaria. El medio de cultivo YPD contiene extracto de levadura 10g/L, peptona de caseína 20g/L y dextrosa 20g/L. Cuando a se requirió de medio YPD solido se adiciono agar 20g/L.

6.7.- Determinación de concentración mínima inhibitoria y letal del aceite esencial sobre *Candida albicans*

A partir de un cultivo en fase estacionaria se inoculo la cepa a 1OD_{600nm} en 10ml de YPD líquido y se agregaron las diferentes concentraciones en cada uno de los tubos en el siguiente orden 5µl, 30µl, 35µl, 36µl, 37µl, 39µl, 40µl, 50µl y 100µl de aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray, ademas se adicionando 125µl

(1.25%) de Dimetil sulfoxido (DMSO) como disolvente del aceite esencial y e incubaron por 24 horas a 28°C a 120 RPM. En el ensayo se incluyó como control a *Cándida albicans* crecida con DMSO al 1.25%, sin aceite esencial y en otros 3 tubos *Cándida albicans* y diferentes concentraciones de agua floral, el primero con 8µl, el segundo con 16µl y el ultimo con 32µl.

Transcurridas las 24hrs se ajustó nuevamente a 1OD_{600nm} en un mililitro de agua destilada estéril, enseguida se lavaron las células y se centrifugaron a 13,000 RPM por 30 segundos, se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendio en 1ml de agua destilada estéril. Se realizaron microdiluciones seriadas en una placa de 96 pozos las cuales se gotearon inmediatamente en cajas de Petri con medio YPD agar y se colocaron en incubación a 28°C por 48 horas, se tomaron fotografías en dos tiempos a las 24 y 48 horas y se registraron los resultados encontrados.

6.8.- Confrontación de la concentración mínima inhibitoria y letal del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray en aislados clínicos de *Candida albicans* de mujeres con neoplasia intraepitelial cervical.

A partir de los cultivos de los aislados clínicos en fase estacionaria, se calculó la cantidad necesaria de cada preinoculo para ajustar la concentración de 1OD_{600nm} en 10ml de medio YPD líquido. Se inocularon 3 tubos de ensayo con 10ml de medio YPD líquido por aislado clínico, uno de ellos solo con *Candida albicans* como control de crecimiento, uno más con 30µl de aceite esencial (concentración mínima inhibitoria) donde inicia la sensibilidad de *Candida albicans* al aceite esencial y un último con 40µl de aceite esencial (concentración mínima letal) concentración mínima requerida en donde se observó un efecto fungicida. A éstos dos últimos de les adiciono 125µl de DMSO como disolvente y se colocaron en incubación a 28°C a 120 RPM por 24 horas. Posteriormente se realizaron ensayos de microdilución y fueron sembrados en cajas de YPD agar y se colocaron en incubación a 28°C por 48 horas, tiempo en el cual se tomaron fotografías del crecimiento a las 24 horas y 48 horas.

6.9.- Efecto del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray sobre la morfología de *Candida albicans*

6.9.1.- Obtención del plasma

Se realizó una venopunción a tres personas previo consentimiento informado, obteniendo 16ml de sangre por cada una de ellas, la sangre se centrifugo a 3,500 RPM por 10 min y una vez separados los elementos formes el plasma se recuperó en tubos Eppendorf y se colocó 1ml de plasma por tubo, como producto final se obtuvo cuatro tubos Eppendorf con 1 ml de plasma por cada una por persona.

6.9.2.- incubación de *Candida albicans* con el aceite esencial

A partir de un cultivo de fase estacionaria se tomó la cantidad necesaria para tener $1OD_{600nm}$ en 1 mililitro de plasma y se colocó en un tubo con la $3\mu L$ de aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray (concentración mínima inhibitoria encontrada en el aislado de referencia) y también se preparó otro tubo más pero con $4\mu L$ de aceite esencial (concentración en donde se observó un efecto fungicida en el aislado de referencia), a ambos tubos se les adiciono $12.5\mu l$ de DMSO como disolvente y como controles se incluyó un tubo con *Candida albicans* sin aceite esencial y un último con *Candida albicans* y DMSO al 1.25% sin aceite esencial.

Los tubos obtenidos se pusieron en incubación a $37^{\circ}C$ por 3 horas, ya concluido este tiempo se llevaron a centrifugación a 13,000 RPM por 30 segundos y se descartó el sobrenadante, la pastilla obtenida se resuspendio en 1ml de aguas destilada estéril y posteriormente la preparación se observó mediante un microscopio de campo claro a un aumento de 40x.

6.9.3.- Cuantificación de levaduras e hifas

La cuantificación de las levaduras e hifas se realizó en la cámara de Neubauer y se visualizó en un microscopio de campo claro con un objetivo 40x.

La cuantificación se realizó utilizando el cuadro central (Figura 13) de la cámara de Neubauer y contabilizando 5 de los cuadros medianos (Figura 14) discriminando el número de levaduras así como de hifas para obtener el valor porcentual del cambio morfológico.

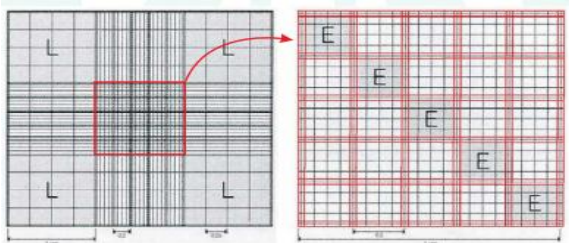


Figura 13.- Cuadro grande central de la cámara de Neubauer:

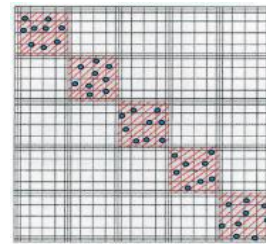
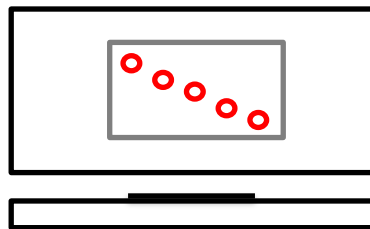


Figura 14.- Ejemplo de recuentos por grupos en cámara de Neubauer

Ejemplo:



Levaduras Hifas

15	2
20	0
<u>10</u>	<u>1</u>
45	3

$$\frac{45}{45 + 3} = \frac{45}{48} = 0.93 \longrightarrow \text{El 93\% son levaduras y el 7 \% hifas}$$

VII.-RESULTADOS

7.1.-Caracterizacion del aislado clínico

Se caracterizó el aislado clínico de referencia mediante la prueba de filamentacion precoz y la prueba bioquímica con CHROmagar *Candida* donde se observa que el aislado de referencia formo tubo germinal (Figura 15) y mostro un color verde claro en CHROmagar *Candida* probando de esta manera que el aislado de referencia se trata de *Candida albicans* (Figura 16).



Figura 15.- Producción de tubo germinal o filamentación precoz por *Candida albicans*

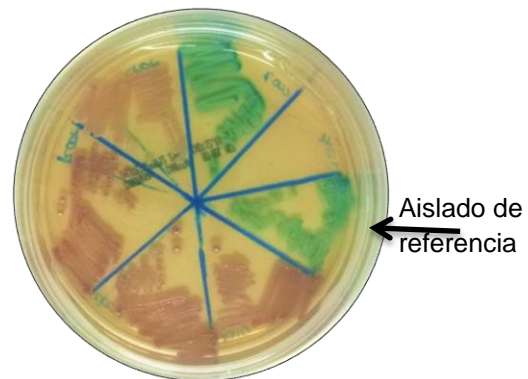


Figura 16.- Crecimiento de la cepa en CHROmagar *Candida albicans*.

7.2.-Aceite esencial obtenido de las extracciones por arrastre de vapor

Se realizaron 36 extracciones por arrastre de vapor de materia vegetal de *Chrysactinia mexicana* Gray donde se obtuvo un rendimiento de 500µl/50g de aceite esencial con una densidad de 841.8mg/cm³, y cumple con las características de densidad, color y olor.

7.3.-Ensayos de control de crecimiento de *Candida albicans* con DMSO y agua floral

Se observó que no existe efecto sobre el crecimiento de *Candida albicans* con el DMSO al 1.25% (Figura 17) así como en los diferentes volúmenes de 8 μ l, 16 μ l, 32 μ l de agua floral utilizadas (Figura 18).

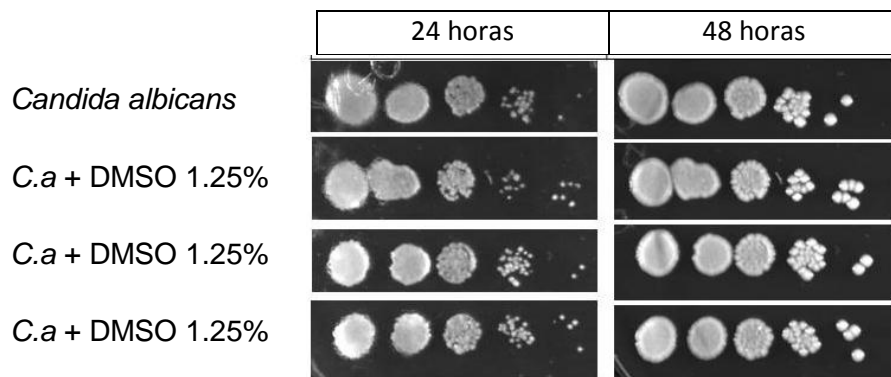


Figura 17.- Crecimiento de *Candida albicans* en presencia de DMSO al 1.25%.

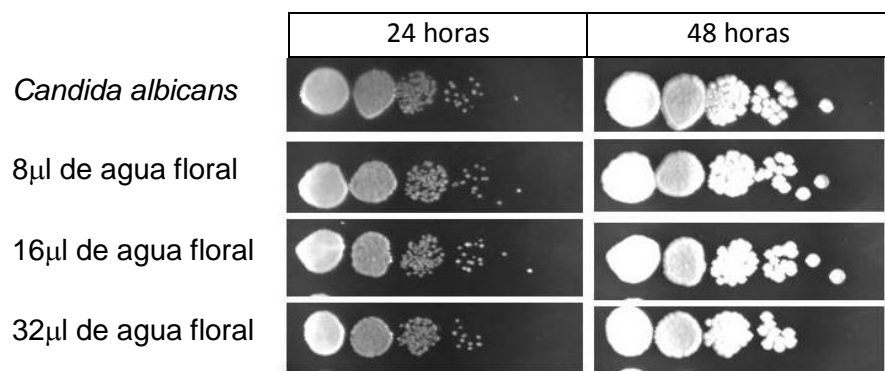


Figura 18.- Crecimiento de *Candida albicans* en presencia de diferentes concentraciones de agua floral.

7.4.- Concentración mínima inhibitoria y letal del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray sobre *Candida albicans*

Las concentración del aceite esencial donde el total de las células de *Candida albicans* no muestran crecimiento, corresponde a la concentración mínima letal de 40µl (Figura 19 y 20). La concentración mínima inhibitoria encontrada es de 30µl del aceite esencial, en donde se observa que inicia el efecto de este sobre el crecimiento de *Candida albicans* (Figura 20). En las concentraciones de 35µl, 36µl, 37µl, 39µl del aceite esencial tiene un efecto gradual en la disminución de crecimiento de *Candida albicans* dependiente de concentración (Figura 21).

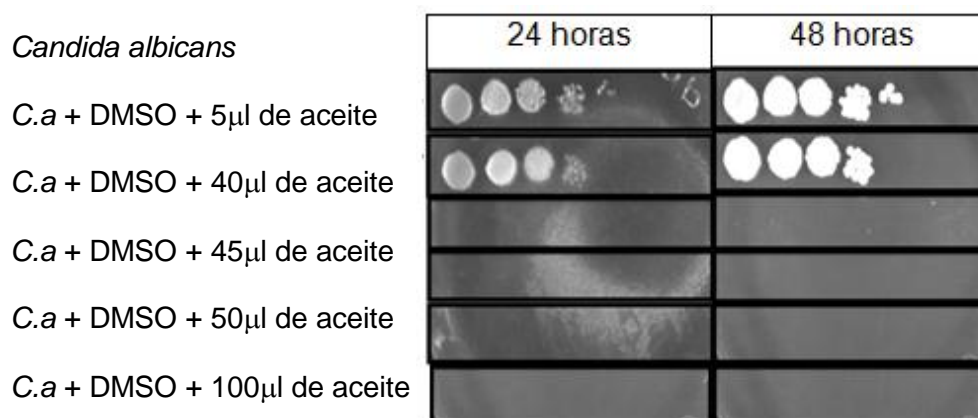


Figura 19.- Efecto letal del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray sobre crecimiento de *Candida albicans*.

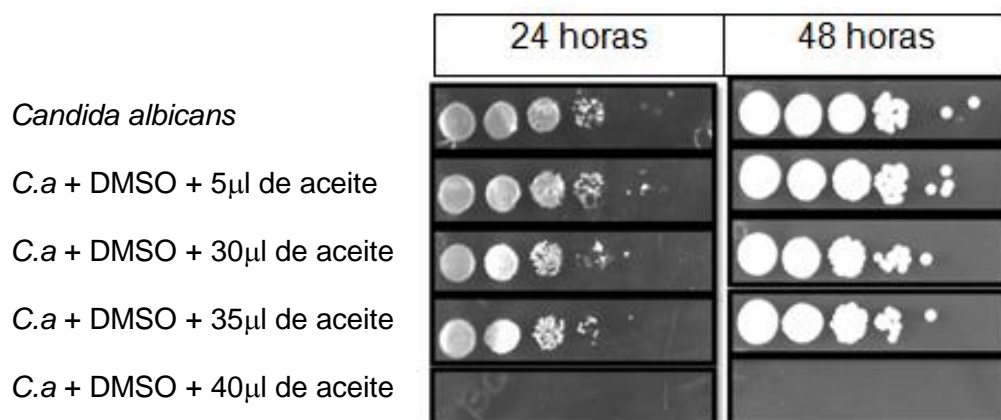


Figura 20.- Disminución de crecimiento de *Candida albicans* en presencia del aceite esencial.

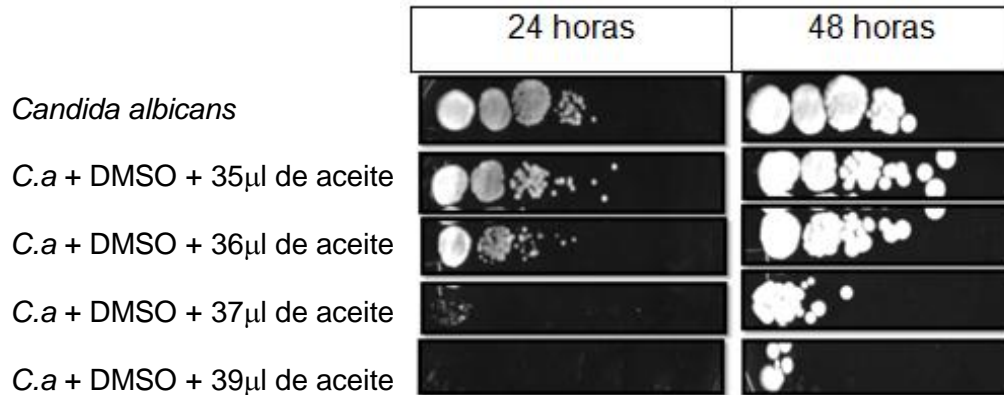


Figura 21.- Efecto en el crecimiento de *Candida albicans* en presencia del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray.

7.5.- Efecto del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray sobre aislados clínicos de *Candida albicans* de mujeres con neoplasia intraepitelial cervical.

Los aislados clínicos muestran el mismo crecimiento en presencia del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray a una concentración de 30µl y 40µl a las 48hrs (Figura 22 y 23); solo se observa en los aislados clínicos 11, 12, 16 y 17 un discreto efecto en la disminución de crecimiento en la concentración de 40µl a las 48hr en la dilución -3.

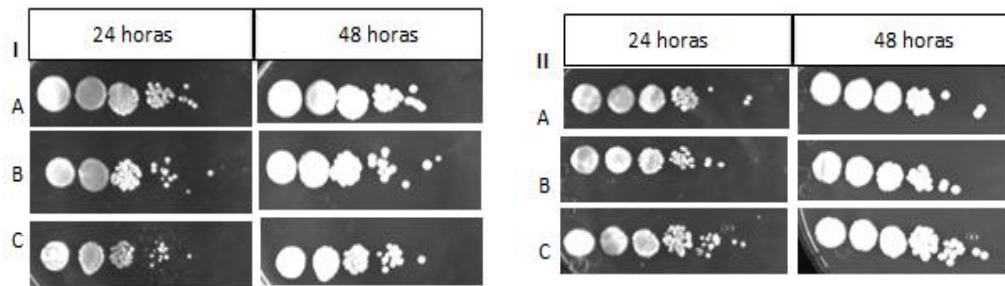


Figura 22.- Efecto en el crecimiento de aislados clínicos en presencia de aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray. Panel: I aislado clínico (1), II aislado clínico (5), Líneas: (A) sin aceite esencial, (B) 30µl de aceite esencial y (C) 40µl de aceite esencial. Crecimiento de 24 y 48 horas.

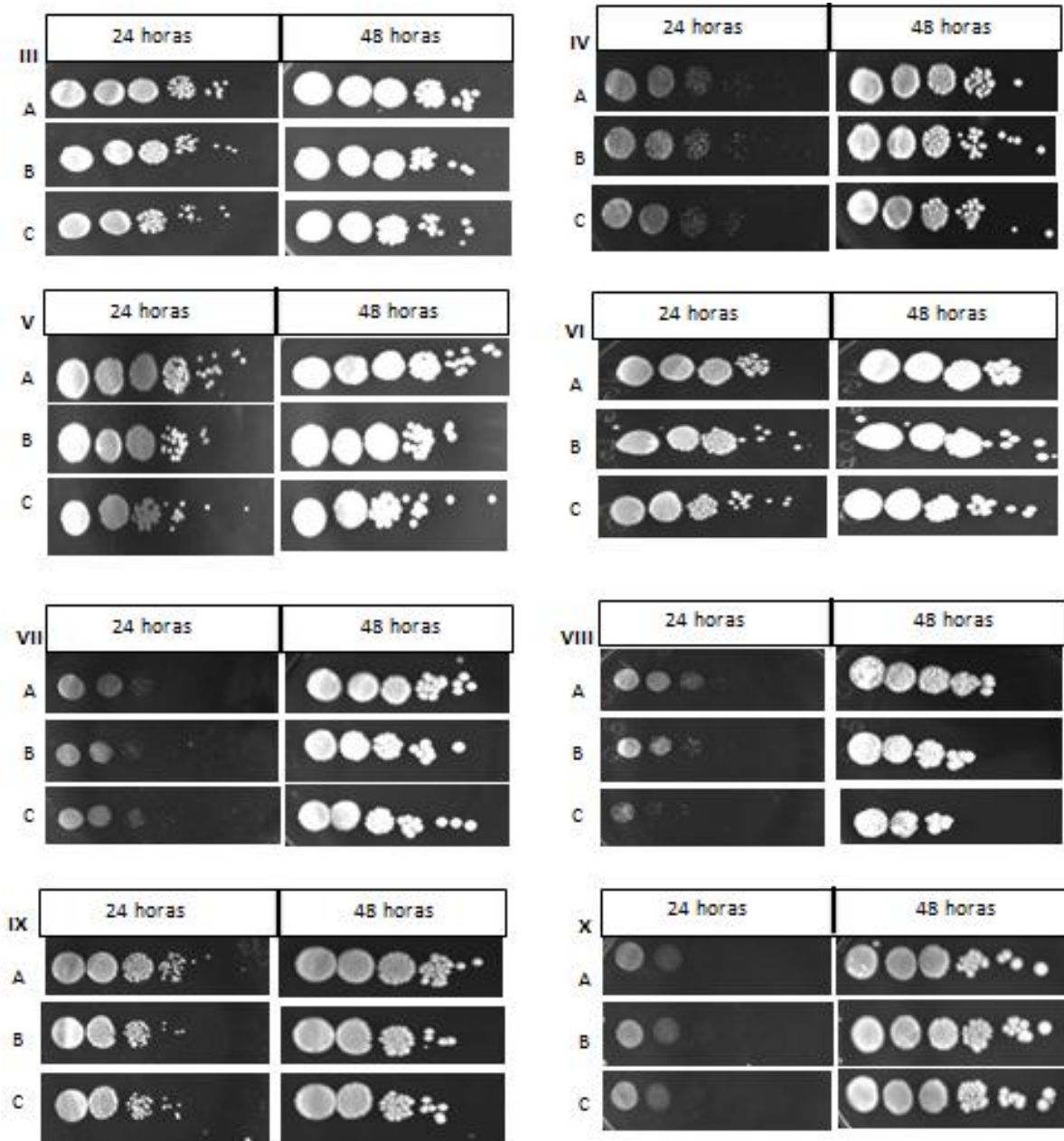


Figura 23.- Crecimiento de aislados clínicos en presencia de aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray. Panel: III aislado clínico (8), IV Aislado clínico (10), V aislado clínico (11), VI aislado clínico (12), VII aislado clínico (13a), VIII aislado clínico (16), IX aislado clínico (17), X aislado clínico (18). Líneas: (A) sin aceite esencial, (B) 30µl de aceite esencial y (C) 40µl de aceite esencial. Crecimiento de 24 y 48 horas.

7.6.- Efecto del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray sobre la morfología de *Candida albicans*

El aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray, tiene efecto inhibitorio sobre la formación del tubo germinal en la cepa de referencia de *Candida albicans* en la concentración mínima inhibitoria en un 99.4% y en la concentración mínima letal es del 100%. (Figura 24 C y D). El DMSO al 1.25% no tiene efecto en el cambio de la morfología de *Candida albicans*. (Figura 24 A y B)

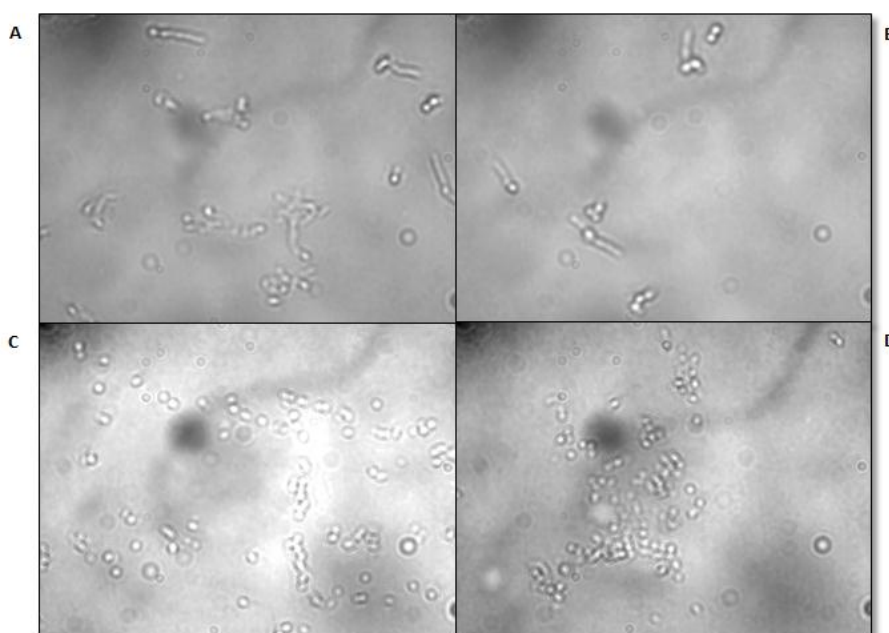


Figura 24.- Crecimiento de tubo germinal en presencia de aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray. Panel: (A) *Candida albicans* sin aceite esencial, (B) *Candida albicans* con 1.25% de DMSO, (C) *Candida albicans* con la concentración mínima inhibitoria del aceite y (D) *Candida albicans* con la concentración mínima letal del aceite.

VIII.-DISCUSIÓN

La capacidad de *Candida albicans* para infectar está respaldada por una amplia gama de factores de virulencia, que incluyen la transición morfológica de levadura a hifa, la expresión de adhesinas e invasinas en la superficie celular, la formación de biofilm, la conmutación fenotípica, la secreción de enzimas hidrolíticas, la rápida adaptación a las fluctuaciones en el pH, flexibilidad metabólica, potente sistema de adquisición de nutrientes y mecanismos de respuesta robustos⁴. Por lo anteriormente mencionado los tratamientos terapéuticos actuales están enfocados en el control de crecimiento y el bloqueo del cambio morfológico, tal como la formación de hifas.

Las hifas son un factor importante en la invasión de tejidos del huésped, esto debido a la capacidad de adherirse a las células epiteliales y endoteliales. Además el crecimiento de la forma filamentosa favorece en la penetración de la célula o tejido ya que la hifa es idónea para abrir la brecha entre las barreras tisulares gracias a que su punta se secretan enzimas capaces de degradar proteínas, lípidos y otros componentes celulares, esto facilita su infiltración en sustratos sólidos y tejidos. Por lo anterior en los últimos años la inhibición de este mecanismo biológico se ha convertido en un blanco de interés, dichas investigaciones se centran en el uso de diferentes ingredientes activos contra esta especie del género *Candida*⁵¹.

En la presente investigación se observó que tras la utilización del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray contra *Candida albicans* el cambio dimórfico de ésta levadura es inhibido en su totalidad y por consiguiente la capacidad invasiva de este patógeno podría disminuir, este hallazgo cobra gran importancia como una nueva propuesta para continuar estudiando este fenómeno y así generar bases científicas que puedan tener una futura aplicación en control y tratamiento de infecciones causadas por *Candida albicans*.

Por otro lado si bien la mayoría de las mujeres están expuestas a candidiasis esporádica así como recurrente a pesar de no tener ninguno factor de riesgo, el porcentaje de padecer Candidiasis vaginal en las mujeres con un diagnóstico de NIC aumenta considerablemente, ya que el daño al epitelio cervical causado por los diferentes serotipos del VPH, crea un ambiente favorable para la proliferación e invasión de patógenos oportunistas, tal es el caso de *Candida albicans*, por lo tanto es importante poner especial atención a este grupo de mujeres susceptibles y así poder aplicar medidas de prevención y control de infecciones fúngicas, reduciendo los índices de morbilidad y mortalidad en los pacientes de alto riesgo.

Un hallazgo notable en esta investigación, fue el hecho de que la gran mayoría de los aislados clínicos de mujeres con candidiasis y NIC, no mostraron una susceptibilidad al aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray cuando se utilizaron las concentraciones mínimas inhibitorias y letales delimitadas en el aislado de referencia, si bien es sabido los aislados clínicos en comparación con las cepas de laboratorio, pueden reflejar la expresión de factores de virulencia y/o patogenicidad por un mayor tiempo en comparación con estas, por lo cual los resultados encontrados en esta investigación no son indicativos de un nulo efecto del aceite esencial, si no la necesidad de probar una mayor concentración del mismo en ensayos posteriores.

El efecto fungicida encontrado en la cepa de referencia podría estar dado por alguno(s) de los 30 compuestos del aceite esencial que se conoce de *Chrysactinia mexicana* Gray por cromatografía de gases y espectrofotometría de masas, en donde los tres en mayor concentración son eucalyptol con 41.3%, piperitona con 37.74% y linalyl acetato con 9.08%; de igual manera estos tres han sido probados contra *Aspergillus flavus* en donde únicamente la piperitona inhibió efectivamente el crecimiento micelial y una completa inhibición de crecimiento se observó a una concentración de 0.6mg/ml¹⁰.

Otro dato interesante obtenido en este estudio acerca del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray fue el efecto fungicida sobre *Candida albicans*, en contraste con lo reportado por Salazar Aranda en 2011⁹, donde no se observó

ningún efecto sobre esta especie con extractos metanólicos derivados *Chrysactinia mexicana* Gray de la planta nativa de Nuevo León, por lo que es importante de mencionar que los derivados de las plantas extraídos por diferentes métodos e incluso entre aceites esenciales, las características varían significativamente por las diferencias que existen entre las distintas especies de plantas y quimiotipos, la procedencia geográfica, estación del año y el procedimiento de extracción⁵², estas diferencias pueden ser extremadamente importantes y cambiar completamente las propiedades químicas o biológicas de un aceite esencial.

Dentro de los hallazgos encontrados en los aceites esenciales se encuentra el efecto antifúngico que algunos de ellos poseen; tal es el caso de *Melaleuca alternifolia* que demostró ser eficaz contra *Candida albicans*, *Candida glabrata* y *Saccharomyces cerevisiae*⁵³, el aceite esencial de *Cymbopogon nardus* con un efecto antifúngico contra diferentes especies del género *Candida*⁵¹, *Satureja montana*, *Origanum*,⁴⁸ por hacer mención de algunas.

De forma particular al aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray se le han atribuido diversas aplicaciones donde las más evidentes son, la acción insecticida de extractos ligeramente polares; acción antifúngica por compuestos tales como piperitona; ligera acción estrogénica por cetosteroides; amebicida y la acción antibacteriana de los flavonoides como flavan, 3-oles, ácido gálico y taninos galicos; acción antidiarreica por taninos gálicos (astringentes) y pectinas (absorbentes); acción expectorante por eucaliptol, y la acción antioxidante de los flavonoides (hepatoprotectores)⁵⁰.

Si bien los mecanismos de acción de los aceites esenciales no están claramente descritos y considerando la gran variedad de compuestos químicos que contienen, es muy probable que su actividad antimicrobiana no sea atribuible a un mecanismo específico, sino a la acción combinada de varios de ellos sobre distintas localizaciones de la célula. En el caso de bacterias Gram negativas sensibles, así como de las Gram positivas se reporta que los aceites esenciales se introducen a través de los lípidos de la membrana celular y mitocondrial, alterando

su estructura y haciéndolas más permeables, como consecuencia tiene lugar una fuga de iones y de otros contenidos celulares lo que puede llevar a la muerte celular.⁵⁴

Burt y Reinders propusieron que los aceites esenciales (oregano, tomillo y clavo, entre otros) ejercen su efecto antimicrobiano sobre fosfolípidos de membrana celular de las bacterias, provocando la formación de poros y afectando la permeabilidad de la membrana⁵⁵. Los componentes de los aceites esenciales también parecen actuar sobre las proteínas de las células que se encuentran embebidas en la membrana citoplasmática, las enzimas ATPasas que se encuentran localizadas en dicha membrana pueden ser alcanzadas por las moléculas lipídicas, viéndose afectada la regulación de energía y la síntesis de componentes estructurales⁵⁴.

Conner y beuchat señalaron que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales en levaduras se debe al daño ocasionado a alguno de los sistemas enzimáticos involucrados en la producción de energía y síntesis de componentes estructurales. Algunos compuestos fenólicos cruzan la membrana citoplasmática e interaccionan con proteínas y enzimas de membrana, causando un flujo opuesto de protones afectando la actividad celular⁵⁶.

Una reciente publicación indican que esta acción antifúngica de aceites esenciales particularmente sobre *Candida albicans* afecta la regulación y la función de importantes enzimas unidos a membrana que catalizan la síntesis del número de componentes principales de polisacáridos de pared celular, tales como beta-glucanos, quitina y manano, perturbando así el crecimiento celular y la morfogénesis.⁵⁷

En un estudio reciente realizado por E. bona y cols, a través de microscopia electrónica se analizó el daño ocasionando por aceites esenciales a *Candida albicans*, se usó aceite esencial de orégano y el efecto que se observó fue en los orgánulos que estaban desorganizados; el núcleo mostró zonas condensadas y una membrana desorganizada; con el aceite esencial de *Satureja montana* se

encontró de igual manera desorganización de orgánulos y núcleo con cromatina no condensada, junto con la presencia de vacuolas autofágicas y a altas concentraciones indujo una disrupción total de los orgánulos celulares y finalmente las células se encogieron; además se originó una reducción significativa en el espesor de la pared celular, particularmente relacionada con la capa fibrilar.⁴⁸

En general los resultados de esta investigación demuestran la eficacia del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray contra *Candida albicans*, inhibiendo el crecimiento así como el cambio morfológico. En estudios futuros la investigación podría ser enfocada en determinar ¿cuál ó cuáles? de los compuestos del aceite esencial es el responsable de los resultados observados, cuales son los mecanismo regulación a nivel genético que están involucrados para la inhibición del cambio morfológico así como su posible mecanismo de acción.

IX.-CONCLUSIONES

El aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray posee propiedad antifúngica contra *Candida albicans*, además demostró ser capaz de inhibir la formación y proliferación de hifas las cuales son uno de sus principales factores de virulencia convirtiéndolo en un prometedor alternativa de tratamiento contra las infecciones fúngicas causadas por este patógeno.

Los aislados clínicos de *Candida albicans* son resistentes a la concentración mínima letal usada en la cepa de referencia.

X.-PERSPECTIVAS

Conocer los compuestos contenidos en el aceite esencial a través de cromatografía de gases y espectrofotometría de masas ya que el aceite esencial trabajado en esta investigación en comparación con el utilizado por Cárdenas-Ortega y Cols, si incluyó la flor de *Chrysactinia mexicana* Gray.

Dilucidar cuáles de los compuestos del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray son los responsables de los efectos reportados en este trabajo.

Identificar en cuál de las fases del crecimiento de *Candida albicans* se produce el efecto fungicida del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray por lo que se realizaría a través de ensayos en las fases exponencial y logarítmica.

Conocer si existe algún cambio en la morfología de la membrana y/o organelos de *Candida albicans* en las concentraciones mínima inhibitoria y letal obtenidas en este trabajo y se propone realizarlo a través de microscopia electrónica de transmisión.

Pensando en su futura utilización como tratamiento de la infección causada por *Candida albicans* en humanos, es necesario probar el aceite esencial en forma total o solo algunos de sus compuestos en células de mamífero en condiciones *in vitro* e *in vivo* para conocer su citotoxicidad.

XI.- REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. Carrizo Paine M. Patología B. 2013.
2. Jaramillo S. Técnicas de separación de mezclas. 2014 [cited 2016 <http://slideplayer.es/slide/138050/>].
3. Hernando A. Destilación por arrastre de vapor. 2013 [cited 2016 <http://formulacion-quimica.blogspot.mx/2013/03/destilacion-por-arrastre-con-vapor.html>].
4. Mayer FL, Wilson D, Hube B. Candida albicans pathogenicity mechanisms. Virulence. 2013;4(2):119-28.
5. Tageteae T. FLORA DEL BAJÍO Y DE REGIONES ADYACENTES. 2004.
6. Pardi G, Cardozo El. Algunas consideraciones sobre Candida albicans como agente etiológico de candidiasis bucal. Acta odontol venez. 2002;40(1):9-17.
7. Villaseñor JL, Redonda-Martínez MdR. El género Chrysactinia (Asteraceae, tribu Tageteae) en México. Revista mexicana de biodiversidad. 2009;80(1):29-37.
8. López-Ávila K, Dzul-Rosado KR, Lugo-Caballero C, Arias-León JJ, Zavala-Castro JE. Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en Candida albicans. Una revisión. Rev Biomed. 2016;27:127-36.
9. Salazar-Aranda R, Pérez-Lopez LA, Lopez-Arroyo J, Alanís-Garza BA, Waksman de Torres N. Antimicrobial and antioxidant activities of plants from northeast of Mexico. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2011;2011.
10. Cárdenas-Ortega NC, Zavala-Sánchez MA, Aguirre-Rivera JR, Pérez-González C, Pérez-Gutiérrez S. Chemical composition and antifungal activity of essential oil of Chrysactinia mexicana Gray. Journal of agricultural and food chemistry. 2005;53(11):4347-9.
11. Morschhäuser J. The development of fluconazole resistance in Candida albicans—an example of microevolution of a fungal pathogen. Journal of Microbiology. 2016;54(3):192-201.
12. Cheng S, Clancy CJ, Checkley MA, et al. The role of Candida albicans NOT5 in virulence depends upon diverse host factors in vivo. Infection and immunity. 2005;73(11):7190-7.
13. Hernández-Hernández F, Córdova-Martínez E, Manzano-Gayosso P, López-Alvarez R, Bazán-Mora E, López-Martínez R. Frecuencia de micosis en pacientes inmunosuprimidos de un hospital regional de la Ciudad de México. Salud publica de Mexico. 2003;45(6):455-60.
14. García RB, Bonifaz A, Chassin AO, Kuba EB, Araiza J, Cabello RR. Correlación clínico-micológica de la candidiasis vulvovaginal. Ginecol Obstet Mex. 2007;75(2):68-72.
15. López-García A, Ruiz-Tagle A, Pérez-Tlacomulco A, Mauleón-Montero A, Sánchez-Hernández JA, Rivera-Tapia JA. Prevalencia de diversas especies de Candida en mujeres con displasia cervical en un Hospital de la Ciudad de Puebla, México. Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio. 2012;59(2):101-6.
16. Duarte MCT, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VLG, Delarmelina C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. Journal of ethnopharmacology. 2005;97(2):305-11.
17. Moran C, Grussemeyer CA, Spalding JR, Benjamin DK, Reed SD. Comparison of costs, length of stay, and mortality associated with Candida glabrata and Candida albicans bloodstream infections. American journal of infection control. 2010;38(1):78-80.
18. Klevay MJ, Ernst EJ, Hollanbaugh JL, Miller JG, Pfaller MA, Diekema DJ. Therapy and outcome of Candida glabrata versus Candida albicans bloodstream infection. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2008;60(3):273-7.
19. Lang G, Buchbauer G. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. Flavour and Fragrance Journal. 2012;27(1):13-39.
20. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils—a review. Food and chemical toxicology. 2008;46(2):446-75.

21. Manohar V, Ingram C, Gray J, et al. Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. *Molecular and cellular biochemistry*. 2001;228(1-2):111-7.
22. Salgueiro LR, Cavaleiro C, Pinto E, et al. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Origanum virens* on *Candida* species. *Planta medica*. 2003;69(09):871-4.
23. Pina-Vaz C, Gonçalves Rodrigues A, Pinto E, et al. Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2004;18(1):73-8.
24. Pinto E, Pina-Vaz C, Salgueiro L, et al. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology*. 2006;55(10):1367-73.
25. Cosentino S, Tuberoso CIG, Pisano B, et al. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian thymus essential oils. *Letters in applied microbiology*. 1999;29(2):130-5.
26. Giordani R, Regli P, Kaloustian J, Mikail C, Abou L, Portugal H. Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. *Phytotherapy Research*. 2004;18(12):990-5.
27. Samson J. Candidosis buccales: Epidémiologie, diagnostic et traitement. *Rev Mens Suisse Odontostomatol*. 1990;100:548-59.
28. Webb BC, Thomas CJ, Willcox MDP, Harty DWS, Knox KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: A review: Part1. Factors influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity. *Australian dental journal*. 1998;43(1):45-50.
29. Odds FC. Pathogenesis of *Candida* infections. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1994;31(3):S2-S5.
30. Mackenzie DWR. Serum tube identification of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Pathology*. 1962;15(6):563-5.
31. Slots J, Taubman MA. *Contemporary oral microbiology and immunology*: Mosby Year Book; 1992.
32. Pierce AM, Pierce Jr HD, Unrau AM, Oehlschlager AC. Lipid composition and polyene antibiotic resistance of *Candida albicans* mutants. *Canadian journal of biochemistry*. 1978;56(2):135-42.
33. Ghannoum MA, Burns GR, Elteen KA, Radwan SS. Experimental evidence for the role of lipids in adherence of *Candida* spp. to human buccal epithelial cells. *Infection and immunity*. 1986;54(1):189-93.
34. Calderone RA, Braun PC. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiological reviews*. 1991;55(1):1-20.
35. Chiochio VM, Matković L. Determination of ergosterol in cellular fungi by HPLC. A modified technique. *The Journal of the Argentine Chemical Society*. 2011;98:10-5.
36. Martínez-Rossi NM, Peres NTA, Rossi A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. *Mycopathologia*. 2008;166(5-6):369-83.
37. González AMR, Castro NMC. Antimicóticos de uso sistémico: ¿ Con que opciones terapéuticas contamos? *Revista CES Medicina*. 2009;23(1):61-76.
38. Catalán M, Montejo JC. Antifúngicos sistémicos. *Farmacodinamia y farmacocinética*. *Revista iberoamericana de micología*. 2006;23(1):39-49.
39. González Saldaña N, Saltigeral Simental P. Guía antimicrobianos, antivirales, antiparasitarios, antimicóticos e inmunomoduladores. 2001.
40. Gutiérrez-Martínez MJ, Araiza-Santibáñez J, Hernández MA, Chávez-Mayol JM, Rodríguez-Piñeyro OM, Bonifaz A. Estudio in vitro de antimicóticos contra cepas de *Candida* aisladas de pacientes del Hospital General de México OD. *Dermatología Revista Mexicana*. 2012;56(2):93-101.

41. Pfaller MA. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *The American journal of medicine*. 2012;125(1):S3-S13.
42. Fidel PL, Sobel JD. Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clinical Microbiology Reviews*. 1996;9(3):335-48.
43. Graterol IJ, Finol HJ, Correnti M. Virus del papiloma humano en lesiones intraepiteliales escamosas (LIE) de cuello uterino: Tipificación y ultraestructura. *Rev Soc Venez Microbiol*. 2006;26(2):89-94.
44. Ferreres I. El pH vaginal en el embarazo. *Matronas profesión*. 2008;9(4):18-20.
45. Sarduy Nápoles MR. Neoplasia Intraepitelial Cervical: preámbulo del cáncer cérvicouterino. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*. 2008;34(2):0-
46. Medina de la Cruz O. Polimorfismo de la metaloproteasa-7 asociado a neoplasia intraepitelial cervical en mujeres potosinas. San Luis Potosí S.L.P. México: Universidad Autónoma de San Luis Potosí; 2015.
47. Peredo-Luna HA, Palou-García E, López-Malo A. TSTS SAAAAAA.
48. Bona E, Cantamessa S, Pavan M, et al. Sensitivity of *Candida albicans* to essential oils: are they an alternative to antifungal agents? *Journal of Applied Microbiology*. 2016;121(6):1530-45.
49. Domínguez XA, Domínguez S, Xa QOE. Limusa-Noriega. México; 1990.
50. Ortega NCC. Biocide effects of *Chrysactinia mexicana* 2011.
51. De Toledo LG, Ramos MADS, Spósito L, et al. Essential Oil of *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle: A Strategy to Combat Fungal Infections Caused by *Candida* Species. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(8):1252.
52. Mandras N, Nostro A, Roana J, et al. Liquid and vapour-phase antifungal activities of essential oils against *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2016;16(1):330.
53. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004;53(6):1081-5.
54. García RM, Palou García E. Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. *Temas selectivos de Ingeniería de Alimentos*. 2008;2(2):41-51.
55. Burt SA, Reinders RD. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157: H7. *Letters in applied microbiology*. 2003;36(3):162-7.
56. Conner DE, Beuchat LR, Worthington RE, Hitchcock HL. Effects of essential oils and oleoresins of plants on ethanol production, respiration and sporulation of yeasts. *International Journal of Food Microbiology*. 1984;1(2):63-74.
57. Braga PC, Dal Sasso M, Culici M, Alfieri M. Eugenol and thymol, alone or in combination, induce morphological alterations in the envelope of *Candida albicans*. *Fitoterapia*. 2007;78(6):396-400.