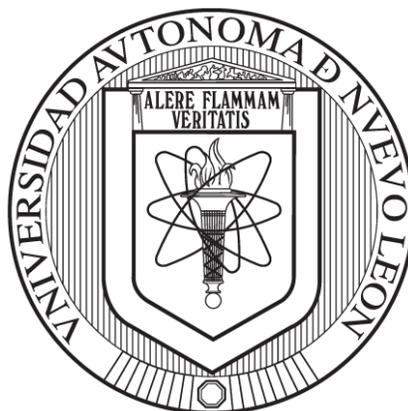


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIFÚNGICO DE EXTRACTOS  
DE MACROMICETOS DEL NORESTE DE MÉXICO  
CONTRA AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE  
HONGOS OPORTUNISTAS**

**Por:**

**Q.B.P. JESÚS ABRAHAM DÍAZ PÁEZ**

**Como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRÍA en  
CIENCIAS con Orientación en Microbiología Médica**

**Noviembre de 2014**

**“Evaluación del efecto antifúngico de extractos de macromicetos del noreste de México contra aislamientos clínicos de hongos oportunistas”**

**Aprobación de la Tesis:**



---

**Dr. med. Lourdes Garza Ocañas**  
Director de Tesis



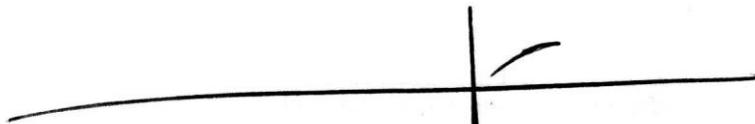
---

**Dr. C. Gloria María González González**  
Co-director de Tesis



---

**Dr. C. María Teresa Zanatta Calderón**  
Miembro de la Comisión



---

**Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado**  
Subdirector de Estudios de Posgrado

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIFÚNGICO DE EXTRACTOS DE  
MACROMICETOS DEL NORESTE DE MÉXICO CONTRA  
AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE  
HONGOS OPORTUNISTAS”

Presentado por: Q.B.P. Jesús Abraham Díaz Páez

Ésta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo Celular del Departamento de Farmacología y Toxicología así como en el Laboratorio de Micología del Centro Regional para el Control de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Microbiología, ambos pertenecientes a la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dr. *med.* Lourdes Garza Ocañas.



---

**Dr. *med.* Lourdes Garza Ocañas**  
**Director de Tesis**

## **DEDICATORIA**

*Con todo mi amor, a los pilares de mi vida: Emilio Díaz Rentería, María Elena Páez Lozano, Gilberto Páez Lozano, Sara Patricia Gutiérrez Gutiérrez, Humberto Gómez y Josefa Ninfa Páez Lozano. Lo mejor de mi vida.*

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres Emilio y María Elena, por todo su apoyo, amor y esfuerzo, por antepoernos a sus hijos ante cualquier necesidad y porque sin sus enseñanzas no hubiera sido posible concluir este reto, cada día los valoro más y más.

A mis tíos Beto, Paty, Ninfa y Humberto, que más que mis tíos, siempre se han comportado como mis segundos padres y han llenado mi vida de momentos inolvidables, mil gracias por todo.

A toda la familia, sobre todo a mis hermanos Juan y Mario, así como a mis primos Chely, Gil, Oly, Mane, Perla, Viri y Fatima; todos, siempre al pendiente de mi progreso tanto profesional como de mi vida diaria.

Al comité de ésta tesis: la Dra. *med.* Lourdes Garza Ocañas, que me brindó la oportunidad de llevar a cabo mis estudios de posgrado sin dejar de formar parte de su departamento, que me ha enseñado muchas cosas profesional y moralmente, por el tiempo que ha invertido en esta investigación de la cual me permitió formar parte y por cuidar que no faltara ningún recurso material para llevarla a cabo; a la Dra. C. Gloria María González González que me acogió como parte de su departamento y me enseñó tantas cosas durante estos dos años y medio, por consentirme, darme tantos ánimos siempre y por tomarse el tiempo para estar al pendiente de este proyecto; y a la Dra. C. María Teresa Zanatta Calderón, por todos sus consejos y seguimiento mientras se llevaba a cabo esta investigación, por el tiempo invertido en revisar mis documentos y por dejar de lado sus actividades para aclararme las dudas cada vez que corría por su ayuda.

A todo el personal del Departamento de Microbiología que me apoyo muchísimo para llevar a cabo este proyecto, especialmente a la Q.C.B. Lydia Oviedo Moreno por brindarme toda su atención y apoyo cada vez que acudía al C.R.C.E.I., a las Químicas Alma Medrano y Carolina Luna que me asesoraron mucho en todas las actividades que hacía ahí y que siempre me apoyaban con el material necesario, desde luego a las secretarías Aida y Mayra que siempre estuvieron al pendiente de mí y me ayudaron muchísimo con cuestiones administrativas, a la Dra. Agustina por el apoyo con el material que le solicitaba y por todo lo que me enseñó en sus clases, a los excelentes profesores el Dr. Palma y el Dr. Rómel por compartir conmigo sus conocimientos, a la Dra. Mariana Elizondo por sus atenciones durante los seminarios y cuando requerí de su apoyo en laboratorio, y por último pero igual de importante, a mis excelentes amigos estudiantes de posgrado: Rita, Byron, Álvaro, Roge, Ale, Liz y Luis, quienes me ayudaron mucho a disfrutar de este posgrado.

A todo el personal del Departamento de Farmacología y Toxicología, especialmente al Q.B.P. Jorge Páez, Dr. C. Christian Badillo y Dr. C. Sandra Montoya por ser tan excelentes amigos y apoyarme muchísimo durante este tiempo, a mis también grandes amigas Adriana Ibarra y Martha Laura Hernández que además me apoyaron muchísimo en la parte experimental de la tesis. A Rosy Martínez por su colaboración y apoyo durante ésta investigación, a la Dr. C. Diana Castillo por asesorarme con las técnicas de

cultivo. A la C. P. Guadalupe Garza y a Gloria Uresti que me facilitaron el material que requerí durante esta investigación, y al M. C. Humberto Garza, por promover que se me diera la oportunidad de estudiar el posgrado, pero sobre todo por enseñarme tantas cosas a lo largo de este tiempo.

A la Dra. C. Licet Villarreal Treviño y la M. C. María Manuela Vela Franco, que a pesar de todos estos años siguen al pendiente de mi vida profesional y que serán siempre para mí un modelo a seguir por su gran calidad ética, moral y profesional.

Al M. F. Jorge Armando Tamayo Escalante, que me apoyó muchísimo durante mis estudios de posgrado, siempre brindándome el ánimo y las palabras necesarias para seguir adelante a pesar de los malos momentos y siempre al pendiente por si necesitaba algo, muchísimas muchísimas gracias!

A todos mis compañeros de la generación con los que viví muchos momentos de alegría y que me ayudaron siempre a sobrellevar los momentos de estrés con una sonrisa en el rostro, especialmente al Q.B.P. Luis Abraham Alonso Rodríguez uno de mis más grandes amigos, que siempre me escucha y que siempre está ahí para mí.

Por último a todas esas personas tan especiales para mí, a mis grandes amigos, que aunque tengo la fortuna de tener muchas personas en mi vida a quienes puedo considerar en este grupo, me gustaría mencionar especialmente a Tavo Mier, Jorge Páez, Sergio Dueñas, Vero de Dueñas, Zule Rincón, Lola Hernández, Diego Galván (Pepe), Abraham Alonso, Carlos Álvarez, Bere Alcalá y Luis Zapata.

A todos, mil gracias!!!

## **TABLA DE CONTENIDO**

CAPÍTULO	Página
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Micosis oportunistas	2
1.1.1 Candidosis	3
1.1.2 Criptococosis	4
1.1.3 Aspergilosis	6
1.2 Tratamientos antimicóticos	7
1.2.1 Tratamientos antimicóticos contra hongos oportunistas	9
1.3 Resistencia	10
1.4 Productos naturales	11
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>16</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>17</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
4.1 Objetivo general	18
4.2 Objetivos específicos	18
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>19</b>

5.1 Colecta e identificación de los macromicetos	19
5.2 Obtención e identificación de los hongos oportunistas	19
5.3 Preparación de soluciones para el medio de cultivo	20
5.4 Preparación de Caldo Melin-Norkrans (preparación para 1 L)	22
5.5 Preparación de Agar Melin-Norkrans (preparación para 1 L)	23
5.6 Cultivo de los macromicetos en Agar Melin-Norkrans	24
5.7 Cultivo de los macromicetos en Caldo Melin-Norkrans	25
5.8 Obtención de biomasa y medio líquido	25
5.9 Extracción metanólica de la biomasa	26
5.10 Extracción del medio de cultivo de macromicetos	27
5.11 Pruebas de susceptibilidad	27
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>30</b>
<b>7. DISCUSIÓN</b>	<b>47</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>52</b>
<b>9. PERSPECTIVAS</b>	<b>53</b>
<b>10. LITERATURA CONSULTADA</b>	<b>54</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1. Cantidad de matraces por macromiceto	30
2. Cantidad de biomasa y extracciones	32
3. Cantidad de extracto y rendimientos	32
4. Conformación de la placa 1 para las pruebas de susceptibilidad	34
5. Conformación de la placa 2 para las pruebas de susceptibilidad	35
6. Resumen de resultados de las pruebas de susceptibilidad	46

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Morfología de los macromicetos en medio sólido	31
2. Morfología de los macromicetos en medio líquido	31
3. Extractos metanólicos	33
4. Pruebas de susceptibilidad del extracto metanólico de <i>C. cyathiformis</i>	36
5. Pruebas de susceptibilidad del extracto de medio de cultivo de <i>C. cyathiformis</i>	37
6. Pruebas de susceptibilidad del extracto metanólico de <i>G. applanatum</i>	38
7. Pruebas de susceptibilidad del extracto de medio de cultivo de <i>G. applanatum</i>	39
8. Pruebas de susceptibilidad del extracto metanólico de <i>P. djamor</i>	40
9. Pruebas de susceptibilidad del extracto de medio de cultivo de <i>P. djamor</i>	41
10. Pruebas de susceptibilidad del extracto metanólico de <i>C. cibarius</i>	42
11. Pruebas de susceptibilidad del extracto de medio de cultivo de <i>C. cibarius</i>	43
12. Pruebas de susceptibilidad del extracto metanólico de <i>L. amarus</i>	44
13. Pruebas de susceptibilidad del extracto de medio de cultivo de <i>L. amarus</i>	45

## ABREVIATURAS

<b>ATCC:</b>	American Type Culture Collection.
<b>CLSI:</b>	Clinical and Laboratory Standards Institute.
<b>g:</b>	Gramo.
<b>h:</b>	Hora.
<b>HPLC:</b>	High Performance Liquid Chromatography.
<b>IHF:</b>	Infecciones causadas por Hongos Filamentosos.
<b>L:</b>	Litro.
<b>M:</b>	Molar.
<b>mg:</b>	Miligramo.
<b>µg/mL:</b>	Microgramo por mililitro.
<b>mL:</b>	Mililitro.
<b>MTCC:</b>	Microbial Type Culture Collection.
<b>nm:</b>	Nanómetro.
<b>PDA:</b>	Agar Papa Dextrosa.
<b>rpm:</b>	Revoluciones por minuto.
<b>SIDA:</b>	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.
<b>UANL:</b>	Universidad Autónoma de Nuevo León.
<b>VIH:</b>	Virus de Inmunodeficiencia Humana.
<b>%:</b>	Por ciento.
<b>% m/v:</b>	Por ciento masa/volumen.
<b>°C:</b>	Grados centígrados.

## RESUMEN

**Q.B.P. Jesús Abraham Díaz Páez**                      **Fecha de Graduación: Diciembre, 2014**  
**Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina**

**Título del Estudio:**            **EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIFÚNGICO DE EXTRACTOS DE MACROMICETOS DEL NORESTE DE MÉXICO CONTRA AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE HONGOS OPORTUNISTAS**

**Número de páginas: 70**

Candidato al Grado de MAESTRÍA en CIENCIAS con Orientación en Microbiología Médica.

**Área de estudio: Microbiología Médica.**

**Propósito y Método de estudio:** Durante las últimas décadas, se ha observado un evidente cambio en los agentes patógenos, los cuales suelen ser más agresivos debido a la implementación de nuevas técnicas y tratamientos que ponen en peligro los mecanismos de defensa del paciente y favorecen el establecimiento de infecciones, con ello, incluso patógenos con escasa virulencia, ahora son capaces de causar serias enfermedades; en este grupo de patógenos, tenemos a los hongos causantes de micosis oportunistas, entre los que destacan los géneros *Candida*, *Cryptococcus* y *Aspergillus*, por su patogenicidad, frecuencia y mortalidad. A su vez, los tratamientos antimicóticos con los que se cuenta en la actualidad tienen múltiples desventajas, como es la resistencia intrínseca o adquirida, las deficiencias farmacocinéticas de los tratamientos y la elevada toxicidad y/o costo de los mismos. Lo anterior ha hecho que la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas, particularmente de origen natural, sea un campo de creciente interés científico. En el presente estudio, se evaluó el efecto antifúngico de extractos de macromicetos del noreste de México contra aislamientos clínicos de hongos oportunistas con el propósito de determinar su potencial como fuente de nuevas moléculas con actividad antifúngica; se recolectaron cinco especies de macromicetos (*C. cyathiformis*, *G. applanatum*, *P. djamor*, *C. cibarius* y *L. amarus*) que crecen en el noreste de México, se cultivaron *in-vitro* y a partir de los cultivos se obtuvieron extractos metanólicos y del medio, los cuales se evaluaron contra aislamientos clínicos de hongos oportunistas de *Candida*, *Cryptococcus* y *Aspergillus*, mediante la técnica de microdilución en placa y en base a las normas M27-A3 y M38-A2 del CLSI, como control se utilizaron las cepas ATCC 22019 de *C. parapsilosis* y ATCC MYA-3626 de *A. fumigatus*. Ninguno de los extractos de las especies evaluadas demostró tener actividad antifúngica contra los hongos estudiados. **Contribuciones y conclusiones:** Si bien diversas especies de macromicetos que crecen en otros países han mostrado tener actividad antifúngica, las especies evaluadas en este estudio no presentaron ésta actividad. Debido a que el uso de la medicina tradicional es común en México, la evaluación de la actividad biológica de los productos naturales es muy importante para establecer sus propiedades farmacológicas o la ausencia de las mismas.

---

Dr. med. Lourdes Garza Ocañas  
Director de Tesis

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

Los hongos han estado en contacto con el hombre desde su origen, en un inicio, es posible que se hayan utilizado como ornato y/o alimento, llegándose a considerar como “alimento sagrado” por algunas culturas. Hasta el siglo XVIII los únicos hongos conocidos fueron los macromicetos o setas, pero gracias a la creación del microscopio por Leeuwenhoek, se nos ha permitido asomar al mundo no perceptible por el ojo humano; con ello, se encontró el vasto grupo de los hongos microscópicos, con los que el hombre ha obtenido múltiples beneficios (como algunos antibióticos), pero también, se amplió el panorama hacia aquellos que son patógenos para él, los animales, las plantas y los insectos. En general, se pueden mencionar los siguientes grupos de hongos: 1) Ornamentales, 2) Alimenticios, 3) Tóxicos, 4) Alucinógenos, 5) Medicinales, 6) Contaminantes y 7) Patógenos; en esta investigación nos enfocaremos principalmente en los grupos 5 y 7 <sup>(5)</sup>.

Se estima que en total existen más de 1.5 millones de especies de hongos, de los cuales sólo entre aproximadamente 100 y 300 especies, se han asociado con enfermedades en el humano, en su mayoría, como agentes causales de micosis raras, ya que pocos son patógenos relativamente comunes <sup>(12, 20, 32)</sup>.

## **1.1 Micosis oportunistas.**

Durante las últimas décadas, se ha observado un evidente cambio en los agentes patógenos; los nuevos tratamientos con modalidades más agresivas, suelen poner en peligro los mecanismos de defensa, lo que favorece que incluso hongos con escasa virulencia intrínseca, se introduzcan en el cuerpo y causen serias enfermedades. Los hongos se comenzaron a ubicar entre los principales patógenos, una vez que se comenzaron a emplear las estrategias para combatir las infecciones causadas por bacterias, los agentes etiológicos más comunes; para el 2011, tanto levaduras como hongos filamentosos se ubicaban entre los 10 patógenos aislados más comúnmente de pacientes de la Unidad de Cuidados Intensivos <sup>(32)</sup>.

Bonifaz (2010) clasifica las micosis en cuatro grupos principales: 1) Las micosis superficiales, que afectan la piel y sus anexos (uñas y pelo); 2) Las micosis subcutáneas, que afectan capas más internas de la piel y algunos órganos; 3) Las micosis profundas o sistémicas, que pueden llegar a afectar todo el organismo; y 4) Las micosis causadas por hongos oportunistas, que son producidas por hongos saprobios inoos, que en condiciones normales no generan enfermedad. En este último grupo, se encuentran las micosis causadas por especies de los géneros *Candida*, *Aspergillus* y *Cryptococcus*, reportados por Horn y cols. (2012) como los géneros de hongos patógenos más importantes.

### 1.1.1 Candidosis.

*Candida* se ha planteado como el prototipo del hongo colonizante, debido a que al formar parte de las microfloras de la orofaringe, el intestino, entre otras, puede pasar desapercibido; sin embargo, alteraciones en el equilibrio de estas microfloras (por emplear antibióticos de amplio espectro, por ejemplo) pueden desencadenar un crecimiento descontrolado de éstas levaduras, por lo que se ha convertido en el género más común de hongos patógenos y sigue siendo amenazador <sup>(32)</sup>.

Es cada vez más aceptado que el intestino es la mayor fuente de candidosis diseminada, llegando incluso a reconocer que la colonización gastrointestinal es el factor de riesgo más importante para adquirir candidosis. Esta micosis, tiende a desarrollarse en etapas tempranas de un tratamiento, por lo que solamente el 10 % de las infecciones surgen una vez que el paciente ha salido del hospital <sup>(32)</sup>.

Como se mencionó anteriormente, las levaduras de *Candida* son causa frecuente de morbilidad y mortalidad en infecciones adquiridas dentro de nosocomios. Éste género ocupa el 4° lugar en aislamientos de sangre en los Estados Unidos, mientras que en Europa se ubica entre el 4° y el 7° lugar. En múltiples estudios llevados a cabo en Brazil y México, se encontró que el 4% de las infecciones sanguíneas nosocomiales eran causadas por especies de éste género. *Candida albicans* es la especie más común, seguida por *C. glabrata* en Estados Unidos, mientras que en América Latina las especies más importantes después de *C. albicans* son *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*; *C. tropicalis* es usualmente aislada de pacientes inmunocomprometidos, mientras que *C. parapsilosis* se ha asociado principalmente a catéteres infectados debido a que tiene la facultad de

formar biofilms, *C. parapsilosis* también ha cobrado una gran relevancia, inclusive por arriba de *C. albicans*, como patógeno de neonatos en la unidad de cuidados intensivos. Incluso en algunos reportes, se menciona que pese a que para los 80's la principal especie causante de fungemias era *C. albicans*, para los 90's las especies *no-albicans* fueron desplazando a este patógeno <sup>(17, 32, 33)</sup>.

Se han reportado tasas de mortalidad de alrededor de 40 % para las candidosis; en reportes de Brazil, México, Argentina, Chile, Colombia y Costa Rica las tasas de mortalidad fluctúan entre el 20 y el 63 %. Inclusive, se han llegado a reportar tasas de mortalidad más bajas en brotes causados por *C. parapsilosis*; sin embargo, éstas varían dependiendo de la edad, por ejemplo: 24-34 % en neonatos de cuidados intensivos, 43 % en niños menores de un año, 23 % en niños de 1-12 años y 40-63 % en adultos <sup>(33)</sup>.

### **1.1.2 Criptococosis.**

La criptococosis es una micosis causada por un complejo grupo de basidiomicetos levaduriformes; éste complejo, conocido como *Cryptococcus neoformans*, está integrado por las variedades: 1) *C. neoformans* var *neoformans*, la cual es ubicua; 2) *C. neoformans* var *gattii*, que es endémica de zonas tropicales y subtropicales y se observa normalmente en pacientes inmunocomprometidos y 3) *C. neoformans* var *grubii*, la más común causante de criptococosis. Es necesario mencionar que en algunos reportes, se considera a la variedad *gattii* como una especie emparentada pero ajena al complejo <sup>(8, 22, 33)</sup>.

Esta micosis, es la principal causa de meningoencefalitis fúngica a nivel mundial y afecta tanto a individuos inmunocompetentes como inmunocomprometidos; se ha reportado como la cuarta infección más común en pacientes con SIDA. Además, puede causar otros cuadros clínicos, como fungemia, neumonía, lesiones de hueso, de piel y de tejidos blandos. En América Latina, la meningoencefalitis es la presentación clínica más común, con un 85% de los casos causados por *C. neoformans* y asociada a infección por VIH en un 80% de los casos <sup>(8, 9, 22, 33)</sup>.

Datos epidemiológicos recientes de la Organización Mundial de la Salud, indican que se presentan más de 1 millón de casos de infección criptocócica cada año en pacientes infectados por VIH en África, lo cual desencadena la muerte de más de 600,000 personas al año <sup>(29)</sup>.

La incidencia de meningitis criptocócica varía de acuerdo a la población bajo estudio. En Rio de Janeiro, la incidencia fue de 0.3 por cada 100,000 habitantes en 2002, incrementándose para 2003 a 0.68. En Colombia, se determinó una incidencia de 0.24 por cada 100,000 habitantes, sin embargo, para pacientes con VIH fue de 3 por cada 100,000 habitantes. La prevalencia de meningitis en México se encuentra entre el 7 y el 11% en pacientes con VIH, con una tendencia a decrecer en los últimos años. Algunos estudios reportan a *Cryptococcus* como la 4<sup>a</sup> o 5<sup>a</sup> levadura más común en hemocultivos; en algunos casos, más común que *C. glabrata* <sup>(33)</sup>.

En un estudio Ibero-Americano multicéntrico llevado a cabo en 2003, se colectaron 340 cepas de humanos, animales y suelo, y se encontró que *C. neoformans* var *grubii* fue la

más común (56-93.3%). Mientras que *C. neoformans* var *neoformans* fue la más común en México, Guatemala, Venezuela, Brazil, Colombia, Perú, Chile y Argentina (con un 45-93.3%). La mayoría de los casos de criptococosis (75-95%) se presentan en hombres jóvenes (<40 años) infectados por VIH. En este subgrupo, *C. neoformans* var *grubii* es el patógeno encontrado más frecuentemente <sup>(33)</sup>.

La criptococosis es la segunda causa de muerte como resultado de una infección fúngica en América Latina. Es de interés mencionar que las tasas de mortalidad en África y América Latina son inaceptablemente elevadas (31-75%) comparadas con un 20% para los países desarrollados <sup>(33)</sup>.

### **1.1.3 Aspergilosis.**

Las infecciones causadas por hongos filamentos (IHF) se han descrito ampliamente en pacientes con neoplasias sanguíneas, trasplantes (especialmente de médula ósea), diabetes y pacientes bajo tratamientos crónicos con altas dosis de esteroides. En América Latina, se ha descrito que las IHF son causadas, en más del 90% de los casos, por *Candida* y *Aspergillus*. Después de *Candida*, las especies de *Aspergillus*, *Fusarium* y los agentes causales de la mucormicosis, son los patógenos más importantes en cuanto a IHF se refiere. En América Latina, la aspergilosis broncopulmonar se ha reportado como la tercera causa de micosis profundas <sup>(6, 32, 33)</sup>.

Las especies de *Aspergillus* son patógenos aéreos que se introducen por la cavidad nasal hacia los senos paranasales para introducirse posteriormente hacia el sistema respiratorio inferior, mismo que suele constituir el principal puerto de entrada de este patógeno <sup>(32)</sup>.

*Aspergillus* es la causa más común de IHF en pacientes con trasplante de médula ósea en América Latina, y es la segunda más común en trasplantes de órganos. La especie más común en aspergilosis es *A. fumigatus*, con la presentación clínica pulmonar como predominante, seguida por sinusitis <sup>(6, 33)</sup>.

La mortalidad por aspergilosis varía de un 30 a un 83%; sin embargo, en América Latina es de más del 70%, especialmente en pacientes con trasplante de médula ósea <sup>(33)</sup>.

## **1.2 Tratamientos antimicóticos.**

La era de los tratamientos sistémicos antifúngicos realmente efectivos, comenzó con la introducción del desoxicolato de Anfotericina B en 1958 por Squibb Laboratories, esto después de exhaustivos intentos para desarrollar formulaciones orales biodisponibles a partir de más de 200 macrólidos poliénicos producidos por el actinomiceto *Streptomyces*. Éste antimicótico se mantuvo como el tratamiento estándar contra micosis graves durante más de 40 años, pero debido a sus efectos adversos, se continuó con la búsqueda de moléculas igual de efectivas pero menos tóxicas que pudiesen ser administradas tanto por vía intravenosa como por vía oral. Este objetivo se alcanzó 3 décadas después, en 1990, con la introducción del Fluconazol, cuyas características farmacológicas y antifúngicas lo posicionaron como el antimicótico más prescrito contra infecciones por levaduras; lamentablemente, éste antimicótico no es activo contra hongos filamentosos, e incluso, existe resistencia intrínseca entre algunas especies del género *Candida* (como *C. glabrata* y *C. krusei*) por lo que la necesidad de alternativas

de amplio espectro seguía vigente. La introducción del Itraconazol en 1992, resultó en una solución parcial a estas limitaciones del Fluconazol, aunque las formulaciones orales poseían una absorción errática o efectos gastrointestinales adversos <sup>(23)</sup>.

Con la introducción del Voriconazol (2002) y el Posaconazol (2006), triazoles de amplio espectro, se transformó completamente el manejo de las micosis invasivas en pacientes inmunocomprometidos. El Voriconazol demostró ser mucho más efectivo que el tratamiento convencional contra la aspergilosis invasiva (Anfotericina B) y ser un agente útil contra la fusariosis; mientras que el Posaconazol tiene un espectro de actividad que no sólo incluye a *Aspergillus* y *Fusarium*, sino también a los mucorales. Además, ambos agentes pueden ser administrados por vía oral, lo cual amplía su utilidad no sólo para tratar infecciones fúngicas, sino también como agentes profilácticos en pacientes severamente inmunocomprometidos. Desafortunadamente, el aumento en el espectro de actividad de los triazoles, suele venir acompañado de un incremento en la variabilidad de su farmacocinética y en el riesgo de interacciones con otros fármacos. Nuevos triazoles, como el Isavuconazol (actualmente bajo investigación), al parecer cuentan con un espectro de actividad similar al del Voriconazol y Posaconazol, pero con menos variabilidad en cuanto a su farmacocinética y con menos interacciones. Por otra parte, se encuentra el reciente descubrimiento en cuanto a tratamientos antimicóticos, las equinocandinas; éstos lipopéptidos semisintéticos inhiben la síntesis de  $\beta$ -1,3-D-glucano, con lo que se daña la pared celular; éste mecanismo de acción, no afecta las células de mamíferos, por lo que no se han observado efectos tóxicos; sin embargo, las equinocandinas carecen de actividad contra algunas levaduras oportunistas comunes

(como especies de *Cryptococcus*) y algunos hongos filamentosos menos comunes (*Fusarium*, *Scedosporium* y mucorales) <sup>(19, 23, 25)</sup>.

En resumen, a pesar del considerable progreso que se ha observado desde el surgimiento de la terapia antifúngica sistémica en los 50's, los tratamientos antifúngicos actuales están muy lejos de la perfección. Ningún agente antimicótico es apropiado para todos los pacientes con micosis debido a las condiciones en las que se encuentra, hipersensibilidades, riesgos de interacción, inmunosupresión, sitio de infección y al riesgo de infecciones con patógenos que presenten una resistencia intrínseca o adquirida al antimicótico <sup>(23)</sup>.

### **1.2.1 Tratamientos antimicóticos contra hongos oportunistas.**

Las guías de tratamiento recomiendan que la candidosis se trate preferentemente con Anfotericina B o Fluconazol y en algunos casos con Voriconazol. En América Latina, el desoxicolato de Anfotericina B se mantiene como el tratamiento antifúngico más comúnmente utilizado para estas micosis, seguido por el Fluconazol. Mientras que las equinocandinas y otras formulaciones de Anfotericina B son raramente utilizadas debido a su alto costo <sup>(9, 33)</sup>.

Con respecto a la meningoencefalitis criptocócica, se recomienda el uso de Fluconazol, Itraconazol o Anfotericina B combinado con Flucitosina; sin embargo, en América Latina, el 80% de los pacientes son tratados con el desoxicolato de Anfotericina B en combinación con Fluconazol, apreciándose resultados aceptables <sup>(9, 33)</sup>.

Lamentablemente, la terapia contra la aspergilosis está lejos de ser efectiva, debido tanto a las dificultades para su diagnóstico como a la falta de antimicóticos eficaces. El Voriconazol se ha planteado como tratamiento de primera línea para la aspergilosis, ya que ha mostrado mejores resultados que la Anfotericina B, aunque se indica que en pacientes a quienes no se les pueda prescribir Anfotericina B o Itraconazol, se les administre Caspofungina; pese a esto, el desoxicolato de Anfotericina B se sigue utilizando en América Latina, por cuestiones económicas <sup>(9, 33)</sup>.

### **1.3 Resistencia.**

Es importante distinguir entre la resistencia clínica y la resistencia microbiana. La resistencia clínica se refiere al fracaso del tratamiento de una micosis con el antimicótico, ya sea por una deficiencia en el agente antimicótico para arribar al sitio de la infección o a la incapacidad del sistema inmune para erradicar el patógeno, cuyo crecimiento se ha retardado por el antibiótico. Por otra parte, la resistencia microbiana se refiere a la resistencia determinada por pruebas de susceptibilidad *in-vitro*; sus resultados, se utilizan para predecir el posible éxito o fracaso al administrar dicho tratamiento <sup>(9)</sup>.

Con respecto a la resistencia a antimicóticos, para las especies de *Candida*, ésta varía de 1-6% para el Fluconazol; aunque en algunos estudios, se reporta que para *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* es menor a 3%. Por el contrario, para *C. glabrata* y *C. krusei* se ha reportado mucho más resistencia que para otras especies, ubicándose en un 30 y un 70% de resistencia, respectivamente. En el caso de las criptocosis, los estudios de

susceptibilidad antimicrobiana a nivel global, han demostrado que más del 99% de los aislados de *Cryptococcus* son susceptibles a Anfotericina B, Fluconazol y Flucitosina; sin apreciarse diferencia entre distintas regiones geográficas de América Latina. De igual manera, para las aspergilosis, estudios recientes concuerdan con que *A. fumigatus* suele ser susceptible a Itraconazol, Voriconazol y Anfotericina B <sup>(33)</sup>.

#### **1.4 Productos naturales.**

Desde la antigüedad, se han empleado productos naturales para tratar distintas enfermedades humanas. La sociedad actual, ha devuelto la mirada hacia el desarrollo de la “química verde” y el uso sustentable de productos de origen natural. Esta tendencia es aún más evidente en la búsqueda de nuevas posibilidades biotecnológicas y farmacéuticas, para lo cual es necesario el desarrollo de investigaciones multidisciplinarias. En el campo de los productos farmacéuticos, la síntesis química del siglo veinte se ha perfeccionado gradualmente, aunque también gradualmente, se ha ido reemplazando por aplicaciones biotecnológicas y ha regresado hacia la infinitamente variable y compleja, química de la naturaleza <sup>(4)</sup>.

Los organismos en la naturaleza, producen metabolitos secundarios con el propósito específico de adquirir ventajas evolutivas, como obtener un mayor espacio o adquirir más nutrientes. Durante la evolución, se han desarrollado una gran variedad de maquinarias enzimáticas que dirigen la biosíntesis de diferentes estructuras moleculares; estas moléculas, resultan de interés por sus distintas actividades biológicas <sup>(4)</sup>.

Se estima que existen más de 300,000 especies de plantas y probablemente cerca de 1.5 millones de especies de hongos, además de insectos, organismos marinos, entre otros, que en conjunto hacen de la naturaleza un vasto reservorio de diversidad biológica y química <sup>(4)</sup>.

Los hongos son conocidos por su química tan peculiar, que difiere ampliamente tanto de la química de los animales como de las plantas superiores. Los metabolitos secundarios de los hongos son producidos para favorecer su establecimiento en los diversos nichos ecológicos; muchos de estos metabolitos, han jugado roles importantes como tratamientos farmacológicos; como ejemplos, tenemos a la Penicilina, que interfiere en la síntesis de la pared celular bacteriana, así como a la Ciclosporina, que es un agente inmunosupresor ampliamente utilizado para evitar el rechazo de trasplantes de órganos <sup>(4)</sup>.

Los hongos conocidos como macromicetos, se han utilizado como remedios medicinales desde hace mucho tiempo por los países asiáticos; taxonómicamente hablando, al grupo de los macromicetos, pertenecen principalmente los basidiomicetos, aunque algunas especies de ascomicetos también entran dentro de éste grupo <sup>(24)</sup>.

Los macromicetos se han asociado a una gran variedad de propiedades farmacológicas, como son efecto antitumoral, inmunomodulador (estimulante, supresor, anti-alérgico, anti-inflamatorio), citostático, antiaterogénico, antioxidante, hipoglucemiante, hepatoprotector, sobre sistema nervioso central y efecto antimicrobiano (contra hongos, bacterias y virus) <sup>(24)</sup>.

En México, las propiedades farmacológicas de los macromicetos nativos no se han estudiado tan ampliamente como en los países asiáticos; se estima que en el país existen alrededor de 200,000 especies de macromicetos, de los cuales sólo se han reportado alrededor de 70 especies que se asocian con propiedades medicinales; sin embargo, son pocos los reportes en los que se analizan dichas actividades <sup>(15, 18)</sup>; es por esto, que el Departamento de Farmacología y Toxicología inició una línea de investigación encaminada a evaluar la actividad biológica de los macromicetos que crecen en el país. Entre los reportes nacionales con los que se cuenta, está el reporte de González y cols. (2010) que evaluaron distintas propiedades farmacológicas de macromicetos del noreste de México, demostrando que *Suillus luteus*, *Lentinus lepideus* y *Suillus lakei* presentaban actividad antioxidante, *S. lakei* efecto inmuno-estimulante y *Ganoderma applanatum*, *Armillaria mellea* y *S. lakei* actividad antimicrobiana; en otro reporte, Tamez y cols. (2013) demostraron la actividad hipoglucemiante del extracto metanólico de una cepa de *L. lepideus* del noreste de México en un modelo murino; y también se cuenta con el reporte de Valencia y cols. (2008) quienes determinaron actividad antibacteriana para el macromiceto *Pleurotus djamor*.

Con respecto a la actividad antimicrobiana, se sabe que los macromicetos requieren de compuestos antibacterianos y antifúngicos para sobrevivir en sus ambientes naturales; por lo que no es sorprendente que compuestos con estas actividades puedan ser extraídos de una gran variedad de macromicetos <sup>(24)</sup>.

En un estudio llevado a cabo por Suay y cols. (2000), se evaluó la actividad antimicrobiana (contra patógenos clínicos y cepas control) de 317 aislados de macromicetos, los cuales representaban a 204 especies diferentes colectadas en España; ellos encontraron que el 45% (109 especies) mostraron actividad antimicrobiana; en general, determinaron que era más común la actividad antibacteriana que la antifúngica, ésta última, presente principalmente en las especies pertenecientes al orden de los Agaricales; a su vez, observaron que había diferencias en cuanto a dicha actividad a nivel de género e incluso de especie, por lo que sugirieron que la habilidad de los macromicetos para producir metabolitos con esta actividad no está distribuida de forma homogénea filogenéticamente hablando.

Por otra parte, Gerasimenya y cols. (2000) probaron distintas actividades para 14 cepas del macromiceto *Pleurotus ostreatus*; con respecto a la actividad antimicrobiana, se demostró que todas las cepas cultivadas en medio líquido poseían dicha actividad, pero al obtener cuerpos fructíferos mediante cultivos en maíz, no se apreciaba actividad antimicrobiana; a su vez, mientras que algunas cepas mostraban actividad antifúngica contra *Aspergillus niger* a partir del extracto del medio de cultivo, esta actividad no se apreciaba a partir del extracto del micelio.

Por último, otros estudios con respecto a la actividad antifúngica han sido llevados a cabo; entre ellos Coetzee y van Wyk (2009) mencionan que varias especies del género *Calvatia* (*C. cyathiformis*, *C. craniiformis*, *C. gigantea* y *C. utriiformis*) tienen la capacidad de producir ácido calvático, molécula asociada con ésta actividad; Acharya (2011) encontró actividad antifúngica en el macromiceto *Pleurotus djamor* contra el

hongo fitopatógeno *Magnaporthe grisea*, posteriormente Giri y cols. (2012) demostraron efecto antimicótico de esta misma especie de macromiceto contra la cepa MTCC CODE 183 de *C. albicans*; además, Nagaraj y cols. (2013) analizaron la actividad antifúngica de distintos extractos del macromiceto *Ganoderma applanatum* contra *C. albicans* (MTCC 1637), *C. indicum* (MTCC 2831), *T. rubrum* (MTCC 3272) y *M. gypseum* (MTCC 2829), para los cuales demostraron que el extracto metanólico fue el más efectivo; Dulger y cols. (2004) demostraron que extractos del macromiceto *Cantharellus cibarius* presentaban actividad antifúngica contra especies de *Aspergillus*, pero no contra levaduras del género *Candida*, mientras que Eren y cols. (2013) demostraron que extractos del macromiceto *Leucopaxillus tricolor* presentaban actividad antifúngica contra una cepa de *Aspergillus fumigatus* fitopatógena.

## **CAPÍTULO 2**

### **JUSTIFICACIÓN**

Debido a la creciente importancia de las infecciones fúngicas oportunistas, así como a las deficiencias de los tratamientos antimicóticos con los que se cuenta en la actualidad (como su elevada toxicidad, el alto costo de los mismos y la resistencia tanto clínica como microbiana, ya sea intrínseca o adquirida), es de gran interés investigar nuevas fuentes de moléculas con efecto antifúngico, entre ellas, los macromicetos representan una fuente natural, de bajo costo y de gran potencial farmacológico para la búsqueda de ésta actividad biológica. Es por esto, que en este proyecto nos planteamos evaluar si extractos de cepas de macromicetos del noreste de México, presentan actividad antifúngica contra patógenos causantes de micosis oportunistas en la región y cepas control.

## **CAPÍTULO 3**

### **HIPÓTESIS**

Los extractos de cultivos *in-vitro* de los macromicetos *Calvatia cyathiformis*, *Cantharellus cibarius*, *Ganoderma applanatum*, *Leucopaxillus amarus* y *Pleurotus djamor* del noreste de México tienen actividad antifúngica contra hongos causantes de micosis oportunistas en la región.

## CAPÍTULO 4

### OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo general.

- Evaluar el efecto antifúngico de extractos de cultivos *in-vitro* de los macromicetos *Calvatia cyathiformis*, *Cantharellus cibarius*, *Ganoderma applanatum*, *Leucopaxillus amarus* y *Pleurotus djamor* colectados en el noreste de México contra aislamientos clínicos de hongos oportunistas.

#### 4.2 Objetivos específicos.

1. Obtener los extractos metanólicos de la biomasa de cultivos *in-vitro* de los macromicetos: *Calvatia cyathiformis*, *Cantharellus cibarius*, *Ganoderma applanatum*, *Leucopaxillus amarus* y *Pleurotus djamor*.
2. Obtener los extractos del medio en donde se cultivaron los macromicetos: *Calvatia cyathiformis*, *Cantharellus cibarius*, *Ganoderma applanatum*, *Leucopaxillus amarus* y *Pleurotus djamor*.
3. Evaluar la actividad antifúngica de cada extracto contra aislamientos clínicos de *Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus fumigatus*.
4. Fraccionar los extractos con mayor actividad antifúngica y evaluar la citotoxicidad de las fracciones más activas.

## CAPÍTULO 5

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### 5.1. Colecta e identificación de los macromicetos.

- a. Los macromicetos *Calvatia cyathiformis*, *Cantharellus cibarius*, *Ganoderma applanatum*, *Leucopaxillus amarus* y *Pleurotus djamor* fueron colectados e identificados por el Ph. D. Fortunato Garza Ocañas de la Facultad de Ciencias Forestales de la U.A.N.L.; posteriormente, se cultivaron durante un mes en Agar Melin-Norkrans y éstos cultivos se entregaron al departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.

#### 5.2. Obtención e identificación de los hongos oportunistas.

- a. Se trabajó con aislamientos clínicos obtenidos e identificados por el Laboratorio de Micología del Centro Regional para el Control de Enfermedades Infecciosas perteneciente al Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.
- b. Para las pruebas, se utilizaron 2 aislamientos de *Candida albicans*, 2 de *Candida parapsilosis*, 2 de *Candida tropicalis*, 2 de *Cryptococcus neoformans* y 2 de *Aspergillus fumigatus*.
- c. Además, como control para las pruebas de susceptibilidad, se utilizaron las cepas ATCC 22019 de *Candida parapsilosis* y ATCC MYA-3626 de *Aspergillus fumigatus*.

### 5.3. Preparación de soluciones para el medio de cultivo.

- a. Solución de cloruro de sodio 0.025 % m/v.
  - i. Se pesaron 0.125 g de cloruro de sodio.
  - ii. Se disolvieron en 100-200 mL de agua bidestilada.
  - iii. Se añadió agua bidestilada hasta completar 500 mL.
  - iv. Se homogenizó completamente.
  - v. La solución fue almacenada en frasco transparente con tapón de rosca a temperatura ambiente.
- b. Solución de cloruro de calcio 0.05 % m/v.
  - i. Se pesaron 0.25 g de cloruro de calcio dihidratado.
  - ii. Se disolvieron en 100-200 mL de agua bidestilada.
  - iii. Se añadió agua bidestilada hasta completar 500 mL.
  - iv. Se homogenizó completamente.
  - v. La solución fue almacenada en frasco transparente con tapón de rosca a temperatura ambiente.
- c. Solución de sulfato de magnesio 0.15 % m/v.
  - i. Se pesaron 0.75 g de sulfato de magnesio heptahidratado.
  - ii. Se disolvieron en 100-200 mL de agua bidestilada.
  - iii. Se añadió agua bidestilada hasta completar 500 mL.
  - iv. Se homogenizó completamente.
  - v. La solución fue almacenada en frasco transparente con tapón de rosca a temperatura ambiente.
- d. Solución de fosfato de potasio 0.5 % m/v.

- i. Se pesaron 2.5 g de fosfato de potasio trihidratado.
  - ii. Se disolvieron en 100-200 mL de agua bidestilada.
  - iii. Se añadió agua bidestilada hasta completar 500 mL.
  - iv. Se homogenizó completamente.
  - v. La solución fue almacenada en frasco transparente con tapón de rosca a temperatura ambiente.
- e. Solución de fosfato de amonio 0.25 % m/v.
- i. Se pesaron 1.25 g de fosfato monobásico de amonio.
  - ii. Se disolvieron en 100-200 mL de agua bidestilada.
  - iii. Se añadió agua bidestilada hasta completar 500 mL.
  - iv. Se homogenizó completamente.
  - v. La solución fue almacenada en frasco transparente con tapón de rosca a temperatura ambiente.
- f. Solución de tricloruro de hierro 1 % m/v.
- i. Se pesaron 2.5 g de tricloruro de hierro.
  - ii. Se disolvieron en 50-100 mL de agua bidestilada.
  - iii. Se añadió agua bidestilada hasta completar 250 mL.
  - iv. Se homogenizó completamente.
  - v. La solución fue almacenada en frasco ámbar con tapón de rosca a temperatura ambiente.
- g. Solución de tiamina 0.1 % m/v.
- i. Se pesaron 0.5 g de tiamina.
  - ii. Se disolvieron en 100-200 mL de agua bidestilada.
  - iii. Se añadió agua bidestilada hasta completar 500 mL.

- iv. Se homogenizó completamente.
  - v. La solución fue almacenada en frasco ámbar con tapón de rosca a temperatura ambiente.
- h. Solución de fosfato dibásico de sodio 0.5 M.
- i. Se pesaron 35.49 g de fosfato dibásico de sodio anhidro.
  - ii. Se disolvieron en 100-200 mL de agua bidestilada.
  - iii. Se aforó a 500 mL.
  - iv. Se homogenizó completamente.
  - v. La solución fue almacenada en frasco transparente con tapón de rosca a temperatura ambiente.
- i. Solución de ácido cítrico 0.5 M.
- i. Se pesaron 52.54 g de ácido cítrico monohidratado.
  - ii. Se disolvieron en 100-200 mL de agua bidestilada.
  - iii. Se aforó a 500 mL.
  - iv. Se homogenizó completamente.
  - v. La solución fue almacenada en frasco transparente con tapón de rosca a temperatura ambiente.

#### **5.4. Preparación de Caldo Melin-Norkrans (preparación para 1 L).**

- a. Se pesaron 500 mg de extracto de levadura.
- b. Se pesaron 3 g de extracto de malta.
- c. Se pesaron 10 g de d-glucosa anhidra.
- d. Se disolvió el extracto de levadura, el extracto de malta y la d-glucosa en 500 mL de agua bidestilada.

- e. Después se agregaron 10 mL de cada una de las soluciones de trabajo de cloruro de sodio, cloruro de calcio, sulfato de magnesio, fosfato de amonio, fosfato de potasio y tiamina.
- f. Se añadió 1.2 mL de la solución de trabajo de tricloruro de hierro.
- g. Se agregó 20 mL de la solución de trabajo de fosfato dibásico de sodio.
- h. Se añadió 2 mL de la solución de trabajo de ácido cítrico.
- i. Se completó a 1 L con 417 mL de agua bidestilada.
- j. En caso de que el pH no fuese de  $6.50 \pm 0.01$ , se ajustó con las soluciones de trabajo de fosfato dibásico de sodio o ácido cítrico hasta alcanzar dicho valor.
- k. Se vertieron aproximadamente 200 mL del medio líquido en matraces Erlenmeyer de 500 mL.
- l. Además de la torunda, se colocó una capucha de papel aluminio.
- m. Se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.
- n. Se dejó reposar hasta alcanzar la temperatura ambiental y se utilizaron para sembrar.

#### **5.5. Preparación de Agar Melin-Norkrans (preparación para 1 L).**

- a. La preparación del medio sólido fue idéntica a la preparación del medio líquido del paso “a” al “j”, excepto que en un principio también se pesaron 15 g de agar bacteriológico, los cuales se disolvieron junto con el extracto de levadura, el de malta y la d-glucosa.
- b. Una vez ajustado el pH del medio, éste se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos.

- c. Al finalizar la esterilización, se agitó hasta ver a contraluz que el agar se había disuelto completamente (evitando que se botara el tapón del recipiente).
- d. Se dejó atemperar hasta aproximadamente 45 °C o hasta que alcanzó una temperatura que se soportaba al tacto (sin que solidificara).
- e. Se vació el medio en las placas de Petri estériles.
- f. Se permitió que se solidificara el medio.
- g. Las placas se colocaron boca abajo hasta su uso, cuando no se utilizaron durante las próximas 24 horas, se refrigeraron a aproximadamente 4 °C hasta su uso.

#### **5.6. Cultivo de los macromicetos en Agar Melin-Norkrans.**

- a. A partir de cultivos en placas con agar Melin-Norkrans de los macromicetos *Calvatia cyathiformis*, *Cantharellus cibarius*, *Ganoderma applanatum*, *Leucopaxillus amarus* y *Pleurotus djamor*, se tomó el inóculo para propagar en más placas con el mismo medio bajo condiciones asépticas.
- b. Con ayuda de un bisturí, se cortaron cuadros de aproximadamente 0.5 x 0.5 cm de los cultivos de cada macromiceto.
- c. Ésos cuadros de inóculo se transfirieron a otra placa con agar Melin-Norkrans, procurando que la superficie con el micelio del macromiceto quedara en contacto con el agar de la nueva placa. Para este paso, se evitó tomar cuadros de inóculo en donde no se apreciara crecimiento o micelio del hongo a simple vista.
- d. Se inoculó cada placa con 3 o 4 cuadros lo más distanciados posibles el uno del otro, pero lejos del borde de la placa.

- e. Las placas se sellaron con parafilm.
- f. Se incubaron durante 1 mes a temperatura ambiente.

### **5.7. Cultivo de los macromicetos en Caldo Melin-Norkrans.**

- a. A partir de cultivos en placas con agar Melin-Norkrans de los macromicetos *Calvatia cyathiformis*, *Cantharellus cibarius*, *Ganoderma applanatum*, *Leucopaxillus amarus* y *Pleurotus djamor*, se tomó el inóculo para los matraces con Caldo Melin-Norkrans.
- b. Bajo condiciones asépticas, cada cultivo en agar Melin-Norkrans se partió en 12 triángulos concéntricos del mismo tamaño con ayuda de un bisturí.
- c. Cada matraz con Caldo Melin-Norkrans, se inoculó con 3 triángulos de cultivo del macromiceto correspondiente (la cuarta parte del cultivo de una placa).
- d. Una vez inoculado el matraz, se selló con la capucha de aluminio y con parafilm.
- e. Los matraces inoculados se incubaron durante 2 meses a temperatura ambiente.

### **5.8. Obtención de biomasa y medio líquido.**

- a. Al concluir la incubación de los macromicetos en medio líquido, se extrajo la biomasa de los matraces y se filtró con ayuda de papel filtro grado 617.
- b. El medio de cultivo restante se filtró también con papel filtro grado 617 y se colectó en un vaso de precipitados.

- c. La biomasa se dejó secar bajo flujo de aire en campana durante 48 h o hasta quedar completamente seca, una vez seca, se pesó y se almacenó protegida de la luz a temperatura ambiente hasta su extracción.
- d. El medio de cultivo filtrado se esterilizó por filtración y se almacenó a temperatura ambiente en matraces Erlenmeyer estériles hasta su liofilización.

### **5.9. Extracción metanólica de la biomasa.**

- a. La biomasa seca se molió hasta obtener fragmentos de aproximadamente 1 cm de diámetro como máximo.
- b. Una vez molida, se colocó en un vaso de precipitados cubierto y tapado con papel aluminio.
- c. Se añadieron 30 mL de Metanol HPLC por cada gramo de biomasa seca.
- d. Se extrajo durante 24 h en estado de reposo.
- e. El sobrenadante de la primera extracción se decantó y reservó en un matraz Erlenmeyer cubierto con papel aluminio a temperatura ambiente.
- f. Nuevamente se agregaron 30 mL de Metanol HPLC por gramo de biomasa seca.
- g. Esta extracción se mantuvo a agitación constante de 100 rpm durante 24 h a temperatura ambiente.
- h. Se decantó el sobrenadante y se reservó en el mismo matraz en donde se colectó el de la primera extracción.
- i. Nuevamente se agregaron 30 mL de Metanol HPLC por cada gramo de biomasa seca.
- j. Se mantuvo en agitación a 100 rpm durante 72 h a temperatura ambiente.

- k. Se decantó el sobrenadante y se mezcló con el de las dos extracciones anteriores.
- l. El extracto se evaporó a sequedad en el rotavapor a 40 °C y 60 rpm.
- m. Se pesó y almacenó en oscuridad a -4 °C.

#### **5.10. Extracción del medio de cultivo de macromicetos.**

- a. Una vez esterilizado por filtración, el medio de cultivo se congeló durante 12 horas aproximadamente, en los recipientes para liofilizar.
- b. Se sometió a liofilización hasta quedar completamente seco.
- c. Se almacenó en oscuridad a -4 °C.

#### **5.11. Pruebas de susceptibilidad.**

- a. Activación y obtención del inóculo de los aislamientos clínicos y controles.
  - i. 48 h antes de llevar a cabo las pruebas de susceptibilidad, se sembraron en PDA (Agar Papa Dextrosa) los aislamientos clínicos y las cepas control.
  - ii. Las levaduras se incubaron a 35 °C y los hongos filamentosos a 30 °C, ambos durante 48 h.
  - iii. Una vez transcurrido este tiempo, se ajustó el inóculo a 0.5 en la escala de McFarland en tubos con solución salina al 0.85 %, a una longitud de onda de 530 nm.
  - iv. A partir de esos tubos, se llevó a cabo una dilución 1:50 con medio RPMI 1640 para los hongos filamentosos y 1:100 para las levaduras.
  - v. Estas últimas diluciones se tomaron como las soluciones de trabajo.

- b. Disolución de los extractos.
  - i. Se pesó 0.1 g de cada extracto en un tubo de 15 x 150.
  - ii. Se disolvió en 1 mL de etanol y se agitó vigorosamente.
  - iii. Posteriormente, se añadieron 9 mL de medio RPMI 1640 y se agitó vigorosamente.
  - iv. Se mezcló 4 mL de la solución anterior con 6 mL de medio RPMI 1640.
  - v. Se agitó vigorosamente y se reservó hasta su uso (Solución de trabajo 4,000 µg/mL).
- c. Pruebas de susceptibilidad.
  - i. Las pruebas de susceptibilidad se llevaron a cabo conforme a las normas M27-A3 y M38-A2 del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).
  - ii. Para cada extracto se utilizaron dos placas de 96 pocillos con fondo en forma de U.
    - 1. En la placa 1 se probaron los 6 aislamientos clínicos de las 3 especies del género *Candida* y se utilizó como control positivo la cepa ATCC 22019 de *C. parapsilosis*.
    - 2. En la placa 2 se probaron los 2 aislamientos clínicos de *C. neoformans* y los 2 de *A. fumigatus*, así como las cepas control (contra el extracto), para esta placa el control positivo fue la cepa ATCC MYA-3626 de *A. fumigatus*.
  - iii. Los controles positivos se sometieron al antimicótico Anfotericina B a concentraciones de 0.03 a 16 µg/mL, las MIC se compararon con las

establecidas en las normas M27-A3 y M38-A2 para comprobar que el resultado fuese el correcto.

- iv. Las concentraciones probadas de cada extracto fueron diluciones seriadas de 2,000 a 3.9  $\mu\text{g/mL}$ .
- v. Para cada prueba se dejó un control de viabilidad (sin extracto) y un control de esterilidad (medio RPMI 1640 sin inóculo y sin extracto).
- vi. Las placas se incubaron a 35 °C durante 72 h, con lecturas a las 24, 48 y 72 h.
- vii. Una vez comprobado que el control positivo arrojó los resultados esperados, que sí se presentó crecimiento en el control de viabilidad y que no está contaminado el control de esterilidad, se procedió a leer las pruebas.
- viii. La concentración mínima inhibitoria (MIC) sería aquella en la que no se apreciara crecimiento (botón o turbidez) y la concentración mínima fungistática sería aquella en la que se apreciara una disminución (comparado contra el control de viabilidad) del 50%.

## CAPÍTULO 6

### RESULTADOS

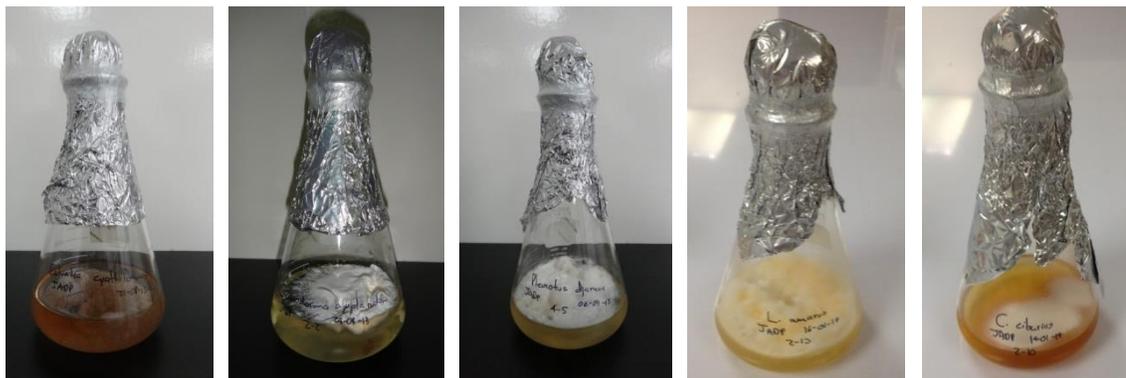
Una vez colectados e identificados por el Ph. D. Fortunato Garza Ocañas, se sembraron aproximadamente 15 placas de Agar Melin-Norkrans con los macromicetos *Calvatia cyathiformis*, *Cantharellus cibarius*, *Ganoderma applanatum*, *Leucopaxillus amarus* y *Pleurotus djamor* si a lo largo del mes de incubación, se apreciaba contaminación en alguna de las placas, ésta era desechada. A partir de esas placas, los macromicetos se sembraron en matraces Erlenmeyer con aproximadamente 200 mL de Caldo Melin-Norkrans, si durante el transcurso de la incubación se apreciaba contaminación en alguno de los cultivos, éste era desechado; en la Tabla No. 1 se indica la cantidad de matraces cultivados para cada especie de macromiceto, mientras que en las Figuras No. 1 y 2 se aprecian las morfologías obtenidas tanto para cultivos *in-vitro* en medio sólido como en medio líquido.

Cantidad de matraces	Especie de macromiceto
50	<i>Calvatia cyathiformis</i>
52	<i>Ganoderma applanatum</i>
51	<i>Pleurotus djamor</i>
47	<i>Leucopaxillus amarus</i>
40	<i>Cantharellus cibarius</i>

**Tabla No. 1.-** Cantidad de matraces cultivados durante 2 meses para cada una de las especies de macromicetos analizadas.



**Figura No. 1.-** Morfologías obtenidas para *Calvatia cyathiformis* (imagen superior izquierda), *Ganoderma applanatum* (imagen superior central), *Pleurotus djamor* (imagen superior derecha), *Leucopaxillus amarus* (imagen inferior izquierda) y *Cantharellus cibarius* (imagen inferior derecha) después de ser cultivados durante un mes a temperatura ambiente en Agar Melin-Norkrans.



**Figura No. 2.-** Morfologías obtenidas para *Calvatia cyathiformis*, *Ganoderma applanatum*, *Pleurotus djamor*, *Leucopaxillus amarus* y *Cantharellus cibarius* (izquierda a derecha) después de ser cultivados durante dos meses a temperatura ambiente en Caldo Melin-Norkrans.

A partir de estos cultivos, se extrajo en primera instancia el medio líquido, el cual fue liofilizado y almacenado, por otra parte, se obtuvo la biomasa, la cual se secó, trituró y

sometió a extracción con metanol, en la Tabla No. 2 se indica la cantidad de biomasa obtenida para cada macromiceto, el volumen de metanol utilizado para cada extracción y el volumen final de extracto obtenido.

Espece de macromiceto	Biomasa seca (g)	Volumen de metanol por extracción (mL)	Volumen final de extracto (mL)
<i>Calvatia cyathiformis</i>	9.76	300	900
<i>Ganoderma applanatum</i>	29.04	900	2,700
<i>Pleurotus djamor</i>	28.04	900	2,700
<i>Leucopaxillus amarus</i>	31.02	950	2,850
<i>Cantharellus cibarius</i>	14.31	450	1,350

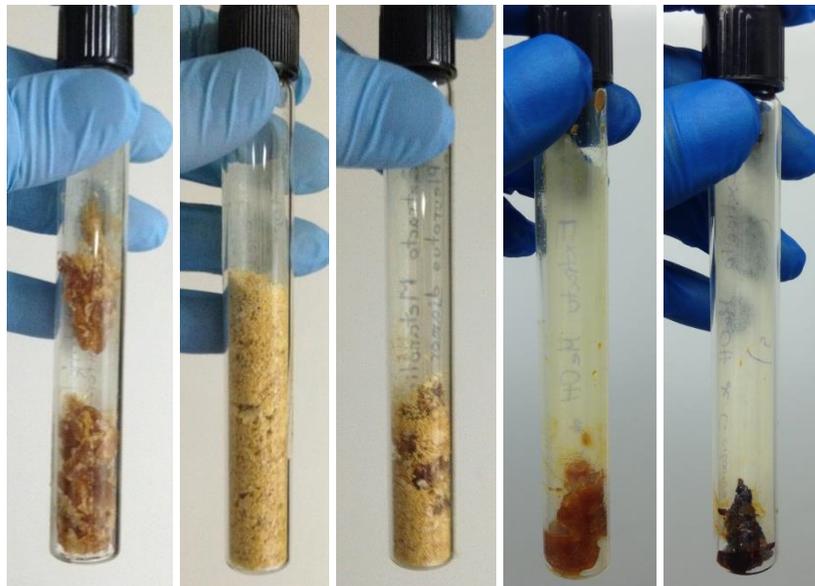
**Tabla No. 2.-** En esta tabla se muestra la cantidad en gramos de biomasa seca obtenida para cada especie de macromiceto, el volumen de solvente utilizado en cada extracción y el volumen de extracto obtenido después de las 3 extracciones.

A continuación, en la Tabla No. 3, se presentan los gramos de extracto metanólico obtenidos para cada especie de macromiceto con sus respectivos rendimientos:

Espece de macromiceto	Extracto metanólico (g)	Rendimientos	
		g de extracto por g de biomasa	g de extracto por matraz
<i>Calvatia cyathiformis</i>	4.41	0.45	0.09
<i>Ganoderma applanatum</i>	2.95	0.10	0.06
<i>Pleurotus djamor</i>	3.04	0.11	0.06
<i>Leucopaxillus amarus</i>	2.86	0.09	0.06
<i>Cantharellus cibarius</i>	1.23	0.09	0.03

**Tabla No. 3.-** En esta tabla se muestra la cantidad en gramos de extracto metanólico que se obtuvo para cada especie de macromiceto; así como la cantidad, en gramos, de extracto que se obtuvo por gramo de biomasa y por matraz cultivado.

Como se aprecia en la Tabla No. 3, los mejores rendimientos, en cuanto a cantidad de extracto metanólico obtenido por gramo de biomasa seca y por matraz, fueron para el macromiceto *Calvatia cyathiformis*; mientras que el macromiceto *Cantharellus cibarius* fue el que presentó la menor cantidad de extracto metanólico por cada matraz cultivado. Además, es pertinente indicar que mientras algunos extractos eran polvos completamente sólidos (*Ganoderma applanatum*), otros extractos fueron sumamente viscosos (*Leucopaxillus amarus* y *Cantharellus cibarius*), ver Figura No. 3.



**Figura No. 3.-** Extractos metanólicos de los macromicetos *Calvatia cyathiformis*, *Ganoderma applanatum*, *Pleurotus djamor*, *Leucopaxillus amarus* y *Cantharellus cibarius* (izquierda a derecha), en esta imagen se muestra que los extractos de *Calvatia cyathiformis*, *Leucopaxillus amarus* y *Cantharellus cibarius* resultaron sumamente viscosos u oleaginosos.

Como se mencionó anteriormente, las pruebas de susceptibilidad para cada extracto se llevaron a cabo en 2 placas, en las Tablas No. 4 y 5 se indica qué cepa se inoculó y qué concentración de extracto o antimicótico se evaluó en cada pocillo de las placas; por otra parte, en las Figuras No. 4-13 se pueden observar los resultados obtenidos para cada

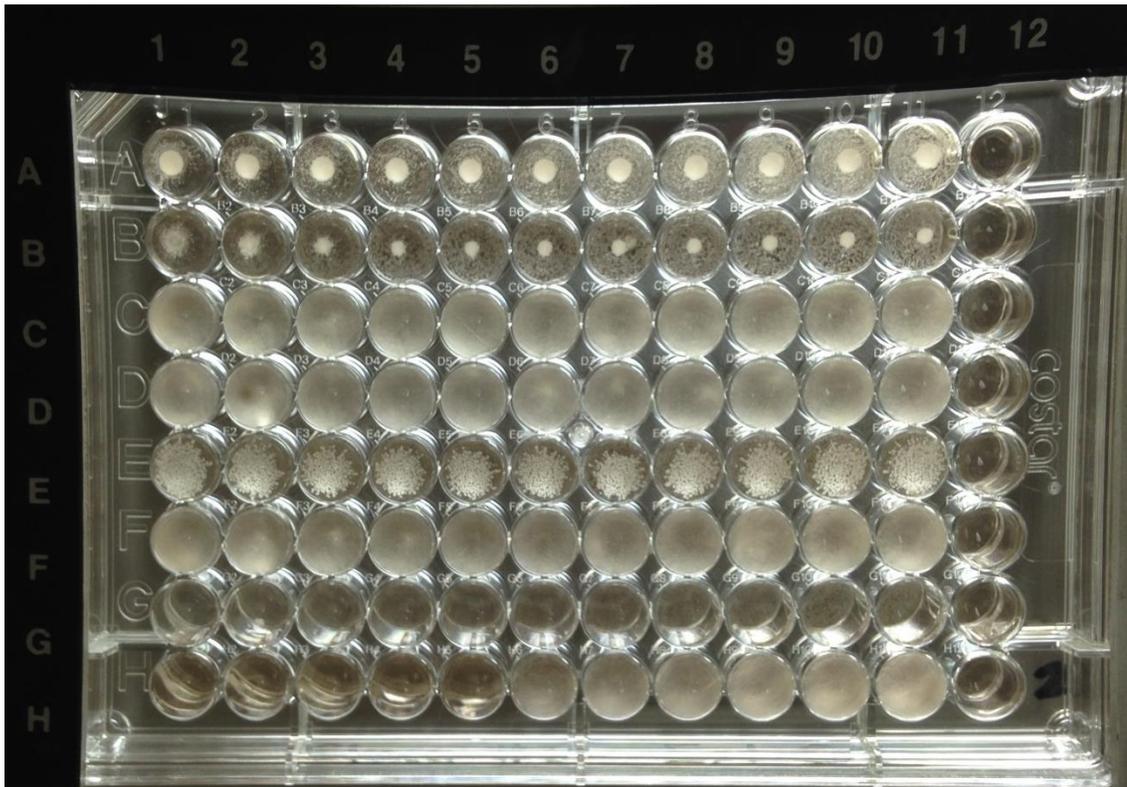
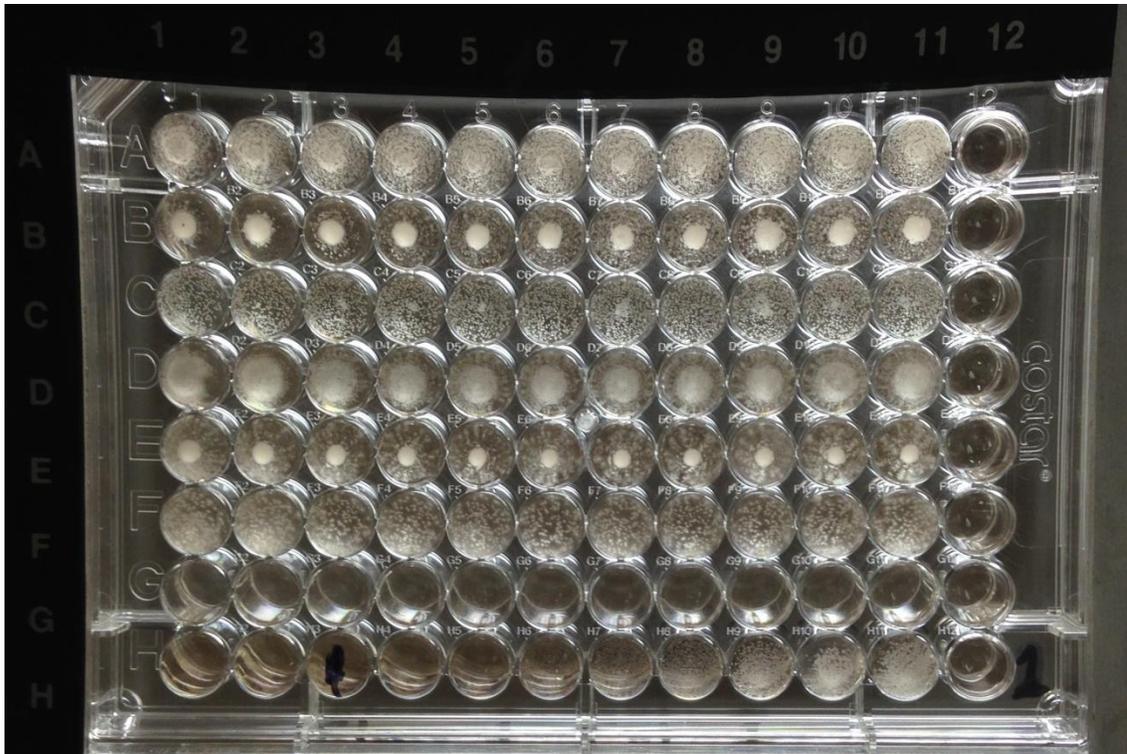
extracto a las 48 h (estos resultados coinciden con los obtenidos a las 72 h, mientras que a las 24 h aún no eran legibles las pruebas), los cuales se resumen en la Tabla No. 6.

PLACA 1												
Fila	Columna											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Ca1	Ca1	Ca1	Ca1	Ca1	Ca1	Ca1	Ca1	Ca1	Ca1	Ca1	SI
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2000	1000	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9	0	0
<b>B</b>	Ca2	Ca2	Ca2	Ca2	Ca2	Ca2	Ca2	Ca2	Ca2	Ca2	Ca2	SI
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2000	1000	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9	0	0
<b>C</b>	Cp1	Cp1	Cp1	Cp1	Cp1	Cp1	Cp1	Cp1	Cp1	Cp1	Cp1	SI
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2000	1000	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9	0	0
<b>D</b>	Cp2	Cp2	Cp2	Cp2	Cp2	Cp2	Cp2	Cp2	Cp2	Cp2	Cp2	SI
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2000	1000	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9	0	0
<b>E</b>	Ct1	Ct1	Ct1	Ct1	Ct1	Ct1	Ct1	Ct1	Ct1	Ct1	Ct1	SI
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2000	1000	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9	0	0
<b>F</b>	Ct2	Ct2	Ct2	Ct2	Ct2	Ct2	Ct2	Ct2	Ct2	Ct2	Ct2	SI
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2000	1000	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9	0	0
<b>G</b>	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2000	1000	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9	0	0
<b>H</b>	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	SI
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.13	0.06	0.03	0	0

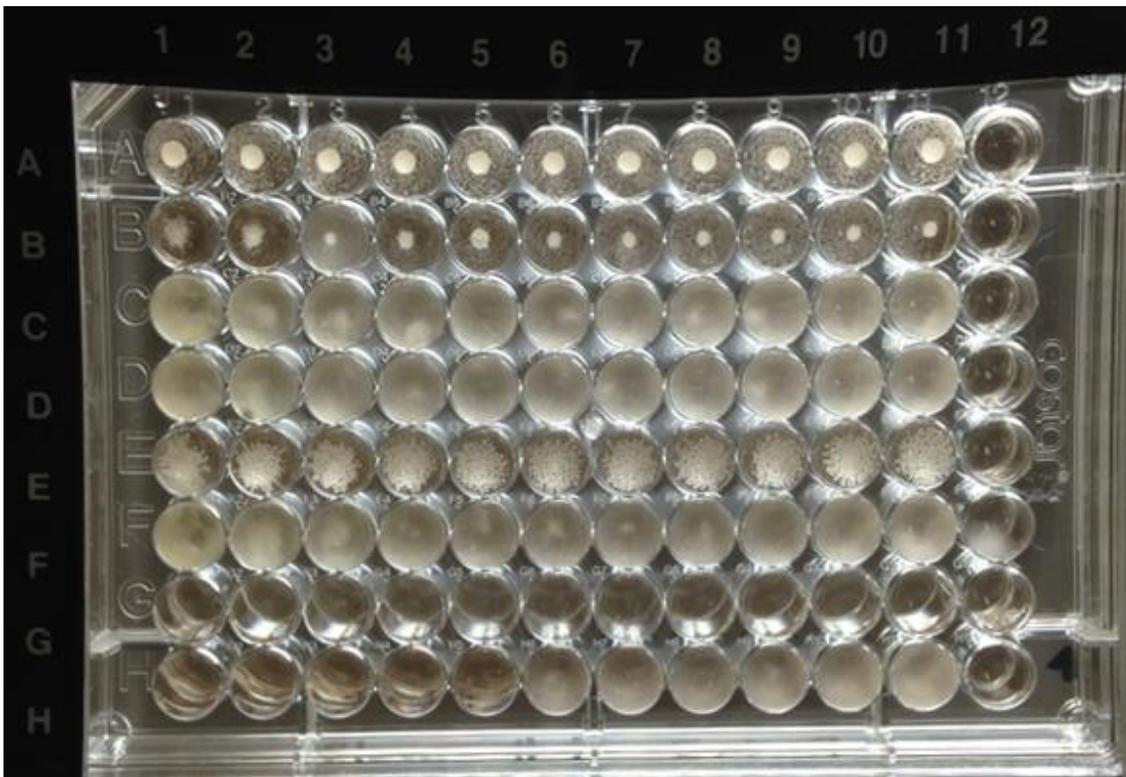
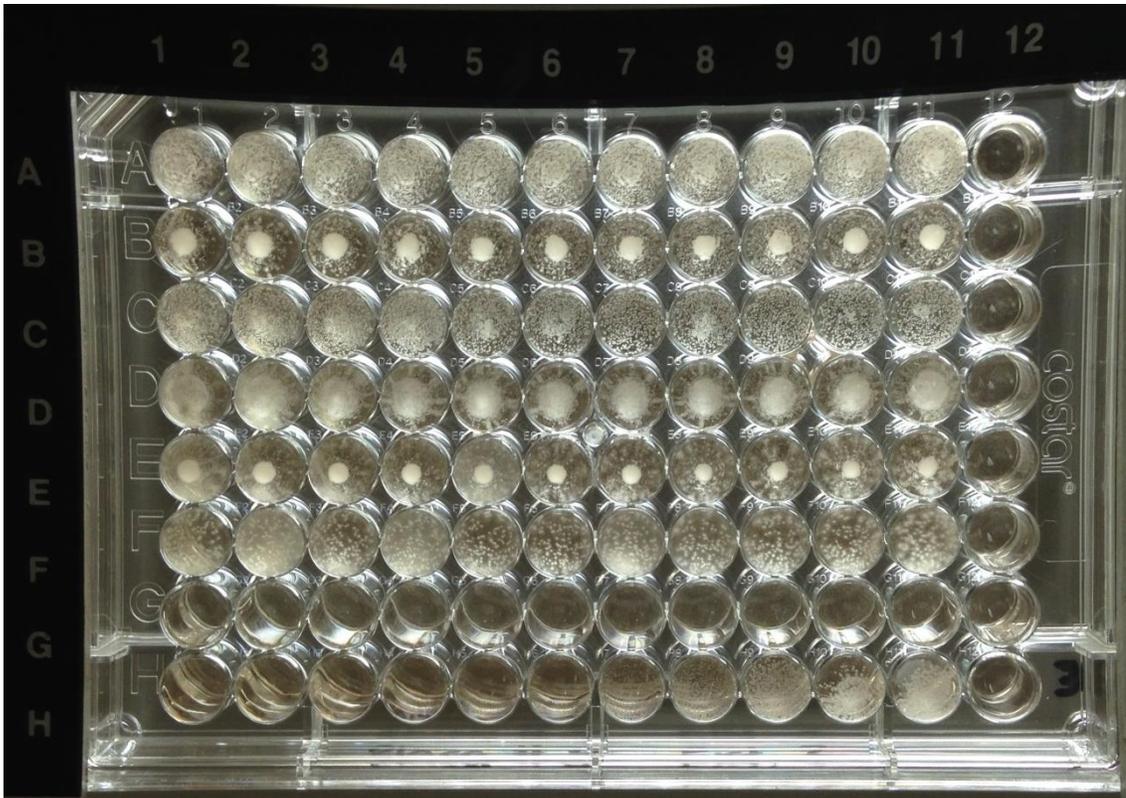
**Tabla No. 4.-** Conformación de la Placa 1 para las pruebas de susceptibilidad; los números que muestran en la parte inferior corresponden a las concentraciones ( $\mu\text{g/mL}$ ) de extracto para cada posillo, excepto para la fila H, para la cual corresponden a las concentraciones ( $\mu\text{g/mL}$ ) de Anfotericina B; las abreviaciones de los inóculos son las siguientes: Ca1 = Aislamiento 1 de *Candida albicans*, Ca2 = Aislamiento 2 de *Candida albicans*, Cp1 = Aislamiento 1 de *Candida parapsilosis*, Cp2 = Aislamiento 2 de *Candida parapsilosis*, Ct1 = Aislamiento 1 de *Candida tropicalis*, Ct2 = Aislamiento 2 de *Candida tropicalis*, C1 = *Candida parapsilosis* ATCC 22019, SI = Sin Inóculo.

PLACA 2												
Fila	Columna											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Cn1	Cn1	Cn1	Cn1	Cn1	Cn1	Cn1	Cn1	Cn1	Cn1	Cn1	SI
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2000	1000	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9	0	0
<b>B</b>	Cn2	Cn2	Cn2	Cn2	Cn2	Cn2	Cn2	Cn2	Cn2	Cn2	Cn2	SI
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2000	1000	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9	0	0
<b>C</b>	Af1	Af1	Af1	Af1	Af1	Af1	Af1	Af1	Af1	Af1	Af1	SI
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2000	1000	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9	0	0
<b>D</b>	Af2	Af2	Af2	Af2	Af2	Af2	Af2	Af2	Af2	Af2	Af2	SI
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2000	1000	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9	0	0
<b>E</b>	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	SI
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2000	1000	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9	0	0
<b>F</b>	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	SI
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2000	1000	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9	0	0
<b>G</b>	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI	SI
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2000	1000	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9	0	0
<b>H</b>	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	SI
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.13	0.06	0.03	0	0

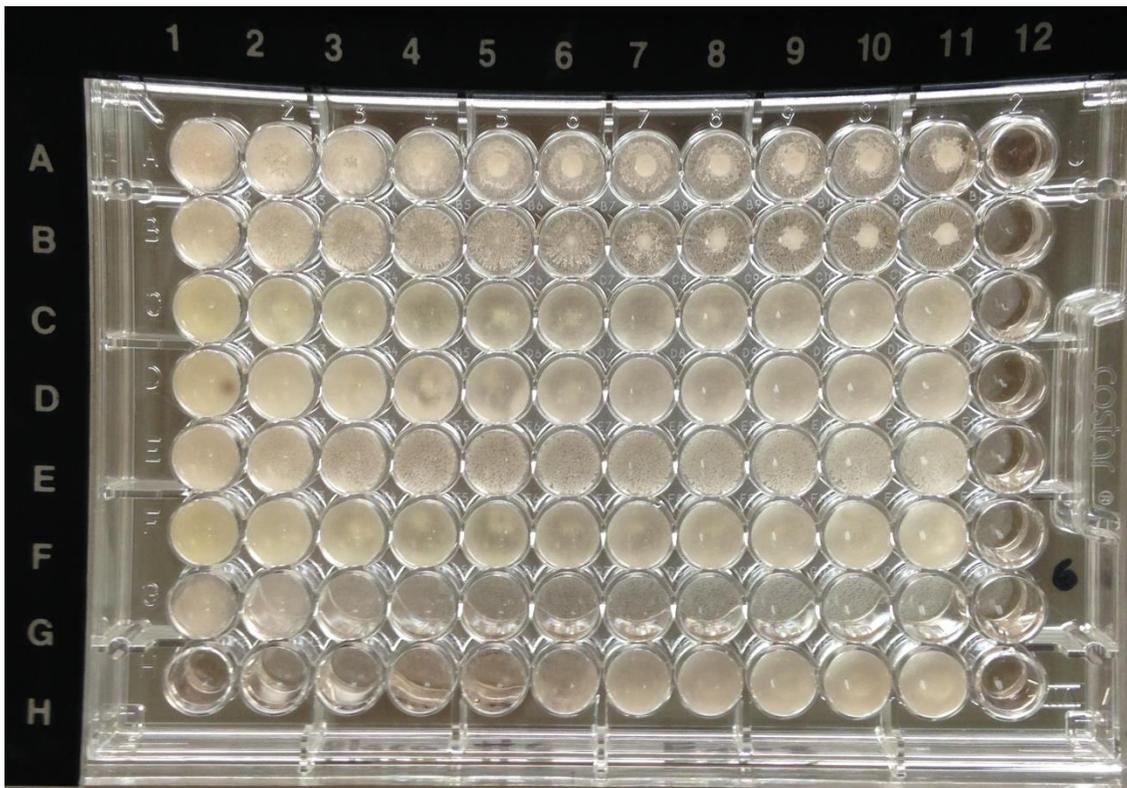
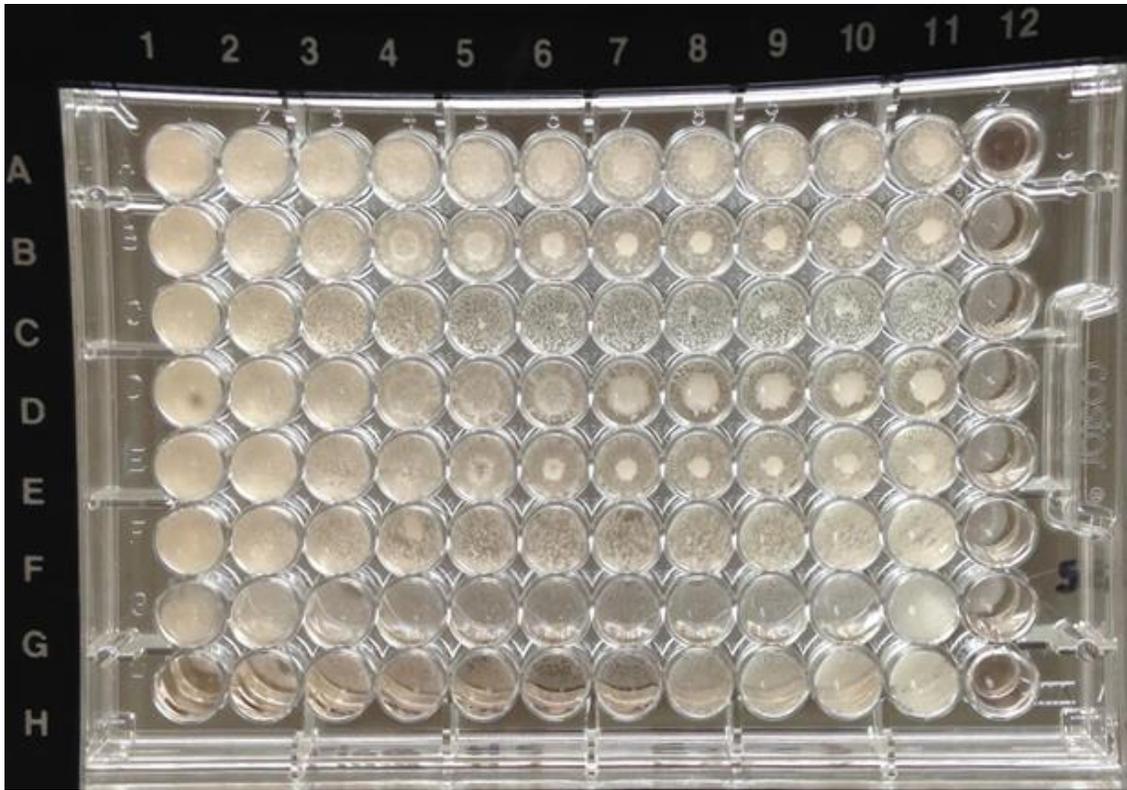
**Tabla No. 5.-** Conformación de la Placa 2 para las pruebas de susceptibilidad; los números que se muestran en la parte inferior corresponden a las concentraciones ( $\mu\text{g/mL}$ ) de extracto para cada pocillo, excepto para la fila H, para la cual corresponden a las concentraciones ( $\mu\text{g/mL}$ ) de Anfotericina B; las abreviaciones de los inóculos son las siguientes: Cn1 = Aislamiento 1 de *Cryptococcus neoformans*, Cn2 = Aislamiento 2 de *Cryptococcus neoformans*, Af1 = Aislamiento 1 de *Aspergillus fumigatus*, Af2 = Aislamiento 2 de *Aspergillus fumigatus*, C1 = *Candida parapsilosis* ATCC 22019, C2 = *Aspergillus fumigatus* ATCC MYA-3626 y SI = Sin Inóculo.



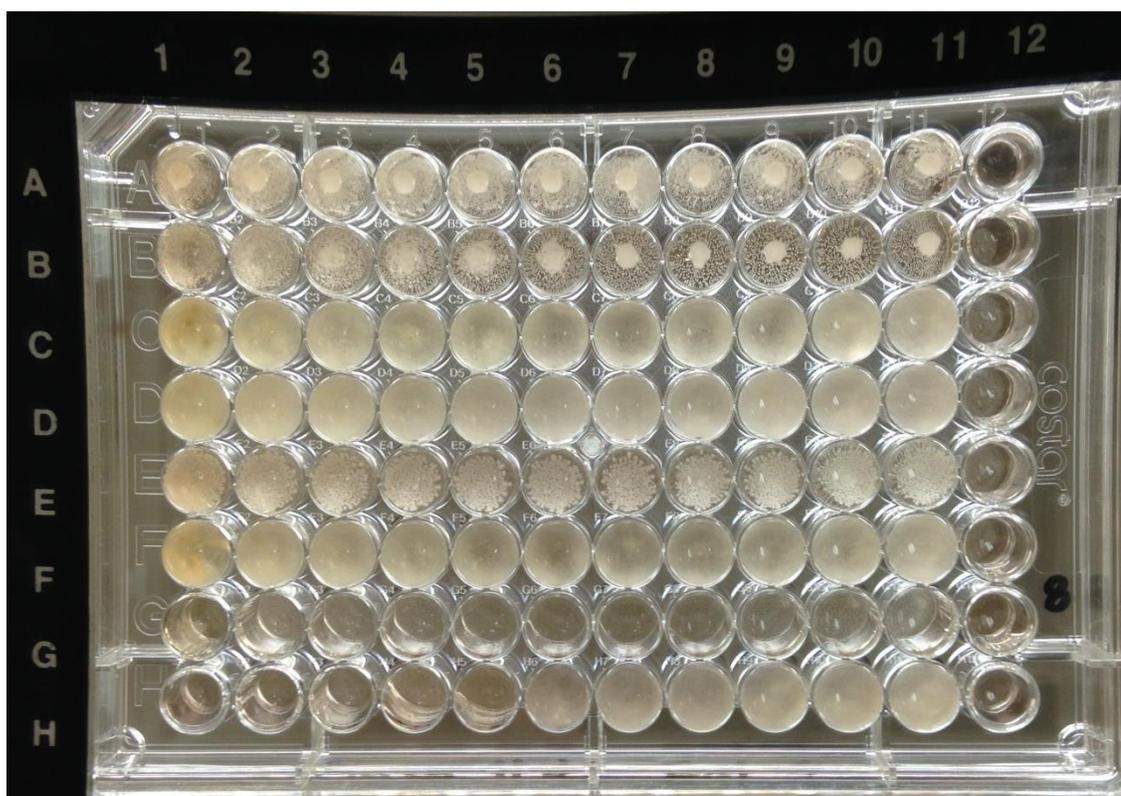
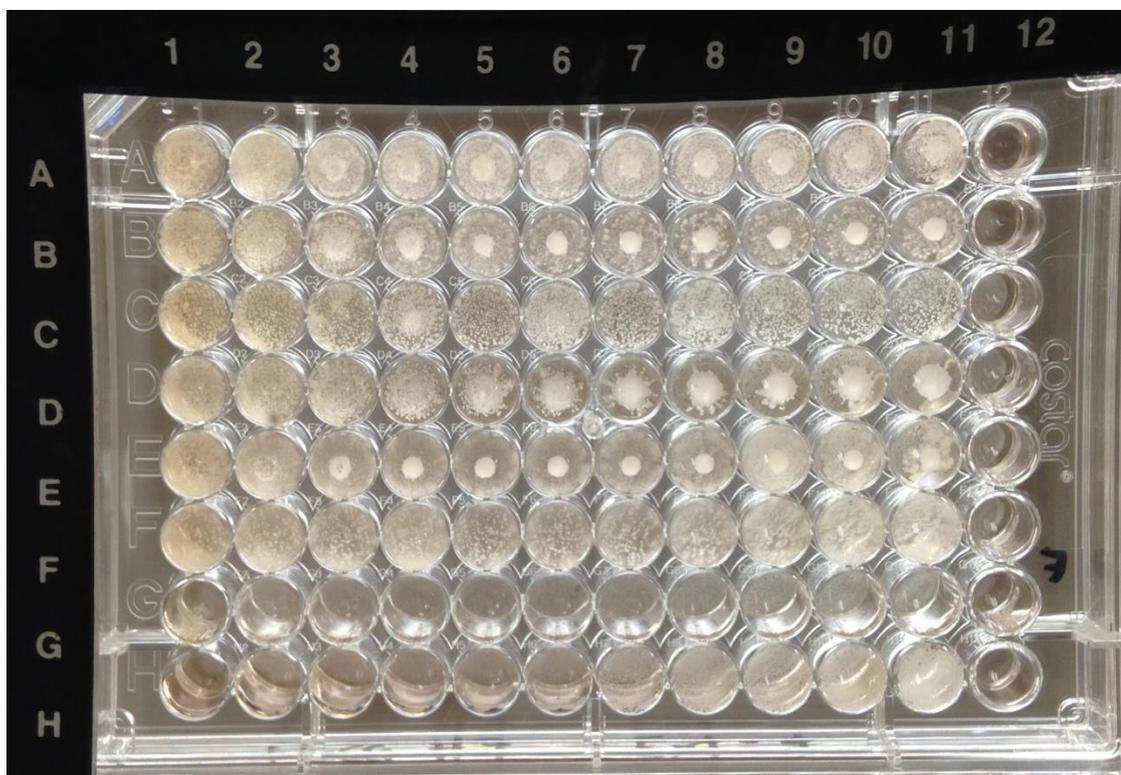
**Figura No. 4.-** Pruebas de susceptibilidad para el extracto metanólico de *Calvatia cyathiformis*. Placa 1 en la parte superior y placa 2 en la parte inferior.



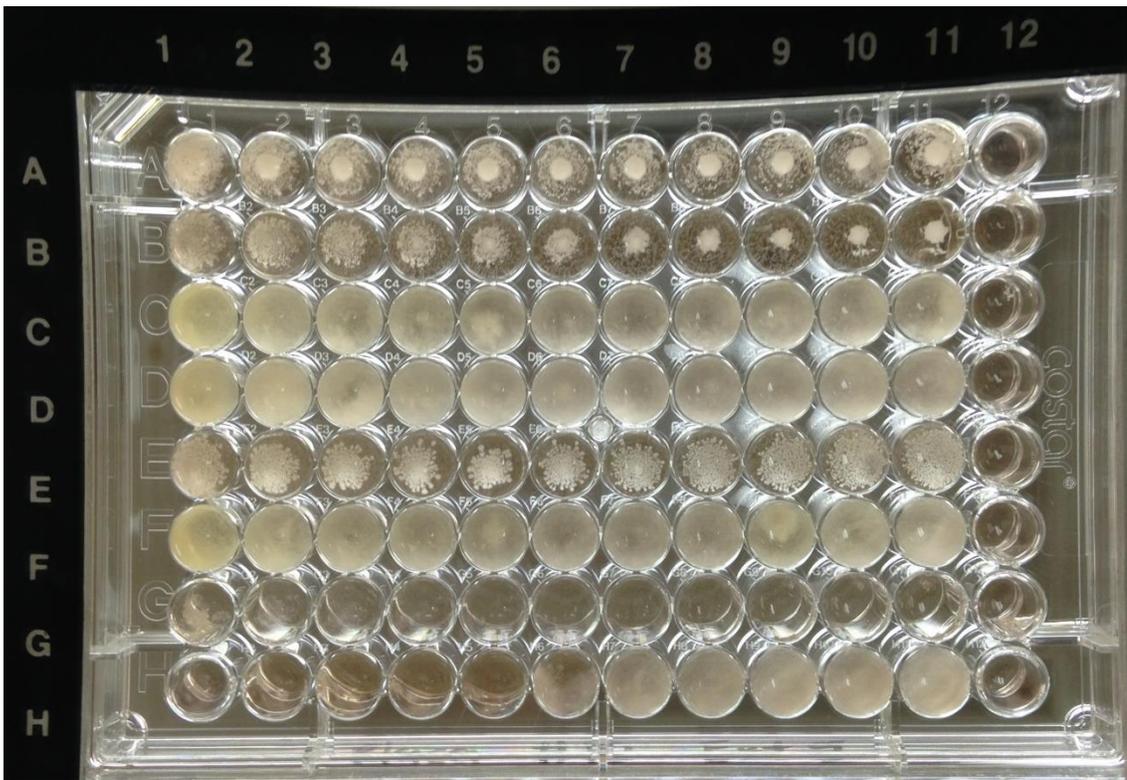
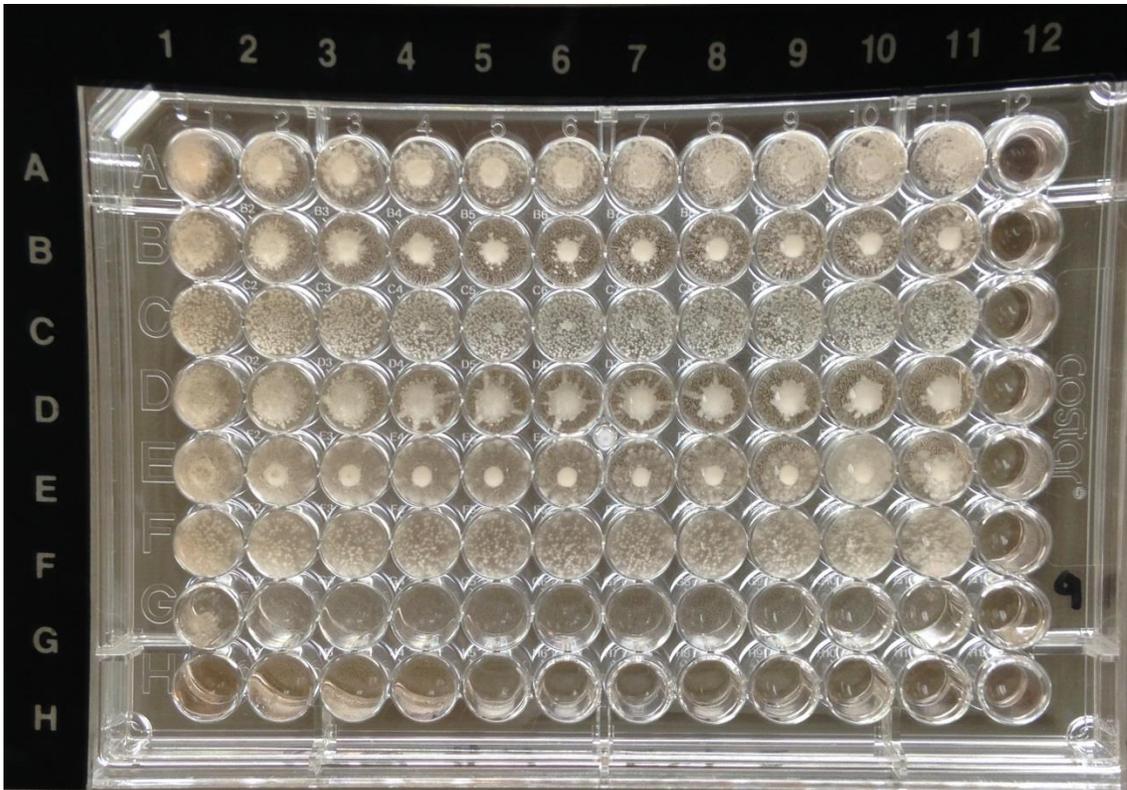
**Figura No. 5.-** Pruebas de susceptibilidad para el extracto del medio de cultivo de *Calvatia cyathiformis*. Placa 1 en la parte superior y placa 2 en la parte inferior.



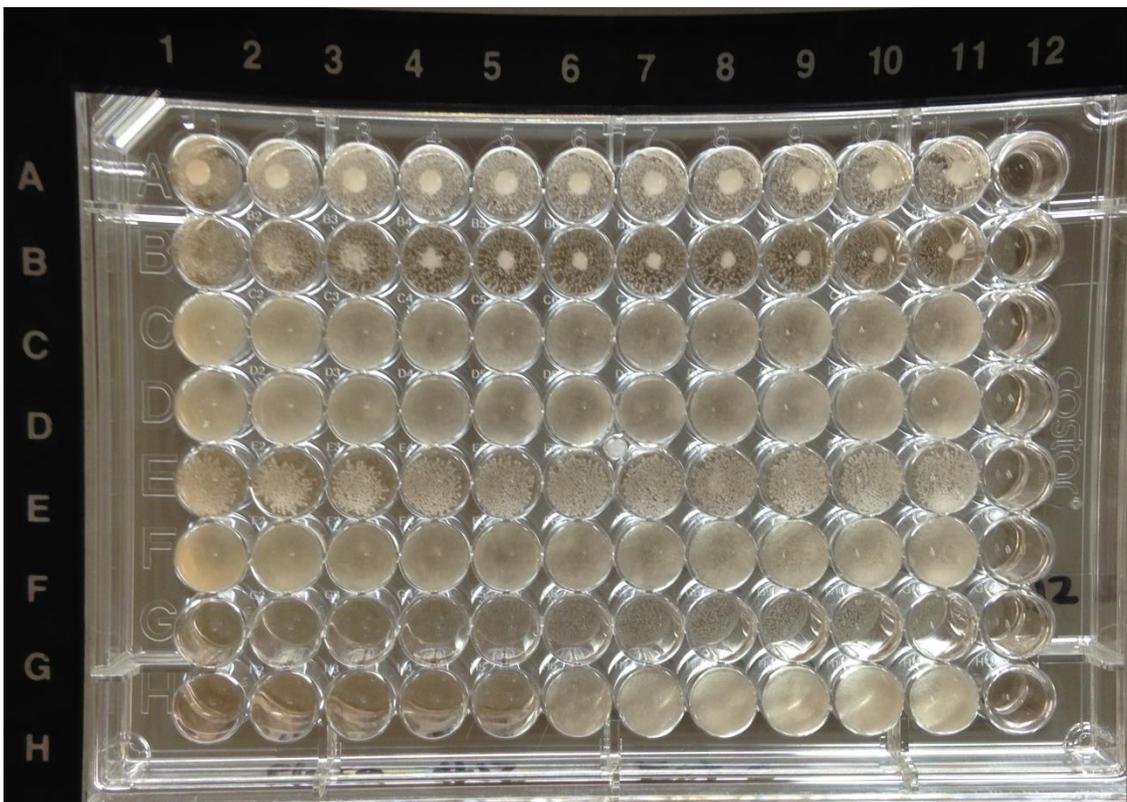
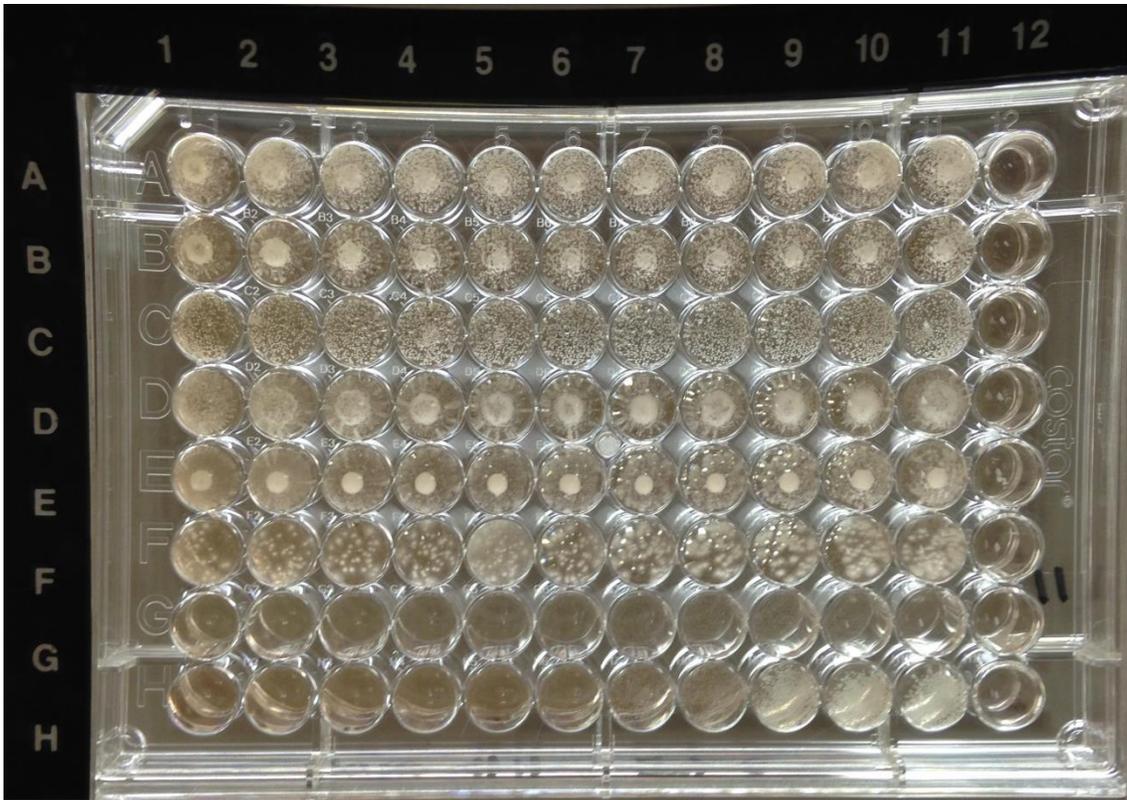
**Figura No. 6.-** Pruebas de susceptibilidad para el extracto metanólico de *Ganoderma applanatum*. Placa 1 en la parte superior y placa 2 en la parte inferior.



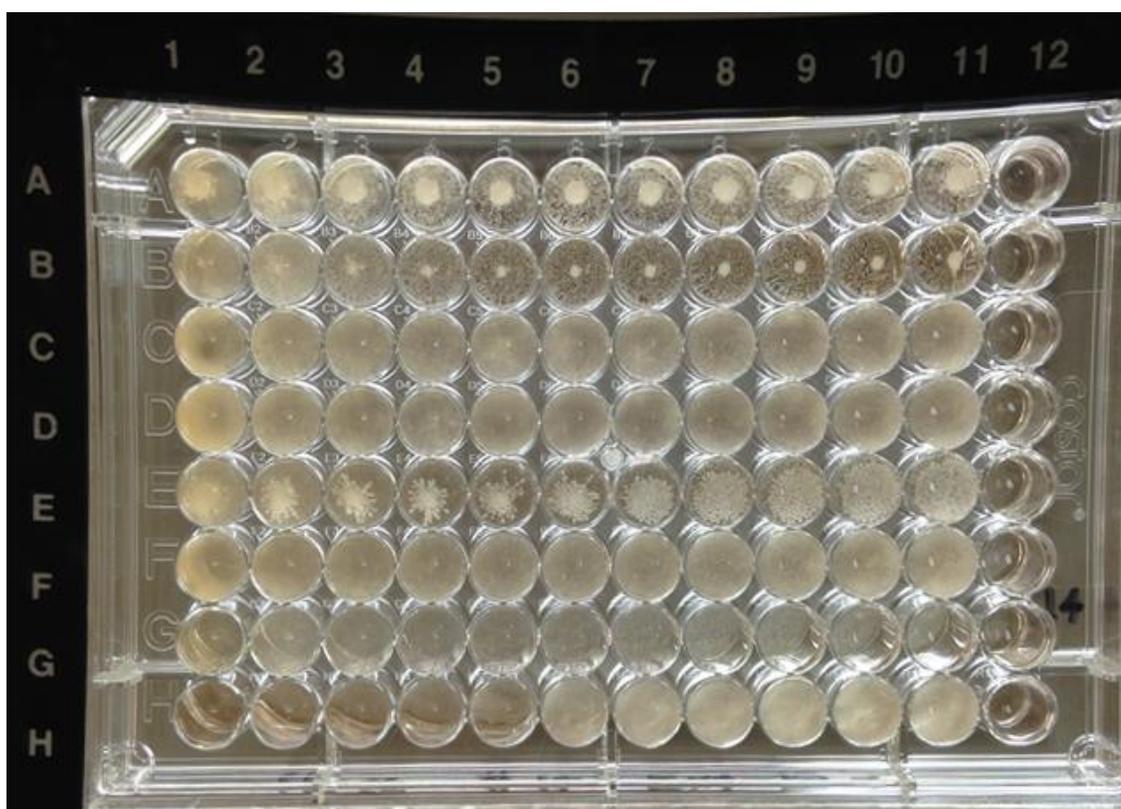
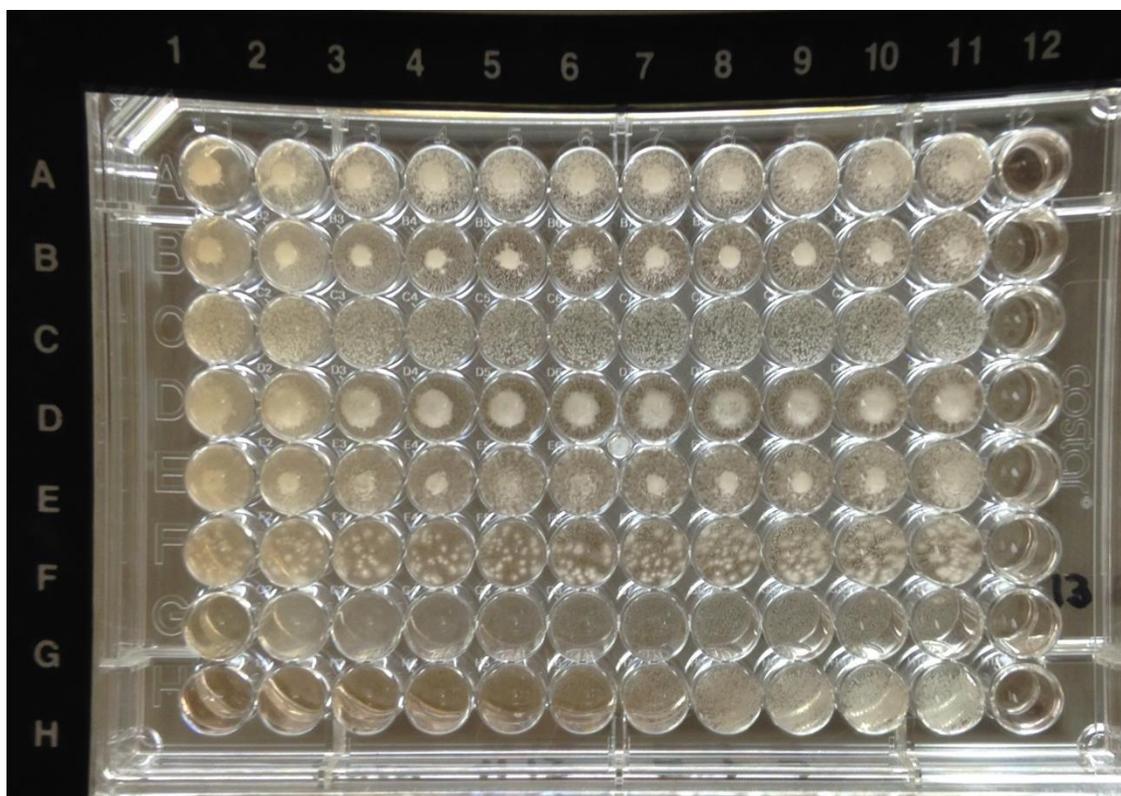
**Figura No. 7.-** Pruebas de susceptibilidad para el extracto del medio de cultivo de *Ganoderma applanatum*. Placa 1 en la parte superior y placa 2 en la parte inferior.



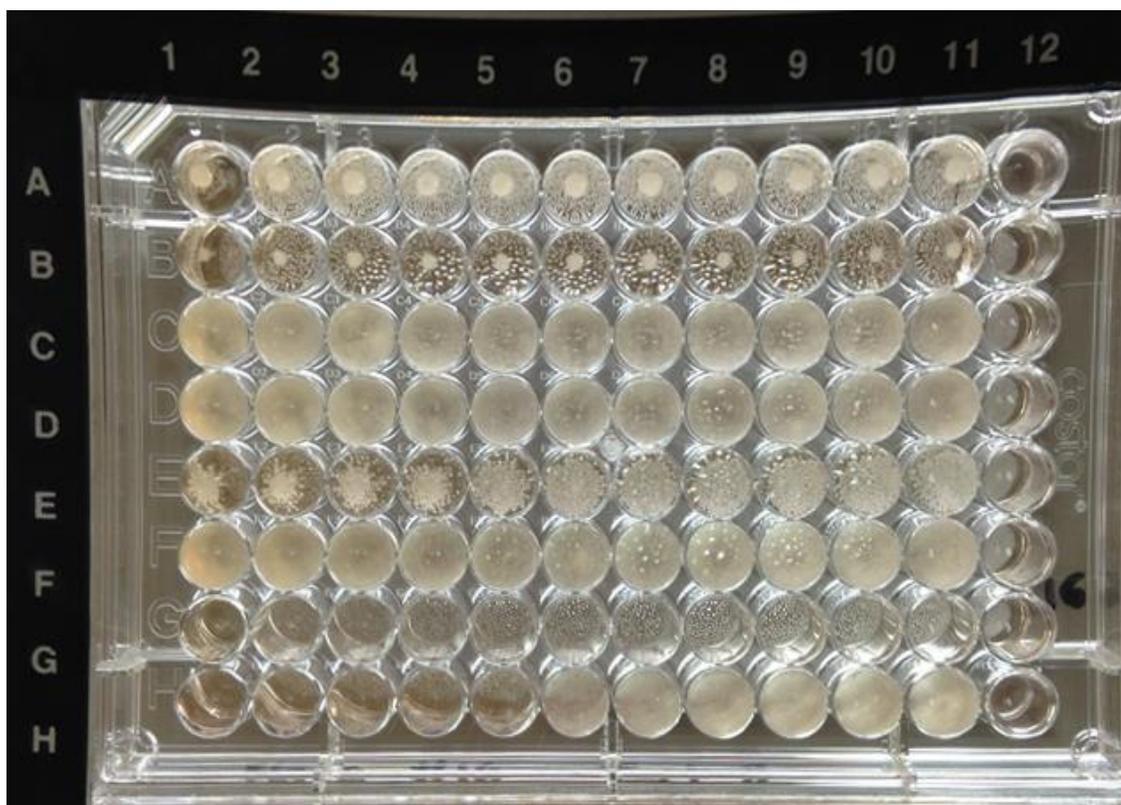
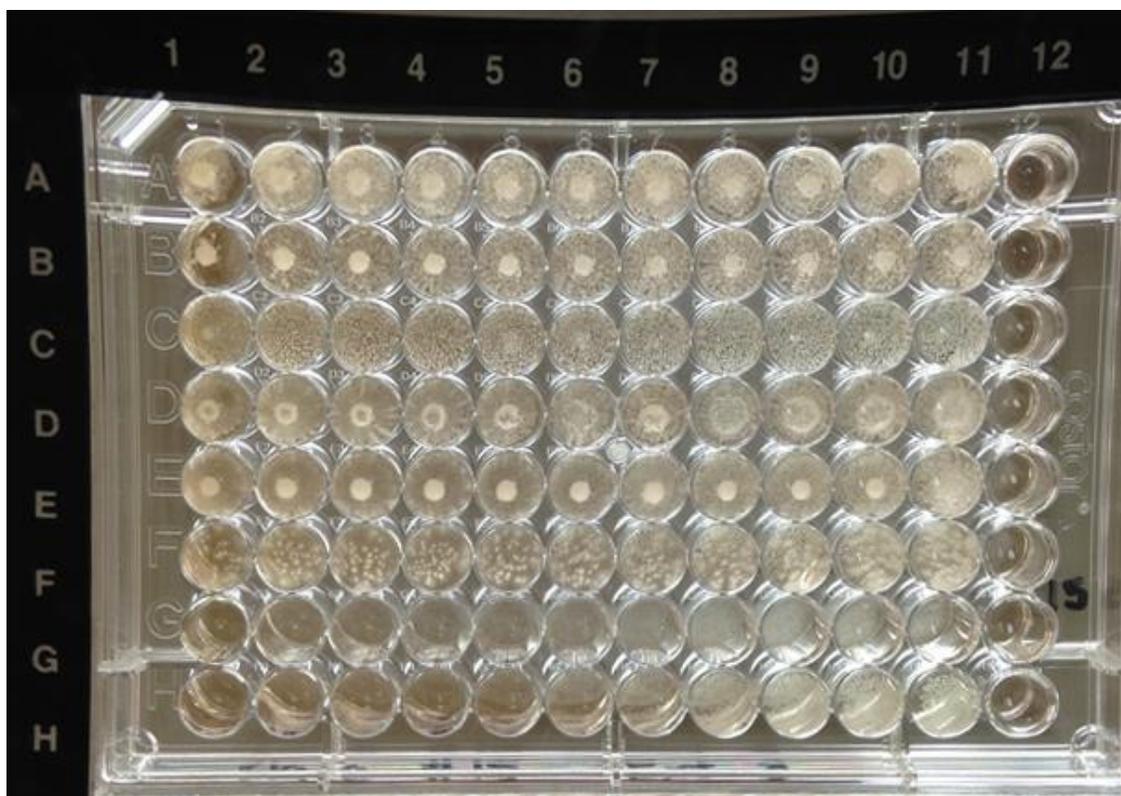
**Figura No. 8.-** Pruebas de susceptibilidad para el extracto metanólico de *Pleurotus djamor*. Placa 1 en la parte superior y placa 2 en la parte inferior.



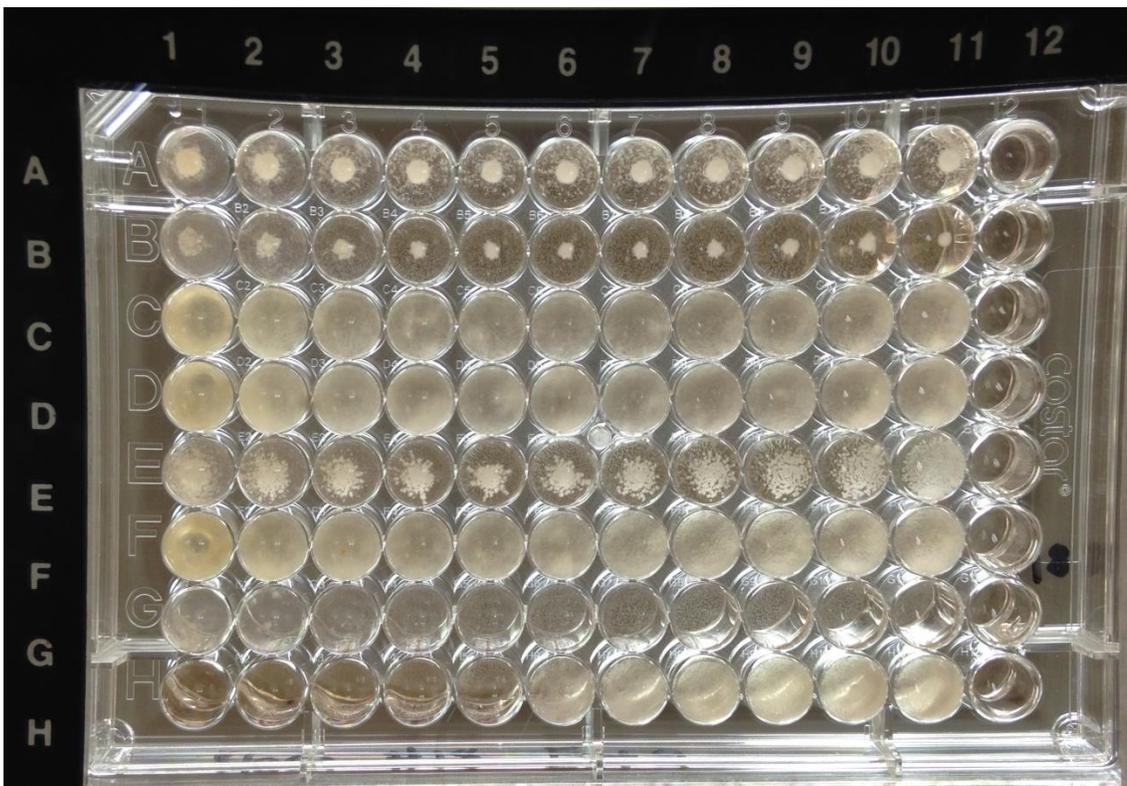
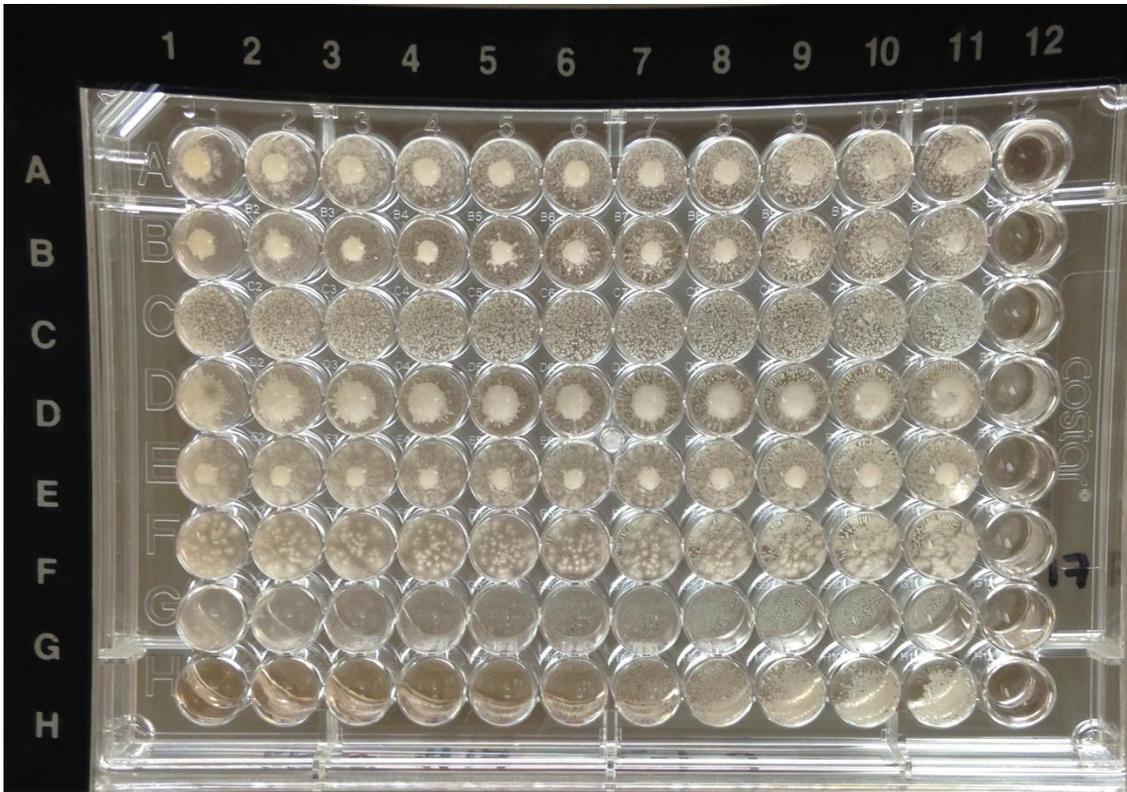
**Figura No. 9.-** Pruebas de susceptibilidad para el extracto del medio de cultivo de *Pleurotus djamor*. Placa 1 en la parte superior y placa 2 en la parte inferior.



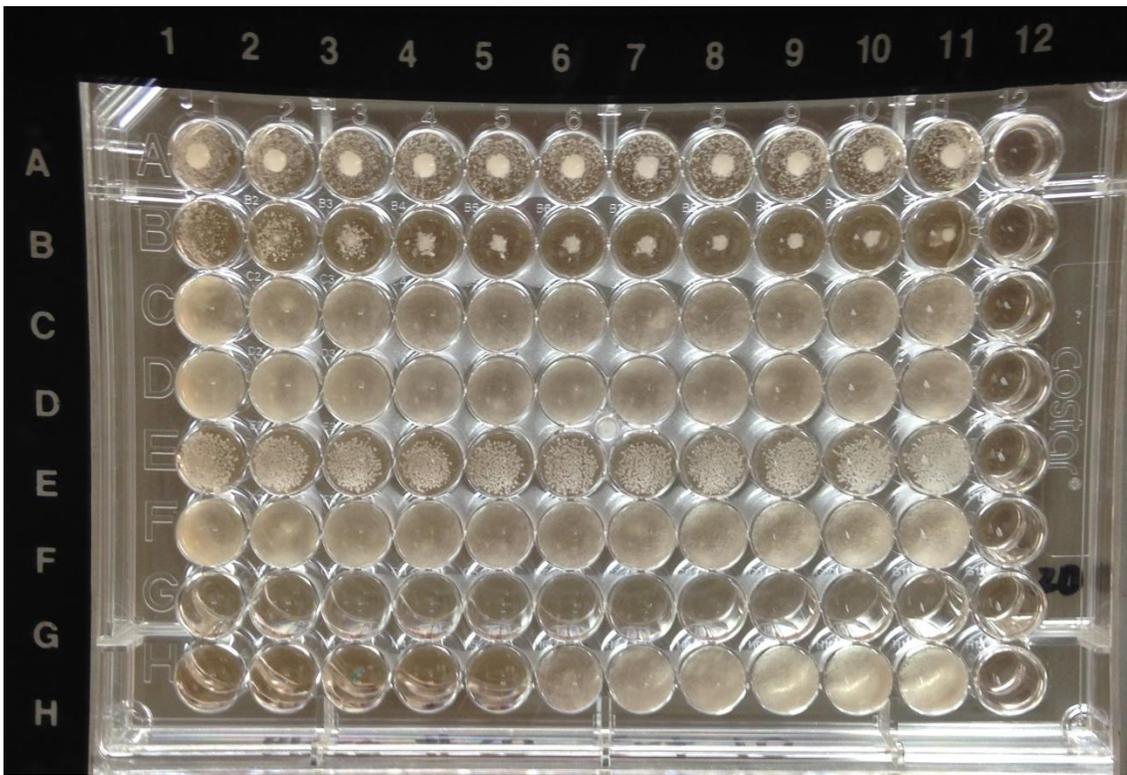
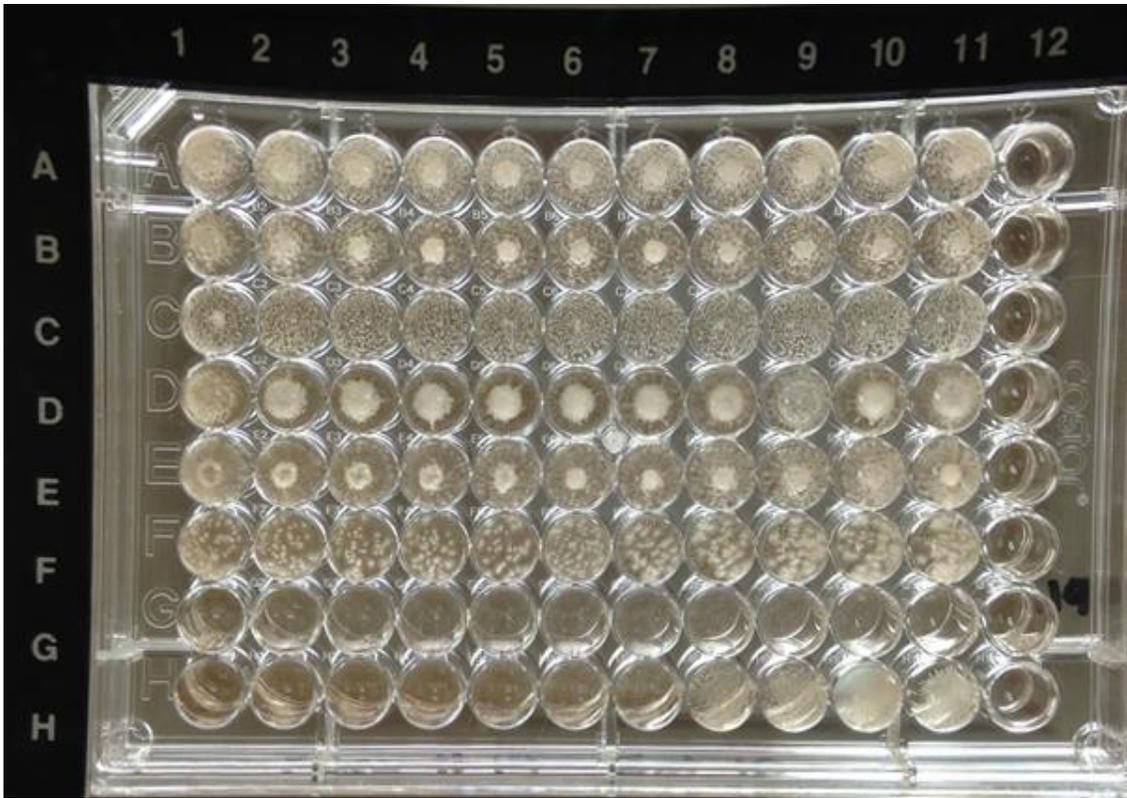
**Figura No. 10.-** Pruebas de susceptibilidad para el extracto metanólico de *Cantharellus cibarius*. Placa 1 en la parte superior y placa 2 en la parte inferior.



**Figura No. 11.-** Pruebas de susceptibilidad para el extracto del medio de cultivo de *Cantharellus cibarius*. Placa 1 en la parte superior y placa 2 en la parte inferior.



**Figura No. 12.-** Pruebas de susceptibilidad para el extracto metanólico de *Leucopaxillus amarus*. Placa 1 en la parte superior y placa 2 en la parte inferior.



**Figura No. 13.-** Pruebas de susceptibilidad para el extracto del medio de cultivo de *Leucopaxillus amarus*. Placa 1 en la parte superior y placa 2 en la parte inferior.

Aislamiento o Control		<i>C. cyathiformis</i>		<i>G. applanatum</i>		<i>P. djamor</i>		<i>C. cibarius</i>		<i>L. amarus</i>	
Especie	No.	EM	EC	EM	EC	EM	EC	EM	EC	EM	EC
<i>C. albicans</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. neoformans</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. fumigatus</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. fumigatus</i> ATCC MYA-3626		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tabla No. 6.-** Resumen de resultados de las pruebas de susceptibilidad. EM = Extracto metanólico, EC = Extracto del medio de cultivo, (-) = Sin actividad antifúngica.

Como se aprecia en las Figuras No. 4-13 y en la Tabla No. 6, no se encontró actividad antifúngica para ninguno de los extractos analizados; pese a que en algunos casos no se presentó la formación del botón como en el control de viabilidad (Columna 11), era evidente el crecimiento del microorganismo, por lo que el resultado se consideró como negativo. En ningún caso se presentó contaminación en el control de esterilidad y en todas las pruebas los controles de cepas ATCC mostraron los valores de MIC esperados según las normas M27-A3 y M38-A2 del CLSI.

## CAPÍTULO 7

### DISCUSIÓN

En investigaciones previas llevadas a cabo en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., las propiedades farmacológicas descritas en reportes internacionales para las especies de macromicetos también presentes en el noreste de México, se conservaban al probarse bajo las condiciones de cultivo *in-vitro* descritas en este proyecto de investigación <sup>(13, 16, 35)</sup>, sin embargo, en el presente estudio no fue así; aunque las condiciones de cultivo pudieran ser un factor determinante para la producción de los metabolitos secundarios que poseen actividad antifúngica, existen otros factores que pudieran estar involucrados en que los macromicetos evaluados en este proyecto, no presentaran dicha actividad. Por ejemplo, Suay y cols. (2000) reportaron no haber encontrado diferencias significativas entre ordenes o familias de macromicetos (con respecto a su actividad antimicrobiana), sin embargo, sí encontraron diferencias a nivel de género e incluso entre distintas cepas de la misma especie, lo que sugiere que la producción de metabolitos con actividad antimicrobiana no está distribuida de forma homogénea y que incluso se puede deber a diferencias genéticas infra-especie. Por lo tanto, pese a que en reportes internacionales se haya asociado con actividad antifúngica a las especies de macromicetos evaluadas en este estudio, es probable que las cepas del noreste de México, no presenten ésta actividad debido a características genéticas que los diferencian de las cepas analizadas en otros reportes.

Por otra parte, Coetzee y van Wyk (2009) llevaron a cabo una revisión de las propiedades farmacológicas y biotecnológicas de las especies del género *Calvatia*; en su artículo, mencionan que las especies *C. cyathiformis*, *C. carniiformis*, *C. gigantea* y *C. utriiformis* son capaces de producir p-carboxifenilazoxicianida (comúnmente conocida como ácido calvático) y que dicho compuesto ha demostrado actividad antibacteriana y antifúngica, entre otras; Motib y cols (2013) también reportan actividad antimicrobiana para *C. craniiformis*; sin embargo, también hay reportes que demostraron lo contrario, al igual que en esta investigación, Suay y cols. (2000) no encontraron actividad antibacteriana ni antifúngica para *C. cyathiformis*; Suay y cols., como nosotros, evaluaron la actividad antimicrobiana de extractos metanólicos de cultivos in-vitro del macromiceto y aunque utilizaron condiciones de cultivo *in-vitro* distintas, sus resultados concuerdan con nuestros hallazgos, por lo que es necesario evaluar si bajo ambas condiciones de cultivo se produce el ácido calvático, así como corroborar si éste compuesto presenta actividad antifúngica.

Como lo mencionan Nagaraj y cols. (2013), existen pocos reportes referentes a la actividad antimicrobiana de las especies del género *Ganoderma*; al respecto, Yamaç y Bilgili (2006), investigaron a la especie *Ganoderma carnosum* contra bacterias y la cepa ATCC 10259 de *C. albicans*, demostrando actividad antibacteriana pero sin encontrar actividad antifúngica; por otra parte, Nagaraj y cols. (2013) evaluaron distintos extractos del macromiceto *Ganoderma applanatum* y éstos poseían actividad tanto antibacteriana como antifúngica (contra *Candida albicans* MTCC 1637 y *Chrysosporium indicum* MTCC 2831) siendo el extracto metanólico el más activo; así mismo, Muhsin y cols.

(2011) también encontraron actividad antibacteriana para *Ganoderma applanatum*, pero éste no poseía actividad antifúngica contra las especies de *Microsporum* y *Trichophytum* evaluadas; en el presente estudio, se analizó la actividad antifúngica de *Ganoderma applanatum* contra aislamientos clínicos de *Candida albicans* y otras especies de hongos oportunistas, pero no se logró demostrar actividad antifúngica para este macromiceto contra ninguno de los microorganismos.

Como lo mencionan Patel y cols. (2012), extractos metanólicos de las especies del género *Pleurotus* han demostrado la inhibición del crecimiento de especies de bacterias (*B. megaterium*, *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*) y hongos (*C. albicans*, *C. glabrata* y especies de *Trichophyton* y *Epidermophyton*); entre ellas, para la especie *Pleurotus djamor*, Valencia y cols. (2008) también reportan actividad antibacteriana, mientras que Acharya y cols. (2011) demostró la actividad antifúngica de extractos etanólicos de éste macromiceto contra el fitopatógeno *Magnaporthe grisea*; Giri y cols. (2012) evaluaron la actividad antimicrobiana de extractos metanólicos de *P. djamor* contra distintos microorganismos, entre ellos, la cepa MTCC CODE 183 de *C. albicans*, contra la cual demostraron actividad antifúngica; sin embargo, a diferencia de éstos reportes, en el presente estudio no se encontró actividad antifúngica en la especie *P. djamor* contra ninguno de los hongos patógenos evaluados.

En algunos reportes, los extractos etanólicos y metanólicos del macromiceto *Cantharellus cibarius* han demostrado poseer actividad antifúngica, Ozen y cols. (2011) demostraron la actividad antifúngica de extractos metanólicos de éste macromiceto contra varias levaduras, entre ellas *C. albicans*; Aina y cols. (2012) también encontraron

actividad antifúngica contra una cepa de *Candida albicans* tanto en extractos metanólicos como etanólicos; sin embargo, Dulger y cols. (2004) demostraron actividad antifúngica contra algunas especies del género *Aspergillus*, pero no contra la cepa ATCC 10231 de *C. albicans*, al igual que Ramesh y Pattar (2010) quienes no encontraron actividad antifúngica significativa contra la cepa ATCC 60192 de *C. albicans*; nosotros, al igual que Dulger y cols. (2004) y Ramesh y Pattar (2010), pero contrario a los hallazgos de Ozen y cols (2011) y Aina y cols (2012), en la presente investigación no encontramos actividad antifúngica contra los aislamientos clínicos de *C. albicans* probados, sin embargo, también contrario a lo reportado por Dulger y cols. (2004) no fue posible demostrar actividad antifúngica para *Cantharellus cibarius* contra los aislamientos clínicos de *A. fumigatus*, ni contra la cepa ATCC MYA-3626 de ésta especie.

Aparte, Barros y cols. (2007) reportaron que las especies del género *Leucopaxillus* han sido utilizadas por la industria química para la extracción de clitocibina, una isoindolinona que ha sido relacionada con actividad antimicrobiana, entre otras; sin embargo, debido a cuestiones taxonómicas de los géneros *Leucopaxillus* y *Clitocybe*, no se cuenta con una gran cantidad de literatura científica con respecto a éstos géneros; en su investigación, Barros y cols. (2007), determinaron la actividad antimicrobiana de *Leucopaxillus giganteus* contra bacterias y levaduras, encontrando que éste macromiceto, en condiciones de cultivo muy similares a las utilizadas durante ésta investigación, no presentaba actividad antifúngica contra *C. albicans* ni contra *C. neoformans*; por otra parte, Eren y cols. (2013) analizaron la actividad antifúngica de *Leucopaxillus tricolor* contra *Aspergillus fumigatus* fitopatógenos, encontrando que

extractos etanólicos y de acetona sí poseían actividad antifúngica contra este microorganismo. En el noreste de México, contamos con la especie *Leucopaxillus amarus*, para la cual se evaluó la actividad antifúngica, sin encontrar esta propiedad farmacológica.

Por último, cabe señalar que debido a las características culturales de la sociedad mexicana, que suele recurrir a productos naturales para remediar algunas enfermedades, es de suma importancia evaluar las propiedades farmacológicas de éstos productos, sobre todo en el caso de los productos obtenidos a partir de macromicetos, ya que, como es evidente en este estudio, pese a que en reportes internacionales se mencionan actividad antifúngica para todos los macromicetos evaluados, en ninguno de ellos se encontró dicha actividad.

## CAPÍTULO 8

### CONCLUSIONES

- Bajo las condiciones de cultivo empleadas en esta investigación, fue posible obtener extractos metanólicos y de medio de cultivo de los macromicetos *Calvatia cyathiformis*, *Cantharellus cibarius*, *Ganoderma applanatum*, *Leucopaxillus amarus* y *Pleurotus djamor* para la evaluación de su actividad antifúngica.
- Los extractos metanólicos y de medio de cultivo de los macromicetos *Calvatia cyathiformis*, *Cantharellus cibarius*, *Ganoderma applanatum*, *Leucopaxillus amarus* y *Pleurotus djamor* no presentaron actividad antifúngica contra los aislamientos clínicos y cepas control analizadas.

## CAPÍTULO 9

### PERSPECTIVAS

- Evaluar otras propiedades farmacológicas de los macromicetos *Cantharellus cibarius* y *Leucopaxillus amarus* del noreste de México, ya que éstas no han sido ampliamente investigadas.
- Emplear condiciones de cultivo similares a las reportadas por la literatura científica para cada macromiceto, para determinar si éstas fueron un factor determinante para que no se presentara actividad antifúngica en los macromicetos aquí evaluados.
- Comparar las cepas aquí analizadas contra las cepas reportadas en otras publicaciones, bajo las mismas condiciones de cultivo, para determinar qué factor influyó en los resultados encontrados.
- Determinar la producción de ácido calvático y clitocibina para los macromicetos *Calvatia cyathiformis* y *Leucopaxillus amarus* bajo éstas y otras condiciones de cultivo y evaluar sus actividades antimicrobianas.

## CAPÍTULO 10

### LITERATURA CONSULTADA

1. Acharya S. Antimicrobial activity of *Pleurotus djamor*. Journal of Mycopathological Research 2011; 49(2): 329-332.
2. Aina DA, Jonathan SG, Olawuyi OJ, Ojelabi DO, Durowoju BM. Antioxidant, antimicrobial and phytochemical properties of alcoholic extracts of *Cantharellus cibarius* a Nigerian mushroom. New York Science Journal 2012; 5(10):114-120.
3. Barros L, Baptista P, Estevinho LM, Ferreira I. Bioactive properties of the medicinal mushroom *Leucopaxillus giganteus* mycelium obtained in the presence of different nitrogen sources. Food Chemistry 2007; 105: 179-186.
4. Bohlin L, Göransson U, Alsmark C, Wedén C, Backlund A. Natural products in modern life science. Phytochem Rev 2010; 9: 279-301.
5. Bonifaz-Trujillo JA. Micología médica básica. 3a edición. México D.F.: McGraw-Hill Interamericana Editores, 2010: 1-349.
6. Chotirmall SH, Al-Alawi M, Mirkovic B, Lavelle G, Logan PM, Greene CM, McElvaney G. *Aspergillus*-associated airway disease, inflammation, and innate immune response. BioMed Research International 2013; 2013: 1-14.
7. Coetzee JC, van Wyk AE. The genus *Calvatia* (*Gasteromycetes*, *Lycoperdaceae*) a review of its ethnomycology and biotechnological potential. Afr J Biotechnol 2009; 8(22): 6007-6015.

8. Cogliati M. Global molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* an atlas of the molecular types. *Scientifica* 2013; 2013: 1-23.
9. Dipiro JT, Talbert RL, Yee GC, Matzke GR, Wells BG, Posey LM. *Pharmacotherapy a pathophysiologic approach*. 8a edición. United States of America: McGraw-Hill Companies, 2011: 1797-2190.
10. Dulger B, Gonuz A, Gucin F. Antimicrobial activity of the macrofungus *Cantharellus cibarius*. *Pak J Biol Sci* 2004; 7(9): 1535-1539.
11. Eren E, Guler P, Kunduz I. Antifungal effects of *Leucopaxillus tricolor* (Peck) Kühner against to the plant pathogens. *IJBPAS* 2013; 2(2):501-505.
12. Garcia-Solache MA, Casadevall A. Hypothesis: Global warming will bring new fungal diseases for mammals. *mBio* 2010; 1(1): 1-3.
13. Garza-Ocañas L, Ramírez-Gómez XS, Garza-Ocañas F, Salinas-Carmona MC, Waksman-de Torres N, Alcaraz-Contreras Y, Torres-Alanís O. Evaluación de la actividad biológica de extractos acuosos de macromicetos del noreste de México. *Ciencia UANL* 2006; 9(2): 164-170.
14. Gerasimenya VP, Efremenkova OV, Kamzolkinina OV, Bogush TA, Tolstych IV, Zenkova VA. Antimicrobial and antitoxical action of edible and medicinal mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm extracts. *Int J Med Mushr* 2002; 4(2): 1-6.
15. Giri S, Biswas G, Pradhan P, Mandal SC, Acharya K. Antimicrobial activities of basidiocarps of wild edible mushrooms of West Bengal, India. *Int J Oharm tech Res* 2012; 4(4): 1554-1560.
16. Gonzalez-Barranco P, Garza-Ocañas L, Vera-Cabrera L, Salinas-Carmona MC, Garza-Ocañas F, Ramírez-Gomez XS, Lujan-Rangel R. Evaluation of antioxidant,

- immunomodulating, cytotoxic and antimicrobial properties of different strains of Basidiomycetes from northeastern Mexico. *J Med Plant Res* 2010; 4(17): 1762-1769.
17. González GM, Elizondo M, Ayala J. Trends in species distribution and susceptibility of bloodstream isolates of *Candida* collected in Monterrey, México, to seven antifungal agents: Results of a 3-year (2004 to 2007) surveillance study. *J Clin Microbiol* 2008; 46(9): 2902-2905.
  18. Guzman G. Diversity and use of traditional mexican medicinal fungi a review. *Int J Med Mushr* 2008; 10(3): 209-217.
  19. Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, Bennett JE, Greene RE, Oestmann TW, Kern WV, Marr KA, Ribaud P, Lortholary O, Sylvester R, Rubin RH, Wingard JR, Stark P, Durand C, Caillot D, Thiel E, Chandrasekar PH, Hodges MR, Schlamm HT, Troke PF, Pauw B. Voriconazole versus amphotericin b for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med* 2002; 347(6): 408-415.
  20. Horn F, Heinekamp T, Kniemeyer O, Pollmächer J, Valiante V, Brakhage AA. Systems biology of fungal infection. *Frontiers in microbiology* 2012; 3(108): 1-20.
  21. Jiménez-Ruiz M, Pérez-Moreno J, Almaraz-Suarez JJ, Torres-Aquino M. Hongos silvestres con potencial nutricional, medicinal y biotecnológico comercializados en Valles Centrales, Oaxaca. *Rev Mex Cienc Agríc* 2013; 4(2): 199-213.
  22. Kozubowski L, Heitman J. Profiling a killer, the development of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Microbiol Rev* 2012; 36(1): 78-94.
  23. Lewis RE. Current concepts in antifungal pharmacology. *Mayo Clin Proc* 2011; 86(8): 805-817.

24. Lindequist U, Niedermeyer THJ, Jülich WD. The pharmacological potential of mushrooms. *eCAM* 2005; 2(3): 285-299.
25. Morris MI. Posaconazole a new oral antifungal agent with an expanded spectrum of activity. *Am J Health Syst Pharm* 2009; 66(3): 225-236.
26. Motib AS, Ibrahim BM, Rahid HH. Evaluation of in vitro activity of *Calvatia craniiformis* extract against bacteria isolated from pregnant women with asymptomatic bacteriuria. *Fac Med Baghdad* 2013; 55(4): 353-357.
27. Muhsin TM, Al-Duboon AHA, Khalaf KT. Bioactive compounds from a polypore fungus *Ganoderma applanatum* (Per s ex Wallr) Pat. *JJBS* 2011; 4(4): 205-212.
28. Nagaraj K, Mallikarjun N, Naika R, Venugopal TM. Phytochemical analysis and *in vitro* antimicrobial potential of *Ganoderma applanatum* (Pers) Pat of Shivamogga District-Karnataka India. *Int J Pharm Sci Rev Res* 2013; 23(2): 36-41.
29. O'Meara TR, Alspaugh JA. The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield. *Clinical Microbiology Reviews* 2012; 25(3): 387-408.
30. Ozen T, Darcan C, Aktop O, Turkecul I. Screening of antioxidant, antimicrobial activities and chemical contents of edible mushrooms wildy grown in the black sea region of Turkey. *Comb Chem High Throughput Screen* 2011; 12(2): 72-84.
31. Patel Y, Narain R, Singh VK. Medicinal properties of *Pleurotus* species (pyster mushroom) a review. *World J Fungal & Plant Biol* 2012; 3(1): 01-12.
32. Pauw BE. What are fungal infections?. *Medit J Hemat Infect Dis.* 2011; 3.
33. Sifuentes-Osornio J, Corzo-León DE, Ponce-de-León LA. Epidemiology of invasive fungal infections in latin america. *Curr Fungal Infect Rep* 2012; 6: 23-34.
34. Suay I, Arenal F, Asensio FJ, Basilio A, Cabello MA, Díez MT, García JB, González –del Val A, Gorrochategui J, Hernández P, Peláez F, Vicente MF.

- Screening of basidiomicetes for antimicrobial activities. *Antonie van Leeuwenhoek* 2000; 78: 129-139.
35. Tamez-de la O EJ, Garza-Ocañas L, Zanatta-Calderón MT, Lujan-Rangél R, Garza-Ocañas F, Badillo-Castañeda CT, Ramírez-Gómez XS. Hypoglycemic and hypocholesterolemic effects of aqueous and methanolic extracts of *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* and *Ganoderma applanatum*, from northeastern Mexico, in Wistar rats. *J Med Plant Res* 2013; 7(11): 661-668.
36. Valencia-del Toro G, Garín-Aguilar ME, Téllez-Jaimes A, Durán-Páramo E. Actividad antibacteriana de extractos hexánicos de cepas de *Pleurotus djamor*. *Rev Mex Mic* 2008; 28.
37. Yamaç M, Bilgili F. Antimicrobial activities of fruit bodies and/or mycelial cultures of some mushroom isolates. *Pharmaceutical Biology* 2006; 44(9): 660-667.