

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



INHIBICION DEL CRECIMIENTO Y DE LA  
FORMACION DEL TUBO GERMINATIVO DE  
*Candida albicans* POR ANTIFUNGICOS E  
INSECTICIDAS DE USO AGRICOLA

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA.

JAVIER MARTINEZ SOLIS

MONTERREY, NUEVO LEON

MAYO DE 1999

TD  
QR245  
M3  
c.1



1080087118

9513

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



INHIBICION DEL CRECIMIENTO Y DE LA  
FORMACION DEL TUBO GERMINATIVO DE  
*Candida albicans* POR ANTIFUNGICOS E  
INSECTICIDAS DE USO AGRICOLA

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA

JAVIER MARTINEZ SOLIS



MONTERREY, NUEVO LEON

MAYO DE 1999

TD  
92245  
M3



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INHIBICION DEL CRECIMIENTO Y DE LA FORMACION DEL TUBO  
GERMINATIVO DE *Candida albicans* POR ANTIFUNGICOS E INSECTICIDAS DE  
USO AGRICOLA

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL  
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN  
MICROBIOLOGIA

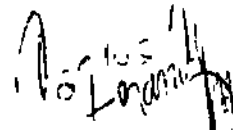
POR

Javier Martínez Solís

APROBADA  
COMISION DE TESIS



Dr. J. Santos García Alvarado  
Presidente (Director Interno)



Dr. Carlos Hernández Luna  
Secretario



Dr. José Ruiz Herrera  
Vocal (Director Externo)



Dr. Benito Pereyra Alferez  
Vocal



Dr. Oliverio Welsh Lozano  
Vocal

## **DEDICATORIA**

**A mis padres: Celestino Martínez Zuñiga y Maria Luisa Solís de Martínez, quienes durante mi vida de estudiante, profesional y como hijo siempre me apoyaron para conseguir mis metas.**

**A mi esposa Amelia Pérez y a mis hijos: Tania Pamela Martínez Pérez, Javier Ricardo Martínez Pérez y Guillermo Adal Martínez Pérez, quienes son y serán la fuente de energía para continuar alcanzando mis metas.**

**A mis hermanos: Irma, Alicia que en paz descansa, Teresa, Guillermo y Carlos, quienes siempre han sido amigos ante todo.**

**A mis cuñadas: Teresa, Irisabella, Santa, Lupe, Mary, Blanca y Juany**

**A mis cuñados: Juan, José, Gabriel y Carlos.**

**A mis amigos: Juan, Rolando, Wendy, Clara, Raquel, Elda, Raul y especialmente a Eduardo y Sergio.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Al Dr. José Santos García Alvarado, por haberme brindado todo el apoyo y dirección que necesitaba durante la realización de esta investigación.**

**Al Dr. José Ruiz-Herrera, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por sus valiosos consejos y la dirección de esta investigación.**

**Al Dr. Benito Pereyra Alférez, Por su valiosa participación en esta investigación.**

**Al Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna, por su acertada participación en la realización de esta investigación.**

**Al Dr. Oliverio Welsh Lozano, por sus acertados consejos y participación de esta investigación.**



## **AGRADECIMIENTO ESPECIAL**

De manera muy especial quiero agradecer al Dr. Manuel Antonio Rodríguez Quintanilla, q.e.p.d. por haberse involucrado en el origen y dirección de esta investigación. Además por sus valiosos consejos como amigo, compañero de trabajo y maestro. Porque para él era más valioso “involucrarse que participar” en las investigaciones.

## INDICE DE CONTENIDO

Página de título.....	
Comisión de tesis.....	
Dedicatoria.....	I
Agradecimientos.....	II
Agradecimiento especial.....	III
Indice.....	IV
Lista de tablas.....	VI
Lista de figuras.....	VII
Lista de abreviaturas.....	
Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Desarrollo de la quimioterapia antifúngica.....	6
Compuestos activos contra la pared celular o la membrana citoplasmática	6
Aspectos bioquímicos de la pared celular de hongos de importancia médica.	7
Síntesis de quitina.....	10
Compuestos activos contra la pared celular de los hongos.....	12
El uso de las polioxinas contra hongos de importancia médica.....	14
Antifúngicos activos contra otros blancos.....	15
Nuevos antifúngicos en estudio.....	18
Objetivos.....	20
Material y Método.....	21

Selección de compuestos.....	21
Cultivo de <i>C. albicans</i> .....	22
Actividad inhibitoria de la formación de tubo germinativo.....	22
Microscopía electrónica de transmisión.....	23
Obtención de paquete celular.....	24
Extracción de la fracción mixta de membranas.....	24
Activación de la F.M.M.....	25
Preparación del sustrato.....	25
Ensayo para incorporación de <sup>14</sup> C UDP-GlcNAc.....	25
Protocolo de actividad de la enzima quitina sintetasa.....	26
Cuantificación del isótopo incorporado.....	27
Determinación de proteínas.....	27
Determinación de incorporación de <sup>14</sup> C GlcNAc.....	28
Protocolo de incorporación de <sup>14</sup> C GlcNAc.....	29
Determinación de incorporación de aminoácidos.....	30
Protocolo para determinar el grado de interferencia en la síntesis de proteínas utilizando como inhibidor :Metalaxil y Maneb.....	31
Protocolo para determinar el grado de interferencia en la síntesis de proteínas utilizando como inhibidor :Benzoilfenilurea y Bitertanol.....	31
Resultados.....	32
Parámetros de crecimiento de <i>C. albicans</i> .....	32
Selección de compuestos con actividad antifúngica.....	32
Lista de compuestos con actividad antifúngica ordenada	

de acuerdo a su ingrediente activo.....	33
Determinación de la C.M.I.....	34
C.M.I. del crecimiento de la forma de levadura de los compuestos seleccionados expresada en ug/ml.....	35
C.M.I. del crecimiento de la forma de micelio de los compuestos seleccionados expresada en ug/ml.....	35
Estudio citológico de <i>C. albicans</i> .....	36
Efecto de los compuestos inhibidores seleccionados sobre la actividad de quitina sintetasa.....	37
Efecto de compuestos inhibidores sobre la biosíntesis de quitina.....	44
Determinación de la interferencia en la síntesis de proteínas.....	49
Discusión.....	52
Conclusiones.....	56
Literatura citada.....	57

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Protocolo de actividad de la enzima quitina sintetasa	26
Tabla 2 Protocolo de incorporación de <sup>14</sup> C GlcNAc	29
Tabla 3 Protocolo para determinar el grado de interferencia en la síntesis de proteínas utilizando como inhibidor: Metalaxil y Maneb	31
Tabla 4 Protocolo para determinar el grado de interferencia en la síntesis de proteínas utilizando como inhibidor: Benzoilfnilurea y Bitertanol	31
Tabla 5 Lista de compuestos con actividad antifúngica ordenada de acuerdo a su ingrediente activo.	33
Tabla 6 Lista de ingredientes activos ordenada de acuerdo al rango de efectividad en la inhibición de la formación de tubo germinativo.	34
Tabla 7 C.M.I. del crecimiento de la forma de levadura de los compuestos seleccionados expresada en ug/ml.	35
Tabla 8 C.M.I. del crecimiento de la forma de micelio de los compuestos seleccionados expresada en ug/ml.	35
Tabla 9 Actividad relativa de la quitina sintetasa de <i>C. Albicans</i> 95775-R.	37
Tabla 10 Actividad relativa de la quitina sintetasa de <i>C. Albicans</i> 95771-S.	38
Tabla 11 Actividad relativa de la quitina sintetasa de <i>C. Albicans</i> 95740-R.	38
Tabla 12 Actividad relativa de la quitina sintetasa de <i>C. Albicans</i> 95759-S.	39

## LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 Microfotografía de <i>C. Albicans</i> bajo el efecto de Benzoil fenil urea	36
Fig. 2 Microfotografía de <i>C. Albicans</i> bajo el efecto de Metalaxil.	36
Fig. 3 Actividad relativa de la quitina sintetasa de <i>C. Albicans</i> 95775-R	40
Fig. 4 Actividad realtiva de la quitina sintetasa de <i>C. Albicans</i> 95771-S	41
Fig. 5 Actividad relativa de la quitina sintetasa de <i>C. Albicans</i> 95740-R	42
Fig. 6 Actividad relativa de la quitina sintetasa de <i>C. Albicans</i> 95759-S	43
Fig. 7 Incorporación de [ <sup>14</sup> C]-GlcNAc en <i>C. Albicans</i> CAI-4 <i>in vivo</i> .	46
Fig. 8 Inhibición de incorporación de [ <sup>14</sup> C]-GlcNAc en material insoluble en NaOH de <i>C. Albicans</i> CAI-4.	47
Fig. 9 Inhibición de incorporación de [ <sup>14</sup> C]-GlcNAc en material insoluble en TCA de <i>C. Albicans</i> CAI-4.	48
Fig. 10 Curva estándar de incorporación de [ <sup>14</sup> C]-L-aminoácidos en <i>C. Albicans</i> CAI-4.	50
Fig. 11 Incorporación de [ <sup>14</sup> C]-L-aminoácidos en <i>C. Albicans</i> CAI-4.	51

## Lista de abreviaturas

$^{14}\text{C}$	Carbono 14
$\frac{1}{4}$ c.m.i.	Una cuarta parte de la concentración mínima inhibitoria
$\frac{1}{2}$ c.m.i.	Un medio de la concentración mínima inhibitoria
c.m.i.	Concentración mínima inhibitoria
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados
g	gramos
GlcNAc	N-acetilglucosamina
h	hora
ug	microgramos
mg	miligramos
min	minutos
mM	milimolar
uL	microlitros
mL	mililitros
NaOH	hidroxido de sodio
%	porciento
r.p.m.	revoluciones por minuto
TCA	ácido tricloro acético
UDP-GlcNAc	Uridin difosfato N.acetil glucosamina

## RESUMEN

*C. Albicans* ha emergido como un importante patógeno en la última década. Desde que algunos pacientes son más susceptibles a las enfermedades candidiásicas, como los pacientes inmunosuprimidos, particularmente aquellos que sufren de SIDA, diabetes, leucemia y con especial atención los pacientes con cáncer.

La formación de tubo germinativo y la micelización han sido reconocidos como los pasos importantes para la invasión tisular. Estos procesos son concomitantes con un metabolismo activo y una alta producción de quitina, este último es el más importante componente de la pared celular.

La mayoría de las drogas activas contra *C. Albicans* tienen como blanco la síntesis de el ergosterol, y muy poco trabajo se ha hecho sobre la interrupción de quitina, no hay antifúngicos disponibles que interfieran con este proceso.

Varios fungicidas e insecticidas usados en la agricultura inhiben la síntesis de quitina. Sin embargo, no hay información sobre su actividad en contra de *C. Albicans*. Por lo que en este trabajo nosotros determinamos la actividad de Metalaxil, Triflumuron, Bitertanol y Maneb sobre el crecimiento, formación de tubo germinativo y la síntesis de quitina cinco cepas de *C. Albicans*. Las c.m.i. de estos compuestos fueron determinadas por el método de Hector, 1994 en placas de microtitulación. La actividad de la quitina sintetasa fue determinada en células completas por el método de Ruiz-Herrera y en las f.m.m. por el método de Ruiz-Herrera y Bartnicki-Garcia, 1976.

Los cuatro compuestos inhiben el crecimiento de levadura de *C. Albicans*. La c.m.i. del Metalaxil y Triflumuron fueron de 19 ug/ml; la del Maneb fue de 39 ug/ml hasta 1.25 mg/ml y la del Bitertanol fue de 39 ug/ml hasta 625 ug/ml. Los mismos compuestos también inhibieron la formación de tubo germinativo: la c.m.i del Metalaxil fue de 38 ug/ml hasta 312 ug/ml; la del Triflumuron fue de 38 ug/ml; la del Maneb fue de 78 ug/ml hasta 1.25 mg/ml y la del Bitertanol fue de 78 ug/ml hasta 625 ug/ml.

La inhibición de la síntesis de quitina fue cepa dependiente. En la mayoría de los casos la síntesis de quitina fue incrementada por los compuestos a ciertas concentraciones. En todos los casos, la c.m.i. de los compuestos no fue suficiente para inhibir la síntesis de quitina. El Bitertanol fue el más efectivo de los compuestos. A una concentración de 10 X la c.m.i., este usualmente reduce la actividad de la enzima quitina sintetasa desde uno hasta un 63%, por lo que en algunas concentraciones fue observada un ligero incremento.



## ABSTRACT

*C. albicans* has emerged as an important pathogen in the last decade. Since some patients are more susceptible to candidal diseases, immunocompromised patients, particularly those suffering of AIDS, diabetes, leukemia and cancer deserve special attention.

Germ tube formation and mycelization have been recognized as important steps for tissue invasion. These processes are concomitant with an active metabolism and high chitin production, the latter being the most important cell wall component.

Most drugs active against *C. albicans* target sterol synthesis, and less work has been done on disruption of chitin synthesis, yet, no medicinal drugs that interfere with this process are available.

Several insecticides or fungicides used in agricultural practices inhibit chitin synthesis. However, no information is available on their activity against *C. albicans*. Thus, in this work we determined the activity of Metalaxil, Triflumuron, Bitertanol and Maneb on growth, germ tube formation and chitin synthesis of four strains of *C. albicans*. The MIC of these compounds was determined by the Hector method in microtitre plates. The chitin synthetase activity was determined in whole cells by the Ruiz-Herrera method and in membrane fractions by the Ruiz-Herrera and Bartnicki-Garcia method.

All four compounds inhibited yeast growth of *C. albicans* (Metalaxil and Triflumuron, MIC= 19µg/ml; Maneb MIC=39µg/ml to 1.25 mg/ml; and Bitertanol, MIC= 39 to 625 µg/ml). The same compounds also inhibited the germ tube formation Metalaxil, MIC=38 to 312 µg/ml; Triflumuron, MIC= 38µg/ml; Maneb MIC=78µg/ml to 1.25 mg/ml; and Bitertanol, MCI= 78 to 625 µg/ml.

Inhibition of chitin synthetase was strain dependent. In many cases the chitin synthesis was increased by the compounds at certain concentrations. In all cases the MIC of the compounds were not enough to inhibit the chitin synthesis. Bitertanol was the most effective compound. At 10X MIC, it usually reduced the enzyme activity from one to 63%, although in some concentrations a slight increase was observed.

## INTRODUCCIÓN

En la pasada década se efectuaron grandes avances en la tecnología médica, particularmente en cirugía, quimioterapia, y trasplante de órganos lo que redujo significativamente la morbilidad y mortalidad de muchas enfermedades. Sin embargo estas tecnologías pueden requerir de tratamientos especiales para pacientes críticamente enfermos de la población general, de hospitales y de las unidades de cuidados intensivos los cuales son los blancos primarios para las infecciones micóticas oportunistas, principalmente causadas por especies de *Candida*.

Banerjee *et al.* reportaron el incremento de infecciones primarias de torrente circulatorio desde 1980 hasta 1989 en hospitales de EUA, usando datos de 124 hospitales que participaron en el Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales (NNSI). Los autores reportaron 25,000 infecciones primarias. Durante este período, se incrementó la incidencia de infecciones micóticas causadas por *Candida*. El aumento fue de un 487 % en los hospitales de enseñanza grandes, de un 219 % para hospitales de enseñanza pequeños y de un 370 % en hospitales sin enseñanza grandes. El incremento para *Candida* fue mayor que para *Staphylococcus aureus*, enterococos, y bacilos aeróbicos gram negativos.

En un reporte más reciente del (NNSI) se encontró que de 1980 a 1990 las infecciones se incrementaron de 2.0 a 3.8 por cada 1000 pacientes. De Enero de 1986 hasta Diciembre de 1990, el número más alto de la tasa de infecciones micóticas por cada 1000 personas se presentó en las siguientes categorías: nacimiento/trauma (16.1), cirugía cardíaca (11.2), oncología (8.6) guarderías de alto riesgo (7.6) y cirugía general (7.3). Las especies de *Candida* causaron el 78 % de todas las infecciones micóticas nosocomiales, y *Candida albicans* provocó el 76 % de todas

infecciones causadas por *Candida*. Un aumento relativo fue observado en las infecciones por *C. albicans* del 52 % en 1980 hasta un 63 % en 1990. Estos investigadores puntualizaron una asociación entre el incremento en la fungemia y el uso de nutrición parenteral total, de cateterización intravascular central, y de antibióticos de amplio espectro (Beck-Sagué C. M. *et al*, 1993).

En ese estudio, la fungemia fue un serio evento: la mortalidad debida a esta fue de un 29 %, comparada con el 17 % para pacientes con infecciones de torrente sanguíneo causada por otros patógenos. Aunque la mortalidad puede estar relacionada con el proceso de enfermedad que predispone pacientes a la infección micótica, los autores piensan que muchas de las muertes observadas en su estudio estuvieron relacionadas a la infección (Beck-Sagué C. M. *et al*, 1993).

De todas las infecciones microbianas en humanos, las micosis, particularmente aquellas que afectan a pacientes inmunocomprometidos, son las más difíciles de curar, aunque se han hecho progresos reales en el desarrollo de drogas antifúngicas.

Muchos agentes antifúngicos se han desarrollado, pero únicamente unos pocos son activos *in vivo* y *ex vivo*. Algunos agentes no pueden ser usados en humanos, ya que no se difunden en los tejidos, o son inactivados por enzimas inducidas (por ejemplo, clotrimazol), o son tóxicos. El uso de antifúngicos *in vivo* está relacionado a la diferencia selectiva en la permeabilidad al agente antifúngico de las células del parásito y las del hospedero. Una droga efectiva debe ser más tóxica para el patógeno que para el hospedero.

Las relaciones entre los tres elementos esenciales, los hongos responsables de la infección micótica, el hospedero, y el agente antifúngico determinan el curso, la severidad y la epidemiología de la enfermedad.

La estructura de la pared celular del hongo, el material que la rodea, y las membranas citoplásmicas todas juegan un importante papel en la permeabilidad a los antibióticos. Varios de estos componentes y otros más de la célula fungal son los blancos para los agentes antimicrobianos (Ryley J, F. *et al*, 1981).

La eficiencia de esos agentes también depende de la respuesta del tejido a la infección y del sitio de la infección. Estos factores del hospedero, así como factores extrínsecos frecuentemente iatrogénicos pueden favorecer el desarrollo de infecciones micóticas oportunistas ( Drouhet E. and B. Dupont, 1985).

Un número elevado de infecciones micóticas invasivas ha sido reportado en pacientes quienes están inmunocomprometidos por enfermedad o quimioterapia. En los EUA la incidencia de casos reportados de aspergilosis se ha incrementado desde 1.91 hasta 4.8 millones de personas, y la incidencia de infecciones por *Cryptococcus neoformans* se ha aumentado de 1970 hasta 1976 desde 1.3 hasta 2.3 millones. Sin embargo, en 1985, con la adición de las infecciones oportunistas que ocurren en pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, las tasas fueron substancialmente superiores (Stenderup A. and H. Schoenheyder, 1984). El costo parcial por esas infecciones es grande, por ejemplo, el valor de las drogas antifúngicas vendidas en 1979 por ocho de los mayores productores fue de aproximadamente 104 millones de dólares (Bullock W. E. and G. S. Deepe, 1983).

Aunado a las infecciones asociadas con los factores iatrogénicos extrínsecos tales como el uso de antibióticos, corticoesteroides y drogas inmunosupresivas, se ha encontrado en adictos a la heroína un nuevo síndrome septicémico causado por *C. albicans*, con lesiones cutáneas, oculares y osteoarticulares (Dupont B. and E. Drouhet, 1985).

## **DESARROLLO DE LA QUIMIOTERAPIA ANTIFÚNGICA.**

Importantes progresos han sido hechos en la quimioterapia antifúngica. Los principales agentes pueden ser divididos en dos grupos sobre las bases de su origen: (1) antibióticos producidos por microorganismos, por ejemplo nistatina, anfotericina B y griseofulvina; y (2) agentes sintéticos, por ejemplo yoduro de potasio, sulfonamidas, fluocitocinas y derivados de los azoles (Drouhet E. and B. Dupont, 1987).

## **COMPUESTOS ACTIVOS CONTRA LA PARED CELULAR O LA MEMBRANA CITOPLASMÁTICA DE HONGOS DE IMPORTANCIA MÉDICA.**

Los agentes antifúngicos disponibles para el tratamiento de micosis sistémicas son limitados en número y efectividad. Mientras que un número considerable de drogas derivadas de los azoles ha sido introducido o están en la actualidad en evaluación, esta nueva clase de agentes ha reemplazado a la anfotericina B como la droga de elección en las infecciones que amenazan la vida del paciente (Diamond R., 1991).

Los compuestos antes mencionados comparten un blanco en el que todos ellos interfieren con la integridad estructural de la membrana citoplasmática. En el caso de la anfotericina B provoca la desorganización física de la membrana, y en el caso de los azoles inhiben la síntesis del componente del ergosterol (Andreoli T. E. and M. Monahan, 1968). Las alilaminas, una nueva clase de agente recientemente introducido al mercado, comparte este blanco interfiriendo con la actividad de la enzima esqualeno epoxidasa (Ryder N.S., G. Seidl and P. F. Troke, 1984).

Los procariotes tienen una amplia variedad de propiedades estructurales y fisiológicas únicas de su reino que son por lo tanto blancos apropiados para las drogas antimicrobianas. En contraste, los hongos, como organismos eucarióticos, tienen un número limitado de blancos

identificados que los distinguen de los sistemas de los mamíferos. Además de las membranas citoplasmáticas, las paredes celulares de los hongos de importancia médica (y algunos protistas) tienen componentes que no son encontrados en ningún lugar en la naturaleza. Los polímeros de carbohidratos compuestos por  $\alpha$  y  $\beta$  glucanas, quitina y mananas todos juegan importantes papeles en el mantenimiento de la integridad estructural de las células fungales. Tal como lo hacen los péptidoglicanos en las paredes celulares bacterianas. Si un compuesto interfiere con la síntesis o estructura de la pared celular, los resultados pueden ser catastróficos para el organismo, tal como lo es el efecto de la  $\beta$ -lactamasas en las bacterias. En los pasados 25 años se han descubierto y descrito compuestos que tienen como su mecanismo de acción primario o secundario, la capacidad para afectar la pared celular de los hongos (Hector R. F., 1993).

#### ASPECTOS BIOQUÍMICOS DE LA PARED CELULAR DE HONGOS DE IMPORTANCIA MÉDICA.

La pared celular de hongos patógenos humanos por ejemplo *C. albicans* comparte muchas similitudes con la de las levaduras saprofiticas. Esta está compuesta de quitina,  $\beta$ -glucanas y manoproteínas. Los dos últimos componentes constituyen aproximadamente el 80 % de la masa de la pared. Esta levadura, sin embargo tiene ligeramente un alto contenido de quitina, constituyendo desde un 0.6 al 1 % de la pared celular. Aunque el 90 % de la quitina esta restringida al sitio de la cicatriz de la gemación, el resto puede encontrarse distribuida a través de la pared celular, contribuyendo a la rigidez. A través de técnicas citoquímicas especializadas, se ha demostrado la presencia de capas múltiples dentro de la pared celular de *C. albicans* que se pueden diferenciar sobre las bases de su composición química (Cassone A. *et al*, 1979; Poulain D. *et al*, 1978). En general, las capas externas se piensa que están compuestas de mananas,

manoproteínas y  $\beta$ -(1,6) glucanas, mientras que en las capas internas predominan las  $\beta$ -(1,3) glucanas y quitina con algo de manoproteínas. Las capas internas son las responsables de mantener la integridad estructural de la pared celular, con un aumento en la rigidez debido a las uniones covalentes entre glucanas y quitina (Surarit R. *et al*, 1988). Se ha descrito en células que entran en la fase estacionaria, una distribución uniforme de los polímeros a través de la pared celular (Cassone A. *et al*, 1979).

En estudios de regeneración de protoplastos de *Candida spp* en estados tempranos, la quitina se sintetiza en cantidades mayores de las que normalmente se encuentran en levaduras intactas o células miceliales. Después de 4 o 5 h de regeneración se puede observar que la localización normal de las mananas es en las capas exteriores y la quitina en las capas interiores. Utilizando inhibidores específicos de la síntesis de quitina, glucanas y manoproteínas introducidos a intervalos durante la regeneración, se pudo documentar la importancia de la red de quitina en la estructura en formación, en la cual las glucanas y manoproteínas se fueron añadiendo subsecuentemente. Los últimos componentes determinan la forma de la célula (Elorza M. V. *et al*, 1987).

Como es el caso con las levaduras saprofiticas, el componente manoproteínico de la pared celular es el responsable de los determinantes antigénicos en *Candida spp*. Se han caracterizado una variedad de antígenos especie-específicos con un esqueleto de residuos con enlaces  $\alpha$  1-6 y cadenas laterales con  $\alpha$  1-2 y enlaces  $\alpha$  1-3. Para *C. albicans* se han descrito enzimas degradativas como por ejemplo, quitinasa, glucanasa y mananasa. El incremento en sus actividades coincide con un incremento en la actividad sintética durante la fase de crecimiento log, esto sugiere la importancia del balance entre la degradación y síntesis durante la

remodelación de la pared celular.

Una importante distinción entre *C. albicans* y *S. cerevisiae* es la capacidad de la primera en crecer en un estado de hifa verdadera y la segunda en un estado de pseudohifa. Además de las diferencias morfológicas, hay algunas importantes diferencias en las composiciones físicas de sus paredes celulares. La fase micelial de *C. albicans*, es conocido que contenga de tres a cinco veces más quitina que la fase de levadura (Braun P. C. and R. A. Calderone, 1978) lo cual esta en relación con los altos niveles de la actividad de la quitina sintetasa durante la formación de tubo germinativo. Mientras que en *C. albicans* la composición total de glucanas, mananas, lípidos y proteínas es similar en ambas formas de crecimiento (Sullivan P. A. *et al*, 1983), la actividad de la  $\beta$ -(1,3)-D-glucana sintetasa es significativamente más alta en la forma de micelio, mientras que la actividad de la exo-(1,3)- $\beta$ -D-glucana hidrolasa es mayormente reducida (Molina M. *et al*, 1987). Por lo que no es sorprendente que en la forma de hifa se encuentre que contiene un alto porcentaje de  $\beta$ -(1,3) glucanas en lugar de  $\beta$ -(1,6) glucanas; lo contrario se presenta en la forma de levadura. Las glucanas en la forma de hifa contienen un alto número de puntos de ramificación, con lo cual Gopal *et. al.* especulan que pueden contribuir a la transición morfogénica entre levadura y micelio. A través de estudios citológicos y ultraestructurales de la formación de tubo germinativo, Cassone A. *et. al.* encontraron que el tubo emergente se originaba de las capas internas de la blastospora y era rico en quitina. Con respecto al papel de las enzimas degradativas en la formación de tubo germinativo, Molina A. *et al*, 1987 encontraron que la actividad de la glucanasa disminuía substancialmente durante la transición de levadura a micelio, mientras que Sullivan P. A. *et al*, 1984 encontraron que la secreción de N-acetilglucosaminidasa se incrementaba grandemente en la forma micelial. Además especulan



que la secreción era facilitada por la mayor cantidad de poros en la pared celular en la fase micelial.

## SÍNTESIS DE QUITINA.

La quitina es el componente más importante de la pared celular en los hongos. Es un polisacárido no ramificado que contiene exclusivamente residuos de N<sup>o</sup>acetilglucosamina (GlcNAc). Las unidades de GlcNAc están unidas a través de enlaces  $\beta$ -1,4, la quitina también puede ser considerada como un polímero que consiste de unidades repetidas del correspondiente disacárido, diacetil quitobiosa. Las cadenas de quitina tienden a asociarse por uniones de hidrógeno en arreglo de fibrillas o laminas. Existen tres isoformas del polisacárido en la naturaleza de acuerdo al arreglo de las cadenas. Estas formas pueden ser reconocidas por difracción de rayos X. En los hongos, solo ha sido detectada la quitina  $\alpha$ , caracterizada por el arreglo antiparalelo (Sentandreu R., S. Mormeneo and J. Ruiz-Herrera, 1994).

Desde el punto de vista bioquímico, la biosíntesis de quitina puede ser considerada como una reacción de transglucosilación donde los residuos de acetilglucosaminil son transferidos desde un donador a un aceptor. El donador universal para la reacción es el nucleótido Uridindifosfato-N-actetilglucosamina (UDP-GlcNAc), el producto de una GlcNAc-1-fosfato uridililtransferasa, mientras que el aceptor es la cadena creciente de quitina (Sentandreu R., S. Mormeneo and J. Ruiz-Herrera, 1994).

No hay un modelo general que describa la reacción catalítica llevada a cabo por las quitinas sintetasas. Varios detalles permanecen sin respuesta. El primero al que se refiere es la iniciación de la reacción. La opinión que prevalece es que no es necesario un aceptor para la iniciación de la cadena de quitina, aunque en algunos reportes se sugiere la utilización como

aceptor de un polipéptido (S. Bartnicki-García, E. Lippman and J. Heick, *Ann. Meeting Am. Soc. Microbiol.* 1979, p.106), y un glucolípido (Mills and Cantino, 1978). Otro problema al que se refiere es la reacción de elongación por las uniones glucosídicas que tienen una configuración  $\beta$ . La enzima presumiblemente tiene dos sitios de unión del sustrato de polaridad opuesta (Ruíz-Herrera J., 1992). Finalmente, mientras que las cadenas de quitina en los microfilamentos corren en forma antiparalela, la síntesis de las cadenas y su asociación en los microfilamentos pueden ser separadas en tiempo. La evidencia para la existencia de un estado intermedio no cristalino para la quitina viene de la observación de que la quitina naciente, en contraste a la quitina madura es más sensible a las quitinasas y deactelasas (Calvo-Mendez C. and Ruíz-Herrera J., 1987; Lopez-Romero E. *et al*, 1982; Molano J. *et al*, 1979) y que la quitina hecha en presencia de calcofluor no es cristalina (Vermeulen C. A. and J. G. A. Wessels, 1986).

Considerando que la quitina existe como un producto insoluble fuera de la barrera de permeabilidad de la célula, se requiere de la existencia de un mecanismo que prevenga la activación prematura de la quitina sintetasa localizada intracelularmente. El modelo que prevalece considera a la quitina sintetasa como un zimogeno, pero la posibilidad alterna es, que la enzima este unida a un inhibidor el cual es el sustrato para la proteasa, que no puede ser eliminado.

Se ha obtenido evidencia de que la activación de la quitina sintetasa por proteasas exógenas ocurre en una reacción en cascada en la cual la proteasa no activa a la enzima por si misma, pero un factor endógeno es responsable de la activación (Ruíz-Herrera J., 1990; Reyna G. and J. Ruiz-Herrera, 1987; Ruiz-Herrera J. *et al*, 1990).

En la actualidad es generalmente aceptado que la quitina sintetasa en los hongos esta

localizada en dos principales compartimentos: los quitosomas (Ruiz-Herrera J. *et al.*, 1977), los cuales son microvesículas involucradas en la transferencia de la enzima a la superficie celular, y el plasmalema, donde tiene lugar la reacción sintética final.

De acuerdo al conocimiento actual, el grupo de investigadores (Sentandreu R., S. Mormeneo and J. Ruiz-Herrera, 1994) ha llegado a la conclusión de que la síntesis y ensamblaje de la pared celular ocurre en pasos subsecuentes. La síntesis de los componentes individuales ocurre intracelularmente o en la interfase de plasmalema-pared celular. Después de que todos esos polímeros son secretados en la pared en expansión, se asocian en algunos casos, a través de un mecanismo que involucra interacciones específicas. Los autores (Sentandreu R., S. Mormeneo and J. Ruiz-Herrera, 1994) sugieren que las proteínas sirven como moléculas de reconocimiento específicas que se unen a los diferentes componentes de la pared celular. La maduración de la pared celular naciente involucra el ensamblaje de microfibrillas de polisacáridos estructurales, el establecimiento de enlaces covalentes entre los diferentes constituyentes de la pared celular. Los autores (Sentandreu E., S. Mormeneo and J. Ruiz-Herrera, 1994) opinan además que las proteínas juegan un papel decisivo en el establecimiento de importantes enlaces secundarios.

#### COMPUESTOS ACTIVOS CONTRA LA PARED CELULAR DE LOS HONGOS.

Inhibidores de la síntesis de quitina. (Historia de las polioxinas y las nikkomicinas). Se han descrito dos grupos de metabolitos de fermentación secundaria estructuralmente relacionados que actúan como inhibidores específicos de quitina sintetasa

(UDP-2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa:quitina 4 $\beta$ -acetamidodesoxi-D-glucosiltransferasa) las polioxinas fueron descritas por primera vez en 1965 (Suzuki S. *et al.*, 1982) y las nikkomicinas en 1976 (Dahn V, *et al.*, 1976) y son compuestos péptido-nucleosidos producidos por *Streptomyces*

*cacaoi* y *Streptomyces tendae* respectivamente. Los dos grupos de compuestos fueron aislados y descritos como resultado de un programa para descubrir fungicidas e insecticidas para uso agrícola (Isono K. *et al*, 1969).

Las polioxinas fueron descubiertas en un monitoreo contra *Pellicularia filamentosa* f. *sasakii*, la cual produce la destrucción de la vaina en plantas de arroz. Una mezcla de polioxinas fue eventualmente puesta en el mercado como un fungicida. La primer cepa productora de nikkomicinas *Streptomyces tendae* TU901, fue aislada en 1970 del suelo en el sitio de las cinco pagodas en Nikko, Japón. Aunque las nikkomicinas han sido intensivamente evaluadas para desarrollo comercial, ningún producto ha alcanzado el mercado. Subsecuente al descubrimiento de las nikkomicinas, se encontró que una subespecie *Streptomyces cacaoi* producía unos metabolitos secundarios denominados neopolioxinas que fueron esencialmente idénticos en estructura a las nikkomicinas (Uramoto M. *et al*, 1980). Hasta la fecha, se han descrito trece polioxinas denominadas desde la A hasta la M y catorce nikkomicinas denominadas: Bx, Bz, Cx, Cz, D, E, I, J, M, N, X, Z, Pseudo-J y Pseudo-Z.

Las polioxinas y las nikkomicinas colectivamente incluyen varios metabolitos congéneres que tienen una similaridad estructural a la UDP-GlcNAc, el sustrato precursor para la quitina. Estos están compuestos de di y tripéptidos hechos de  $\alpha$ -L-aminoácidos unidos a una uridina nativa o substituida (o a formilimidazolina en el caso de las nikkomicina x) y actúan como inhibidores competitivos de la quitina sintetasa (Endo A. and T. Mitasato, 1970). Todas las polioxinas y las nikkomicinas tienen perfiles similares de potencia *ex vivo* contra quitina sintetasas aisladas de diferentes fuentes fungales, reportando valores de  $K_i$  de inhibición de 0.6  $\mu$ M para la polioxina A, 0.5  $\mu$ M para nikkomicina X, de 2 a 3.5  $\mu$ M para nikkomicina Z de 0.6 a

3.0  $\mu\text{M}$  para polioxina D y 32  $\mu\text{M}$  para polioxina B (Gow L. A. and C. P. Selitren-Nikoff, 1984).

Es de consideración comentar que todos estos datos fueron generados antes de que fueran descritas múltiples formas de quitina sintetasa.

#### EL USO DE LAS POLIOXINAS CONTRA HONGOS DE IMPORTANCIA MÉDICA.

Las polioxinas fueron descubiertas en 1965 (Suzuki S. *et al*), poco tiempo después aparecieron reportes de sus efectos sobre una variedad de hongos saprofiticos. En 1977, los inhibidores de la síntesis de quitina fueron propuestos como agentes terapéuticos para enfermedades micóticas (Gooday G. W., 1977), pero no fue sino hasta 1983 en que aparecieron los primeros reportes sobre los efectos de la polioxina D sobre hongos de importancia médica. Una razón para este retraso puede ser la percepción de que esas sustancias fueron en su mayoría, inactivas contra levaduras saprofiticas, con una diferencia de tres ordenes de magnitud entre la  $K_i$  de inhibición de la quitina sintetasa aislada y la concentración necesaria para matar las células (Bowers B: *et al*, 1974). Con base en el descubrimiento de que la polioxina D era activa contra la fase parasítica de *Coccidioides immitis* en el rango de  $\mu\text{g/ml}$ , era plausible el uso de estos agentes como drogas antifúngicas.

En otro estudio, 4 cepas de *C. albicans* fueron susceptibles a la polioxina D en el rango de 500 a 2,000  $\mu\text{g/ml}$ . El efecto en las células se manifestó con aumento en el volumen y encadenamiento. Cuando se examinaron utilizando la tinción con blanco de calcofluor, se pudo observar menor fluorescencia en las células tratadas que en las células control, lo cual indicaba una reducción en los niveles de quitina incorporada en la pared celular. Los autores resaltan el hecho de que el sitio de formación del septo carecía de fluorescencia, una área que normalmente es rica en quitina (Braun P. C., 1978).

## ANTIFÚNGICOS ACTIVOS CONTRA OTROS BLANCOS.

### POLIENOS.

La anfotericina B, es la droga de selección para el tratamiento de la mayoría de las micosis invasivas. Para los hongos filamentosos, levaduras y dimórficos que son los patógenos en estas infecciones, la CMI generalmente es de 0.05-1 µg/ml (Woods R. A. *et al*, 1979). Las formas de levadura y micelio de especies de *Candida* son sensibles a la anfotericina B y otros polienos, mientras que la mayor actividad del ketoconazol y otros azoles es contra la forma micelial (Woods E. A. *et al*, 1979).

El desarrollo de resistencia en especies de *Candida* es rara. La actividad antifúngica de la anfotericina B esta relacionada con la unión al ergosterol, pues es el esteroles primario en la membrana de hongos sensibles. Como resultado de esta interacción, aparecen poros en la membrana de los hongos, causando la salida de constituyentes celulares y, al final la muerte celular (Kerridge D. and W. L. Whelan, 1984).

La anfotericina B es pobremente absorbida en el tracto gastrointestinal. Las micosis sistémicas pueden ser tratadas por vía parenteral. La combinación de la anfotericina B y la fluocitocina da mejores resultados que la anfotericina B sola en el tratamiento de micosis. La ventaja de la combinación es la reducción de la dosis y por lo tanto la toxicidad de los polienos y la eliminación de mutantes resistentes a fluocitocina (Utz J. P. *et al*, 1975).

### AZOLES.

Los imidazoles antifúngicos representan una importante contribución en la quimioterapia de las micosis. En 1944, Wooley demostró que la molécula del benzimidazol inhibía el crecimiento bacterial y fúngico. Después la observación de Jerchel de que la adición y

substitución de grupos sobre la molécula del benzimidazol tenía influencia sobre sus propiedades, a la fecha se han sintetizado un gran número de derivados de imidazoles con propiedades antifúngicas (Jerchel D. *et al*, 1951). De entre estos sobresalen el thiabendazol, mebendazol y clotrimazol; todos fueron de aplicación tópica a micosis superficiales.

**Clotrimazol.** Un tritilimidazol fue el primer azol oral. Efectivo en micosis profundas de humanos y experimentales. La desventaja que presenta es que a los pocos días del tratamiento existe una inducción de enzimas microsomales que resulta en la destrucción de la actividad antifúngica de esta droga. La destrucción metabólica y la toxicidad limitan el uso de este azol a uso tópico en micosis superficiales (Plempel M. *et al*, 1974).

**Miconazol.** Ha sido evaluado como un agente tópico, oral e intravenoso. Su absorción es ligeramente mejor que la del clotrimazol con un 25 a 30 % de la dosis administrada detectable. La droga se une a proteínas en un 95 % y no se difunde bien en líquido cefaloraquídeo ( pero puede ser administrado intratecalmente). Este azol penetra fácilmente en líquido sinovial y vítreo. Muchos efectos tóxicos del miconazol se han reportado, algunos de ellos están relacionados con el uso de altas dosis o cursos de terapias prolongadas. Los efectos adversos incluyen flebitis, prurito, erupción, fiebre, escalofríos, náusea, vómito, diarrea, somnolencia, hiperlipidemia, hipoantremia, y toxicidad hematológica y hepática. En la candidiasis gastrointestinal se usaban dosis de 1g por día para tratamiento y profilaxis. En el uso intravenoso del miconazol es de (600 a 1200 mg por día) en infecciones causadas por *Candida*. El miconazol es una alternativa para anfotericina B cuando la última esta contraindicada o sin efectividad y cuando no es posible el tratamiento oral con ketoconazol (Bodey G. P. and V. Fainstein, 1985).

**Ketoconazol.** El ketoconazol representa una innovación en el tratamiento de las

enfermedades micóticas. La droga es atractiva debido a que es activa oralmente (tabletas de 200 mg), y es soluble en agua a pH menor a 3. La absorción oral o gastrointestinalmente es variable y puede ser administrada concomitantemente con cimetidina u otro antiácido. El mecanismo de acción del ketoconazol involucra la inhibición de la síntesis del ergosterol por una interacción selectiva con la 14  $\alpha$ -desmetilasa dependiente del citocromo P450. Las concentraciones de 10-100 veces menor a la CMI pueden interferir con la formación de tubo germinativo en *C. albicans* (Vanden Bosshe H., 1985).

Los efectos adversos son menores que los del miconazol. Las dosis mayores de 400 mg por día pueden causar náusea o vómito. La hepatotoxicidad, se muestra por una elevación asintomática en transaminasas en suero. La hepatitis clínica es rara pero puede ser fatal si se administra continuamente la droga. La interferencia con la síntesis de testosterona y la hormona adrenocorticotrópica puede explicar los síntomas tales como impotencia sexual, astenia, calvicie y ginecomastia, lo cual es usual después de dosis altas y/o dosis prolongadas (Pont a. *et al*, 1982).

#### **OTROS IMIDAZOLES.**

Algunos derivados de azoles como el tioconazol, sulconazol, isoconazol, oxiconazol, fenticonazol y el bífonazol son usados en micosis superficiales y representan una alternativa comparando con el tolnaftato y alilaminas (Petrany G. *et al*, 1984).

Los nuevos azoles que están en evaluación: el terconazol, como un agente tópico; el itraconazol y el fluconazol, como agentes sistémicos. El fluconazol tiene características muy diferentes; es soluble en agua, exhibe baja unión en suero, tiene una vida media (24 h), es eliminado en forma activa en la orina y difunde en líquido cefalorraquídeo (Richardson K. *et al*,



1985).

## **NUEVOS AGENTES ANTIFÚNGICOS EN ESTUDIO.**

El blanco de los nuevos agentes lipopéptidos es la pared celular de los hongos, lo cual reduce los efectos tóxicos colaterales (Gordee R., 1991). El lipopéptido cilofungin es una nueva clase de agente antifúngico natural y semisintético (Gordee R., 1991). El blanco molecular del lipopéptido parece ser la enzima 1,3-b-glucana sintetasa de la pared celular. La droga experimental es bien tolerada en animales de laboratorio y en humanos. Los miembros de esta clase de moléculas tienen como componentes una cadena lateral lipofílica unida a un núcleo peptídico, el cual incluye seis residuos de aminoácidos. El cilofungin fue desarrollado hace una década y es uno de los lipopéptidos modificados con actividad antifúngica restringida. Los componentes aminoácido y ácido graso de la molécula pueden ser alterados químicamente para modificar el espectro de actividad. El cilofungin tiene actividad antifúngica para una variedad de especies de *Candida*, incluyendo un rango de aislamientos clínicos (Gordee R., 1991).

*C. albicans* ha adquirido gran relevancia en los últimos años, ya que frecuentemente ataca a pacientes inmunosuprimidos por razones terapéuticas, o a pacientes que sufren de diabetes, leucemia y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Está plenamente demostrado que la formación de un tubo germinativo y la micelización a partir de células levaduriformes es el primer paso necesario para la invasividad tisular por este hongo.

La mayor parte de los fármacos utilizados en la actualidad para combatir este microorganismo actúan sobre la ruta metabólica de lípidos y esteroides. El conocimiento reciente de que la formación de tubo germinativo requiere de una biosíntesis muy activa de la sintetasa de la quitina para la formación de nueva pared celular, ofrece un campo de investigación todavía no

bien explorado para este microorganismo, ya que hasta la fecha no se conocen fármacos efectivos en el mercado que bloqueen esta ruta metabólica.

Existen muchos insecticidas de uso agrícola cuya actividad esta centrada en la alteración de la biosíntesis de la quitina, sin embargo su actividad no ha sido explorada frente a *C. albicans*. Por lo que estos compuestos ofrecen una alternativa terapéutica potencial en el campo de la micología médica.

El propósito de este trabajo es la búsqueda, el ensayo y el conocimiento bioquímico de la actividad de estas sustancias en la micelización de células en forma de levadura de *C. albicans*, así como determinar su interferencia con la biosíntesis de la quitina, y el estudio más profundo con microscopía electrónica de los cambios citológicos que acompañan a la actividad de estas sustancias.

## **OBJETIVO GENERAL:**

Encontrar compuesto(s) que inhiban el crecimiento y la formación del tubo germinativo en *C. albicans*.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

Determinar la capacidad de inhibir el crecimiento y la formación del tubo germinativo de *C. albicans* por los compuestos seleccionados.

Establecer las concentraciones mínimas inhibitorias (C.M.I.) de los compuestos que inhiban el crecimiento y la formación del tubo germinativo de *C. albicans*.

Establecer los cambios morfológicos inducidos por los compuestos seleccionados en células de *C. albicans* por microscopía electrónica.

Determinar el efecto de los compuestos seleccionados sobre la actividad de la enzima quitina sintetasa unida a membranas de *C. albicans*.

Determinar el efecto de las sustancias seleccionadas sobre la actividad de la enzima quitin sintetasa en células de *C. albicans*.

Determinar el efecto de las sustancias seleccionadas en la síntesis de quitina en células de *C. albicans*.

Establecer el efecto de las sustancias seleccionadas sobre la síntesis de proteínas en células de *C. albicans*.

## MATERIAL Y METODOS

CEPAS: Se utilizaron a las siguientes cepas de *C. albicans* 95740-R, 95775-R, 95771-S, 95759-S y CAI-4. Estas se mantuvieron como cultivo de reserva en agar Sabouraud inclinado a temperatura ambiente y se sembraron cada quince días.

### SELECCIÓN DE COMPUESTOS

Los compuestos analizados en el trabajo se seleccionaron en base a los siguientes parámetros: 1) no haber sido analizada su actividad contra *Candida*, 2) presentar baja toxicidad, 3) estar aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos (F.D.A.), 4) ser soluble en agua, 5) no producir efectos teratogénicos, ni mutagénicos, 6) tener buena estabilidad, 7) estar formulado en polvo o ser emulsificable, y 8) modo de acción: que inhibiera germinación y micelización.

Originalmente se escogió a los siguientes compuestos: Anilazina, Azufre, Benomil, Benzoilfenilurea, Bitertanol, Brestan, Captafol, Captan, Carbendazim, Clorotalonil, Hidróxido de cobre, Oxiclورو de cobre, Oxido de cobre, Sales de cobre, Sulfato tribásico de cobre, Dinocap, Acetato de dodemorf, Edifenfos, Etridiazol, Fosetil, Iprodiona, Kasugamicina, Mancozeb, Mancozeb más cobre, Maneb, Manex más carbendazim, Metalaxil, Metoxicloro, Oxicarboxin, Hidroxicloruro de propamocarb, Propiconazol, Quintozeno, Thiabendazol, Thiram, Triadimenol, Tridemorph, Triforine, Vinclozolin y Zineb.

### CULTIVO DE *C. albicans*

Se preparó un precultivo que consistió en transferir una asada del cultivo de reserva a un tubo Falcón de 50 ml conteniendo 15 ml del medio YPG (extracto de levadura 1 %, peptona 1 % y glucosa 2 %). Este se incubó en un baño de agua marca Lab-line modelo Orbit a 37°C y 200 r.p.m. por 24 h. El paquete celular se recuperó por centrifugación a 5000 r.p.m. a 4°C por 5 min., y se desechó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 15 ml del medio YPG, y se transfirieron a un matrás Erlenmeyer de 500 ml que contenía 100 ml del medio YPG. El cultivo se colocó en incubación a 37°C, a 200 r.p.m. por 24 h. Durante el período de incubación se extrajeron alicuotas de 2 ml, a las que se les determinó su absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro marca Beckman modelo Junior. El blanco utilizado fue 2 ml del medio YPG.

#### ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA FORMACIÓN DE TUBO GERMINATIVO

La medición de la actividad inhibitoria en la formación de tubo germinativo en *C. albicans*, se realizó de acuerdo al método de Hector, (1994). Este consistió en utilizar placas para microtitulación de polipropileno (Sigma Chemical Co. modelo M-4404), en la que en cada pozo se depositaron 100 µl del medio RPMI-1640 estéril, además 80 µl del inóculo de *C. albicans* previamente calibrado a  $1 \times 10^6$  células/ml y 20 µl del inhibidor a probar. La calibración de las células se realizó mediante cuenta en hematocitómetro y después ajustándose a una  $A_{600}$  de 0.14 en un espectrofotómetro marca Beckman modelo 340. El inhibidor se probó desde una concentración de 40 mg/ml hasta 0.019 mg/ml para encontrar la máxima dilución a la que inhibía el crecimiento. Cuando existía crecimiento en el medio este se tornaba de color amarillo. La inhibición del crecimiento se definió como un cambio nulo en la coloración del medio que originalmente es de color rojo. El sistema se incubó a 37°C, a 150 r.p.m. por 24 h en el baño de

agua. La determinación de la inhibición se efectuó en forma visual, de acuerdo al viraje de coloración. Una vez determinada la C.M.I., se procedió a extraer una alícuota de 50  $\mu$ l para observar la morfología celular al microscopio óptico y determinar si se inhibió la formación de tubos germinativos.

## MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Las células se lavaron en agua o en solución amortiguadora de fosfatos al 0.1 M (pH 7.2) mediante centrifugación o filtración. Después se suspendieron en 1.5 ml de glutaraldehído al 2.5 % disuelto en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M (pH 7.2) hasta posterior procesamiento. En seguida las células se lavaron dos veces con 1.5 ml de una solución amortiguadora de fosfatos al 0.1 M (pH 7.2) y se resuspendieron en 1.5 ml de esta solución.

Para la postfijación, las células se lavaron tres veces con 1.5 ml de amortiguador de fosfatos al 0.1 M (pH 7.2), después se transfirieron a una solución de fijación de 1.5 ml de tetraóxido de osmio al 2 % disuelto en el mismo amortiguador y se incubó por 2 h.

Para la deshidratación las células se lavaron dos veces en agua destilada y después se transfirieron a una serie de soluciones de etanol al 50, 70, 80, 90, 95 y 100 % colocándose en cada solución por 15 min en dos ocasiones. Después, las muestras se resuspendieron en una solución de óxido de propileno y Embed 812, (1:1) por 1 h y después dos cambios a resina pura (1h para cada cambio) permitiéndose la infiltración de la resina. Enseguida, la suspensión celular se colocó en cápsulas de inclusión de propileno y la muestra se concentró por centrifugación. Las cápsulas se incubaron 48 h a 70 °C para su endurecimiento. Se cortaron secciones delgadas y se trataron con acetato de uranilo y citrato de plomo por métodos estándares para observación al

microscopio electrónico de transmisión.

## OBTENCIÓN DE PAQUETE CELULAR

**Precultivo.** Un tubo Falcón de 50 ml conteniendo 15 ml del medio YPG, se inoculó con una asada del cultivo de reserva y se colocó en incubación a 28°C, a 200 r.p.m. por 24 h.

Después el paquete celular se recuperó por centrifugación a 5000 r.p.m. a 4°C por 5 min y se resuspendió en 15 ml de medio YPG fresco.

## EXTRACCIÓN DE LA FRACCIÓN MIXTA DE MEMBRANAS

Se cultivó a *C. albicans* de la manera mencionada previamente, adicionalmente la recuperación del paquete celular se realizó, transfiriendo el cultivo en frascos de 250 ml y centrifugando a 5000 r.p.m. a 4°C por 5 min. El precipitado se resuspendió en 7.5 ml de agua destilada y estéril. La suspensión de células se transfirió a un frasco de Duran de 70 ml y se le agregó 15 ml de perlas de vidrio de 0.45 mm de diámetro. A esta mezcla se le aplicaron 4 pulsos de 30 s en el homogenizador Braun. El homogenizado se centrifugo a 5,000 r.p.m. a 4 C por 5 min. El líquido sobrenadante se extrajo con una pipeta Pasteur y se colocó en tubos de 13 x 51 mm "quick seal" marca Beckman. Estos se sellaron y centrifugaron a 100,000 r.p.m. a 4°C por 1 h utilizando un rotor T100, en una ultracentrífuga marca Beckman modelo T100. El sobrenadante se desechó y el sedimento que contenía la fracción mixta de membranas se colectó con una espátula. Este último se resuspendió en un tubo Eppendorf (de 1.5 ml), con 1 ml de una solución amortiguadora de fosfatos 1M glicerol 50 mM y se mantuvo en hielo.

## ACTIVACIÓN DE LA F.M.M.

La activación de la fracción mixta de membranas se realizó con la finalidad de trabajar con fracciones activadas y sin activar, también con fracciones activadas durante el proceso de exposición a los inhibidores y comparar las diferencias en su comportamiento.

La activación se realizó, de la manera siguiente. Una alícuota de 100  $\mu\text{l}$  de la F.M.M. se colocó en un tubo Eppendorf y se le agregó 40  $\mu\text{g/ml}$  de tripsina y se incubó por 15 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo agregando 80  $\mu\text{g/ml}$  del inhibidor de la tripsina del frijol de soya (SBTI) y se mantuvo en hielo. De acuerdo al protocolo se trabajó con F.M.M. con y sin activación previa a los experimentos

## PREPARACIÓN DEL SUBSTRATO

El sustrato se preparó en un tubo Eppendorf (de 1.5 ml), con una mezcla de 90  $\mu\text{l}$  de  $\text{C}^{14}$  UDP-GlcNAc, 1.6 mg de UDP-GlcNAc, 44.2 mg de GlcNAc y 910  $\mu\text{l}$  de agua desionizada. La concentración final en los ensayos fue de GlcNAc al 40 mM, y UDP-GlcNAc al 0.5 mM.

## ENSAYO PARA INCORPORACIÓN DE $\text{C}^{14}$ UDP-GlcNAc

La finalidad de medir la incorporación de este sustrato en presencia de los fungicidas e insecticidas, fue establecer el grado de interferencia en la síntesis de quitina en las fracciones mixtas de membranas extraídas de las cepas de trabajo de *C. albicans*.

En tubos Eppendorf (de 1.5ml) se depositaron subsecuentemente 12.5  $\mu\text{l}$  de agua destilada estéril, 2.5  $\mu\text{l}$  de Magnesio 6  $\text{H}_2\text{O}$  al 0.1 M, 25  $\mu\text{l}$  de la F.M.M. activada o sin activar, 10  $\mu\text{l}$  del sustrato, y por último, 40 o 120  $\mu\text{g}$  de tripsina (2.5  $\mu\text{l}$  y 7.5  $\mu\text{l}$  de la solución de



reserva de tripsina a una concentración de 0.8 mg/ml) de acuerdo al esquema de la Tabla 1. El sistema se incubó por 1 h a temperatura ambiente y en obscuridad, al término se detuvo la reacción agregando 1 gota de ácido acético glacial.

Tabla 1. PROTOCOLO DE ACTIVIDAD DE LA ENZIMA QUITINA SINTETASA

VIAL	Agua	Mg	FMM	Vol.	Subst.	Tripsina	Inhib.	Conc.
1	12.5 µl	2.5 µl	Normal	25 µl	10 µl	0	0	Control
2	12.5 µl	2.5 µl	Normal	25 µl	10 µl	0	0	Control
3	10.0 µl	2.5 µl	Normal	25 µl	10 µl	2.5 µl	0	Control
4	10.0 µl	2.5 µl	Normal	25 µl	10 µl	2.5 µl	0	Control
5	12.5 µl	2.5 µl	Preactiv	25 µl	10 µl	0	0	Control
6	12.5 µl	2.5 µl	Preactiv	25 µl	10 µl	0	0	Control
7	0	2.5 µl	Normal	25 µl	10 µl	0	12.5 µl	CMI
8	0	2.5 µl	Normal	25 µl	10 µl	0	12.5 µl	CMI
9	0	2.5 µl	Normal	25 µl	10 µl	2.5 µl	10.0 µl	CMI
10	0	2.5 µl	Normal	25 µl	10 µl	2.5 µl	10.0 µl	CMI
11	0	2.5 µl	Preactiv	25 µl	10 µl	0	12.5 µl	CMI
12	0	2.5 µl	Preactiv	25 µl	10 µl	0	12.5 µl	CMI
13	0	2.5 µl	Normal	25 µl	10 µl	0	12.5 µl	10xCMI
14	0	2.5 µl	Normal	25 µl	10 µl	0	12.5 µl	10xCMI
15	0	2.5 µl	Normal	25 µl	10 µl	2.5 µl	10.0 µl	10xCMI
16	0	2.5 µl	Normal	25 µl	10 µl	2.5 µl	10.0 µl	10xCMI
17	0	2.5 µl	Preactiv	25 µl	10 µl	0	12.5 µl	10xCMI
18	0	2.5 µl	Preactiv	25 µl	10 µl	0	12.5 µl	10xCMI
19	0	2.5 µl	Normal	25 µl	10 µl	0	12.5 µl	100xCMI
20	0	2.5 µl	Normal	25 µl	10 µl	0	12.5 µl	100xCMI
21	0	2.5 µl	Normal	25 µl	10 µl	2.5 µl	10.0 µl	100xCMI
22	0	2.5 µl	Normal	25 µl	10 µl	2.5 µl	10.0 µl	100xCMI
23	0	2.5 µl	Preactiv	25 µl	10 µl	0	12.5 µl	100xCMI
24	0	2.5 µl	Preactiv	25 µl	10 µl	0	12.5 µl	100xCMI

## CUANTIFICACIÓN DEL ISOTOPO INCORPORADO

Se armó el porta filtro múltiple marca Millipore modelo 1225 colocando filtros de fibra de vidrio de 25 mm de diámetro previamente humedecidos en una solución de lavado que contiene, ácido acético 1N (18 ml), etanol al 95 % (490 ml) y agua destilada y estéril (492 ml). Se agregaron 5 ml de la solución de lavado al porta filtro y después se descargó la muestra, se filtró utilizando una bomba de vacío, después se lavó dos veces con la misma solución. Los filtros se secaron en una estufa marca BG modelo E57 a una temperatura de 90 °C por 10 min.

El líquido de centelleo se preparó con una mezcla de 2 g de PPO (2,5 difeniloxazol), 100 mg de dimetilpopop y 1 l de tolueno. De esta solución se agregaron 5 ml a viales de centelleo y se colocaron en el contador de centelleo marca LKB-Wallace modelo 1219 Rackbeta, seleccionando el programa A9 para C<sup>14</sup>. Se obtuvieron las lecturas de fondo, después se colocaron los filtros en los viales, y se obtuvieron las lecturas expresadas en C.P.M. a las cuales se les restó el valor de las C.P.M. de fondo, obteniéndose las C.P.M. netas.

## DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

La determinación de proteínas se realizó en esta fase por el método de Lowry, de la manera siguiente. Una alícuota de 100 µl de la F.M.M., se centrifugó a 5000 r.p.m. por 2 min a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante y se le agregaron 100 µl de NaOH 1N y se dejó reposar por 1h. Después, se extrajo una alícuota de 20 µl y se le agregó 80 µl de agua destilada. A la alícuota de 100 µl se le agregó 1 ml del reactivo de Lowry (tartrato de sodio al 1 %, sulfato de cobre al 1 % y carbonato de sodio al 2 %) y se incubó por 10 min. Después se le agregaron 100 µl del reactivo de Folin 1N en agua y se incubó por 45 min a temperatura

ambiente. La absorbencia se determinó en un espectrofotómetro marca Beckman modelo 340 a una longitud de onda de 750 nm. Se utilizó albúmina sérica bovina como patrón para una curva de calibración.

#### DETERMINACIÓN DE INCORPORACIÓN DE C<sup>14</sup> GlcNAc

Se obtuvo un precultivo de la cepa *C. albicans* CAI-4 de la manera ya descrita, y se inoculó en un matr az Erlenmeyer de 1000 ml conteniendo 250 ml del medio YPG y se incubó bajo las mismas condiciones del precultivo. El paquete celular se recuperó por centrifugación y se inoculó en un matr az Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 100 ml del medio de Lee (1994) bajo la siguiente formulación:

componente	cantidad	cantidad
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5.00 g	0.500 g
Mg SO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0.20 g	0.020 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.50 g	0.250 g
NaCl	5.00 g	0.500 g
Prolina	0.50 g	0.050 g
Biotina	0.05 g	0.005 g
Glucosa o GlcNAc	12.5 g	1.25 g
H <sub>2</sub> O aforando a:	1000 ml	100 ml

El cultivo se incubó a 28°C por 24 h a 200 r.p.m. y se recuperó el paquete celular por centrifugación bajo las mismas condiciones. Este último se lavó una vez con agua destilada estéril, se resuspendió en un volumen de 100 ml con el agua. En seguida se colocó en agitación a 200 r.p.m. por 3h a 28 °C en un baño de agua. Las células se lavaron nuevamente dos veces, se resuspendieron en 10 ml y se almacenaron a 4°C.

En un tubo Eppendorf (de 1.5 ml), se depositaron 120 µl de agua destilada, desionizada y estéril, además se agregaron 10 µl de C<sup>14</sup> GlcNAc para una cuenta total de 100,000 C.P.M.

La solución madre de los compuestos inhibidores que se probaron se preparó a una concentración de 1 mg/ml, a partir de la cual se tomaron volúmenes equivalentes a ¼ de la C.M.I., ½ de la C.M.I., la C.M.I. y 2 veces la C.M.I., respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2. PROTOCOLO DE INCORPORACIÓN DE C<sup>14</sup> GlcNAc.

Matríz No.	Medio de Lee c/0.125g glucosa	Substrato GlcNAc C <sup>14</sup>	Inhibidor	Sus. cel. <i>C. albicans</i> 10,000/ml	Tratamiento
1	3.36 ml	15 µl	0	140 µl	NaOH 1N
2	3.36 ml	15 µl	¼ CMI	140 µl	NaOH 1N
3	3.36 ml	15 µl	½ CMI	140 µl	NaOH 1N
4	3.36 ml	15 µl	CMI	140 µl	NaOH 1 N
5	3.36 ml	15 µl	2X CMI	140 µl	NaOH 1N
6	3.36 ml	15 µl	0	140 µl	TCA 6%
7	3.36 ml	15 µl	¼ CMI	140 µl	TCA 6%
8	3.36 ml	15 µl	1/2CMI	140 µl	TCA 6%
9	3.36 ml	15 µl	CMI	140 µl	TCA 6%
10	3.36 ml	15 µl	2X CMI	140 µl	TCA 6%

Con la finalidad de determinar la incorporación de GlcNAc que fue incorporada en la biosíntesis de quitina, se precipitó mediante el siguiente procedimiento. El sistema se incubó en un baño de agua marca Lab-line modelo Orbit a 37°C, y 200 r.p.m. por 1 h. Después, de las muestras No.1 a la 5 se extrajeron alícuotas de 2 ml, se trataron con NaOH 1N, y se colocaron a ebullición en un baño de agua por 10 min. Al término se filtraron a través de filtros Whatman No.1 en un porta filtros múltiple marca Millipore modelo 1225. Las muestras se lavaron dos veces con una solución de NaOH 1N, y los filtros se secaron a 90°C por 10 min para después determinar su radiactividad en el contador de centelleo líquido ya mencionado. Con el propósito de establecer la proporción de sustrato marcado con C<sup>14</sup> fue incorporado en lípidos, proteínas y carbohidratos se procedió a precipitar de la manera siguiente. Las muestras No. 6 a la 10 se procesaron de la siguiente forma: a una alícuota de 1 ml del cultivo se le agregaron 5 ml de ácido tricloroacético al 6% frío y se colocaron en hielo por 1 h y después se filtraron. Los filtros se secaron a 90°C por 10 min de la manera mencionada anteriormente y se determinaron las C.P.M. en el contador de centelleo líquido

#### DETERMINACIÓN DE INCORPORACIÓN DE AMINOÁCIDOS

Con el fin de determinar el efecto de los inhibidores en la síntesis de proteínas se realizó el siguiente procedimiento; a un matríz Erlenmeyer de 25 ml se le añadió 5.76 ml del medio de Lee, con 0.125 g de glucosa, 4 µl de una mezcla de L-aminoácidos marcados con C<sup>14</sup> marca Du Pont (NEN-445) equivalente a 352,000 C.P.M., y 140 µl del paquete celular previamente preparado. El sistema se incubó a 37°C, a 200 r.p.m. por 75 min en un baño de agua. Se extrajeron alícuotas de 1 ml cada 15 min y se trataron con 5 ml de ácido tricloroacético al 6 % frío y después se colocaron en hielo por una h. Después se pasaron por filtros Whatman No.1 al vacío en la forma mencionada, y se lavaron dos veces con el ácido tricloroacético. Los filtros se secaron de forma ya descrita y se analizaron en el contador de centelleo.

El análisis de los inhibidores se realizó mediante el protocolo mostrado en las Tablas 3 y 4.

**Tabla 3. PROTOCOLO PARA DETERMINAR EL GRADO DE INTERFERENCIA EN LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS UTILIZANDO COMO INHIBIDOR: Metalaxil y Manex.**

No.de matraz	especificación	Medio de Lee	Mezcla de aa	Inoculo	Inhibidor
1	Control	3.36 ml	2.5 µl	140 µl	0
2	¼ de C.M.I.	3.36 ml	2.5 µl	140 µl	0.01 mg/ml
3	½ de C.M.I.	3.36 ml	2.5 µl	140 µl	0.02 mg/ml
4	C.M.I.	3.36 ml	2.5 µl	140 µl	0.038mg/ml
5	2X C.M.I.	3.36 ml	2.5 µl	140 µl	0.076mg/ml

**Tabla 4. PROTOCOLO PARA DETERMINAR EL GRADO DE INTERFERENCIA EN LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS UTILIZANDO COMO INHIBIDOR: Benzoilfenilurea y Bitertanol.**

No.de matr�az	especificación	Medio de Lee	Mezcla de aa	Inoculo	Inhibidor
1	Control	3.357 ml	2.5 µl	140 µl	0
2	¼ de C.M.I.	3.321 ml	2.5 µl	140 µl	36.5 µl
3	½ de C.M.I.	3.284 ml	2.5 µl	140 µl	73.0 µl
4	C.M.I.	3.219 ml	2.5 µl	140 µl	138 µl
5	2X C.M.I.	3.080 ml	2.5 µl	140 µl	277 µl

## RESULTADOS

### PARÁMETROS DE CRECIMIENTO DE *C. albicans*

En la primera fase de esta investigación, se determinaron las condiciones de crecimiento de la forma de levadura de las cepas 95740-R, 95775-R, 95771-S y 95759-S de *C. albicans*, encontrando que el rango de temperatura óptimo fue de 25 a 28°C, a 150 r.p.m. en el medio de cultivo YPG. Las fases de crecimiento de acuerdo a las lecturas de la densidad óptica del cultivo, estuvieron localizadas de la siguiente forma: la fase lag se presentó desde las 0 hasta las 4h, mientras que la fase exponencial desde las 4 hasta las 14 y 18 h y la fase estacionaria a partir de este tiempo. En este trabajo seleccionamos el tiempo de 18 h, para determinación de la formación de tubos germinativos.

### SELECCIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

De acuerdo con las clases de antifúngicos sistémicos que están actualmente en uso clínico, existen en el área agrícola una buena cantidad de compuestos que pertenecen al grupo de los derivados de azoles, tiocarbamatos y benzoilfenilureas que no han sido probados en el hongo patógeno humano *C. albicans*. De todos los compuestos probados, se escogieron los que presentaron la capacidad de inhibir la forma de levadura y micelio a las concentraciones más bajas. Así se seleccionaron a benzoilfenilurea, bitertanol, manex y metalaxil.

La mayoría de los compuestos presentaron una C.M.I. que era igual o mayor a 2.5 µg/ml (Tabla 5).

Tabla 5. LISTA DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA ORDENADA DE ACUERDO A SU INGREDIENTE ACTIVO.

Compuesto	C.M.I. de Crecimiento* $\mu\text{g/ml}$	Compuesto	C.M.I. de Crecimiento* $\mu\text{g/ml}$
Anilazina	2.5	Iprodiona	20
Azufre	10	kasugamicina	20
Benomil	1.25	Mancozeb	10
Benzoilfenilurea	0.01	Mancozeb + cobre	10
Bitertanol	0.03	Maneb	0.03
Brestan	2.5	Manex	0.03
Captafol	10	Metalaxil	0.01
Captan	20	Metoxicloro	10
Carbendazim	5	Oxicarboxin	10
Clorotalonil	5	Oxidil + mancozeb	2.5
Hidróxido de cobre	10	Hidroxiclورو de propamocarb	2.5
Oxicloruro de cobre	10	Propiconazol	2.5
Oxido de cobre	10	Quintozeno	5
Sales de cobre	10	Thiabendazol	2.5
Sulfato tribásico de cobre	10	Thiram	10
Dinocap	5	Triadimenol	10
Acetato de dodemorf	20	Tridemorph	5
Edifenfos	2.5	Triforine	2.5
Etridiazol	2.5	Vinclozolin	10
Fosetil	10	Zineb	20

\* Valor de C.M.I. más baja de las cuatro cepas analizadas.

Los compuestos probados en los experimentos de inhibición de la formación de tubos germinativos, los dividimos en 3 grupos: a) alta efectividad, que incluyó a aquellos compuestos que requirieron de una concentración menor a 2.5  $\mu\text{g/ml}$ , b) moderada efectividad, que



comprendió a los compuestos que necesitaron de concentraciones desde 2.5 hasta 5.0  $\mu\text{g/ml}$ , y de c) baja efectividad, que reunió a los compuestos que ocuparon concentraciones desde los 5 hasta 10  $\mu\text{g/ml}$ , y de 10 hasta 20  $\mu\text{g/ml}$  (Tabla 6).

Tabla 6. LISTA DE INGREDIENTES ACTIVOS DE ACUERDO A SU RANGO DE EFECTIVIDAD EN LA INHIBICIÓN DE LA FORMACIÓN DE TUBOS GERMINATIVOS

Rango de concentraciones en $\mu\text{g/ml}$			
< 2.5	> 2.5 < 5	> 5 < 10	> 10 < 20
Benomil	Anilazina	Azufre	Captan
Benzoilfenilurea	Brestan	Captafol	Iprodiona
Bitertanol	Edifenfos	Hidróxido de cobre	Kasugamicina
Maneb	Etridiazol	Oxicloruro de cobre	Zineb
Metalaxil	Oxidil + mancozeb	Oxido de cobre	
	Hidroxiclورو de propamocarb	Sulfato tribásico de cobre	
	Propiconazol	Fosetil	
	Thiabendazol	Mancozeb	
	Triforine	Metoxicloro	
	Carbendazim	Oxicarboxin	
	Clorotalonil	Thiram	
	Dinocap	Triadimenol	
	Quintozeno	Vinclozolin	
	Tridemorph		

#### DETERMINACIÓN DE LA C.M.I.

En la tabla 7, se puede observar como el benzoilfenilurea es el compuesto con la más baja C.M.I. (0.019  $\mu\text{g/ml}$ ) y el más constante en las cuatro cepas que se utilizaron en este trabajo. El metalaxil se comportó muy similar al anterior, solo difiriendo en la cepa 95740-R en la que se presentó una C.M.I. más elevada (0.156  $\mu\text{g/ml}$ ). El manex se comportó igual con la misma C.M.I en las cepas 95740-R y 95771-S, mientras que en las cepas 95759-S y 95775-R mostró una

C.M.I. de 0.312 y 1.25  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente. Por último, el bitertanol presentó una variabilidad dependiente de cepa, con un rango desde 0.039 hasta 0.625  $\mu\text{g/ml}$ .

Las C.M.I. para la formación de tubos germinativos de las cepas fue de a) benzoilfenilurea: 0.038  $\mu\text{g/ml}$ ; b) bitertanol: para la cepa 95775-R: 0.156  $\mu\text{g/ml}$ ; para la cepa 95740-R: 0.078  $\mu\text{g/ml}$ ; para la cepa 95771-S: 0.312  $\mu\text{g/ml}$ ; y para la cepa 95759-S: 0.625  $\mu\text{g/ml}$ ; c) maneb: para la cepa 95775-R: 1.25  $\mu\text{g/ml}$ ; para la cepa 95740-R: 0.078  $\mu\text{g/ml}$ ; para la cepa 95771-S: 0.078  $\mu\text{g/ml}$ ; y para la cepa 95759-S: 0.312  $\mu\text{g/ml}$ ; d) metalaxil: para la cepa 95740-R: 0.312  $\mu\text{g/ml}$ ; mientras que para las cepas 95775-R, 95771-S y 95759-S: 0.038  $\mu\text{g/ml}$ , (tabla 8).

Tabla 7. C.M.I. DEL CRECIMIENTO DE LA FORMA DE LEVADURA DE LOS COMPUESTOS SELECCIONADOS EXPRESADAS EN  $\mu\text{G/ML}$ .

Cepas de <i>C. albicans</i>				
Compuesto	95775-R	95740-R	95771-S	95759-S
benzoilfenilurea	0.01	0.01	0.01	0.01
bitertanol	0.07	0.03	0.16	0.63
maneb	1.25	0.03	0.03	0.31
metalaxil	0.01	0.16	0.01	0.01

Tabla 8. C.M.I. DEL CRECIMIENTO DE LA FORMA DE MICELIO DE LOS COMPUESTOS SELECCIONADOS EXPRESADAS EN  $\mu\text{g/ml}$ .

Cepas de <i>C. albicans</i>				
Compuesto	95775-R	95740-R	95771-S	95759-S
benzoilfenilurea	0.03	0.03	0.03	0.03
bitertanol	0.16	0.07	0.31	0.62
maneb	1.25	0.07	0.07	0.31
metalaxil	0.03	0.31	0.03	0.03

## ESTUDIO CITOLÓGICO DE *C. albicans*

Una vez establecidas las C.M.I. de los compuestos inhibidores del crecimiento de *C. albicans*, se procedió a realizar un análisis de las células por medio de microscopía electrónica como se describió en Material y Métodos. De acuerdo a los resultados obtenidos, aparentemente las células no presentaron cambios importantes en su estructura inducidos por los compuestos (Figs. 1 y 2).

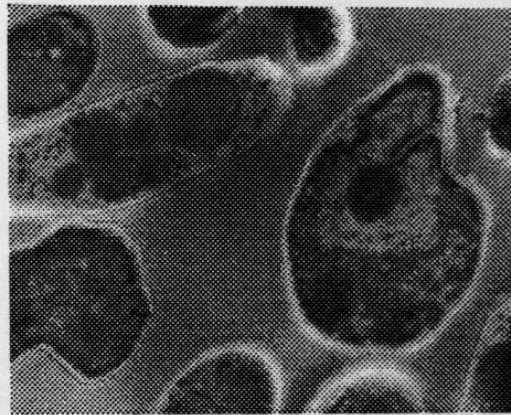


Fig. 1 *albicans* 95775-R.

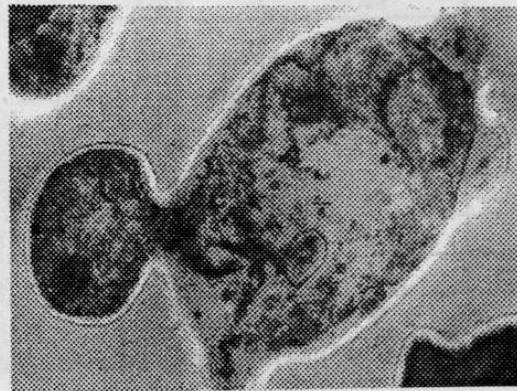


Fig. 2

Fig. 1 y 2. Microfotografía de *C. albicans* bajo el efecto de benzoil fenil urea (1) y metalaxil (2). No observándose cambios detectables en su morfología.

**EFFECTO DE LOS COMPUESTOS INHIBIDORES SELECCIONADOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE QUITINA SINTETASA.**

La actividad de quitina sintetasa se aumentó o disminuyó dependiendo del compuesto y de la concentración analizada. Los resultados se encuentran resumidos en las Tablas siguientes.

Tabla 9. ACTIVIDAD RELATIVA DE LA QUITINA SINTETASA DE *C. albicans* 95775-R.

		Concentración Mínima Inhibitoria			
Tratamiento	Conc.	0.078 µg/ml	0.019 µg/ml	0.2 µg/ml	0.019 µg/ml
		bitertanol	metalaxil	maneb	benzoilfenil
		Actividad Relativa*			
Normal	C.M.I.	1.33	0.67	1.16	1.91
Con tripsina	C.M.I.	1.28	0.52	0.94	1.03
Preactivada	C.M.I.	1.07	0.72	1.4	1.82
Normal	C.M.I. 10 X	1.07	0.68	0.95	1.61
Con tripsina	C.M.I. 10 X	0.65	0.51	0.53	1.19
Preactivada	C.M.I. 10 X	0.53	0.69	1.38	1.82
Normal	C.M.I. 100 X	0.71	0.67	1.18	2.1
Con tripsina	C.M.I. 100 X	0.8	1.47	0.58	1.11
Preactivada	C.M.I. 100 X	0.85	0.7	2.06	1.95

\*Actividad Relativa= actividad con inhibidor/actividad sin inhibidor

Tabla 10. ACTIVIDAD RELATIVA DE LA QUITINA SINTETASA DE *C. albicans* 95771-S

		Concentración Mínima Inhibitoria			
		0.078 µg/ml	0.019 µg/ml	0.2 µg/ml	0.019 µg/ml
Tratamiento	Conc.	bitertanol	metalaxil	maneb	benzoilfenil
		Actividad Relativa *			
Normal	C.M.I.	0.76	0.6	4.85	0.88
Con tripsina	C.M.I.	0.89	1.36	2.03	0.83
Preactivada	C.M.I.	0.88	0.77	0.31	1.2
Normal	C.M.I. 10 X	0.5	0.78	1.03	6.79
Con tripsina	C.M.I. 10 X	0.72	0.53	1.91	2.78
Preactivada	C.M.I. 10 X	0.54	0.81	1.14	1.34
Normal	C.M.I. 100 X	0.54	0.6	0.95	5.64
Con tripsina	C.M.I. 100 X	0.54	1.36	0.9	2.78
Preactivada	C.M.I. 100 X	0.37	0.76	1.63	1.34

\*Actividad Relativa= actividad con inhibidor/actividad sin inhibidor

Tabla 11. ACTIVIDAD RELATIVA DE LA QUITINA SINTETASA DE *C. albicans* 95740-R.

		Concentración Mínima Inhibitoria			
		0.078 µg/ml	0.019 µg/ml	0.2 µg/ml	0.019 µg/ml
Tratamiento	Conc.	bitertanol	metalaxil	maneb	benzoilfenil
		Actividad Relativa*			
Normal	C.M.I.	0.76	0.52	5.3	1.42
Con tripsina	C.M.I.	0.89	0.79	2.15	1.19
Preactivada	C.M.I.	0.88	1.57	0.62	1.03
Normal	C.M.I. 10 X	0.37	0.76	0.72	0.93
Con tripsina	C.M.I. 10 X	0.67	0.63	0.75	0.78
Preactivada	C.M.I. 10 X	0.56	1.09	0.5	0.96
Normal	C.M.I. 100 X	0.36	0.78	1.18	1.11
Con tripsina	C.M.I. 100 X	0.61	0.53	0.58	1.07
Preactivada	C.M.I. 100 X	0.41	0.81	2.06	0.73

\*Actividad Relativa= actividad con inhibidor/actividad sin inhibidor

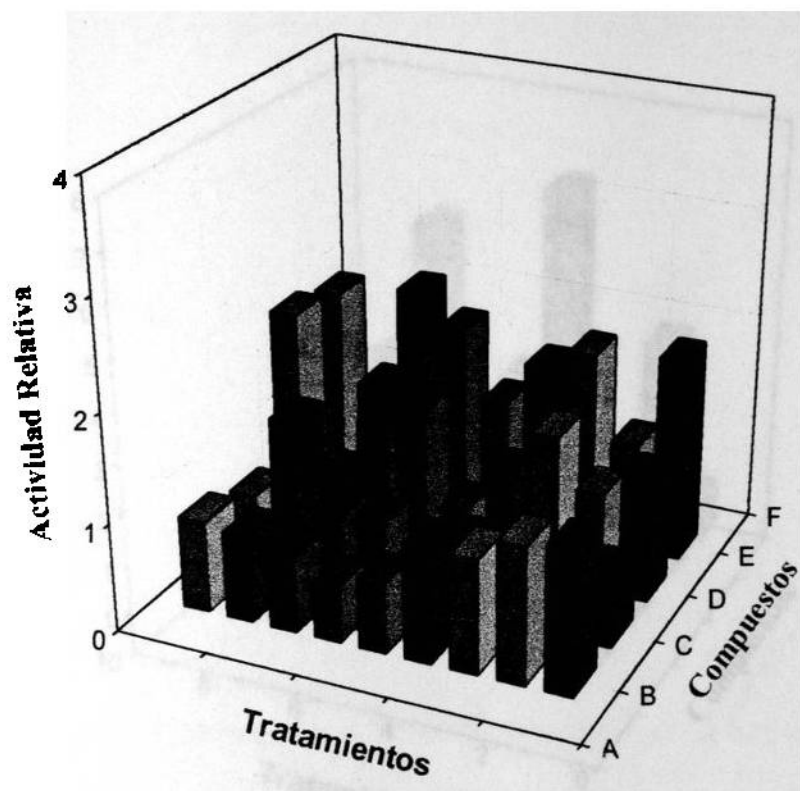
Tabla 12. ACTIVIDAD RELATIVA DE LA QUITINA SINTETASA DE *C. albicans* 95759-S.

		Concentración Mínima Inhibitoria			
		0.078 µg/ml	0.019 µg/ml	0.2 µg/ml	0.019 µg/ml
Tratamiento	Conc.	bitertanol	metalaxil	maneb	benzoilfenil
		Actividad Relativa*			
Normal	C.M.I.	2.82	0.53	1.14	1
Con tripsina	C.M.I.	2.82	0.79	2.27	1.11
Preactivada	C.M.I.	2.33	1.57	0.62	1.37
Normal	C.M.I. 10 X	1.01	1.22	0.87	0.75
Con tripsina	C.M.I. 10 X	1.05	1.04	0.76	1.15
Preactivada	C.M.I. 10 X	1.31	1.15	0.74	1.42
Normal	C.M.I. 100 X	1.21	0.58	1.62	1.09
Con tripsina	C.M.I. 100 X	1.15	1.32	4	1.36
Preactivada	C.M.I. 100 X	1.31	0.77	0.58	1.78

\*Actividad Relativa= actividad con inhibidor/actividad sin inhibidor

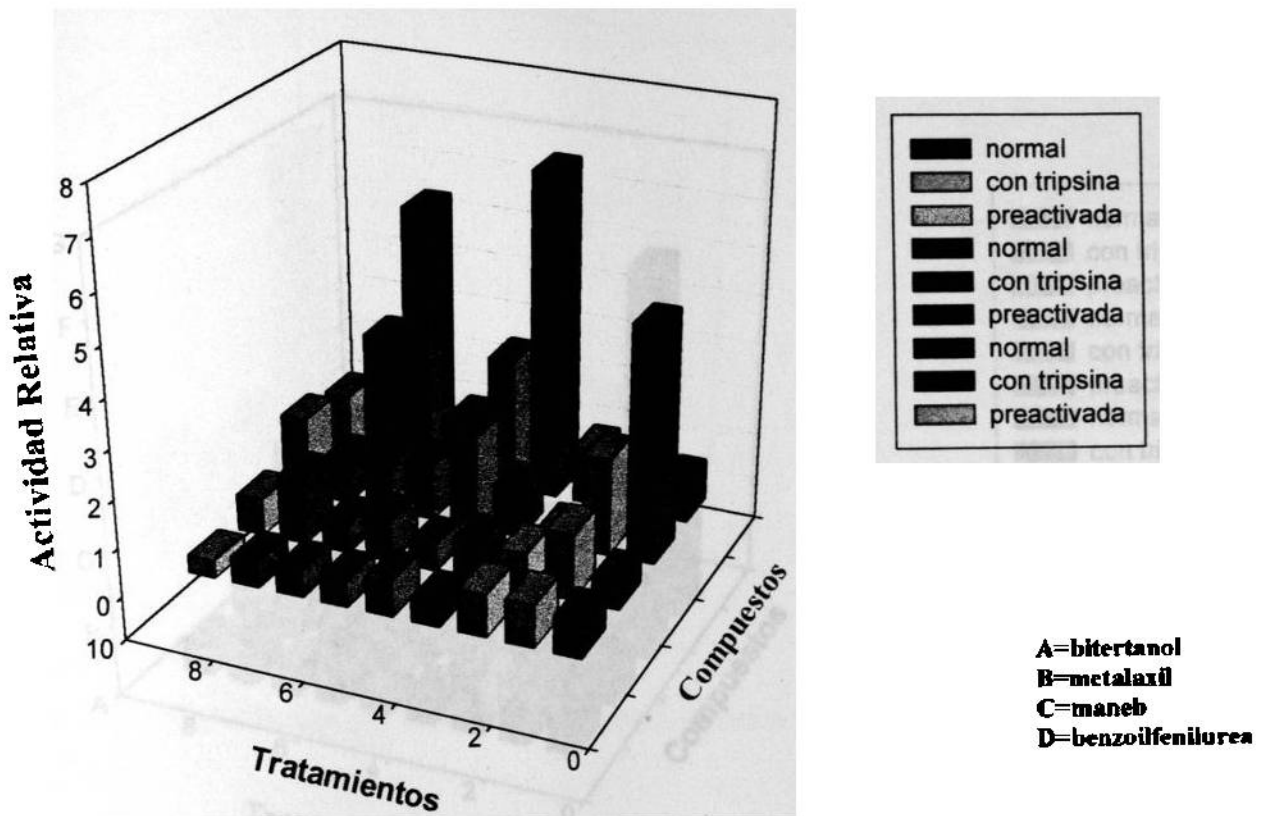
La más interesante observación es el poco efecto de los inhibidores en la actividad de la quitina sintetasa que se presentó en las cepas 95775-R y 95759-S (Figs. 3 y 6), en comparación con las cepas 95771-S y 95740-R (Figs. 4 y 5). Cabe hacer notar, que los compuestos maneb y benzoilfenilurea estimularon la actividad de la enzima en las fracciones activadas con tripsina durante el ensayo y con activación controlada, en comparación con la fracción sin activar, siendo más notorio en las cepas 95775-R y 95759-S. Mientras que en las cepas 95771-S y 95740-R, el bitertanol y el metalaxil no ejercieron un efecto tan notorio en comparación con el maneb y la benzoilfenilurea. Otra observación interesante es que el bitertanol aceleró la actividad de la quitina sintetasa en las 4 cepas, pero de manera más notoria en las cepas 95775-R y 95759-S.

Fig. 3 Actividad relativa de la quitina sintetasa de *C. albicans* 95775-R



**B=bitertanol**  
**C=metalaxil**  
**D=maneb**  
**E=benzoilfenilurea**

**Fig. 4 Actividad relativa de la quitina sintética de *C. albicans* 95771-S**





**Fig. 5 Actividad relativa de la quitina sintetasa de *C. albicans* 95740-R**

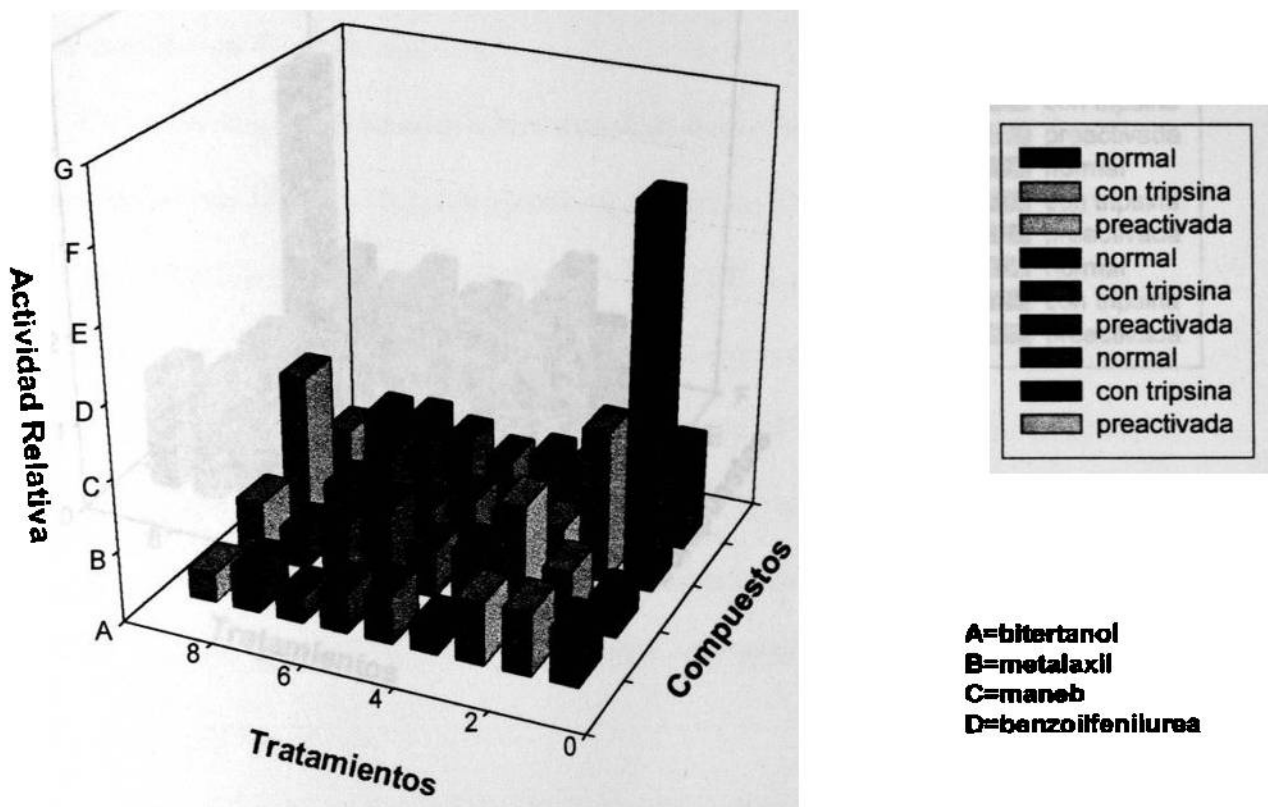
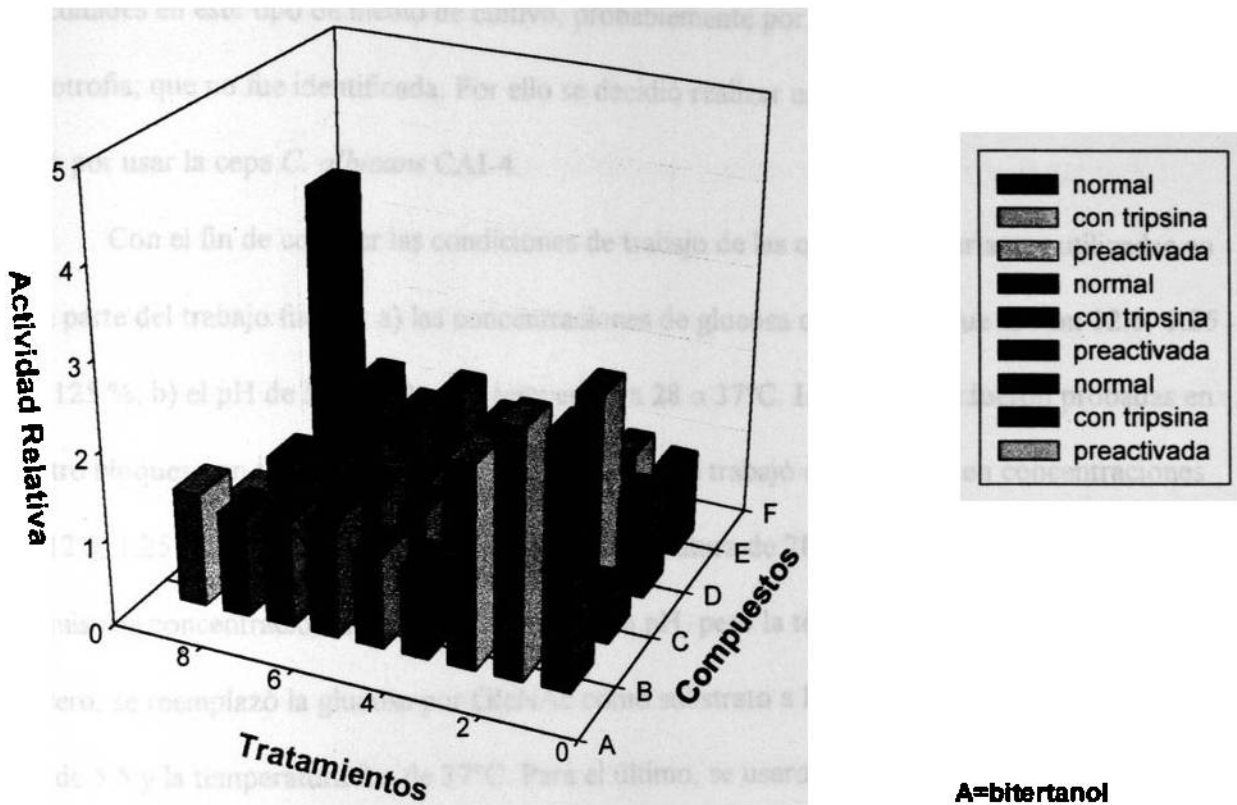


Fig. 6. Actividad relativa de la quitina sintetasa de *C. albicans* 95759-S



A=biteranol  
 B=metalaxil  
 C=maneb  
 D=benzofenilurea

## **EFFECTO DE COMPUESTOS INHIBIDORES SOBRE LA BIOSÍNTESIS DE QUITINA IN VIVO**

En esta fase del trabajo se pretendió establecer las condiciones de crecimiento de las cepas de *C. albicans* 95740-R, 95775-R, 95771-S y 95759-S en el medio de Lee, el cual presentó dificultades en este tipo de medio de cultivo, probablemente por tener una auxotrofia, que no fue identificada. Por ello se decidió realizar un cambio en la cepa utilizada, y se optó por usar la cepa *C. albicans* CAI-4.

Con el fin de conocer las condiciones de trabajo de las cepas. Las variantes utilizadas en esta parte del trabajo fueron: a) las concentraciones de glucosa o GlcNAc, que fueron 12.5, 1.25 y 0.125 %; b) el pH de 5.5 o 7.0; c) la temperatura 28 o 37°C. Las variantes fueron probadas en cuatro bloques con tres repeticiones. Para el primero se trabajó con glucosa en concentraciones de 12.5, 1.25 y 0.125 %, a un pH de 7.0, y la temperatura de 28°C. En el segundo, se probaron las mismas concentraciones de glucosa y el mismo pH, pero la temperatura fue de 37°C. Para el tercero, se reemplazó la glucosa por GlcNAc como sustrato a las mismas concentraciones, el pH fue de 5.5 y la temperatura fue de 37°C. Para el último, se usaron las mismas condiciones del anterior, pero el pH fue de 7.0.

Durante el estudio cinético efectuado, la muestra que mostró la mayor incorporación de [<sup>14</sup>C]-GlcNAc (5428 cpm) fue la que correspondía a una concentración de 0.125 % de glucosa, a una temperatura de 37°C, un pH de 7.0, y un tiempo de incubación de 1 h, con una masa celular que contenía 180 mg de proteína. Por lo que estas condiciones de crecimiento fueron seleccionadas para los siguientes experimentos.

La cinética de crecimiento se volvió a analizar, variando en esta ocasión el tiempo de

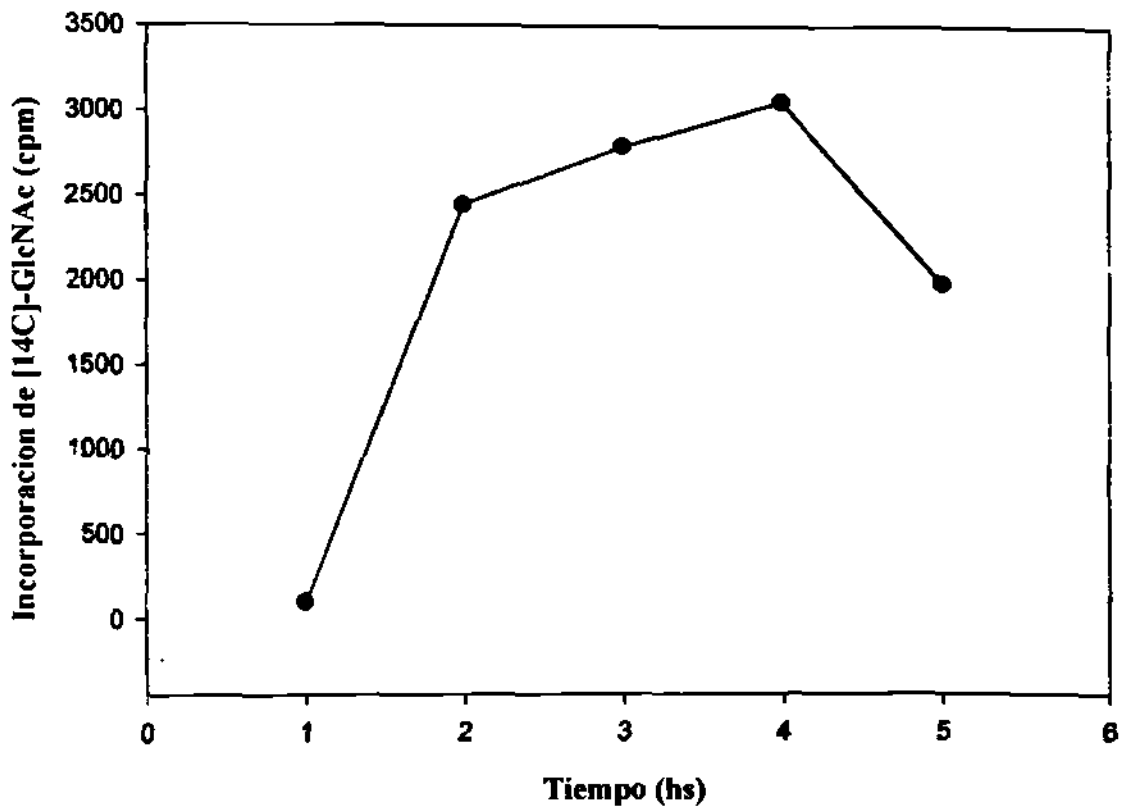
extracción de las alicuotas, para corroborar los datos obtenidos, y se incrementó el tiempo de incubación siendo este de 1, 2, 4, 6 y 8 h. Se obtuvieron los siguientes datos de incorporación de radioactividad: 99 cpm a la primera h, 2445 cpm a las 2 h, 2791 cpm a las 4 h, 3054 cpm a las 6 h y 1981 cpm a las 8 h, por lo que se decidió seleccionar el tiempo de 2 h ya que con base en los datos obtenidos, se pudo observar que a partir de este tiempo y hasta las 4 h la actividad era lineal para saturarse posteriormente (Fig. 7).

Posteriormente se hizo un análisis cinético de la misma forma, pero con tiempos de incubación menores de 60 min, para verificar la linealidad de la asimilación de la [<sup>14</sup>C]-GlcNAc. Una vez seleccionadas las condiciones de trabajo, se procedió a probar el grado de interferencia de los compuestos metalaxil, maneb, bitertanol y benzoilfenilurea en la incorporación de sustrato cuando se usó una concentración de un cuarto de la CMI.

La inhibición de la incorporación fue dependiente de la concentración del inhibidor, siendo el Metalaxil el más eficiente. La inhibición máxima obtenida al emplear 2X la CMI fue de aproximadamente 20-40 % dependiendo del inhibidor empleado.

Durante los experimentos para determinar la interferencia de los compuestos sobre la incorporación de [<sup>14</sup>C]-GlcNAc, es importante hacer notar que el triflumuron (benzoilfenilurea) estimuló la incorporación del sustrato. Por otra parte, el metalaxil, el maneb y el bitertanol solo inhibieron de manera parcial la incorporación, en el material insoluble en NaOH (Fig. 8). En el caso del material precipitado con ácido tricloroacético, es interesante hacer notar que en presencia de metalaxil y triflumuron (benzoilfenilurea) se mostró escasa incorporación con respecto a la muestra control, además se observó que en presencia del maneb y el bitertanol la inhibición de incorporación del sustrato no fue total, (Fig. 9).

**Fig. 7** Incorporación de [ $^{14}\text{C}$ ]-GlcNAc en *C. albicans* CAI-4 in vivo.



**Fig. 8 Inhibición de incorporación de [<sup>14</sup>C]-GlcNAc en material insoluble en NaOH de *C. albicans* CAI-4**

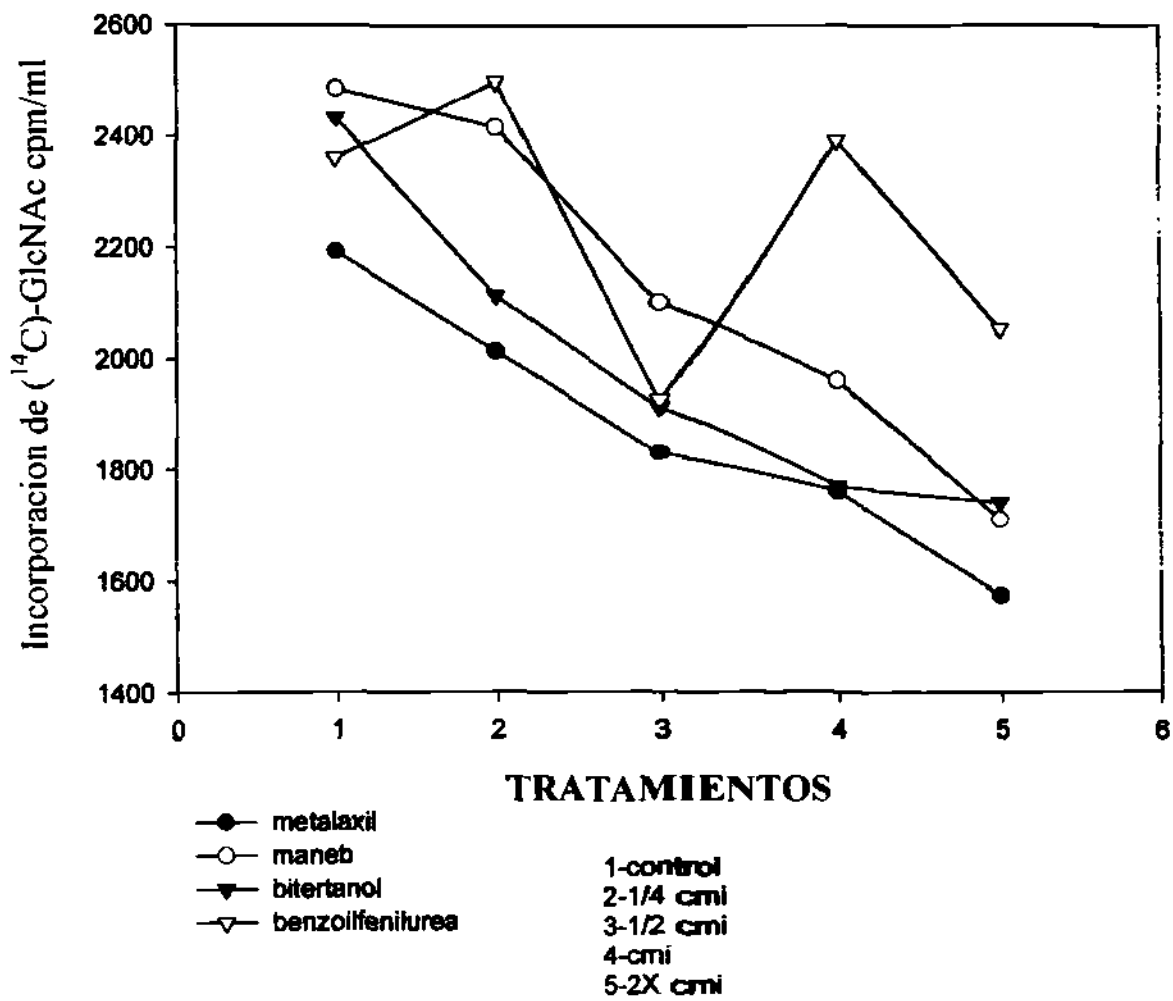
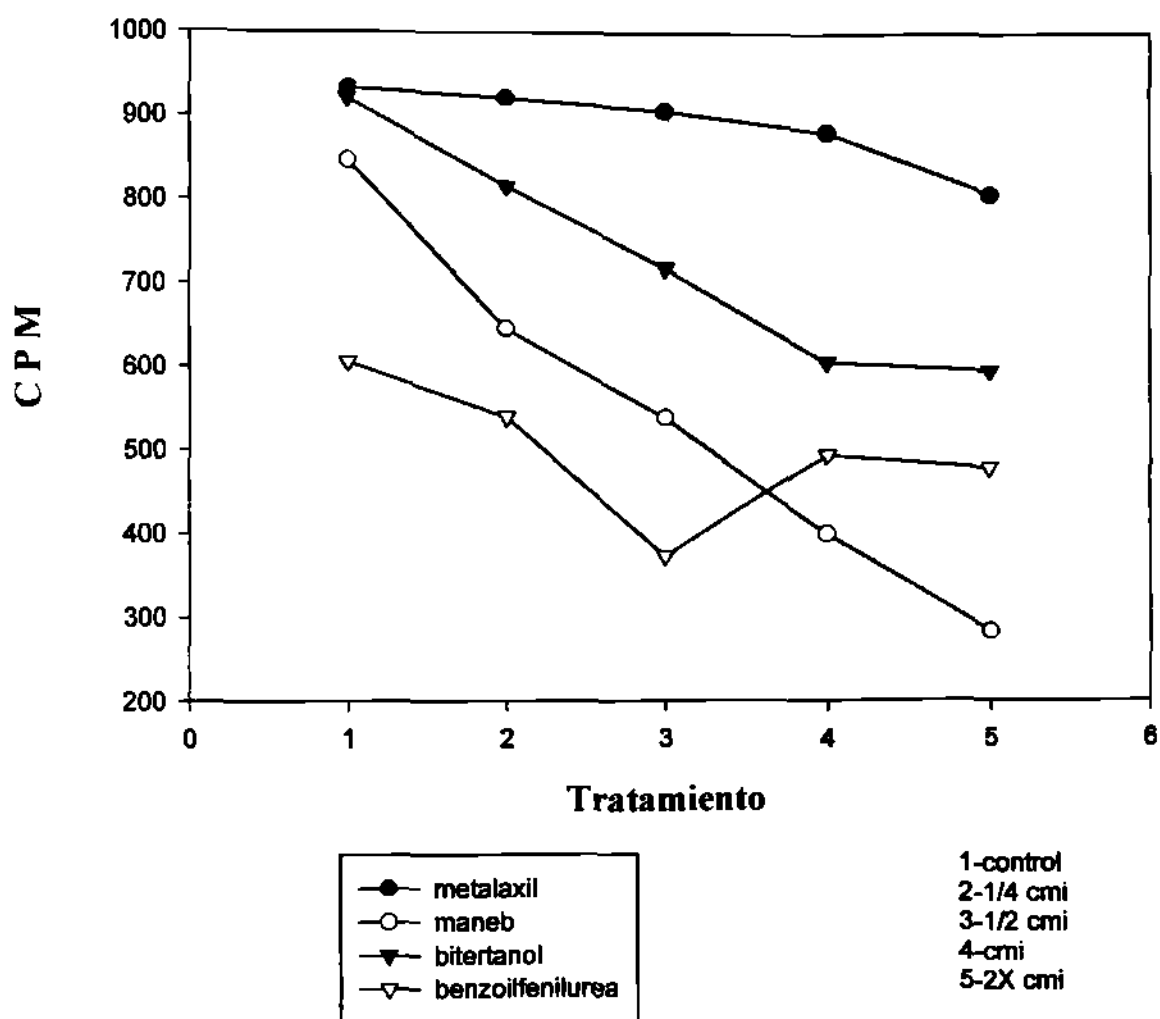


Fig. 9 Inhibición de incorporación de [<sup>14</sup>C]-GlcNAc en material insoluble en TCA de *C. albicans* CAI-4



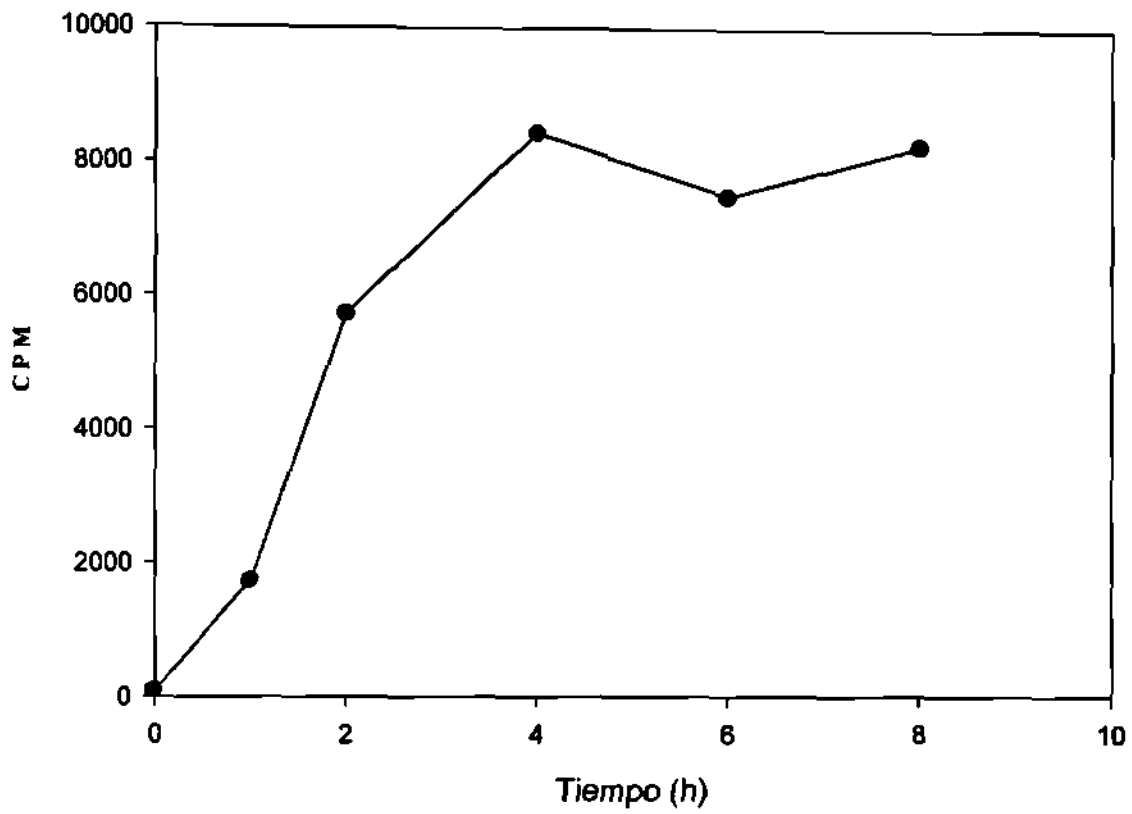
## **DETERMINACIÓN DE LA INTERFERENCIA EN LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS.**

Para determinar el grado de **interferencia** de los compuestos seleccionados en la biosíntesis de proteínas, en esta parte del trabajo se realizó una cinética de la incorporación de una mezcla de [<sup>14</sup>C]-L-aminoácidos en el material precipitado con ácido tricloracético, como se describió en Material y Métodos. Los resultados de la incorporación fueron los siguientes: al tiempo cero la radioactividad observada en el material precipitado con ácido tricloracético fue de 97 cpm; para los 15 min fue de 1737 cpm; a los 30 min de 5733 cpm; a los 45 min de 8444 cpm; a los 60 min de 7492 cpm y a los 75 min de 8258 cpm, (Fig. 10). Para experimentos posteriores se seleccionó el tiempo de 30 min como el adecuado por su linealidad.

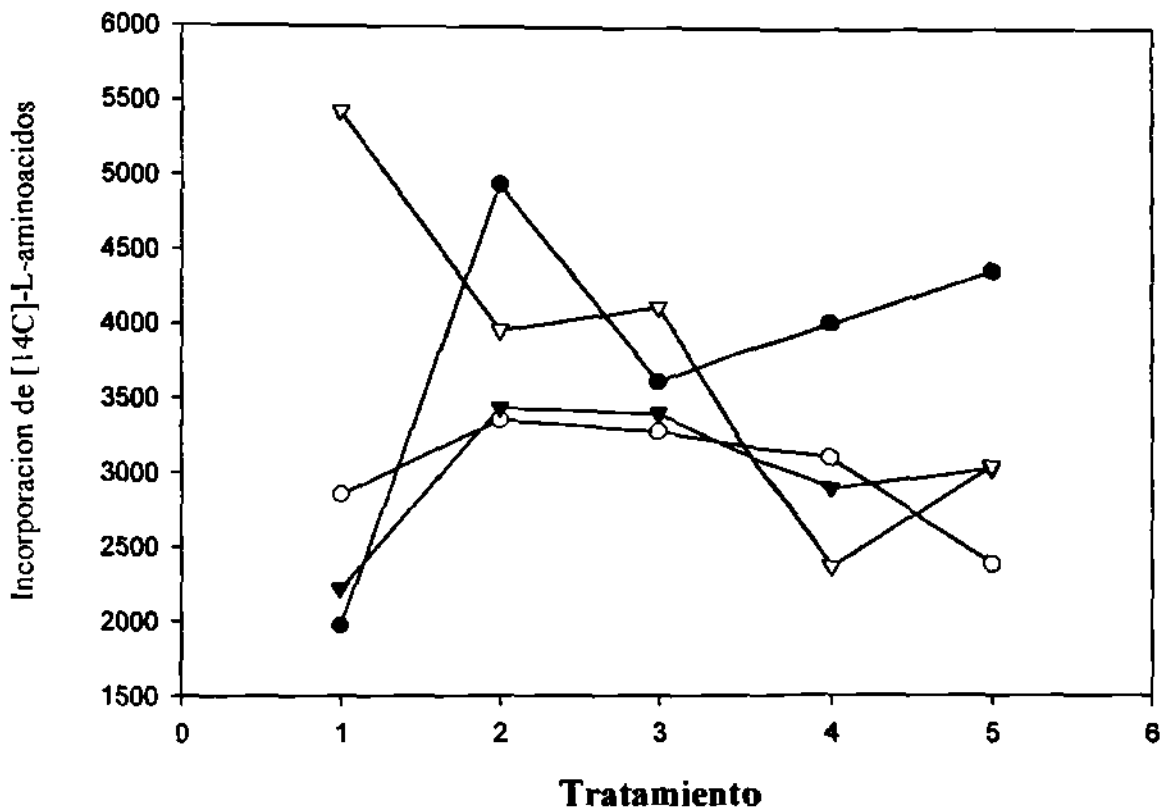
Utilizando las mismas condiciones de trabajo de la cinética, se expuso a *C. albicans* a la acción de los compuestos inhibidores. Siendo notable el efecto de estimulación sobre la síntesis de proteínas que ejerció el metalaxil con respecto a la muestra control. En cambio el triflumuron (benzoilfenilurea) mostró un efecto reductor de la incorporación del substrato radioactivo. La estimulación ejercida por el maneb y el bitertanol no fue tan notable, en comparación con el efecto del triflumuron (Fig. 11).



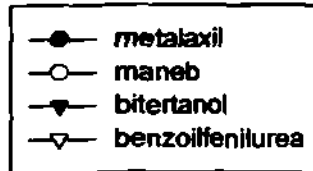
**Fig. 10. Curva estándar de incorporación de  $^{14}\text{C}$  -L-aminoácidos en *C. albicans* CAJ-4**



**Fig. 11. Incorporación de [<sup>14</sup>C]-L-aminoácidos en *C. albicans* CAI-4**



1-control  
 2-1/4 cmi  
 3-1/2 cmi  
 4-cmi  
 5-2X cmi



## DISCUSIÓN

Las sustancias utilizadas durante nuestros experimentos de la síntesis de quitina *in vitro* casi no inhiben la actividad de la enzima quitina sintetasa. Incluso, en la mayoría de los resultados muestran un aumento en la actividad de la enzima, el cual es muy variable. Entre los factores que pueden influir en esta variabilidad de los resultados se encuentran: las condiciones en las que fue utilizada la enzima quitina sintetasa, como por ejemplo: sin activación, con activación catalítica controlada y con el activador catalítico presente. Las cepas crecieron en forma adecuada en los experimentos de incorporación de UDP-GlcNAc, pero no para la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -GlcNAc en los que se utilizó el medio de cultivo de Lee (medio mínimo), ya que las cepas mostraron ser deficientes para crecer en este medio, por lo que se utilizó la cepa *C. albicans* CAI-4 que crecía satisfactoriamente en este medio de cultivo.

Para los experimentos de incorporación de  $^{14}\text{C}$ -GlcNAc, se cultivaron las células para llevarlas a un estado de sincronización de la fase G cero, conservándose a 4°C hasta por un período máximo de 7 días, después del cual se reemplazaban.

El protocolo que se diseñó para la realización de la cinética de incorporación de  $^{14}\text{C}$ -GlcNAc, contempló el estudio del fenómeno de la transición de levadura a micelio bajo la regulación de temperatura y pH, siendo la temperatura de 28°C a 37°C. El rango de pH que se manejó para la transición fue de 5.5 a 7.0. En el caso del sustrato se utilizó el GlcNAc con y sin radiactividad, el GlcNAc no radiactivo se empleó a diferentes concentraciones, siendo seleccionada la concentración de 0.125 g. El tiempo para desarrollar la cinética de crecimiento fue de 8 h. Los resultados obtenidos de esta cinética nos condujeron a seleccionar el tiempo de una h de incubación debido a que después de este tiempo la curva tendió a mantenerse en un valor constante.

Otro factor importante fue el tipo de compuestos utilizados, es importante hacer notar que no existe evidencia del papel bioquímico que juegan los inhibidores en el incremento de la

actividad de la enzima quitina sintetasa. Por otra parte, la actividad de la enzima fue dependiente de la cepa utilizada.

Los resultados de los experimentos de la biosíntesis de la quitina *in vivo* mostraron una inhibición de la incorporación de GlcNAc hacia la quitina, pero esta inhibición no fue total y además mostró variabilidad dependiente del compuesto y de las concentraciones utilizadas. Es de interés hacer notar que, en los experimentos *in vitro* la actividad de la enzima fue estimulada pero en los experimentos *in vivo* la incorporación de GlcNAc fue inhibida.

Se realizó una cinética de incorporación de una mezcla de aminoácidos marcados con  $^{14}\text{C}$ . La carga de cpm en esta cinética fue de 352,000 cpm. De los resultados obtenidos, se seleccionó utilizar 30 min como tiempo de incubación debido a que fue el punto que presentó linealidad ascendente en la curva de crecimiento, y nos permitió demostrar si existía reducción en la incorporación de aminoácidos marcados con  $^{14}\text{C}$ . Al analizar comparativamente los resultados de los experimentos de la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -aminoácidos, se demostró una estimulación de la síntesis de proteínas, contrariamente a lo esperado. Estos datos son de interés desde el punto de vista bioquímico, ya que *in vitro* la actividad de la quitina sintetasa se estimuló, la incorporación de GlcNAc *in vivo* se inhibió, en tanto que la síntesis de proteínas fue estimulada. Existen teorías que indican que la quitina sintetasa debe ser exteriorizada y una vez en el exterior, une los polímeros de GlcNAc para formar las fibras de quitina, que después maduran y son incorporadas a la pared celular. Nuestros datos se pueden explicar desde el punto de vista *in vivo* donde los compuestos pueden interrumpir la síntesis de quitina en el exterior de la membrana plasmática, pero como las sustancias no inhiben la síntesis de proteínas podemos suponer que se mantiene la producción de la enzima quitina sintetasa.

Si los compuestos pasan a través de la pared celular pero no pueden ser interiorizados al citoplasma, estos pueden mantenerse en el sitio donde estaría actuando la enzima quitina sintetasa uniendo los polímeros de GlcNAc, para formar las fibras de quitina que después serán ensambladas en la pared celular durante la formación de el tubo germinativo. De acuerdo a las observaciones de nuestros experimentos *in vivo* si la actividad de la enzima fue inhibida aunque no en su totalidad, podemos pensar que los compuestos utilizados pudieron actuar en la forma antes mencionada.

Las cepas utilizadas, se comportaron diferente cuando fueron puestas en contacto con los inhibidores. Por ejemplo: en las cepas 95759-S y 95775-R la actividad de la quitina sintetasa fue incrementada de manera general por todas las sustancias. Por el contrario en las cepas 95740-R y 95771-S el incremento mostrado fue menor estas cepas con respecto a las cepas anteriores Fig. 3-6.

En los experimentos *in vivo* donde utilizamos GlcNAc marcado con carbono 14 , la incorporación del substrato fue muy variable. Aparentemente cuando fue variando la concentración de los compuestos, la incorporación de el substrato fue disminuyendo, pero como se pudo observar al utilizar el benzoilfenilurea la actividad se mostró muy variable. Por el contrario con el resto de las sustancias esta fue decreciendo gradualmente. Por lo que podemos inferir que las sustancias interfirieron en la síntesis de quitina *in vivo*. Pero cuando se analizó la incorporación de GlcNAc en el material insoluble en TCA y en los experimentos donde se usó L-aminoácidos marcados con carbono 14, la mayoría de los resultados mostraron un incremento de la actividad de la quitina sintetasa y de la síntesis de proteínas cuando se utilizaron maneb, metalaxil ,bitertanol y benzoilfenilurea.

De acuerdo a los resultados mencionados anteriormente la incorporación del GlcNAc en el material insoluble en TCA se incrementó. Cuando utilizamos L-aminoácidos marcados, la incorporación se incrementó notablemente cuando el hongo fue expuesto a los inhibidores probados.

Otro aspecto que es relevante mencionar es que los resultados de los experimentos donde se utilizaron los inhibidores el GlcNAc y L-aminoácidos ambos marcados con carbono 14 y la cepa CAI-4 revelaron que la actividad de los compuestos no estaba dirigida hacia la incorporación de GlcNAc durante la biosíntesis de quitina. Por otra parte, la síntesis de proteínas no fue el blanco específico de las sustancias probadas. Probablemente el sitio de acción de las sustancias se encuentre en otro compartimento celular. Por lo que sería muy conveniente la búsqueda del sitio de acción tanto en la ruta de la síntesis de quitina en otros pasos de esta ruta metabólica.

Otro de los aspectos relevantes de este trabajo es, investigar si la ruta de secreción de la enzima quitina sintetasa pudo ser inhibida, como un efecto secundario del modo acción de los compuestos probados.

## **CONCLUSIONES**

- 1- La mas interesante observación es el poco efecto de los inhibidores en la actividad de la enzima quitina sintetasa.**
- 2- Los compuestos como el tiocarbamato y benzoilfenilurea casi no inhiben la actividad de la quitina sintetasa *in vitro*, pero si inhiben la incorporación de GlcNAc a quitina *in vivo*, sin afectar la síntesis de proteínas, incluso la estimulan.**
- 3- Los compuestos como el tiocarbamato y benzoilfenilurea estimulan la síntesis de proteínas. pero no tenemos evidencia a que nivel de la síntesis de proteínas trabajan estos compuestos.**

## LITERATURA CITADA

- Andreoli T. E. and M. Monahan. 1968. *The interaction of polyene antibiotics with thin lipid membranes.* J. Gen. Physiol. 52:300-325.
- Beck-Sagué C. M., W. R. Jarvis. 1993. *The nosocomial infections surveillance system. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990.* J. Infect. Dis. 167:1247-1251
- Birse E.Ch., Y.M. Irwin, A.W.Fonzi and P.S Syphera. 1993. *Cloning and Characterization of ECE 1, a gene expresse in asociation with cell elongation of the dimorphic pathogen Candida albicans* Infect Immun 61:3648-3655.
- Bossche H. V., D. W. Warnock, B. Dupont, D. Kerridge, S.S. Gupta, L. Improvisi, P. Marichal, F. C. Odds, F. Prouost, and O. Ronin. *Antigungal Drug Resistance, Departament of Comparative Biochemistry Janssen Research Foundation B-2340 Beerse, Belgium.*
- Bowers B. and E. Cabib. 1974. *Effect of polioxin D on chitin synthesis and septum formation in Saccharomyces cerevisiae.* J. Bacteriol. 119:564-575.
- Braun P. C. and R. A Calderone. 1978. *Chitin synthesis in Candida albicans: Comparison of yeast and hyphal forms.* J. Bacteriol.135:1472-1477.
- Brummer E.N. and D.A.Stevens. 1994. *Effect of macrophage colony-stimulation factor on anticryptococcal activity of bronchoalveolar macrophages: synergy with fluconazole for killing.* Antimicrob. Agents Chemother.38:2158-2161.
- Bullock W. E. and G. S. Deepe. 1983. *Medical mycology in crisis.* J. Lab. Clin. Med. 102:685-693.



- Casadevall A., E.D.Spitzer, D.Webb, M.G.Rinaldi.1993. Susceptibilities of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from patients with recurrent cryptococcal meningitis to amphotericin B and fluconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.***37**:1383-1386.
- Cassone A., D. Kerridge, and E. F. Gale. 1979. Ultrastructural changes in the cell wall of *Candida albicans* following cessation of growth and their possible relationship to the development of polyene resistance. *J. Gen. Microbiol.* **110**:339-349.
- Chapman T., O.Kinsman and J.Hooston. 1992. Chitin Biosynthesis in *Candida albicans* grown in vitro and in vivo and its Antimicrob. Agents Chemother.**36**:1909-1914.
- Chattaway F.W., M.R.Holmes and A.J.E.Barlow.1968.Cell Wall Composition of the mycelial and blastospore forms of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.***51**: 367-376.
- Chen-Wu, J.L., J. Zwicker, A.R. Bowen, and P.W. Robbins. 1992. Expression of chitin synthase genes during yeast and hyphal growth phases of *Candida albicans*. *Mol.Microbiol.***6**: 497-502.
- Cid, V.J., A. Duran, F. del Rey, M. P. Snyder, C. Nombela and M. Sánchez. 1995. Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **59**: 345-386.
- Cole K.L. 1992. In vitro characterization and prevention of germ tube formation in *Candida albicans*. Ph.D. Thesis the University of Texas graduate school of biomedical sciences at San Antonio. 31-45.
- Coote P.J., M.V. Jones, K. Edgar and M.B. Cole. 1992. TPK gene products mediate camp-independent thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **138**:2551-2557.

- Davies J. 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* **264**: 375-388.
- Delbrück S. and J. Ernst 1993. Morphogenesis-independent regulation of chitin transcript levels in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 859-866.
- Diamond R. 1991. The growing problem of mycoses in patients infected with the immunodeficiency virus. *Rev. Infect. Dis.* **13**:480-486.
- Drouhet E. and B. Dupont. 1985. Recent progress in antimycotics. Chemotherapy of deep seated mycoses due to filamentous fungi: by ketoconazol and by association of antifungal agents. In arait, ed. Filamentous microorganisms. Biomedical aspects. Tokyo:Japan Scientific Societies Press:305-344.
- Drouhet E. and B. Dupont. 1987. Evolution of antifungal agents: Past, present and future. *Rev. Infect. Dis.* **9**:4-14
- Dupont B. and E. Drouhet. 1985. Cutaneous, ocular and osteoarticular candidiasis in heroin addicts:New clinical and therapeutic aspects in 38 patients. *J. Infect. Dis.* **152**:577-591.
- Elorza M. V., A. Murgui, H. Rico, F. Miragall, and R. Sentandreu. 1987. Formation of a new cell wall by protoplasts of *Candida albicans*: effect of papulacandin B, tunicamycin and nikkomycin. *J. Gen. Microbiol.* **133**:2315-2325.
- Emery H.S., C.P. Shelburne, J.P. Bowman, P.G. Fallon, C.A. Schultz and E.S. Jacobson. 1992. Genetic study of oxygen resistance and melanization in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* **62**: 5694-5697.
- Endo A., and T. Misato. 1970. Mechanism of action of the antifungal agent polyoxin D. *J. Bacteriol.* **104**:189-196.

- Georgopapadakou N.H., and T. J. Walsh. 1996. Antifungal agents: Chemotherapeutics targets and immunologic strategies. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 279-291.
- Gestel J.V. 1986. The vapour phase activity of antifungal compounds: a neglected or a negligible phenomenon?. Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division), pp. 207-218.
- Gil M.L., M.Casanova. and J.P.Martinez. 1994. Changes in the cell wall glycoprotein composition of *Candida albicans* associated to the inhibition of germ tube formation by EDTA *Arch. Microbiol.* **161**: 489-494.
- Gooday G. W. 1977. Biosynthesis of the fungal wall-mechanisms and implications. *J. Gen. Microbiol.* **99**:1-11.
- Gow L. A., and C. P. Selitrennikoff. 1984. Chitin synthesis of *Neurospora crassa*: inhibition by nikkomycin, polyoxin B, and UDP. *Curr. Microbiol.* **11**:211-216.
- Harpy J.C. and G.W. Gooday. 1983. Stability and zymogenic nature of chitin synthase from *Candida albicans*. *Curr. Microbiol.* **9**:51-54.
- Hector R.F. and P.C. Braun. 1986. Synergistic action of nikkomycins X and E with papulocandin B on whole cell and regenerating protoplasts of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **29**:389-394.
- Hector R.F. and P.C. Braun. 1986. A 96-well epifluorescence assay for rapid assessment of compounds inhibitory to *Candida spp.* *J. Clin. Microbiol.* **24**:620-624.
- Hector R.F., P.C. Braun., J.T. Hart and M.E. Kamarck. 1990. The use of flow cytometry to monitor chitin synthesis in regenerating protoplasts of *Candida albicans*. *J. Med. Vet. Mycology.* **28**: 51-57.
- Hector R. F. 1993. Compounds active against cell walls of medically important fungi. *Clin.*

Microbiol. Rev. 6:1-21.

Hostetter M.K. 1994. Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida spp* with epithelial and endothelial surfaces. Clin. Microbiol. Rev. 7:24-42

Jacobson E.S., N.D. Jenkins and J.M. Todd. 1994. Relationship between superoxide dismutase and melanin in a pathogenic fungus. Infection Immun. 62:4085-4086.

Kerridge D., and W. L. Whelan. The polyene macrolide antibiotics and 5-fluorocytosine: molecular actions and interactions. In: Trinci, APJ, Ryley J. F., eds. Mode of action of antifungal agents. Cambridge: Cambridge University Press, 1984:343-375.

Kenney M.J. *Candida* blastopore adhesion association and invasion of the gastrointestinal tract of vertebrates: "*Candida* adhesion and invasion". The UPJOHN Company, Kalamazoo, Michigan 4900.

Levitz S.M. and R.D. Diamond. 1985. A rapid colorimetric assay of fungal viability with the tetrazolium salt MTT. J. Infect. Dis. 152:938-945.

Linder K.L. and A.G. Gilman. 1992. G proteins tucked in to the internal surface of the cell's outer membrane, these versatile molecules coordinate cellular responses to a multitude of signals. Scientific American. pp. 36-43.

Lodder J. Kreger-Van Rijn: General classification of the yeasts. In: the yeasts. A taxonomic study, edited by J. Lodder, 1970. pp. 21.

Lopez L.J., S.C. McVay and L.W. Chaffin. 1994. Murine tissues exposed to cytotoxic drugs display altered patterns of *Candida albicans* adhesion. Infect. Immun. : 4226-4232.

Magee P.T. 1990. The use of genetic analysis in the study of the Biology of *Candida albicans* in the "Genetic of *Candida*". D.R. Krish, Kelly and M.B. Kurtz eds. CRC Press, Boca

Raton, Fla.

- Milewski S., O'donnell R.W. and Gooday G.W. 1992. Chemical modification studies of the active centre of *Candida albicans* chitinase and its inhibition by allosamidin. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 2545-2550.
- Molina M., R. Cenamor, and C. nombela. 1987. Exo-(1,3)-beta-glucanase activity in *Candida albicans*: effect of the yeast to mycelium transition. *J. Gen. Microbiol.* **133**:609-617.
- Odds F.C. 1986. A survey of old and new antifungal tests in vitro. Science publishers B.V. (Biomedical Division). pp. 13-19.
- Odds F.C. 1994. *Candida* species and virulence. *ASM news.* **60**: 6.
- Pfaller A.M., B Dupont., G.S Kobayashi., J. Müller., M.G. Rinaldi., I. A Espinel., S. Shadomy., P.F. Troke., J.J. Walsh and D.W. Warnock. 1992. Standarized suceptibility testing of fluconazole: An international colaborative study. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**: 1805-1809.
- Pfaller M.A., M. Lancaster, A. Espinel, Ingroff, A. Fothergill, C. Grant, M.R. McGinnis, L. Pasarell, M.G. Rinaldi and L. Steele-More. 1994. Multisite reproducibility of colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 1625-1628.
- Poulain D., G. Tronchin, J. F. Dubremetz, and J. Biguet. 1978. Ultrastructure of the cell wall of *Candida albicans* blastospores: Study of its constitutive layers by the use of a cytochemical technique revealing ploysaccharides. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* **129**:141-153.
- Rast D.M., M. Horsch, R. Furter. and G.W. Gooday. 1991. A complex chitinolyting system in

- exponentially growing mycelium of *Mucor rouxii*: Properties and function. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 2797-2810.
- Rinaldi M.G. 1993. Biology and pathogenicity of *Candida* species "Candidiasis: Pathogenesis, Diagnosis and Treatment". Edited by G.P. Bode, Raven Press, LTD, New York.
- Ruiz-Herrera, J., C. G. Leon, A. Carabez-Trejo and E. Reyes-Salinas. 1996. Structure and chemical composition of the cell walls from haploid yeast and mycelial forms of *Ustilago maydis*. *Fungal Gen. & Biol.* **000**:1-11
- Ruiz-Herrera, J. and B. Xoconostle-Cazares. 1995. Molecular and genetic control of chitin biosynthesis in fungi. *Arch. Med. Res.* **26**: 315-321.
- Ruiz-Herrera J. 1994. Polyamines DNA methylation and fungal differentiation. *Crit. Rev. Microbiol.* **20**:143-150
- Ryder N. S., G. Seidl, and P. F. Troke. 1984. Effect of the antimycotic drug maftifine on growth and sterol biosynthesis in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **25**:483-487.
- Ryder N.S. 1985. Especific inhibition of fungal sterol biosynthesis by SF 86-327, a new allylamine antimycotic agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**: 252-256.
- Ryley J. F., R. G. Wilson, M. B. Gravestock, and J. P. Poyser. 1988. Experimental approaches to antifungal chemotherapy. *Adv. Pharmacol. Chemother.* **18**:50-176.
- Scherer S. 1990. Molecular genetics of *Candida albicans* and molecular evolution: in "The genetic of *Candida*" D.R. Krish, R. Kelly and M.B. Kurtz, eds. crc Press, Boca Raton, Fla.
- Scherer S. and P.T. Magee. 1990. Genetics of *Candida albicans*. *Microbiol. Rev.* **54**: 226-241.
- Sentandreu R., S. Mormeneo and J. Ruiz-Herrera. 1994. Biogenesis of the fungal cell wall.

- Shaw A.J., C.P. Mol, B. Bowers, S.J. Silverman, M.H. Valdivieso, and A. Duran. Shepherd M.G. 1985. Pathogenicity of morphological and auxotrophic mutants of *Candida albicans* in experimental infections. *Infect. Immun* 50: 541-544.
- Soll D.R. 1992. Dimorphism and high-frequency switching in *Candida albicans*, in "The genetic of *Candida*", D.R. Krisch, R. Kelly and M.B. Kurtz, eds. crc Press, Boca Raton, Fla.
- Soll D.R. 1992. High-frequency switching in *Candida albicans*. *Clin. Microbiol. Rev.* 5: 183-203.
- Stenderup A., H. Schoenheyder. 1984. Mycoses complicating AIDS. *Microbiological Sciences*. 1:219-223.
- Sullivan D. A., N. J. Mc Hugh, L. Roman, and M. G. Shepherd. 1984. The secretion of N-acetylglucosaminidase during germ-tube formation in *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* 130:2213-2218.
- Surarit R., P. K. Gopal, and M. G. Shepherd. 1988. Evidence for a glycosidic linkage between chitin and glucan in the cell wall of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* 134:1723-1730.
- Uramoto M., K. Kobinata, K. Isono, T. Higashijima, T. Miyazawa, E. E. Jenkins, and J. A. McCloskey. 1980. Structures of the neopolioxins A, B, and C. *Tetrahedron Lett.* 21:3395-3398.
- Wang Y. and A. Casadevall. 1994. Growth of *Cryptococcus neoformans* in presence of L-Dopa decreases its susceptibility to Amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 2648-2650.
- Woods R. A., M. Bard, I. E. Jackson, and D. J. Drutz. 1979. Resistance to polyene antibiotics and correlated sterol changes in two isolates of *Candida tropicalis* from a patient with an amphotericin B-resistant funguria. *J. Infect. Dis.* 129:53-59.

Yadan J.C., M. Gonnev, P. Sarthov, and F.L. Goffic. 1984. Sensitivity to nikkomycin Z in *Candida albicans*: Role of peptide permeases. *J. Bacteriol.* **160**: 884-888.



