



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD Y LA PRODUCCIÓN ANIMAL

“Evaluación del efecto del propóleo en cultivos celulares infectados con *Malassezia pachydermatis*”

T E S I S

Que para optar por el grado de
Maestra en Ciencias de la Salud y la Producción Animal

P R E S E N T A

Iris del Socorro Flores Rodríguez

T U T O R:

Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM

C O M I T É T U T O R A L

Ma. De Lourdes Juárez Mosqueda-FMVZ UNAM
Carlos Gerardo García Tovar-FES-Cuautitlán-UNAM

Cuautitlán Izcallí, Estado de México, Mayo

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

FINANCIAMIENTO

Esta tesis ha sido realizada dentro del programa de becas del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con el apoyo número 713123 para su desarrollo.

La investigación ha contado también con la financiación de los proyectos:

PAPIIT 200915 “*Desarrollo de productos con propóleo para su uso en la pasteurelosis del conejo, el distemper canino y la otitis canina*”,

PIAPI 1602 “*Morfología Veterinaria y Biología Celular*” y

PIAPI 1632 “*Desarrollo de productos sintéticos y prototipos farmacéuticos a base de propóleo para su aplicación en la salud animal*”.

PUBLICACIÓN:

La principal publicación relacionada con esta tesis de maestría ha sido hasta el momento:

Evaluation of changes in actin filaments of RK13 cells infected with *Malassezia pachydermatis*

Flores I., Cruz, T.A., Nieto, J.L., González, F.R., Soto, C.I. and García, C.G. (2018). Open Journal of Veterinary Medicine, 8: 15-24.

LUGARES DE REALIZACIÓN:

Taller de miel y apiario de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 4, bajo la responsabilidad del M. en A. Liborio Carrillo Miranda.

Laboratorio 4 de Morfología Veterinaria y Biología Celular de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, Campo 4, a cargo del Dr. Carlos Gerardo García Tovar.

Laboratorio 6 de Microbiología Veterinaria de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 4, bajo la responsabilidad del Dr. Tonatiuh A. Cruz Sánchez.

Laboratorio 121 de Química Orgánica, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 1, bajo la responsabilidad del Dr. José Guillermo Penieres Carrillo.

Laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos, de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala a cargo de la Dra. María Margarita Canales Martínez.

Presentación de resultados de este trabajo:

Los resultados de esta investigación fueron presentados en los siguientes foros académicos:

Reunión Internacional de Ciencias Veterinarias, en la FMVZ-UNAM los días 1, 2 y 3 de junio del 2016.

IX Congreso del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Salud y la Producción Animal, en la FMVZ-UNAM los días 20 y 21 de junio de 2016

XII Congreso de Apicultores y 6° Congreso Cubano de Apicultura, del 18 al 22 de julio del 2016, en la Habana, Cuba.

XXV Congreso de Ciencias Veterinarias (PANVET) efectuado en la ciudad de Panamá del 3 al 7 de octubre del 2016.

IX Congreso Nacional de Micología Médica “Dr. Amado González Mendoza y Dr. José de Jesús Mayorga Loera”, en la ciudad de Guadalajara los días 19, 20 y 21 de octubre del 2017.

Congreso de Biología Molecular de Hongos, en la ciudad de Querétaro, los días 22 al 26 de octubre del 2017.

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Tonatiuh A. Cruz Sánchez, mi tutor y guía para la realización de este proyecto, por brindarme la confianza y oportunidad de trabajar con él, por su siempre enorme paciencia y accesibilidad en todo momento. Por siempre alentar a los estudiantes a prepararnos. Por su asesoramiento, y por haber puesto a mi disposición los recursos materiales necesarios para la realización de esta tesis.

Un agradecimiento muy especial al Dr. Carlos Gerardo García Tovar, por su enorme colaboración e interés en este proyecto, sus consejos, su insistencia, entusiasmo y guía que han sido vitales para la conclusión de este trabajo.

Al M en C Francisco Rodolfo González Díaz y al MVZ José Luis Nieto Bordes por su asesoría técnica durante la realización de la fase experimental del trabajo, por mostrarse siempre atentos y amables.

A la Doctora Lourdes Juárez Mosqueda por todas sus atenciones durante el desarrollo de la investigación. Siempre es de agradecer su asistencia a los seminarios.

También es mi deseo agradecer a los sinodales: Dr. Francisca Hernández Hernández y José Guillermo Penieres Carrillo por sus valiosas aportaciones y correcciones a este trabajo.

RESUMEN

El citoesqueleto es uno de los objetivos más importantes para los microorganismos durante la adherencia e invasión de las células hospederas. Se ha demostrado que bacterias y hongos alteran el citoesqueleto de actina en células no fagocíticas para promover su internalización, la motilidad y supervivencia intracelular. *Malassezia pachydermatis* es considerado uno de los principales agentes involucrados en la otitis canina, un padecimiento de difícil tratamiento dada la alta tasa de recidiva, por lo que se están probando nuevas alternativas terapéuticas para su manejo. Una de ellas es el propóleo, una sustancia resinosa producida por abejas con amplia evidencia terapéutica. Poco se conoce acerca de los mecanismos de patogenicidad de esta levadura sobre los tejidos que afecta. Por lo anterior en esta investigación se establece un modelo de infección *in vitro* de células RK13, Vero y HeLa, evaluando en estas los cambios morfológicos y de los filamentos de actina frente a la exposición a *Malassezia pachydermatis* en diferentes tiempos, en presencia de propóleo. Se dividieron los cultivos celulares en 4 grupos: un control con células sin infectar, un grupo de células cultivadas con CDS, un grupo de células infectadas con *M. pachydermatis* y un grupo de células infectadas tratadas con propóleo. Los cultivos fueron valorados con microscopio óptico invertido y posteriormente con microscopía de fluorescencia y microscopía confocal para la evaluación de los filamentos de actina. Se observó en los cultivos bajo microscopio invertido la adhesividad de las levaduras a las células y daños a la monocapa celular tales como células redondeadas y lisis celular. En la microscopía de fluorescencia se reveló que la infección por *M. pachydermatis* induce cambios en el citoesqueleto de actina: en los sitios de adhesión de las levaduras se formaron agrupaciones celulares de forma circular con aparente sobrecrecimiento, células agrandadas y redondeadas con pérdida de las fibras de estrés y engrosamiento de la corteza celular.

Mediante microscopía confocal se analizaron cultivos infectados en donde se observó la formación de sincitios y pequeñas estructuras circulares de actina que corresponden a los sitios en los que se adhieren las levaduras, además de observarse que cada núcleo está rodeado por anillos de actina. En conclusión, la presencia de *Malassezia pachydermatis* en las células causa alteraciones en la morfología celular, acompañadas de modificaciones en los filamentos de actina como un posible mecanismo de patogenicidad.

Palabras claves: *Malassezia pachydermatis*, Citoesqueleto, Actina, Propóleo, Cultivos Celulares.

ABSTRACT

The cytoskeleton constitutes one of the most important structures usually targeted by microorganisms during host cell adherence and invasion. It has been demonstrated that both, bacteria and fungi, alter the cell's actin cytoskeleton of non-phagocytic cells in order to promote their internalization, motility and intracellular survival. *Malassezia pachydermatis* is considered one of the main etiological agents in canine external otitis, a hard-to-treat condition due to its high rate of recurrence, and for which new alternative therapeutic approaches for its management are being tested. Propolis, a resinous substance produced by bees and whose therapeutic properties have been extensively documented, is one of such alternatives. Little is known about the pathogenic mechanisms that *M. pachydermatis* exerts on affected tissues. It is for these reasons that the present study established an *in vitro* infection model using RK13 cells, Vero cells and HeLa cells, in order to evaluate the morphological and actin filament changes that occurred when the cells were exposed to *M. pachydermatis* at different times and when propolis was present in the culture. Cellular cultures were divided in 4 groups: a control group with non-infected cells, a second group of cells cultured in SDB, a third group of cells infected with *M. pachydermatis* and, finally, a fourth group of infected cells that were treated with propolis. All cultures were first examined by inverted microscopy and then by fluorescence microscopy and confocal microscopy in order to make an evaluation of the actin filaments. When the cultures were examined by inverted microscopy, the yeast cell-adherence capacity was observed, as well as de damages exerted on the cell monolayer: rounded cells, cellular lysis. When examined by fluorescence microscopy, we were able to observe that cell infection by *M. pachydermatis* induces several changes on the actin cytoskeleton: on the sites of yeast adhesion to the cell, circular cellular aggregations were formed, which presented evident overgrowth, the cells were also bigger and rounded and presented loss of stress fibers and cellular cortex thickening. When examined by confocal microscopy, the infected culture presented syncytium formation and small circular actin structures corresponding to yeast adhesion sites; it was also observed that each nucleus was surrounded by actin rings. In conclusion, cell infection by *M. pachydermatis* causes alterations in cellular morphology and is also accompanied by modifications of the actin filaments as a possible pathogenic mechanism.

Key words: *Malassezia pachydermatis*, Cytoskeleton, Actin, Propolis, Cellular Cultures

ÍNDICE DE CONTENIDO

PÁG

RESUMEN	V
ABSTRACT	VI
LISTA DE TABLAS	4
LISTA DE FIGURAS	4
ABREVIATURAS	5
INTRODUCCIÓN	6
1. GENERALIDADES DE <i>Malassezia</i>	7
1.1 Taxonomía	8
1.2 <i>Malassezia pachydermatis</i>	9
1.3 Características morfológicas	9
1.4 Características fisiológicas y bioquímicas	10
1.5 Epidemiología de la otitis por <i>M. pachydermatis</i>	10
1.6 Consideraciones anatómicas del oído canino	11
1.7 Etiopatogenia de la otitis por <i>M. pachydermatis</i>	12
2. CITOESQUELETO	14
2.1 Estructuras de orden superior	15
2.1.1 Lamelipodios	15
2.1.2 Filopodios	15
2.1.3 Fibras de estrés	16
2.1.4 Corteza celular.....	16
2.2 El citoesqueleto en procesos infecciosos	16
3. PROPÓLEO	17
3.1 Generalidades del propóleo.....	17
3.2 Composición química	17
3.3 Actividad biológica.....	17
3.3.1 Efecto antifúngico	18
3.4 Métodos de extracción	18
3.5 Control de calidad	19

3.6 Análisis químico del propóleo	19
3.7 Cromatografía de gases.....	19
3.8 Espectrometría de masas.....	20
3.8.1 Obtención y análisis de un espectrograma de masas.....	20
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
HIPÓTESIS.....	23
OBJETIVOS	23
Objetivo general.....	23
Objetivos particulares	23
DISEÑO EXPERIMENTAL	24
MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
Origen y obtención de los propóleos empleados	25
Acondicionamiento de las muestras de propóleo.....	25
Preparación de los extractos etanólicos de propóleo (EEP).....	25
Rendimiento de los extractos de propóleo	25
Perfil químico de los propóleos	26
Compuestos fenólicos	26
Cuantificación de flavonoides.....	26
Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)	26
Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos etanólicos de propóleo (EEP)	26
Microorganismos.....	26
Cultivo de <i>M. pachydermatis</i> y condiciones de crecimiento	26
Prueba cualitativa de sensibilidad.....	26
Preparación de los stocks de propóleo	26
Preparación de los discos	27
Preparación del inóculo.....	27
Realización de la prueba de inhibición radial.....	27
Pruebas cuantitativas de sensibilidad.....	27
Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	27
Determinación de la Concentración Mínima Fungicida (CMF)	27

Cultivo de células RK13	28
Infección de la línea celular RK13 con <i>M. pachydermatis</i>	28
Evaluación de la capacidad de adherencia y daño a la monocapa celular	28
Evaluación de los cambios a los filamentos de actina	28
Ensayo de citotoxicidad <i>in vitro</i> del propóleo	29
Microscopía de fluorescencia	29
RESULTADOS	30
Origen y obtención de los propóleos	30
Obtención de los extractos etanólicos de propóleo	31
Rendimiento de los extractos de propóleo	31
Perfil químico de los propóleos	32
Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).....	32
Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos etanólicos de propóleo	35
Prueba cualitativa de sensibilidad	35
Infección de cultivos de células RK 13 con <i>M. pachydermatis</i>	37
Infección de cultivos de células HeLa y Vero con <i>M. pachydermatis</i>	44
Efecto del propóleo sobre los cultivos de células RK13, HeLa y Vero.....	47
DISCUSIÓN	49
PROSPECTIVAS	56
LITERATURA CITADA.....	57
ANEXOS.....	62

LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Clasificación taxonómica de <i>M. pachydermatis</i>	7
Tabla 2	Conformación anatómica del oído del canino	10
Tabla 3	Proteínas de unión a actina y sus funciones	14
Tabla 4	Diluciones seriadas de propóleo	28
Tabla 5	Rendimiento de los extractos de propóleo obtenidos durante las dos cosechas de 2015	30
Tabla 6	Constituyentes del EEP de la cosecha de agosto del 2015	31
Tabla 7	Constituyentes del EEP de la cosecha de noviembre del 2015	33
Tabla 8	Efecto de 5 concentraciones del EEP cosechado en dos fechas diferentes sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>M. pachydermatis</i>	34

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	<i>Malassezia pachydermatis</i>	9
Figura 2	Anatomía del meato acústico externo	11
Figura 3	Oídos de caninos infectados con <i>M. pachydermatis</i>	12
Figura 4	Propóleo proveniente de la misma región en FES- Cuautitlán en dos diferentes cosechas	29
Figura 5	Dos diferentes tonalidades dadas por el EEP de las dos cosechas de 2015	30
Figura 6	Efecto de diferentes concentraciones de propóleo, utilizando el método de difusión en agar	35
Figura 7	Concentración Mínima Fungicida	36
Figura 8	Células RK13 infectadas con <i>M. pachydermatis</i>	37
Figura 9	Cultivos de células RK13 infectadas con <i>M. pachydermatis</i> a diferentes tiempos de infección. Microscopía óptica.	38
Figura 10	Cultivo de células RK13 infectadas con <i>M. pachydermatis</i> a diferentes tiempos de incubación. Microscopía de fluorescencia	39
Figura 11	Células RK13 infectadas con <i>M. pachydermatis</i> con presencia de sincitios y anillos perinucleares en levaduras	40
Figura 12	Sobrecrecimiento de células RK13 infectadas con <i>M. pachydermatis</i>	41
Figura 13	Cortes ópticos de la región de sobrecrecimiento de células RK13 infectadas con <i>M. pachydermatis</i> .	42
Figura 14	Cultivos de células HeLa y células Vero infectadas con <i>M. pachydermatis</i>	43
Figura 15	Cambios en los filamentos de actina en cultivos de células Vero y células HeLa infectadas con <i>M. pachydermatis</i>	44
Figura 16	Células Hela infectadas con <i>M. pachydermatis</i>	45
Figura 17	Células Vero infectadas con <i>M. pachydermatis</i>	46

ABREVIATURAS

ABP	Proteínas de Unión a Actina
ADS	Agar Dextrosa Sabouraud
ATCC	American Type Culture Collection (Colección Americana de Cultivos Tipo)
BSA	Albúmina Bovina Sérica
CDS	Caldo Dextrosa Sabouraud
CMF	Concentración Mínima Fungicida
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol
DMEM	Medio Eagle Modificado de Dulbecco
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
MAE	Meato acústico externo
<i>m/z</i>	Masa-carga
PBS	Buffer Fosfato Salino
TR	Tiempo de retención
TRITC	Isotiocianato de tetrametilrodamina
UV-VIS	Ultravioleta visible

INTRODUCCIÓN

El propóleo es un producto con una documentada efectividad contra virus, bacterias y hongos. Es un material similar a la resina que las abejas aprovechan y recolectan de los árboles y lo utilizan en la colmena, ocasionalmente mezclado con cera, para reforzar la estabilidad estructural, disminuir vibraciones y bloqueo de entradas alternativas donde podría ingresar fauna que afecte a la colmena.

Uno de los padecimientos más importantes en pequeñas especies es la otitis por *Malassezia pachydermatis*, que es una levadura del phylum *Basidiomycota*, que forma parte de la microbiota de la piel, particularmente en áreas ricas en glándula sebáceas. Es una afección de difícil tratamiento. La otitis canina debe manejarse en forma tópica y sistémica. El tratamiento incluye limpieza del canal auditivo, con soluciones comerciales que eliminan el exceso de detritus celular. Hasta el momento existe un reporte de la eficacia clínica del propóleo en perros con otitis aguda y subaguda, frente a diferentes agentes causales, incluyendo a *M. pachydermatis* (Lozina, 2004).

Poco se conoce acerca de los mecanismos de patogenicidad de esta levadura sobre los tejidos que afecta. Se ha estudiado en diversos patógenos, entre ellos otras levaduras como *Malassezia furfur*, *Candida albicans* y *C. glabrata* en donde se han observado cambios en la organización de los filamentos de actina que participan durante la difusión de estos patógenos dentro de los órganos afectados (Baroni, 2001; Schindler, 2008; Muñoz, 2016; Ortega 2016).

En este trabajo se pretende establecer un modelo de infección *in vitro* y conocer el efecto de *M. pachydermatis* sobre los filamentos de actina en células RK13 y evaluar el efecto del propóleo usado sobre esta levadura.

1. GENERALIDADES DE *MALASSEZIA*

Las levaduras del género *Malassezia* comprenden 17 especies, la mayoría de ellas lipofílicas; algunas producen pitiriasis versicolor y están asociadas a otros padecimientos como dermatitis seborreica, otitis externa (en algunos animales), dermatitis atópica, psoriasis y fungemias (Wang *et al.*, 2014; Lorch *et al.*, 2018).

Guillot y Guého (1995) reclasificaron el género con base en sus características micromorfológicas y ultraestructurales, secuencia de RNA y DNA nuclear y ribosómico, además de pruebas bioquímicas y fisiológicas de degradación de ácidos grasos por sustancias tensoactivas tipo *tween*.

Las especies de *Malassezia* se reproducen de forma asexual por blastoconidios de diversas formas: globosos o esféricos, ovales y cilíndricos. Producen gemaciones enteroblásticas y monopolares (Bonifaz, 2015).

Las levaduras del género *Malassezia* forman parte de la microbiota cutánea normal de mamíferos y pueden causar fungemias que ponen en peligro la vida, así como otras infecciones nosocomiales en los seres humanos inmunodeprimidos, especialmente en los recién nacidos prematuros y aquellos pacientes expuestos a catéteres intravenosos (Salah, 2005; Giusiano, 2006). Mientras que la enfermedad en los seres humanos es más comúnmente causada por *Malassezia furfur*, un comensal de la piel humana también ha dado lugar a partir de *M. pachydermatis*, para el que los perros son un hospedero natural. En algunos casos, las fuentes de infecciones humanas han sido relacionados con mascotas que son propiedad de trabajadores de la salud (Chang, 1998).

La mayoría de las 17 especies reconocidas son lipodependientes, con excepción de *M. pachydermatis*, que afecta a diversos animales, en especial el meato acústico externo de los perros.

1.1 Taxonomía (Tabla 1)

El género *Malassezia* ha sido colocado en el phylum *Basidiomycota*, orden Malasseziales debido a las siguientes características:

- a) Poseen ureasas (urea positiva).
- b) Cuentan con pared celular multiestratificada.
- c) Cuentan con invaginaciones en la membrana celular.
- d) Dependen de lípidos (excepto *M. pachydermatis*).
- e) Requieren de temperatura mínima de 30°C.
- f) No se ha descrito fase sexual ni fermentan azúcares.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *M. pachydermatis*.

Reino	Fungi
Phylum	Basidiomycota
Subphylum	Ustilaginomycotina
Clase	Exobasidiomycetes
Orden	Malasseziales

Género	<i>Malassezia</i>
Especies	<i>furfur</i> <i>globosa</i> <i>obtusa</i> <i>pachydermatis</i> <i>slooffiae</i> <i>sympodialis</i> <i>restricta</i> <i>dermatis</i> <i>japonica</i> <i>yamatoensis</i> <i>caprae</i> <i>equina</i> <i>nana</i> <i>cuniculi</i> <i>arunalokei</i> <i>brasiliensis</i> <i>vespertilionis</i>

1.2 *Malassezia pachydermatis*

Esta especie fue descrita por primera vez por Weidman en 1925, quien observó numerosas levaduras con forma de botella de boliche (Fig. 1A) en las escamas de la piel de rinocerontes (*Rhinoceros unicornis*) con una dermatitis exfoliativa generalizada. Fue descrita como *Pityrosporum pachydermatis* y transferida al género *Malassezia* por Dodge en 1935 (Weidman, 1925).

1.3 Características morfológicas

Después del crecimiento en 32 a 37°C por 7 días en medio ADS (Fig. 1B), las colonias individuales son convexas, con un diámetro de 4-5 mm, de color amarillo pálido-crema, poco brillante, algunas con borde liso u ondulado (Bond, 1995; Guého, 1995).

Las levaduras son elipsoidales a cilíndricas, de 4-5 x 2-2.5 µm, presentan una pared celular gruesa (Fig. 1C).

La reproducción es asexual. La formación de blastoconidios se origina mediante un proceso de gemación monopolar enteroblástica. La gema formada se separa de la célula parental por medio de la formación de un septo seguido por una fisión. La separación generalmente deja una cicatriz pronunciada en la célula parental, que tras sucesivas gemaciones da lugar a un collarote de donde han emergido las anteriores gemas (Ahearn, 1998) adoptando así su forma de cacahuete, huella de zapato o Matrioshka (Fig. 1D). Los filamentos nunca se observan en esta especie (Boekhout, 2010).

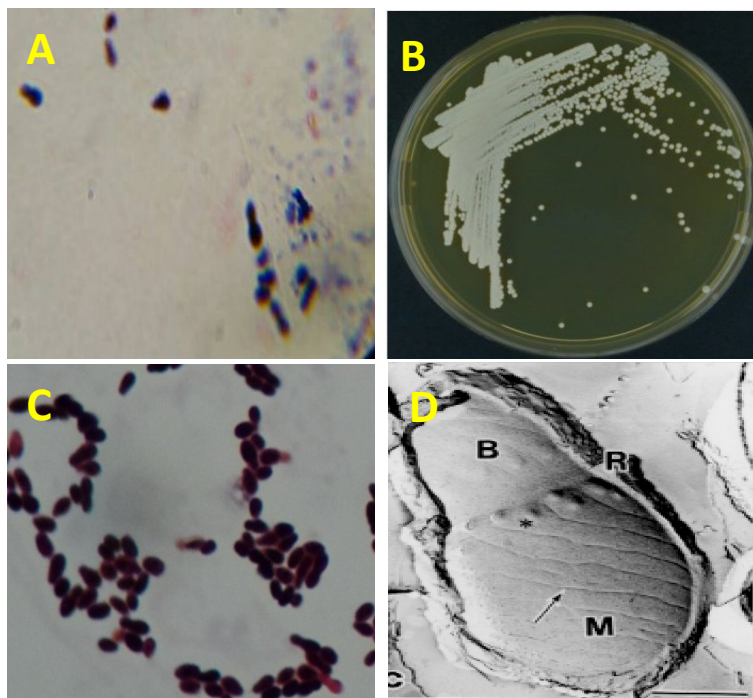


Figura 1. *Malassezia pachydermatis*.
 A: Frotis teñido con Gram de paciente canino;
 B: Colonias crecidas en medio ADS;
 C: Células ovoides teñidas con Gram a partir del cultivo purificado;
 D: Microscopía electrónica de *M. pachydermatis* (Tomada de Nakagaki *et al*, 2000).

1.4 Características fisiológicas y bioquímicas

M. pachydermatis difiere de las cepas lipodependientes por el hecho de que la suplementación con lípidos no es un requerimiento necesario para su desarrollo, por lo tanto, puede ser aislada con relativa facilidad en medio ADS. Sin embargo, la adición al medio de alguna fuente de lípidos como Tween 80, aceite de germen de maíz o aceite de oliva, pueden incrementar su crecimiento.

1.5 Epidemiología de la otitis por *M. pachydermatis*

Reportes hasta el año 2003 informaban sobre una incidencia de infecciones por *M. pachydermatis* del 10 al 20% en la población canina, siendo menor la frecuencia en gatos, en los que esta levadura afecta del 2 al 6% de la población (Pereira, 2003).

M. pachydermatis es el agente responsable de cerca del 30-80% de los casos de otitis externa y está asociada con el 30% de los casos de dermatitis seborreica o atópica en perros (Kumar, 2002;

Nowakiewics, 2013). En humanos, ésta puede causar fungemias, especialmente en recién nacidos en unidades de terapia intensiva (Al-Sweih, 2014).

1.6 Consideraciones anatómicas del oído canino

El oído es un órgano que cubre 2 funciones primordiales: la percepción del sonido y ayuda en el mantenimiento de la posición corporal del animal mediante el equilibrio.

El entendimiento de la anatomía y fisiología de este órgano es esencial cuando se trata la otitis. Se compone de tres regiones anatómicas diferentes, pero estrechamente relacionadas (Tabla 2).

Tabla 2. Conformación anatómica del oído del canino.

Región	Constituyentes	Función
Oído externo	Oreja y meato acústico externo.	Recepción de sonidos.
Oído medio	Cavidad timpánica, membrana timpánica, huesecillos del oído (martillo, yunque y estribo) y tuba auditiva.	Transforma ondas sonoras en vibraciones mecánicas.
Oído interno	Laberinto óseo (vestíbulo, canales semicirculares y cóclea) y laberinto membranoso (utrículo y sáculo, conductos semicirculares y conducto coclear).	Transforma vibraciones mecánicas en impulsos eléctricos que son reconocidos por el centro de audición del cerebro.

La oreja y el meato acústico externo (MAE) están conformados por el cartílago auricular, que comienza en el orificio externo del oído y se enrolla en forma de embudo, se continua con el cartílago anular transformándose en un túnel a medida que alcanza las porciones inferiores del MAE. Éste tiene una longitud variable (5-10 cm) y se divide en las porciones vertical y horizontal, y continúa hasta alcanzar la membrana timpánica, formando una “L”, lo que complica la eliminación natural de sustancias anormales del MAE. El lumen tiene un diámetro de 0.5 – 1 cm (Fig. 2).

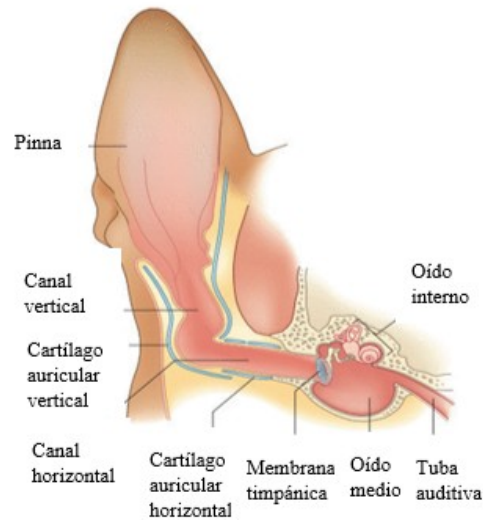


Figura 2. Anatomía del meato acústico externo. (Patel, 2008).

1.7 Etiopatogenia de la otitis por *M. pachydermatis*

Durante la otitis, el MAE se torna altamente propenso a la multiplicación de los agentes patógenos, observándose un estrechamiento en su luz y una disminución de la migración epitelial fisiológica. Por otra parte, la inflamación favorece la formación de un edema que provoca un exudado. Además, las glándulas ceruminosas incrementan su actividad y adoptan un aspecto quístico. Esto promueve una disminución de la fracción lipídica del cerumen por dilución en las secreciones apocrinas. Todos estos acontecimientos son responsables de un aumento de la humedad en el conducto y una disminución bacteriostática del cerumen. Con este factor, todos los agentes patógenos (bacterias, levaduras y parásitos) pueden dañar a los queratinocitos del MAE y favorecer la acumulación de restos en el lumen (Fig. 3).



Figura 3. Oídos de caninos infectados con *M. pachydermatis*.

A, B, C y D: Caninos con secreción, inflamación, descamación, y dolor en el meato acústico externo de donde se aisló *M. pachydermatis*. El paciente D presentó un hematoma auricular en ambos oídos debido a la comezón. A la citología se observó *Malassezia* y cocos Gram positivos (Flores, 2016).

Las enzimas producidas por la levadura pueden permitir despolimerización de la matriz intersticial (por ejemplo, hialuronidasa, la condroitina - sulfatasa) y de la membrana celular (por ejemplo, proteinasa, fosfolipasa), el aumento de la invasión tisular y la penetración (Radlinsky, 2005).

2. CITOESQUELETO

El citoesqueleto es una malla fina de filamentos proteicos que le dan forma, resistencia y movimiento a las células, permitiéndoles interactuar con su medio, cambiar de forma y moverse. Está conformado por 3 diferentes componentes: los filamentos intermedios, microtúbulos y los filamentos de actina (Alberts, 2015).

Los filamentos de actina forman una extensa red, cuyo principio básico es la polimerización-despolimerización. La actina es una proteína globular (actina G) de 375 aminoácidos que da origen a estructuras formadas por dos protofilamentos enrollados en forma helicoidal (Actina F), mediante la unión de ATP a los monómeros de actina G que los activa para polimerizar. El ensamblaje espontáneo de monómeros de actina pura no es favorable, ya que la formación de dímeros es inestable y solo se estabilizan hasta que se forman oligómeros que, dependiendo de la concentración crítica de monómeros activos, el filamento crece rápidamente. Una vez que se forma el filamento el ATP se hidroliza a ADP y esto ocasiona la inestabilidad del filamento y los monómeros tienden a separarse (despolimerización). Una vez libres, los monómeros intercambian ADP por ATP y están listos para un nuevo ciclo de polimerización. (Alberts, 2015; Pollard 2003).

Existen proteínas (Tabla 3) que se unen a actina y que regulan su dinámica y estabilidad, lo que afecta de manera directa la formación de estructuras derivadas de la polimerización de actina en los sitios y el momento requerido por la célula, en respuesta a las señales que recibe. En general se clasifican como aquellas que se unen a monómeros de actina, de unión colateral, unión a los extremos, fragmentadoras de filamentos, entrecruzadoras, asociadas a membrana y motoras. (Pollard & Earnshaw, 2008; Alberts *et al*, 2015).

Los filamentos de actina forman arreglos de estructuras de orden superior que influyen en las propiedades mecánicas y de señalización celular. Los filamentos de actina se organizan como redes entrecruzadas, semejantes a mallas, redes ramificadas (similares a arborizaciones), haces paralelos (en donde los filamentos de actina se ordenan en forma paralela) y haces contráctiles, que al contrario de los anteriores, los filamentos se ordenan en forma antiparalela e interactúan con proteínas motoras como las miosinas. A partir de estas estructuras se forman componentes celulares como son los lamelipodios, filopodios, fibras de estrés y corteza celular (Alberts 2015).

2.1 Estructuras de orden superior

2.1.1 Lamelipodios

El lamelipodio puede definirse como una extensión aplanada de la membrana plasmática constituida principalmente por una gran cantidad de filamentos de actina. Al observar una célula en migración, se puede observar con detalle la conformación del lamelipodio, el cual está integrado por diferentes regiones: en el borde frontal (borde líder) se forma una banda delgada con extensiones cilíndricas (filopodios); detrás de esta región, está una zona de mayor espesor denominada lámina. Los lamelipodios tienen ciclos de formación y retracción (Pollard 2003; Small, 2008).

2.1.2 Filopodios

Son protrusiones filamentosas altamente dinámicas, compuestas de filamentos de actina y alineadas de manera paralela relacionadas con citosensibilidad, motilidad o formando citonemas que actúan como conductos entre dos células (Scott 2002; Passey, 2004; Sherer, 2008; Heckman 2013).

Tabla 3. Proteínas de unión a actina y sus funciones.

Nombre	Funciones
Timosina	Proteína encargada de secuestrar monómeros de actina e impedir su polimerización (Kuzan 2016).
Formina	Permite la polimerización progresiva de los filamentos, proteínas capping que desplazan a las forminas y bloquean la polimerización en el extremo +.
Cofilina	Se une a actina-ADP y corta los filamentos favoreciendo su despolimerización (Shekhar, 2016).
Profilina	Activa a los monómeros de actina para su polimerización (Carlier, (2013).
Alfa-actinina	Une filamentos de actina antiparalelos y permite la unión de miosina para la formación de fibras contráctiles (Naumanen, 2008).
Filamina:	Encargada de formar redes en forma de malla y geles ortogonales tridimensionales de actina (García, 2006).
Fimbrina (plastina):	Entrecruza filamentos de actina en haces paralelos estrechos (Delanote, 2005).
ARP2/3:	Es un complejo de proteínas encargado de formar núcleos para la polimerización de actina uniéndose a filamentos de actina y permitiendo la formación de redes ramificadas (Pollard 2003, Helgeson 2014).

2.1.3 Fibras de estrés

Son estructuras contráctiles de acto-miosina encontradas en muchos tipos de células no-musculares. Forman cables intracelulares con diferentes disposiciones (fibras de estrés dorsales y ventrales, arcos transversos y cubiertas perinucleares), importantes en el anclaje celular, motilidad, soporte y en la mecanotransducción, tienden a ser gruesas y relativamente estables en células no motiles (Naumanen 2008; Tojkander 2012; Galkin 2012).

2.1.4 Corteza celular

Forma una red polimérica de actina bajo la membrana plasmática de la célula animal, la cual es importante para dar soporte a la membrana, mantener y dar la forma a la célula, tiene gran plasticidad (propiedades viscoelásticas), lo que permite cambiar la forma celular, moverse y ejercer fuerza, además de formar dominios de membrana y participar en vías de señalización (Salbreux 2012; Roubinet 2012).

La formación de las estructuras de orden superior y componentes celulares es a partir de señales extra e intracelulares, que activan principalmente a la familia RHO de GTPasas monoméricas, por ejemplo, Cdc42 activa la formación de filopodios, Rac induce la formación de lamelipodios y Rho la de fibras de estrés. La vía de WASP induce la activación de Arp2/3 y la formación de redes ramificadas que polimerizan al actuar en conjunto con proteínas como profilina, cofilina y Cap, dando origen a la nucleación de actina y su polimerización en un arreglo de treadmilling dendrítico (un extremo se polimeriza, mientras el otro despolimeriza) (Alberts, 2015; Pollard, 2003).

2.2 El citoesqueleto en procesos infecciosos

Se ha observado que muchos patógenos, a través de su evolución, adquirieron mecanismos moleculares para manipular al citoesqueleto de actina de su hospedero para su beneficio. Derivado de esto, en las últimas tres décadas ha resurgido un gran interés en estudiar los mecanismos celulares y moleculares en la patogenicidad microbiana (Vallance y Finlay, 2000). Así, patógenos como *Listeria monocytogenes* aprovechan la fuerza de propulsión de polimerización de actina para moverse dentro de la célula y salir para alcanzar otra célula vecina e invadirla (Gouin *et al.*, 2005); *E. coli* enteropatógena coloniza la superficie de los enterocitos sobre pedestales, que son protrusiones de membrana ocasionados por la polimerización de actina estimulada por la propia bacteria (Oliver *et al.*, 2008).

En lo que respecta a las levaduras, recientemente se han estudiado las modificaciones en los filamentos de actina durante la infección con *Candida albicans*, donde se encontró que esta levadura provoca rearrreglos en los filamentos de actina formando agregados de actina en los sitios de contacto con las levaduras, desaparición de las fibras de estrés, cúmulos de actina alrededor del tubo germinativo en células que están siendo invadidas por *C. albicans* (Ortega, 2016).

3. PROPÓLEO

3.1 Generalidades del propóleo

Numerosas investigaciones buscan en las terapias naturales, como las basadas en el uso del propóleo, una alternativa a los tratamientos alópatas. Este tipo de terapias han demostrado ser incluso más efectivas que los métodos alópatas y por lo tanto deberían considerarse por los profesionales en el tratamiento de las patologías sobre las cuales se tiene evidencia científica que avala sus beneficios (Fierro, 2000).

Esta sustancia es una resina de origen céreo, de composición compleja y consistencia viscosa, que las abejas elaboran a partir de partículas resinosas de diferentes vegetales y que utilizan en la construcción, reparación y protección de la colmena.

Las características morfológicas y la composición química del propóleo son heterogéneas y varían según la región donde se localiza la colmena, las variedades vegetales que predominan alrededor de la colmena (aproximadamente en un radio de 2 km) y las condiciones ambientales, por ello, su color puede variar del pardo rojizo al amarillo verdoso y oscurecerse al negro, dependiendo también de la edad (Burdock, 1998; Imhof *et al.*, 2005).

Desde el punto de vista productivo, se ha sugerido que no todas las abejas de la especie *Apis mellifera* propolizan con la misma intensidad. Una misma colmena producirá propóleos en diferentes cantidades en distintas épocas y aún puede haber diferencias en las cantidades producidas en cada año, pues las abejas trabajan según sus necesidades y posibilidades. Por otra parte, en una misma colmena la apariencia externa de los propóleos puede variar de una extracción a otra (Montenegro *et al.*, 1997).

3.2 Composición química

A través del empleo de métodos cromatográficos, espectroscópicos y espectrométricos se ha podido determinar la composición del propóleo; así se han podido aislar y caracterizar benzofenonas preniladas, flavonoides, isoflavonoides, polifenoles, ácidos fenólicos, di terpenos y tri terpenos (Sulaiman *et al.*, 2011), Shaheen *et al.*, 2011).

3.3 Actividad biológica

Este producto es ampliamente utilizado por sus variadas actividades biológicas, entre las cuales se pueden mencionar la antiinflamatoria, antiviral, antibacteriana, antifúngica, por mencionar algunas (Bankova, 2005).

En términos de actividad antioxidante y antimicrobiana, los principales constituyentes de los propóleos son compuestos fenólicos (Kumar *et al.*, 2007). Estos compuestos orgánicos se caracterizan por poseer en su estructura molecular al menos un grupo fenol (un anillo aromático unido al menos a un grupo funcional hidroxilo), además, algunos son clasificados como metabolitos secundarios de las plantas.

Los ácidos fenólicos y flavonoides tienen una variedad muy heterogénea de funciones en las plantas, muchos son productos de defensa ante herbívoros y patógenos, otros proveen soporte mecánico a la planta, otros atraen polinizadores o dispersores de frutos, o actúan como agentes alelopáticos (reducen el crecimiento de plantas competidoras que estén cerca), mientras que algunos de ellos absorben radiación electromagnética en la zona donde se localizan (Kroon y Williamson, 1999; Martínez-Florez *et al.*, 2002), representando una protección natural para las plantas contra la radiación UV del sol, lo cual explica el efecto protector de la oxidación de la piel por ciertos preparados a base de extractos de propóleos, además de la barrera química de defensa contra microorganismos (hongos, bacterias y virus) en las colmenas (Cushnie y Lamb, 2005).

3.3.1 Efecto antifúngico

Las propiedades antimicóticas del propóleo han sido estudiadas por numerosos investigadores, esta actividad depende del origen del propóleo y del solvente usado para su extracción (Cafarchia *et al.*, 1999; Flores *et al.*, 2016).

Se tienen reportes de la acción antimicótica de un propóleo sobre *M. pachydermatis*, donde éste a concentración de 0.30 mg/mL produce la inhibición del desarrollo de esta levadura, observándose también una mayor efectividad inhibitoria del extracto etanólico que del acuoso (Lozina, 2004).

Investigaciones hechas sobre la acción antibacteriana de sustancias individuales aisladas del propóleo, muestran que un solo componente no tiene mayor actividad que el total del extracto, sugiriendo sinergismo entre los constituyentes.

3.4 Métodos de extracción

Existen varios métodos de extracción de los propóleos usando diferentes solventes. La elección del solvente depende de la aplicación del extracto y de la viabilidad técnica. Los componentes activos parecen ser más solubles en propilenglicol y etanol. Muy pocos componentes son solubles en agua, pero incluso los extractos acuosos muestran algunos efectos bactericidas y fungicidas.

La elección del disolvente correcto es de vital importancia si el producto se va a utilizar para el consumo humano. Normalmente, solo el etanol o, excepcionalmente, el propilenglicol, se deben

utilizar. Otros alcoholes pueden ser utilizados solo si sus interacciones fisiológicas internas y externas son suficientemente conocidas y seguras.

3.5 Control de calidad

Al tener diferencias en color, olor y composición, se vuelve difícil establecer un control de calidad estandarizado (Bankova, 2005).

La mayoría de los propóleos frescos tiene un olor resinoso agradable. La cantidad de cera y la contaminación detectada visualmente debe ser tan baja como sea posible. El propóleo viejo se vuelve muy duro y quebradizo y puede ser también muy oscuro, llegando a decaer su actividad biológica. Sin embargo, el propóleo congelado o congelado recientemente también es muy frágil físicamente.

Existen normas oficiales de calidad de propóleos en varios países, pero la mayoría de las normas se refieren a la limpieza o la adulteración del producto bruto y, a veces, sus extractos. Los límites máximos y mínimos para determinados grupos químicos están definidos, pero pocas pruebas estandarizadas están disponibles para determinar las actividades biológicas de los diversos componentes.

Al caracterizar una muestra es necesaria la determinación del porcentaje de cera, partículas como polen y restos de abejas, compuestos fenólicos, índice de oxidación, contenido de flavonoides, índice de yodo, humedad, cantidad de resinas, porcentaje de cenizas, apariencia, estructura y consistencia (León, 2012). Sin embargo, el contenido de fenoles y flavonoides es un parámetro que establece tanto la calidad del material como su potencial biológico (Rodríguez, 2015).

3.6 Análisis químico del propóleo

Al estudiar sustancias con actividad biológica y/o farmacológica como el propóleo, es fundamental identificar los potenciales componentes que son responsables de la actividad evaluada (Quintero, 2011). Cabe señalar que la mayoría de los estudios no pretenden determinar la composición química completa, sino tan sólo de los elementos de interés, así como la cuantificación de estos (Bracho, 2003).

3.7 Cromatografía de gases

Actualmente, la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) es uno de los métodos más utilizados en el análisis de propóleos, ya que permite la adquisición del peso molecular e información estructural, junto con la identificación de compuestos (Bankova, 2005).

En la cromatografía de gases, la muestra se inyecta en la fase móvil, la cual es un gas inerte (generalmente He). En esta fase, los distintos componentes de la muestra pasan a través de la fase estacionaria que se encuentra fijada en una columna. La columna se encuentra dentro de un horno con programación de temperatura. La velocidad de migración de cada componente (y en consecuencia su tiempo de retención en la columna) será función de su distribución entre la fase

móvil y la fase estacionaria. Cada soluto presente en la muestra tiene una diferente afinidad hacia la fase estacionaria, lo que permite su separación: los componentes fuertemente retenidos por esta fase se moverán lentamente en la fase móvil, mientras que los débilmente retenidos lo harán rápidamente. Un factor clave en este equilibrio es la presión de vapor de los compuestos (en general, a mayor presión de vapor, menor tiempo de retención en la columna). Como consecuencia de esta diferencia de movilidad, los diversos componentes de la muestra se separan en bandas que pueden analizarse tanto cualitativa como cuantitativamente (López, 2001; Gutiérrez, 2002).

3.8 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una técnica que se fundamenta en la separación e identificación de partículas en una mezcla química, obteniendo la masa molecular y la abundancia de los componentes de dicha mezcla (Erra, 2004).

El proceso de la espectrometría de masas comprende básicamente cuatro etapas:

- Ionización de la muestra.
- Aceleración de los iones por un campo eléctrico.
- Dispersión de los iones según su masa/carga.
- Detección de los iones, producción de una señal eléctrica y generación del correspondiente espectro.

Con la espectrometría de masas se puede proporcionar información acerca de:

- La composición elemental de las muestras
- De la composición de las moléculas inorgánicas, orgánicas y biológicas.
- De la composición cualitativa de mezclas complejas.
- De la estructura y composición de sustancias químicas.
- Identificación de los compuestos por cromatografía en capa fina y papel.

3.8.1 Obtención y análisis de un espectrograma de masas

En un espectrómetro de masas, como consecuencia del bombardeo electrónico en la cámara de ionización, las moléculas se rompen en una serie de fragmentos; siempre que una misma molécula se exponga a las mismas condiciones, dará el mismo tipo y número de fragmentos, que constituirán el patrón.

El pico del espectrograma que aparece con valor más elevado de masa-carga (m/z) o ion molecular corresponde a la molécula ionizada sin fragmentar y recibe el nombre de masa patrón. Esta masa patrón permite determinar con rapidez y precisión la masa molecular, siempre que se opere con una tensión de ionización no excesivamente elevada, la cual produciría la fragmentación total de la molécula (Rouessac, 2003).

El pico mayor del espectrograma de masa se llama pico base. Normalmente la altura de este pico se toma como valor de porcentaje de 100. Las intensidades de los demás picos se expresan en porcentajes de la intensidad del pico base.

Cuando se trabaja con sistemas acoplados de cromatografía de gases a espectrometría de masas, éste último se utiliza como una huella química, comparando los espectros de masas obtenidos con los espectros de compuestos patrón almacenados en bibliotecas informáticas (Plascencia, 2010).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los estudios sobre los mecanismos de patogenicidad de *Malassezia pachydermatis* y su relación con la otitis externa y la dermatitis, son poco claros, diferente a lo que ocurre con investigaciones con otras especies de *Malassezia* en clínica humana.

Dentro de la actividad antifúngica, poco se conoce sobre el mecanismo de acción del propóleo sobre *M. pachydermatis*, siendo esta levadura el principal agente aislado en cultivos de pacientes caninos afectados por otitis externa; este patógeno se encuentra muy extendido en la población canina y es un riesgo latente para los pacientes con algunos factores desencadenantes.

Se ha observado que otras levaduras, como *Candida albicans*, producen cambios en la organización de los filamentos de actina en la célula afectada (Schindler, 2008; Ortega, 2016), por lo que se piensa que esto también sea provocado por *M. pachydermatis*.

No se tiene información sobre los mecanismos de patogenicidad de *M. pachydermatis*, durante la infección en cultivo celular, su adhesividad, formación de colonias, alteración del cultivo celular y de la morfología celular y los cambios en el citoesqueleto que podrían ocurrir, por lo que se espera que el presente estudio contribuya a esclarecer algunos de estos cambios bajo el estímulo del propóleo.

HIPÓTESIS

La infección por *Malassezia pachydermatis* podría ocasionar cambios en la morfología y estructura del citoesqueleto de las células infectadas en un cultivo celular y el efecto antimicótico del propóleo revertiría los cambios ocasionados por este patógeno.

OBJETIVOS

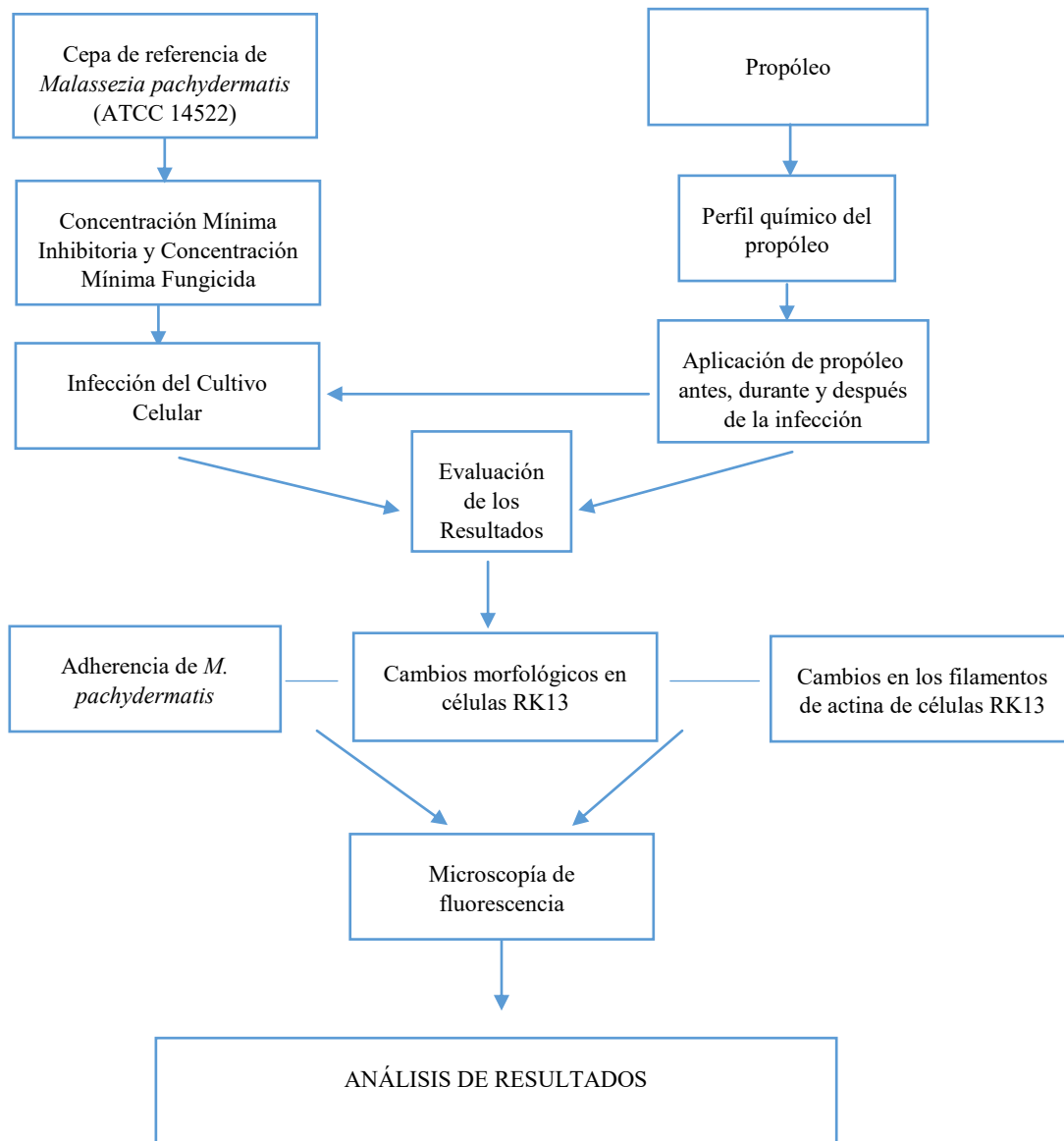
Objetivo general

Evaluar los cambios en los filamentos de actina en cultivos celulares ocasionados por la infección con *M. pachydermatis* y el efecto antimicótico del propóleo aplicado antes, durante y después de la infección.

Objetivos particulares

- Recolectar propóleo del apiario de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.
- Obtener el perfil químico del propóleo a evaluar.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria y Mínima Fungicida del extracto de propóleo sobre la cepa de referencia de *M. pachydermatis*.
- Establecer un modelo de infección *in vitro* de células RK13 con *M. pachydermatis*.
- Evaluar el efecto de *M. pachydermatis* sobre la morfología de las células RK13.
- Realizar la evaluación de los cambios ocasionados en los filamentos de actina de las células RK13 infectadas con *M. pachydermatis* mediante ensayos de fluorescencia directa a través de su análisis por microscopía de fluorescencia y confocal.
- Evaluar el efecto del propóleo sobre *M. pachydermatis* aplicado antes, durante y después de la infección de los cultivos celulares.

DISEÑO EXPERIMENTAL



MATERIAL Y MÉTODOS

Origen y obtención de los propóleos empleados

Se trabajó con propóleos procedentes del apiario de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de dos cosechas diferentes: junio y noviembre del 2015, por tener diferentes condiciones climáticas y de floración.

Acondicionamiento de las muestras de propóleo

Tras ser retiradas de la colmena, se refrigeraron las mallas con propóleo y posteriormente se retiró la mayor cantidad de la resina en frío mediante la fricción de dichas mallas, dado que las bajas temperaturas facilitan la manipulación de esta sustancia, al hacerla de una consistencia menos viscosa. Se pesaron las muestras y fueron retiradas manualmente las impurezas tales como restos de malla, abejas y trozos grandes de cera. Se trituró el propóleo en trozos pequeños en un mortero de porcelana.

Preparación de los extractos etanólicos de propóleo (EEP)

Se pesaron 50 g de una muestra de propóleo de cada cosecha ya acondicionadas y se colocaron cada una en un matraz con etanol al 70% en una proporción 1:3 (propóleo: alcohol). Las muestras fueron mantenidas protegidas de la luz, en agitación constante por 7 días.

Cumplido este tiempo las muestras fueron filtradas y se les eliminó el excedente de etanol; la muestra de la segunda cosecha fue colocada en un rotovapor Büchi (modelo R-114 B-480) en baño de agua a 50° C y 85 rpm, dejándose evaporar los remanentes de alcohol y agua, mientras que la muestra de la primera cosecha se dejó secar de manera tradicional, en un frasco destapado, cubierto con tela en oscuridad por 1 mes.

Rendimiento de los extractos de propóleo

El rendimiento de cada muestra de propóleo se calculó de acuerdo con la fórmula:

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{\text{Peso del extracto (g)}}{\text{Peso inicial de la muestra}} \times 100$$

Perfil químico de los propóleos

Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos fueron determinados por el método de *Folin Ciocalteu* con ácido gálico como estándar de referencia, con base en una reacción colorimétrica de oxidación-reducción y midiéndose por espectrofotometría de absorción UV-VIS; se graficaron curvas de calibración con las concentraciones 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 µg/mL, usando concentraciones de propóleo de 0.02 mg/mL (Rodríguez, 2015).

Cuantificación de flavonoides

Los flavonoides fueron cuantificados con quercetina como estándar de referencia (1 a 90 mg/L). La concentración que se empleó de cada extracto fue de 0.02mg/ml.

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

El análisis se realizó en el Laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, Se analizaron los compuestos volátiles emitidos por las 2 muestras de los extractos etanólicos de propóleo, con un cromatógrafo de gases (modelo 6850) acoplado a un espectrómetro de masas (modelo 5975C, Agilent Technologies).

Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos etanólicos de propóleo (EEP)

Microorganismos

Para evaluar la actividad antifúngica de los extractos etanólicos de propóleo de FES- Cuautitlán se utilizó la cepa de referencia ATCC-14522 de *M. pachydermatis*.

Cultivo de *M. pachydermatis* y condiciones de crecimiento

La cepa de *M. pachydermatis* (ATCC-14522) fue cultivada por 72 horas a 33°C en agar dextrosa Sabouraud (BD Bioxon) conteniendo caseína (1%), dextrosa (4%) y agar. Las levaduras fueron recolectadas del medio sólido, lavadas tres veces con PBS y resuspendidas en caldo dextrosa Sabouraud (CDS) líquido.

Prueba cualitativa de sensibilidad

Preparación de los stocks de propóleo

Se prepararon diferentes concentraciones de propóleo (0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.5 mg/mL), para lo que el EEP fue diluido en DMSO y DMEM (50 µL de DMSO y 950 µL de DMEM).

Preparación de los discos

Para realizar esta prueba, se cortaron discos de papel filtro de 5mm de diámetro, se esterilizaron y se impregnaron con 10 µL de extracto de propóleo de cada concentración (0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.5mg/mL y un disco como control negativo con 10 µL de DMSO).

Preparación del inóculo

Para asegurar la pureza del cultivo, se realizó la siembra a partir de un cultivo de *M. pachydermatis* incubado a 37°C por 72 horas en agar SDA a otra caja conteniendo este agar. Se incubó nuevamente a 37°C por 72 horas. Se tomó una colonia, se suspendió en solución salina fisiológica al 0.9% y se agitó en vórtex, se ajustó la densidad del inóculo al tubo 1 de la escala de McFarland, equivalente a una concentración de 1×10^6 levaduras/mL (Lozina, 2004).

Realización de la prueba de inhibición radial

A partir del inóculo preparado anteriormente, se realizó la siembra masiva sobre las placas con agar SDA con hisopos estériles, se colocaron sobre esta los discos impregnados con propóleo de cada concentración y el disco con DMSO al centro. Se incubaron a 37°C por 7 días, siendo revisadas a las 24 horas para evaluar la presencia de algún contaminante. A las 72 horas se hizo la medición del diámetro de los halos de inhibición con un Vernier y finalmente a los 7 días se realizó la última observación.

Pruebas cuantitativas de sensibilidad

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se prepararon 7 tubos con caldo CDS, el tubo 1 solo contenía el medio, los tubos 2 a 7 se inocularon con *M. pachydermatis*, 10 µL de la suspensión de levaduras. Para determinar la CMI, se adicionó EEP con las diferentes concentraciones (0.1, 0.15, 0.2, 0.25 y 0.5 mg/mL a los tubos 2, 3, 4, 5 y 6, respectivamente; el tubo 7 se utilizó como control del crecimiento de la levadura, por lo que no se le adicionó propóleo). Se realizó la prueba por duplicado para cada inóculo. Se dejaron incubar a 37°C, revisándolos a las 24 y 48 horas y finalmente a los 7 días para evaluar el crecimiento y turbidez creada por la levadura.

Determinación de la Concentración Mínima Fungicida (CMF)

Tras los 7 días, periodo total de incubación de los tubos de la CMI, se tomó una lazada de cada uno de los tubos y se realizó la siembra por estría en placas con medio ADS. Se incubaron a 37°C, siendo revisadas a las 24 y 72 horas y finalmente a los 7 días. La ausencia de crecimiento es indicativa de un efecto fungicida (Londoño *et al.*, 2008).

Cultivo de células RK13

Se cultivaron células RK13 (ATCC CCL-37, células de riñón de conejo de morfología epitelial) en medio DMEM, suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, adicionando antibióticos (penicilina, 5000 UI y estreptomina, 5 µg/mL). Las células se mantuvieron en una incubadora a 37°C, en una atmósfera con 5% de CO₂ y 95% de humedad. Para la realización de este trabajo, las células se cultivaron en placas de cultivo de 24 pozos que contenían cubreobjetos redondos previamente esterilizados.

Infección de la línea celular RK13 con *M. pachydermatis*

En placas de cultivo de 24 pozos, se colocaron 1x10⁶ células RK13 por pozo.

Las placas fueron divididas en 4 grupos:

Grupo 1, con células RK13;

Grupo 2, control con medio CDS;

Grupo 3, células RK13 infectadas con *M. pachydermatis* y

Grupo 4, células infectadas tratadas con propóleo.

La infección se realizó a una proporción 10:1 (levaduras: células RK13), mientras que al grupo control solo se le adicionó medio de cultivo. Los ensayos se realizaron por triplicado y fueron incubados a 37°. Los diferentes grupos fueron monitoreados cada 24, 48 y 72 horas.

Evaluación de la capacidad de adherencia y daño a la monocapa celular

Las células RK13 infectadas con *M. pachydermatis* fueron observadas al microscopio invertido, para visualizar los cambios en la morfología de la monocapa, así como de la formación de colonias de levaduras. También se realizó la evaluación de células infectadas colocadas en cubreobjetos bajo microscopio óptico. Para lo anterior, los cubreobjetos con células RK13 con o sin *M. pachydermatis* fueron removidos de los pozos a las 24, 48 y 72 horas, lavados con PBS para retirar las levaduras no adheridas, fijados con formalina acuosa al 10% en PBS, montados y examinados para visualizar las levaduras adheridas.

Evaluación de los cambios a los filamentos de actina

La evaluación de la interacción de la levadura con las células en cultivo se determinó por fluorescencia directa. Para esto, los cubreobjetos con células RK13 cultivadas en monocapa, con y sin *M. pachydermatis* fueron removidos del medio, fijados con formalina acuosa al 10% en PBS durante 20 minutos, lavados con PBS, permeabilizados con Tritón X-100 al 0.5% en PBS durante 5 minutos, lavados nuevamente con PBS, bloqueados con BSA al 1% en PBS durante 20 minutos, lavados con PBS e incubados con faloidina conjugada con rodamina (Tetramethyl Rhodamine-IsoThioCyanate (TRITC) labelled phalloidin, Sigma-Aldrich®), (diluida 1:100 en PBS) por 20 minutos, lavados con PBS y finalmente se realizó un lavado con agua desionizada.

Se montaron los cubreobjetos en portaobjetos utilizando medio de montaje adicionado con DAPI (4'6-diamino-2-phenylindole) (Ultracruz ® Mounting Medium for Fluorescence) y fueron observados al microscopio de fluorescencia.

Ensayo de citotoxicidad *in vitro* del propóleo

Para evaluar la citotoxicidad del propóleo, se propagaron cultivos de células RK13 en placas de 24 pozos. Se preparó una solución madre o stock conteniendo 50 µL de DMSO, 950 µL de medio DMEM y 1 mg de EEP. A partir de ésta se realizaron diluciones seriadas para lograr las diluciones de 0.5, 0.25 y 0.125 mg/mL. El ensayo se realizó por duplicado y fue revisado a las 2, 24, 48 y 72 horas. (Tabla 4).

Tabla 4. Diluciones seriadas de propóleo.

	Tubo 1: Solución madre o stock	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4
	50 µL de DMSO	500 µL de la solución madre	500 µL de solución del tubo 2	500 µL de solución del tubo 3
	950 µL de DMEM	500 µL de DMEM	500 µL de DMEM	500 µL de DMEM
Concentración	1 mg/mL propóleo	0.5 mg/mL propóleo	0.25mg/mL	0.125 mg/mL

Microscopía de fluorescencia

Una vez obtenidas las preparaciones, se realizó la observación con microscopio de fluorescencia Zeiss Axioscop 40, acoplado a una cámara Evolution VF Cooled Color de Media Cybernetics, para evaluar los cambios en el citoesqueleto de actina provocados por las levaduras y por la presencia de propóleo. Para una observación más detallada del papel de las levaduras en las células, se usó un microscopio confocal Nikon A1R+ STORM.

RESULTADOS

Origen y obtención de los propóleos

Se realizó la obtención de los propóleos en greña del apiario de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán durante las cosechas de los meses de agosto y noviembre del 2015. Las imágenes muestran dos propóleos provenientes de la misma región, en dos cosechas diferentes (con 9 meses de diferencia), en donde se observa la variación de tonalidades (Fig. 4).

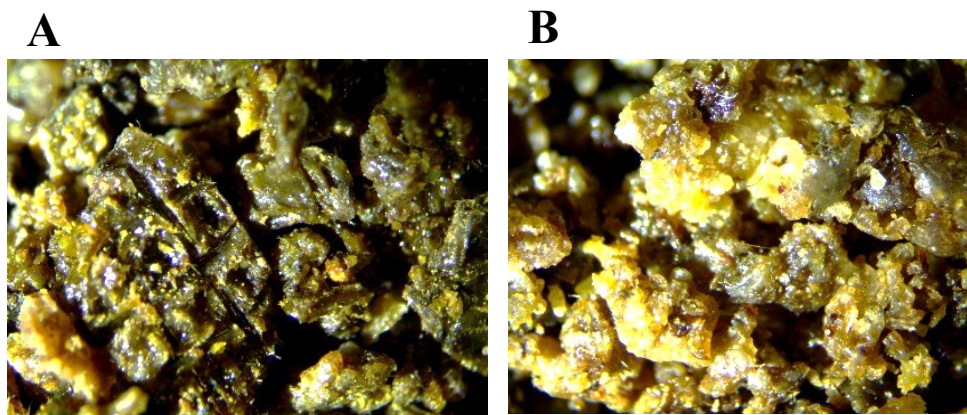


Figura 4. Propóleo proveniente de la misma región en FES-Cuautitlán en dos diferentes cosechas

A: Cosecha del 27 de junio del 2015; B: Cosecha del 5 de noviembre del mismo año (10X).

El apiario de la FES-Cuautitlán, Campo 4, está localizado en el municipio de Cuautitlán Izcallí, Estado de México, cuyas coordenadas (latitud: 19°40'50" N; longitud: 99°12'25" O y altitud: 2,260 msnm) permiten el desarrollo de jacarandas, álamos blancos, colorines, fresnos, eucaliptos, encinos, pirules, capulines, sauces y ahuehuetes, entre otros (Gutiérrez, 2011).

Londoño (2010), durante un estudio realizado menciona que las flores de las principales plantas visitadas por las abejas son *Callistemon citrinus* (cepillo), *Eucalyptus camaldulensis* Dehnhartdt (eucalipto) y *Ricinus communis* L. (higuerilla) para la elaboración de propóleos.

Obtención de los extractos etanólicos de propóleo

Transcurrido el tiempo en que se evaporó la mayor cantidad de alcohol, se obtuvo el EEP de cada una de las muestras de propóleo, presentándose dos tonalidades diferentes (Fig. 5).

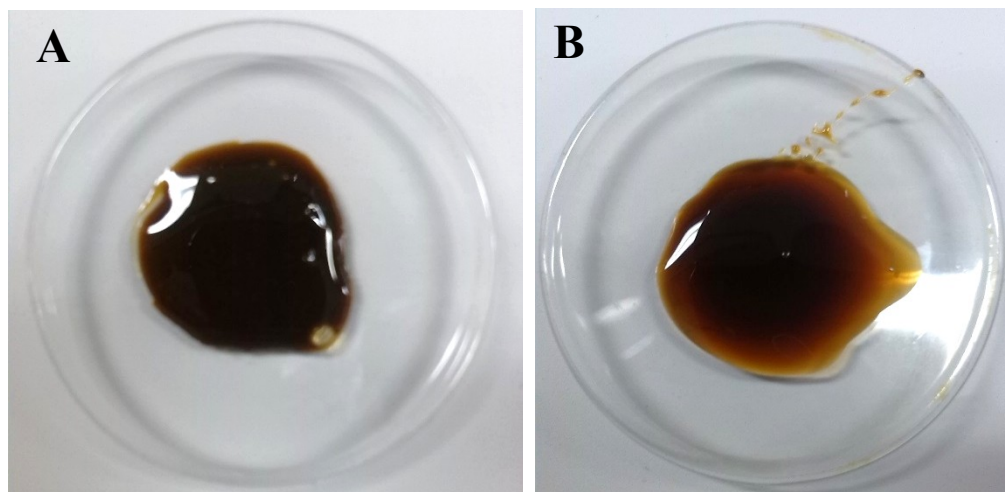


Figura 5. Dos diferentes tonalidades dadas por el EEP de las dos cosechas de 2015. A: Cosecha del 27 de junio de 2015; B: Cosecha del 5 de noviembre del mismo año

Rendimiento de los extractos de propóleo

En la Tabla 5 se muestra la cantidad de gramos de propóleos obtenidos del apiario de la FES-Cuautitlán durante las dos cosechas de 2015. La cantidad en peso corresponde al propóleo extraído de mallas colectoras tras la refrigeración y raspado. Se muestra el modo de secado y los gramos de extracto obtenido.

Tabla 5. Rendimiento de los extractos de propóleo obtenidos durante las dos cosechas de 2015.

Cosecha	Peso (g)	Propóleo utilizado (g)	Tipo de secado	EEP (g)	Rendimiento (%)
Junio del 2015	93.2	50	A temperatura ambiente	13.1	14.05
Noviembre del 2015	96.9	50	Al vacío	19.8	20.43

Perfil químico de los propóleos

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

Después del análisis por cromatografía se observó una marcada diferencia en cuanto a la composición química del propóleo de ambas cosechas (Tablas 6 y 7), esto, como previamente se menciona probablemente es el resultado de las diferencias tanto en clima y vegetación aún en un mismo año en el área circundante al apiario.

Se lograron cuantificar 69 picos para el propóleo de la 1ª cosecha y 61 picos para la 2ª cosecha del propóleo de 2015. Ambas tablas presentan los 10 principales compuestos propuestos según la base de datos del espectrómetro.

Tabla 6. Principales componentes del EEP de la cosecha de agosto del 2015.

Pico	Tiempo de retención (minutos)	% del total	Nombre propuesto según la base de datos del espectrómetro de masas	Nombre común	Actividad
1	15.507	2.26	Benzaldehido, 2-nitro-, diaminometilidenedihidrazona	No determinado	Alcaloide con efecto Antiparasitario (Amal et al., 2011).
2	19.892	1.46	α -Bisabolol	Bisabolol Levomenol	Cicatrizante, Inhibe moléculas proinflamatorias, antimicrobiano (Kamatou, 2010 ; Maurya et al., 2014).
3	23.711	15.46	Ácido hexadecanoico, etil éster	Acido palmítico	Antiinflamatorio, disminuye el nivel de lípidos asociados a enfermedades cardiovasculares (Morse, 2015).
4	25.098	6.55	2-Nonadecanona	2-nonadecanona	Pertenece a la clase de compuestos orgánicos conocidos como cetonas
5	25.813	10.40	Etil oleato	Etil oleato	Feromona en abejas (Leoncini, 2004).

6	26.088	2.80	Ácido octadecanoico, etil éster	Ácido octadecanoico	Capta radicales libres causantes de estrés oxidativo; poseen actividades antiinflamatorias, antialérgicas, antitrombóticas, antimicrobianas y antineoplásicas (Kuskoski 2005).
7	26.507	2.15	1,19-Eicosadieno	1, 19 Eicosadieno	No determinado
8	27.394	8.07	2-Heptadecanona	2-heptadecanona	Antimicrobiana (Ochoa, <i>et al.</i> , 2015).
9	28.241	3.14	Ácido Octadecanoico, etil éster	Ácido esteárico	Emoliente y protector, impide la desecación de la capa córnea de la piel, y se absorbe fácilmente a través de ésta.
10	29.800	6.60	4H-1-Benzopiran-4-ona, 2,3-dihidro-5,7-dihidroxi-2-phenil-, (S)-	Pinocembrina	Antibacterial, antiinflamatoria, anticancerígena (Kumar, 2007), neuroprotectora, (Razul <i>et al.</i> , 2013).

Tabla 7. Principales componentes del EEP de la cosecha de noviembre del 2015.

Pico	Tiempo de retención (minutos)	% del total	Compuesto propuesto según la base de datos del espectrómetro de masas	Nombre común	Actividad
1	10.347	7.07	Bencil metil cetona	No determinado	Antiséptico al ser una cetona
2	14.042	7.57	Triacetina	Triacetina	Presenta propiedades fungicidas
3	23.707	4.75	Ácido hexadecanoico, etil éster	Acido palmítico	Antiinflamatorio, disminuye el nivel de lípidos asociados a

					enfermedades cardiovasculares (Morse, 2015).
4	24.118	3.70	Octadecanal	Ácido esteárico	Es empleado como feromona por los insectos
5	25.098	10.78	2-Nonadecanona	2-Nonadecanona	Pertenece a la clase de compuestos orgánicos conocidos como cetonas
6	25.681	1.88	Naftalenona	Naftalenona	Antiinflamatorio (inhibe la actividad proinflamatoria de los neutrófilos (Hsieng Chou, 2012).
7	26.087	2.58	Ácido Octadecanoico, etil éster	Ácido octadecanoico	Capta radicales libres causantes de estrés oxidativo; poseen actividades antiinflamatorias, antialérgicas, antitrombóticas, antimicrobianas y antineoplásicas (Kuskoski <i>et al.</i> , 2005).
8	27.393	18.20	2-Pentadecanona	Pentadecanona	Actividad citotóxica (Walia, 2012).
9	28.241	1.98	Ácido Eicosanoico, etil éster	Ácido araquídico	No determinado
10	29.436	4.31	2-Tetradecanona	2- tetradecanona	Feromona sexual de algunos insectos (Zhang <i>et al.</i> , 2003).

Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos etanólicos de propóleo

Prueba cualitativa de sensibilidad

La lectura se realizó a partir de las 24 horas para descartar la presencia de contaminantes, posteriormente a las 72 horas y finalmente a los 7 días.

En la Tabla 8 se muestran los resultados de la prueba de inhibición, en donde cabe señalar que existió inhibición desde la concentración más baja (0.1mg) para ambos propóleos.

Tabla 8. Efecto de 5 concentraciones del EEP cosechado en dos fechas diferentes sobre el crecimiento *in vitro* de *M. pachydermatis*

EEP	Concentración					Control
	0.1 mg	0.15mg	0.2mg	0.25mg	0.5mg	DMSO
Agosto 2015	+	+	++	++	++	-
Noviembre 2015	+	+	++	++	++	-

++: Inhibición total; +: Inhibición parcial; -: Sin inhibición

En la figura 6 se pueden observar los diferentes halos de inhibición obtenidos por cada una de las diferentes concentraciones de propóleo, observando que se tiene inhibición a partir de 0.1mg/ml para ambas cosechas. Al centro se observa el control con DMSO, en donde se encontró crecimiento, prueba de que éste no tiene actividad fungicida. La Figura 7 muestra ausencia de crecimiento a partir de la concentración de 0.1 mg/ml de propóleo.

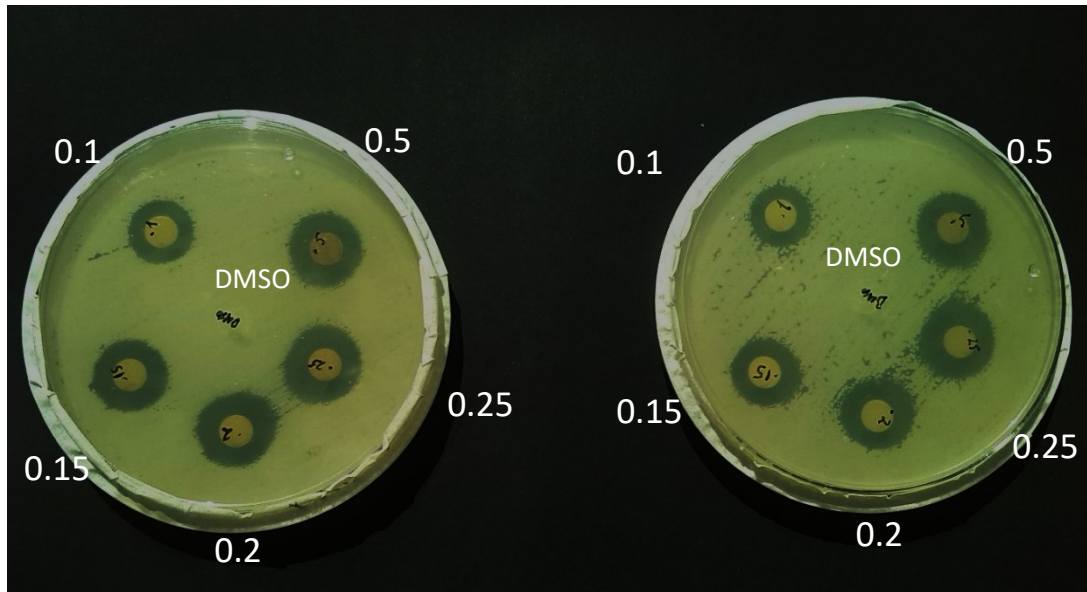


Figura 6. Efecto de diferentes concentraciones de propóleo, utilizando el método de difusión en agar. Todas las concentraciones incluyeron halos de inhibición del crecimiento. No se observó diferencia entre ambas cosechas.

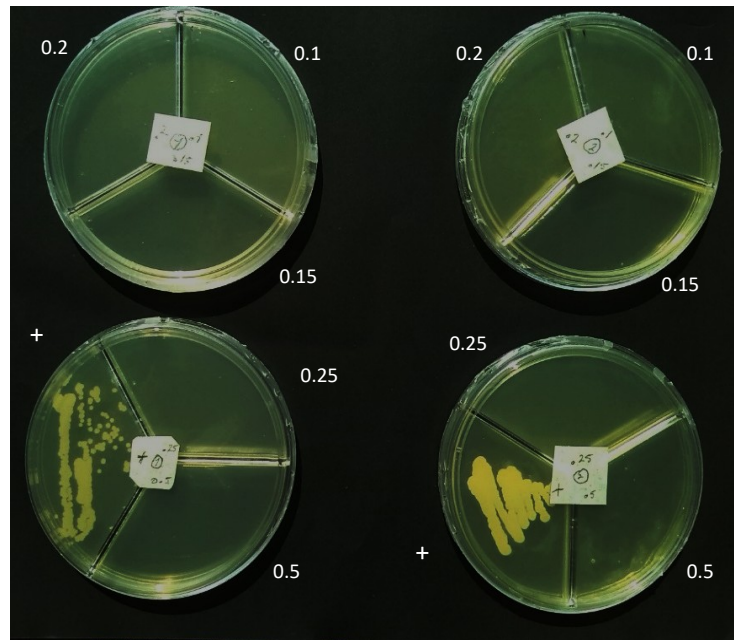


Figura 7. Concentración Mínima Fungicida. Sólo se observa crecimiento en el control positivo.

Infección de cultivos de células RK 13 con *M. pachydermatis*

Se observan las células de los grupos control y células adicionadas con CDS, vistas bajo microscopía óptica, formando una monocapa con estructura normal (Fig. 8 A y C). En los mismos grupos, al marcar los filamentos de actina con faloidina rodaminada y observarlas al microscopio de fluorescencia, no se observaron cambios en la estructura del citoesqueleto de actina, como lo son la presencia de filopodios, cortezas celulares y fibras de estrés definidas (Fig. 8 B y D). Al analizar con microscopía óptica los cultivos de las células RK13 infectadas con *M. pachydermatis*, se notó la pérdida de la morfología celular, con células redondeadas y pérdida de la estructura de la monocapa; se observó la formación de colonias o agrupaciones de levaduras en forma de racimos de uva, adheridas al cultivo celular (Fig. 8 E). En los cultivos infectados, marcados con faloidina rodaminada para detectar los filamentos de actina, se observó la formación de agrupaciones celulares en los sitios de adherencia de las levaduras, con un aparente sobrecrecimiento en estratos, con aumento del grosor de la corteza celular y ausencia de fibras de estrés (Fig. 8 F).

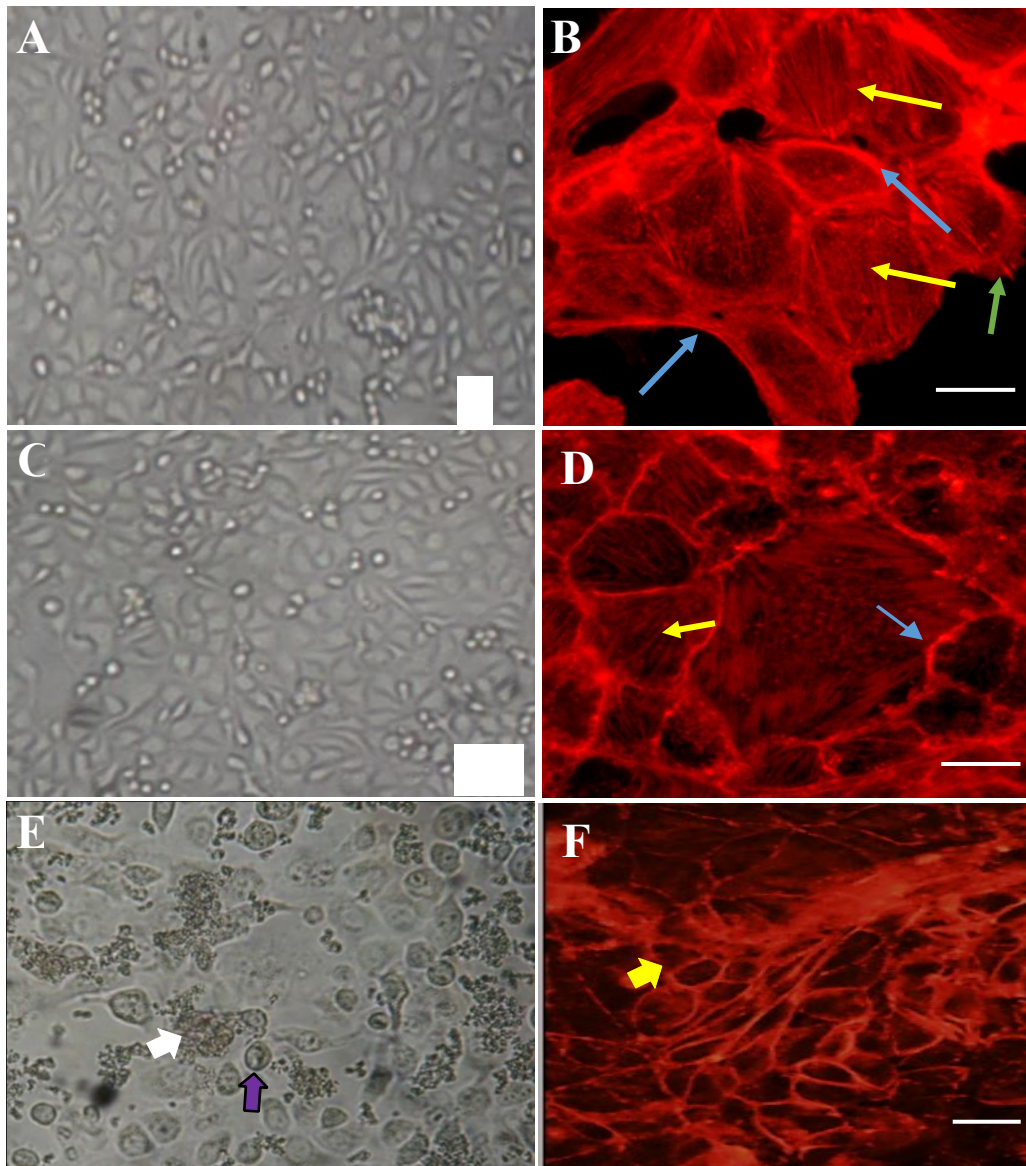


Figura 8. Células RK13 infectadas con *M. pachydermatis*.

A y B: Grupo control de células RK13 sin infectar; C y D: Células RK13 adicionadas con caldo Sabouraud; E y F: Cultivos celulares infectados; A, C y E: Microscopía óptica; B, D y F: Filamentos de actina marcados con faloidina rodaminada (técnica de fluorescencia directa).

B y D: Cortezas celulares (flechas azules), fibras de estrés (flechas amarillas), lamelipodio (flecha verde); E: Colonias de *M. pachydermatis* (flecha blanca) y células redondeadas (flecha morada); F: Agrupaciones celulares redondas en el sitio de adherencia de las levaduras (flecha amarilla). Barra = 10 μm

Se realizó el monitoreo de los cultivos celulares infectados con *M. pachydermatis* a las 24, 48 y 72 horas, mediante microscopía óptica y se observó en todos los tiempos la formación de colonias de levaduras en forma de racimos de uva adheridas al cultivo celular. Se observaron cambios en la morfología celular y de la estructura de la monocapa que se fueron agudizando conforme pasó el tiempo de infección de las células RK13, y a las 72 horas se observó destrucción del cultivo por lisis celular (Fig. 9).

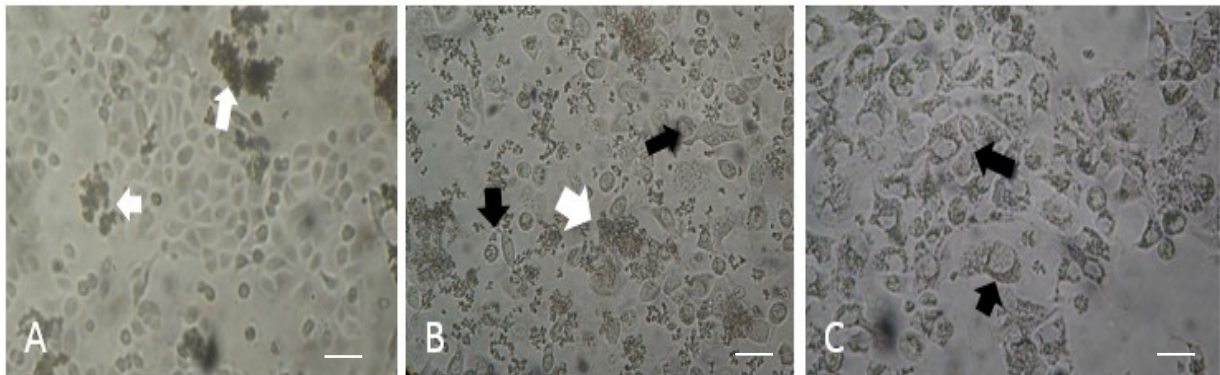


Figura 9. Cultivos de células RK13 infectadas con *M. pachydermatis* a diferentes tiempos de infección.

A: 24h;

B: 48h;

C: 72 h post infección.

Las flechas blancas señalan colonias de levaduras, las flechas negras muestran cambios en la morfología celular y destrucción de la monocapa por lisis celular. Microscopía óptica. 40x. Barra = 10 μ m

Al realizar la microscopía de fluorescencia de los cultivos infectados con *M. pachydermatis*, en los que se realizó el marcaje de los filamentos de actina con faloidina rodamina y los núcleos con DAPI, se notó que las levaduras autofluorescen en longitud de onda correspondiente al color verde. La observación de los cultivos celulares, a los diferentes tiempos de infección, permitió corroborar las observaciones en microscopía óptica: cambios en la morfología de las células y pérdida de la estructura del cultivo celular. Asimismo, se demostró que a los diferentes tiempos de infección se va perdiendo la estructura de los filamentos del citoesqueleto de actina: aumento de la corteza celular, ausencia de fibras de estrés y pérdida de las uniones intercelulares. Se puede notar el aumento del tamaño de las colonias de levaduras adheridas al cultivo conforme pasa el tiempo de infección (Fig. 10). Asimismo, se observó la formación de sincitios en los sitios de adhesión de la levadura, presencia de células redondeadas y lisis celular con pérdida de la estructura de la monocapa del cultivo celular. Por otro lado, se observó la presencia de pequeños anillos de actina rodeando los núcleos de *M. pachydermatis* (Fig. 11).

En los sitios de adherencia de *M. pachydermatis* a las células RK13, se observó la proliferación de estas con pérdida de la morfología celular, ausencia de fibras de estrés y formación de sincitios. Al realizar el análisis por microscopía confocal, en el plano Z (vista tridimensional), se comprobó un aumento en el espesor de una monocapa del cultivo de células no infectadas (16 μm) a un sobrecrecimiento en varios estratos de las células infectadas a un espesor de 32 μm . Esto también se demuestra al observar los núcleos en un solo estrato en cultivos no infectados contra núcleos en diferentes estratos en los cultivos infectados (Fig. 12).

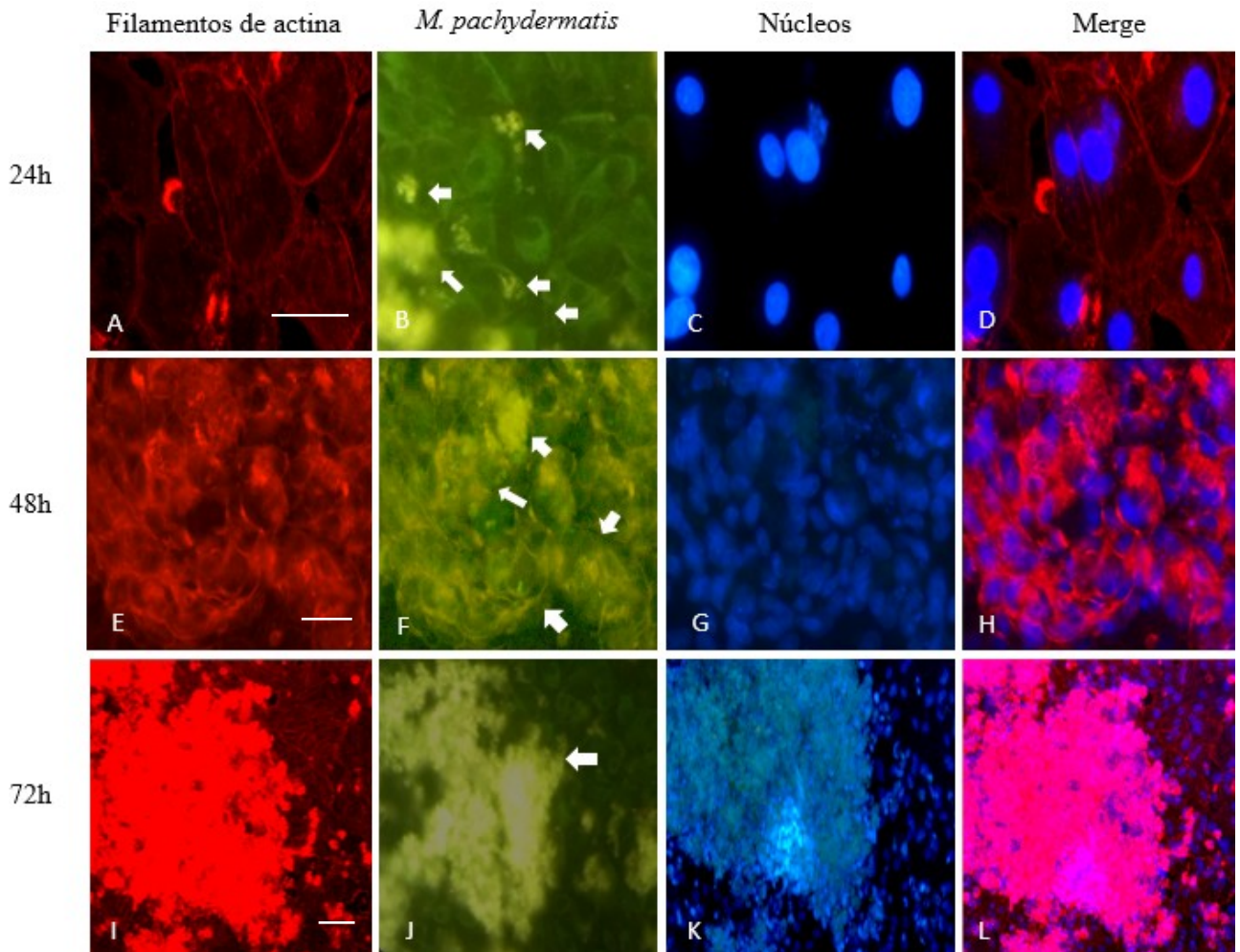


Figura 10. Cultivo de células RK13 infectadas con *M. pachydermatis* a diferentes tiempos de incubación

Marcaje de filamentos de actina con faloidina-rodamina, colonias de *M. pachydermatis* autofluorescen en longitud de onda correspondiente al color verde y núcleos marcados con DAPI. Merge muestra la sobreposición de los planos. Las flechas blancas indican la presencia de colonias de levaduras. A-D (60x); E-H (40x); I-L (20x). Barra = 10 μm .

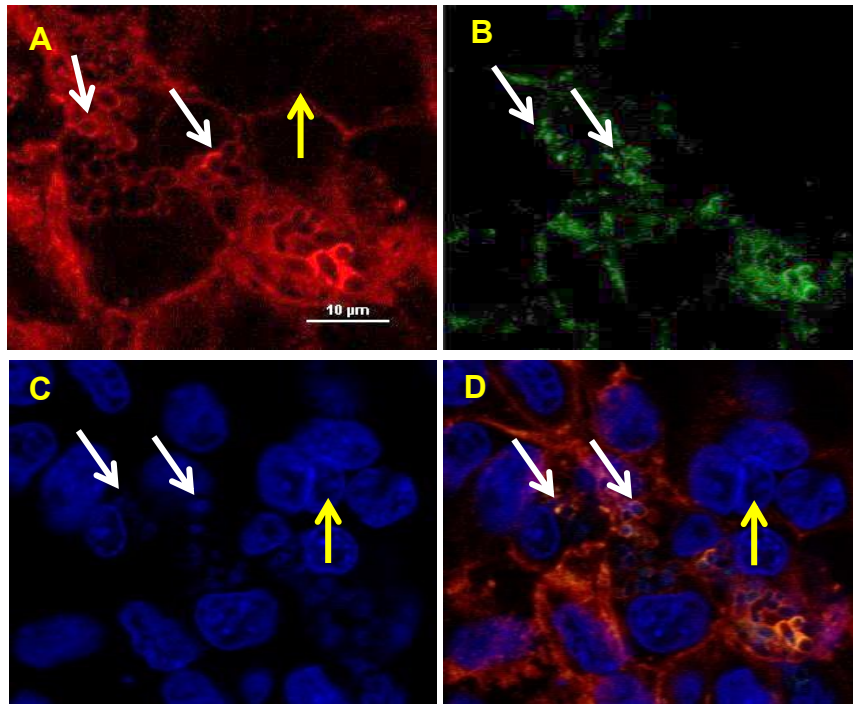


Figura 11. Células RK13 infectadas con *M. pachydermatis* con presencia de sincitios y anillos perinucleares en levaduras.

A: Filamentos de actina marcados con faloidina rodaminada, B: *M. pachydermatis*; C: Núcleos marcados con DAPI; D: Sobreposición de las figuras A y C.

A y D: Formación de sincitios (flecha amarilla); A, B, C y D: anillos perinucleares en levaduras (flecha blanca). Microscopía confocal (60X). Barra = 10 µm.

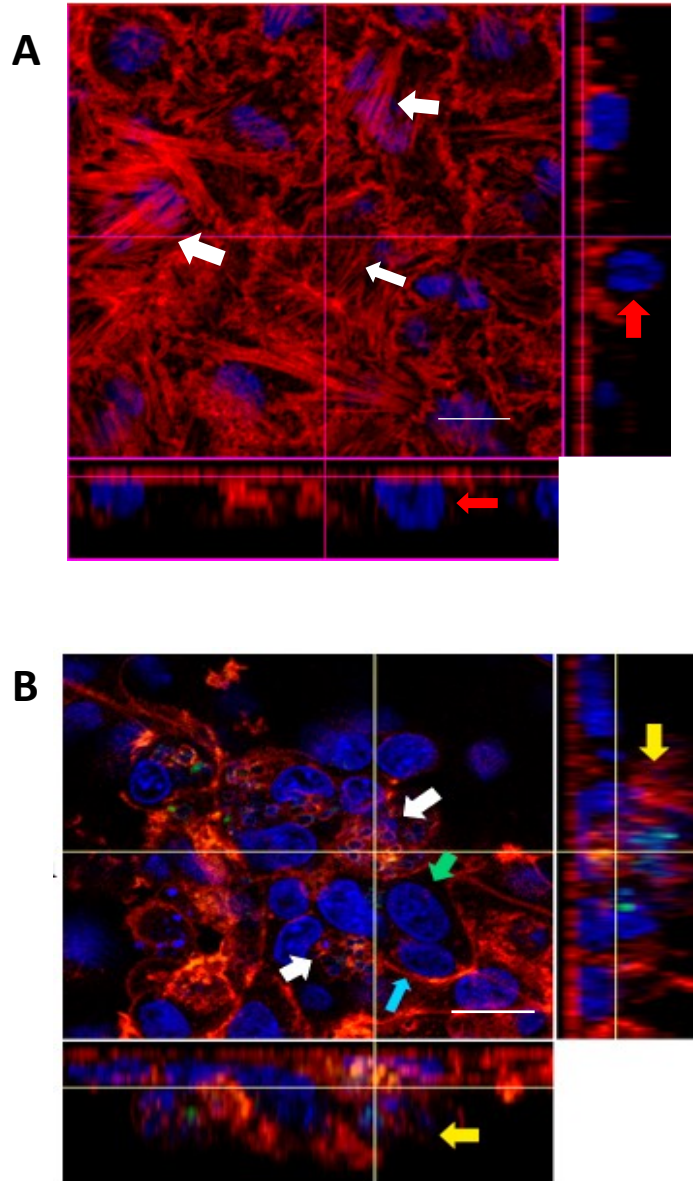


Figura 12. Sobrecrecimiento de células RK13 infectadas con *M. pachydermatis*.

A: Células RK13 sin infectar. Fibras de estrés definidas (flechas blancas).

B: Células RK13 infectadas. Localización de las levaduras, anillos perinucleares de actina (flecha blanca); pérdida de fibras de estrés y formación de sincitios (flecha verde); acumulación de actina en la corteza celular (flecha azul).

Los recuadros corresponden a las vistas ortogonales en plano Z mostrando una monocapa con espesor de 16 μm (flecha roja) en las células sin infectar (A), y sobrecrecimiento de la monocapa con espesor de 32 μm (flecha amarilla) en la monocapa infectada (B).

Técnica fluorescencia directa. Microscopía confocal. 60X. Barra = 10 μm .

Al analizar los cortes ópticos realizados en los sitios de sobre crecimiento del cultivo de células RK13 hechos en los sitios de adhesión de las levaduras a las células RK13, se observó que el sobre crecimiento de las células es sobre una monocapa de células sin cambios aparentes en su forma ni en la estructura de los filamentos de actina, donde se puede observó la presencia de fibras de estrés (Fig. 13 B - D), mientras que la presencia de levaduras se denota en las formaciones de agregados celulares (Fig. 13 E – O) donde se refleja la pérdida de dichas fibras de estrés.

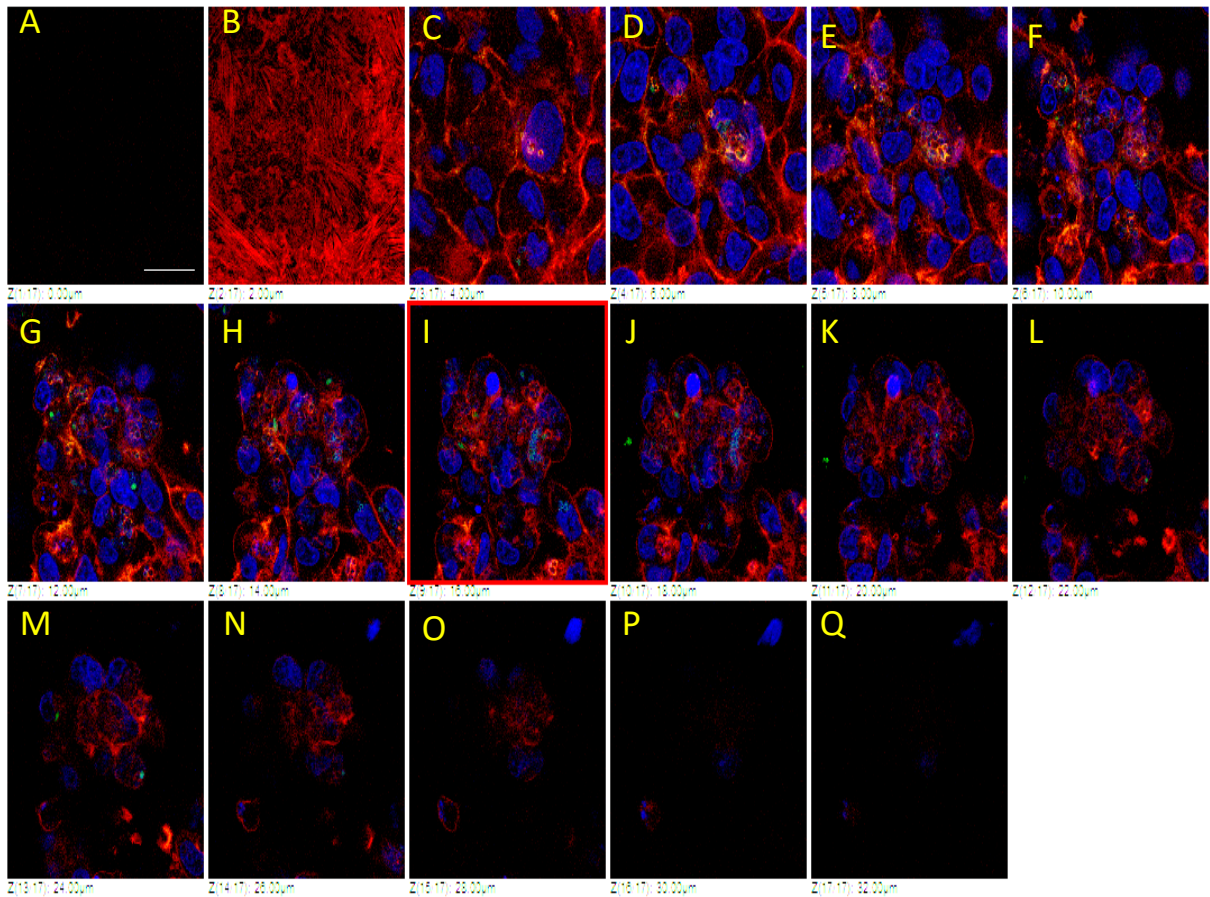


Figura 13. Cortes ópticos de la región de sobre crecimiento de células RK13 infectadas con *M. pachydermatis*.

Técnica de fluorescencia directa en la que se marcaron los filamentos de actina con faloidina rodaminada y los núcleos con DAPI.

Microscopía confocal: cortes ópticos (2 µm) que inician en el dominio basal de las células del estrato inferior (A y B) y se dirigen hacia el dominio apical de las células del estrato superior (O-Q). Se puede observar que las células del dominio basal, sobre la que crecen las células dañadas, no muestran alteraciones.

Microscopía confocal. (60X). Barra = 10 µm.

Infección de cultivos de células HeLa y Vero con *M. pachydermatis*

Con el fin de corroborar los resultados obtenidos en células RK13, se realizó la infección de cultivos de células HeLa (ATCC CCL-2) y Vero (ATCC CCL-81). En estas líneas celulares también se logró reproducir la infección con *M. pachydermatis*. En ambas líneas celulares se pudo demostrar la adherencia de las levaduras formando colonias similares a las descritas en los cultivos de células RK13 (Fig. 14).

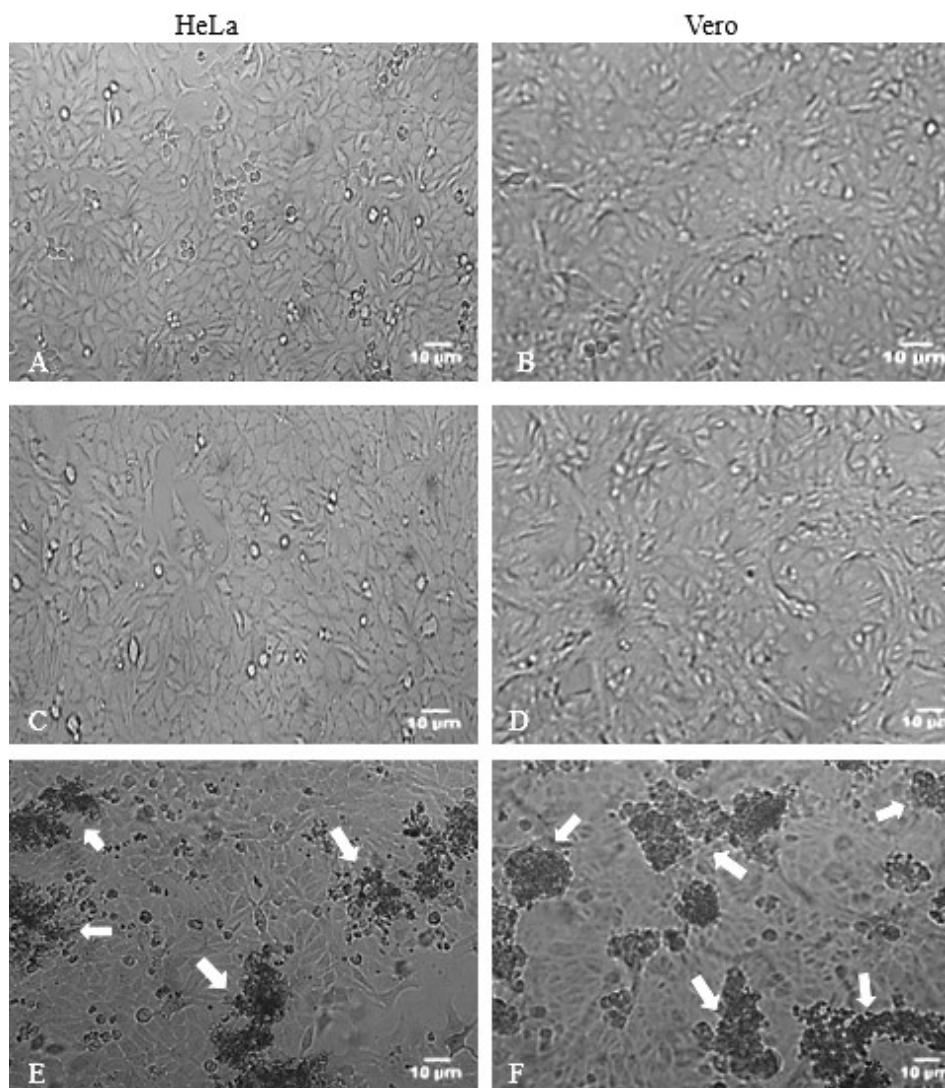


Figura 14. Cultivos de células HeLa y células Vero infectadas con *M. pachydermatis*.

A y B. células de los grupos control; C y D. células cultivadas con CDS; E y F. células infectadas con *M. pachydermatis*. Cultivos con 72 horas de exposición. Las flechas blancas señalan la formación de colonias de levaduras. Microscopía óptica. 40x.

Al realizar la valoración de la estructura del citoesqueleto de actina, en las células HeLa se observaron cambios similares a los que se describieron en las células RK13 (agrupaciones con alteración de la forma celular, pérdida de las uniones intercelulares y ausencia de las fibras de estrés). En las células Vero se observó también la alteración de la estructura del citoesqueleto de actina con cambios en la forma y ausencia de las fibras de estrés, pero en este caso las agrupaciones celulares se observaron en torno a las colonias de las levaduras (Fig. 15).

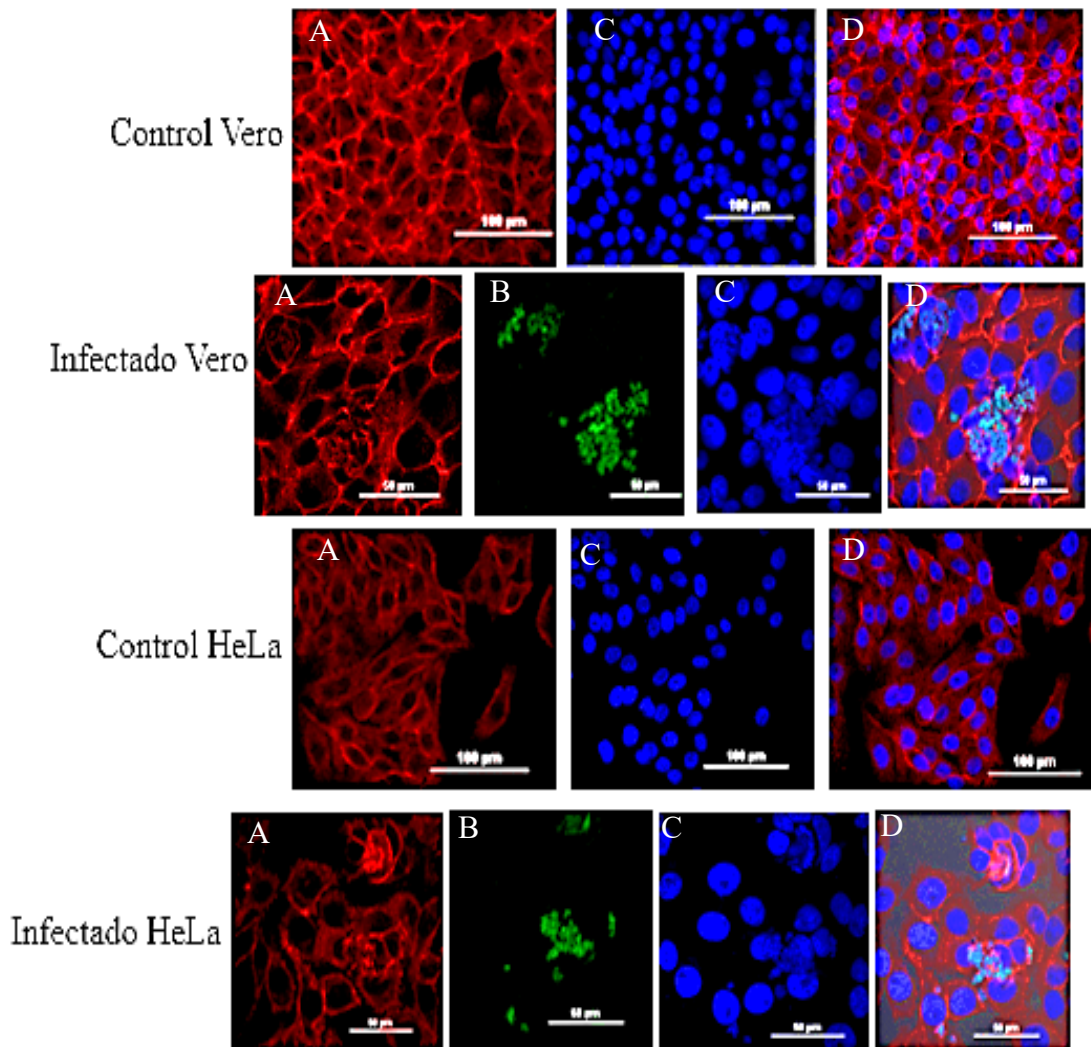


Figura 15. Cambios en los filamentos de actina en cultivos de células Vero y células HeLa infectadas con *M. pachydermatis*.

A. Filamentos de actina marcados con faloidina rodaminada; B. *M. pachydermatis* autofluoresce en longitud de onda para el color verde; C. Núcleos marcados con DAPI; D. Merge o superposición de A y C.

En la Figura 16 se observan detalles de las células HeLa formando agrupaciones circulares en los sitios adhesión de las levaduras, con cambio en la forma de las células: aumento de la corteza celular, pérdida de las uniones intercelulares y ausencia de las fibras de estrés.

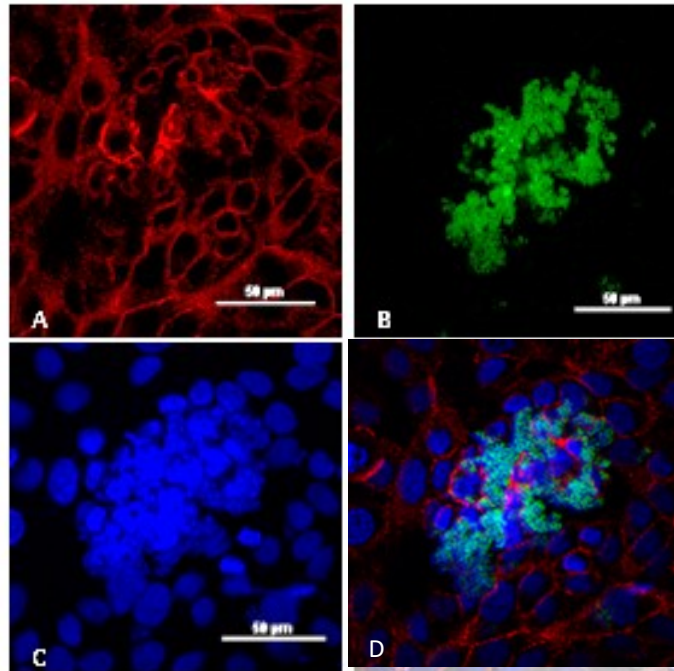


Figura 16. Células Hela infectadas con *M. pachydermatis*.

A. Marcaje de actina con faloidina rodaminada mostrando cambios en la forma de las células y pérdida de fibras de estrés;

B. Autofluorescencia de *M. pachydermatis*;

C. Marcaje de núcleos con DAPI;

D. Merge o sobreposición de A, B y C.

Microscopía confocal. 60x.

En el caso de las células Vero, se observa como las células se agrupan en torno a la colonia de levaduras adheridas al cultivo celular, dando la impresión de la formación de esferas. También se pudo notar el cambio en la forma celular y alteraciones de la estructura de los filamentos de actina con pérdida de las fibras de estrés (Fig. 17).

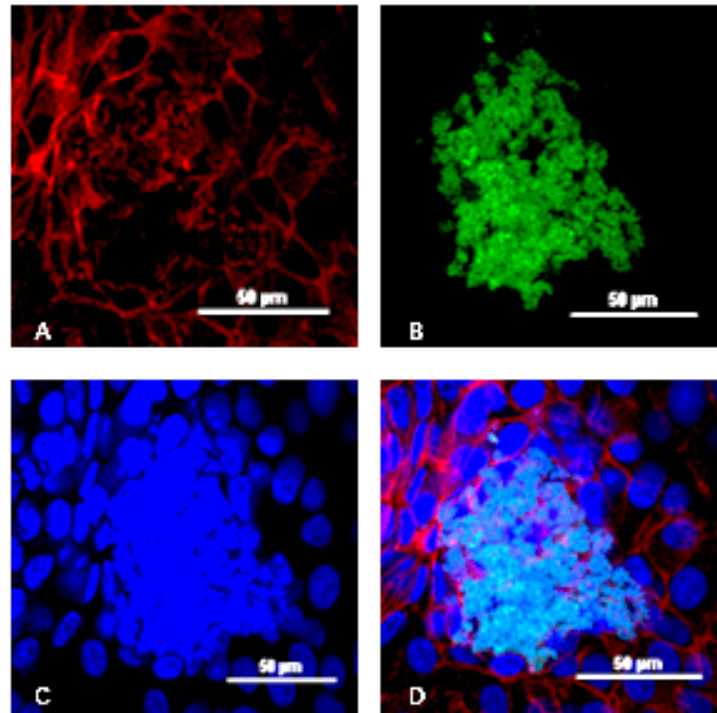


Figura 17. Células Vero infectadas con *M. pachydermatis*.

- A. Marcaje de actina con faloidina rodaminada mostrando cambios en la forma de las células y pérdida de fibras de estrés;
- B. Autofluorescencia de *M. pachydermatis*;
- C. Marcaje de núcleos con DAPI;
- D. Merge. Microscopía confocal. (60x).

Efecto del propóleo sobre los cultivos de células RK13, HeLa y Vero

Con base en los resultados de la CIM y CFM encontrados, en este trabajo se probó una concentración máxima de 0.5 mg/mL y una mínima de 0.25 mg/mL de propóleo sobre los cultivos de células RK13. Se observó que a concentración de 0.5 mg/mL de propóleo, los cultivos no muestran alteraciones morfológicas las primeras 24 horas (Fig. 18 A y B); sin embargo, a partir de las 48 horas comienza a perderse la estructura normal del cultivo celular y aparecen células redondeadas (Fig. 18 C y D). La dosis de 0.25 mg/mL es mejor tolerada por los cultivos

celulares, pero sólo hasta las 72 horas de incubación, ya que después de este tiempo aparecen las alteraciones antes mencionadas (Fig. 18 E y F). Se realizó el mismo experimento con 2 líneas celulares adicionales (Vero y HeLa) observándose también el daño.

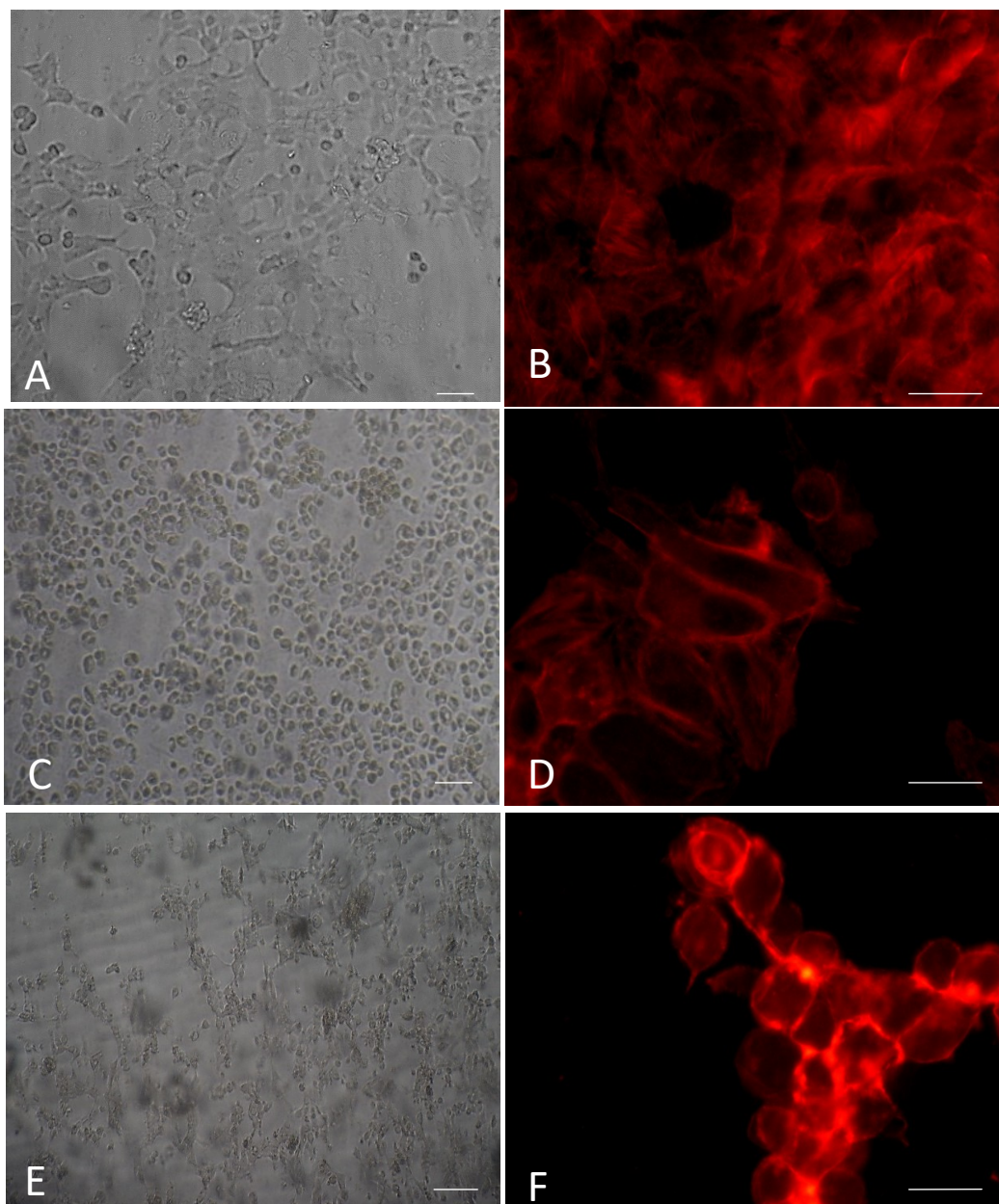


Figura 18. Células RK13 con propóleo

A. Células RK13 con 0.25 mg de propóleo a las 24 horas de incubación; B. marcaje de actina de células con la misma dosis; C. Células RK13 con 0.25 mg de propóleo a las 48 h; D. marcaje de actina de células con la misma dosis; E. Células RK13 con 0.25 mg de propóleo a las 72 h; F. marcaje de actina de células con la misma dosis. Barra = 10 μ m.

DISCUSIÓN

En los últimos años ha aumentado el interés por estudiar la habilidad de los patógenos para invadir y reproducirse en células no fagocíticas con el fin de asegurar su supervivencia. En levaduras como *Candida albicans*, *C. glabrata* o *Malassezia furfur* que están asociadas a infecciones crónicas difíciles de erradicar, se ha reportado su internalización en células no fagocíticas, induciendo su activación mediante la modulación del citoesqueleto de actina (Coutinho, 2000; Zachary, 2012; Nowakiewicks, 2013; Al-Sweih *et al.*, 2014). Sin embargo, la capacidad de *M. pachydermatis* para invadir células epiteliales y responder a la infección mediante la alteración de los filamentos de actina no ha sido estudiada.

En este trabajo se aporta evidencia que ayuda a entender las interacciones entre un patógeno fúngico (*M. pachydermatis*) y células epiteliales en un modelo *in vitro*. Nuestros resultados indican que *M. pachydermatis* induce en las células epiteliales alteraciones en la estructura de la monocapa celular, con alteraciones de la forma y sobrecrecimiento de las células sobre una monocapa sin alteraciones. Las células sin infectar formaron una monocapa única con morfología celular adherente.

Al realizar el desafío con *M. pachydermatis*, las levaduras se adhirieron al cultivo formando colonias que fueron creciendo en forma de racimos de uva (Figura 9 A, flechas blancas), lo que se ha descrito como “cuórums” en modelos de infección *in vivo*, donde existe una alta densidad de levaduras en piel lesionada, en comparación con controles normales (Jiménez, 2016). En modelos *in vitro* se mencionan estas agrupaciones como clusters o racimos de blastoconidios, organizados en mono o multicapas con producción variable de matrices extracelulares (Canizzo, 2007; Figueredo *et al.*, 2012). Recientemente se ha hecho referencia a que las moléculas responsables de la agregación del cuórum son las señales de comunicación y coordinación del comportamiento entre levaduras por medio de la secreción de moléculas de señalización en una población y son las responsables de la formación de biopelículas o biofilms, que impiden la penetración de agentes antifúngicos, dada la estrecha proximidad entre levaduras y su matriz (Desai, 2014; Allen, 2015). La detección del cuórum ha sido un área de gran interés en los últimos tiempos, y se sabe que *Malassezia* funciona como cuórums (Thayikkannu, 2015), lo que en este modelo *in vitro* también se demuestra, observándose este fenómeno no sólo en la línea

celular RK13, sino en Vero y HeLa (Fig. 14 E y F). Así mismo se observó que las colonias crecieron y hubo fusión entre ellas, mientras que, al mismo tiempo, algunas levaduras se desprendían y adherían al cultivo para formar nuevas colonias e iniciar las lesiones, lo que ocasionó la presentación de los cambios y las alteraciones de manera asincrónica.

Es sabido que muchos patógenos que afectan células no fagocíticas inducen alteraciones en las estructuras que los conforman para lograr su internalización, motilidad y supervivencia, así como colonizar células vecinas (Cheng *et al.*, 2005; Gouin, 2005; Ortega, 2016; Yang, 2014). En este estudio *M. pachydermatis* ocasionó cambios en la morfología celular también perceptibles en el citoesqueleto (Fig. 8 E) que fueron claramente evidenciados al evaluar los filamentos de actina al microscopio de fluorescencia. Se observó la formación de agrupaciones circulares con cambios en la morfología celular con consecuente alteración de la corteza celular y pérdida de las fibras de estrés (Fig. 8 F) que coinciden con el sitio de adherencia de las levaduras. Baroni (2001), trabajando con una levadura del mismo género (*M. furfur*) también reporta disgregación de los filamentos de actina durante la infección de un modelo *in vitro*, como consecuencia del proceso de penetración de la levadura a las células. Este hallazgo en nuestro modelo experimental *in vitro* podría soportar la hipótesis de que *Malassezia pachydermatis in vivo* causa una rotura inicial en la función de barrera de la epidermis. por su parte, (Yang *et al.*, 2014) mencionan que los rearrreglos en los filamentos de actina en la célula diana, incluyendo su ensamble y despolimerización, pueden ser respuestas a la internalización de *Candida albicans*, aquí observamos en estadios más avanzados de la infección la formación de sincitios, presencia de células redondeadas y lisis celular con pérdida de la estructura de la monocapa celular (Fig. 11). Finalmente reportamos que, en los sitios de adherencia, *M. pachydermatis* estimula la proliferación de las células RK13, pues al realizar el análisis por microscopía confocal en el plano Z, se comprobó que el espesor del cultivo de una monocapa en células no infectadas midió 16 μm , mientras que existió un sobrecrecimiento en varias capas de las células infectadas, dando un espesor de 32 μm (Fig. 12). Esto también se demuestra al observar los núcleos en un solo estrato en cultivos no infectados contra núcleos en diferentes estratos en los cultivos infectados, apoyando la teoría de que *M. pachydermatis in vivo* causa hiperqueratosis (engrosamiento de la capa queratinizada de la piel) e hiperplasia (aumento del tamaño de un órgano o tejido, debido al aumento en el número de células) observadas en lesiones macroscópicas y lesiones histológicas

(Martín *et al*, 2001; Zachary, 2012), lo que hipotéticamente es el resultado de una reacción inflamatoria y/o de hipersensibilidad a los productos de secreción de la levadura y a sus antígenos y sustancias enzimáticas (Mauldin, 1997; Gupta, 2000; Coutinho, 2000), que al igual que otros microbios cutáneos, *M. pachydermatis* produce y que participan en su nutrición. La liberación de enzimas por el hongo asegura que una oferta local apropiada de alimentos puede entrar en la célula en una forma adecuada para su posterior metabolización. Por su parte, se sabe que el genoma de *M. globosa* tiene una abundancia de genes que confieren hidrolasas secretadas (incluyendo lipasas, fosfolipasas, proteasas, etc.), con similitudes a las expresadas por *Candida albicans* (Olivry, 2001). Estas sustancias son propensas a estar involucradas a inducir respuestas inmunes e inflamatorias, sin embargo, la importancia relativa de los diversos productos enzimáticos de *M. pachydermatis* en la inducción de la inflamación cutánea no ha sido plenamente establecida (Tártara, 2016). El daño causado por la presencia de la levadura en nuestro estudio podría obedecer a la liberación de estas enzimas, más que a una respuesta inmunitaria, ya que en este trabajo sólo se empleó un cultivo celular infectado, sin intervención del sistema inmune, observándose un aumento en la proliferación de células que se encontraban en contacto con las levaduras (hipertrofia), lo que sugiere que los cambios son inducidos por éstas como un medio de protección y de evasión de la respuesta inmune. Estos hallazgos podrían ayudar a comprender el mecanismo de patogenicidad de esta levadura y explicar la presencia de hipertrofia e hiperqueratosis epidérmica observada en biopsias donde reside la levadura y el difícil manejo terapéutico de la otitis y dermatitis por *M. pachydermatis*. Aunado a lo anterior, cabe señalar que el sobrecrecimiento implica el estímulo de las células a dividirse, lo que implica la intervención del citoesqueleto, donde las células deben desprenderse del sustrato, desestructurar sus uniones intercelulares y estructuras como las fibras de estrés, redondearse para posteriormente entrar en mitosis; después las células hijas se unen a las células del estrato inferior, formándose nuevas uniones intercelulares.

Aunado a lo anterior reportamos como un hallazgo la formación de anillos perinucleares de actina en *M. pachydermatis* (Figs. 11 y 12). Estos anillos también han sido reportados en *Fellomyces fuzhouensis* (Kopecka *et al*, 2012), *Cryptococcus neoformans* (Kopecka *et al*, 2013) y *C. albicans* (Atre *et al*, 2009), y fungen como un depósito temporal de actina en las células, que al comenzar a proliferar, la actina se libera de estos depósitos de los anillos y se reorganiza para

formar parches y cables de actina involucrados en la citocinesis. Otra teoría de la existencia de estos anillos es la de que esta actina perinuclear puede estar involucrada en la migración de material desde el núcleo de la levadura madre para la formación de la hija durante la mitosis.

En cuanto al efecto del propóleo sobre las células, un estudio realizado en 2009, en el que se evaluó la actividad antimicrobiana del propóleo frente a aislados de *Staphylococcus coagulasa* positiva y *M. pachydermatis* de otitis canina, presentó una CFM para ésta levadura de 2.4 mg/mL utilizándose la técnica de microdilución en caldo (Cardoso, 2009), mientras que Tovar (2016) encontró que a partir de una CMF de 0.25 mg/mL ocurren alteraciones en la morfología de *M. pachydermatis* tales como cambios en la morfología estándar, disminución de tamaño, zonas rugosas de la superficie celular y presencia de poros en las levaduras. Sin embargo, en este trabajo obtuvimos una dosis contra la levadura a partir de 0.5 mg/mL, misma que al ser utilizada sobre los cultivos celulares causó daño celular a las pocas horas de su aplicación, mientras que una dosis menor (0.25 mg/mL) fue inocua para los cultivos celulares las primeras 48 horas, causando alteraciones a partir de las 72 horas. Por su parte, otro estudio menciona que el extracto etanólico de propóleo a una dosis de 0.458 mg/mL afecta la viabilidad celular. Esta pérdida de viabilidad es dependiente tanto de las concentraciones del extracto, como del tiempo de exposición (48 horas). Además, hace mención que el EEP parece ser un compuesto altamente citotóxico, puesto que al utilizar concentraciones bajas induce cambios morfológicos y muerte celular, y encontrando que las células son más tolerantes al propóleo hidrosoluble, ya que a concentraciones altas las células aún son viables (Martínez, 2017).

Si bien en este trabajo no se logró observar el efecto del propóleo contra *M. pachydermatis*, este trabajo brindó dos aportaciones importantes para el estudio y la comprensión de la enfermedad padecida por esta levadura:

Primero, se estableció un modelo de infección *in vitro* de cultivos celulares (células RK13, HeLa y Vero) expuestas a *M. pachydermatis* gracias al cual fue posible visualizar los eventos de adhesividad y daño ocasionados por las levaduras mediante la observación de los cambios morfológicos de las células en cultivo y de la estructura de los filamentos de actina. Este modelo permitirá realizar estudios de patogénesis de la enfermedad a nivel celular, subcelular, ultraestructural y molecular que nos permitan comprender y explicar las alteraciones patológicas

y signos que se observan en los pacientes. Así mismo podrá servir como modelo de estudio para la evaluación de fármacos y otras estrategias terapéuticas contra la enfermedad producida por esta levadura.

Segundo, nos permitió corroborar que el modelo es adecuado para el estudio de la patogenia de la infección por *M. pachydermatis*, ya que fue posible demostrar que las levaduras se adhirieron al cultivo formando colonias en forma de racimos de uva y el efecto que tienen sobre las células, los hallazgos más importantes que se encontraron fueron alteración de la morfología celular y de la estructura de los filamentos de actina así como sobrecrecimiento de la monocapa en los sitios de adherencia de las levaduras lo cual explicaría en parte las lesiones óticas y signos manifestados en las especies animales afectadas.

Por último, también se hizo una aportación con relación a la estructura del citoesqueleto de actina en la levadura. Los filamentos de actina dan origen a cables y parches en las levaduras y en el caso de *M. pachydermatis* también forman anillos perinucleares reportados solo en *Fellomyces fuzhouensis* y *Cryptococcus neoformans*. Estas aportaciones no se han reportado hasta el momento, por lo que esta información sería una primicia sobre los aspectos celulares de la infección que permitiría comprender parte de la patogénesis de la enfermedad.

CONCLUSIONES

- 1) Se obtuvo el perfil químico del propóleo recolectado del apiaro de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán mediante ensayos de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
- 2) Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria y Mínima Fungicida del extracto del propóleo sobre la cepa de referencia de *M. pachydermatis*.
- 3) Se estableció un modelo de infección *in vitro* con *M. pachydermatis* en cultivos de células RK13, HeLa y Vero.
- 4) Se demostró la adhesión de *M. pachydermatis* a las células en cultivo formando colonias con una morfología similar a racimos de uva.
- 5) *M. pachydermatis* alteró la estructura de los cultivos celulares; mediante la observación de los cultivos a través de microscopía óptica se observaron cambios en la morfología celular seguidos de muerte celular con destrucción de la monocapa celular.
- 6) Mediante ensayos de fluorescencia directa se demostró la alteración de la estructura de los filamentos de actina consistentes en pérdida de las fibras de estrés y alteraciones de la corteza celular.
- 7) En los ensayos de fluorescencia directa se determinaron cambios en la morfología de las células y la formación de agregados en forma circular en los sitios de adhesión de las levaduras.
- 8) Mediante el análisis con microscopía confocal fue posible demostrar que los agregados celulares correspondían a un sobrecrecimiento en varios estratos de los cultivos de células RK13 y HeLa en los sitios de adhesión de las levaduras y la formación de agregados celulares en los cultivos de células Vero que cubrían a las colonias de *M. pachydermatis* en estructuras con una morfología similar a esferas.
- 9) A través del análisis mediante microscopía confocal se demostró la pérdida de la forma celular, presencia de células redondeadas, formación de sincitios, lisis con desprendimientos de las células en cultivo con la consecuente destrucción de la monocapa.
- 10) Se reporta la presencia de anillos perinucleares de actina en *M. pachydermatis*.

11) La información aquí mostrada brinda un mayor acercamiento al mecanismo de patogenicidad de esta levadura, donde al no existir la interacción del sistema inmune u otros factores presentes en la infección *in vivo*, se postula que los cambios fueron inducidos por *M. pachydermatis*.

12) Se hicieron ensayos para evaluar el efecto del propóleo sobre *M. pachydermatis* en el modelo de infección *in vitro* de los cultivos de células RK13, HeLa y Vero. Se probaron diferentes tipos de propóleo (extracción alcohólica y acuosa) a diferentes concentraciones, pero se observó que a las CMI y CMF más bajas, en los tiempos requeridos para los ensayos de infección, el propóleo ocasionaba daño a las células en cultivo.

PROSPECTIVAS

- a) Analizar mediante ensayos de microscopía de fluorescencia y análisis confocal el efecto de *M. pachydermatis* sobre los otros elementos del citoesqueleto (microtúbulos y filamentos intermedios).
- b) Llevar a cabo ensayos de microscopía electrónica de transmisión y barrido para evaluar a nivel ultraestructural el proceso de infección de los cultivos celulares con *M. pachydermatis*.
- c) Aislar y caracterizar las proteínas, enzimas u otras moléculas secretadas por *M. pachydermatis* durante el proceso de infección de los cultivos celulares para evaluar su participación en la inducción de las alteraciones ocasionadas por la levadura en las células en cultivo.
- d) Realizar cambios en el protocolo de evaluación del efecto del propóleo sobre *M. pachydermatis* en un sistema *in vitro*.
- e) Aislar los principales principios activos del propóleo y utilizarlos para evaluar su efecto sobre *M. pachydermatis* en el modelo de infección *in vitro* establecido en este trabajo.
- f) Evaluar clínicamente la actividad antifúngica de los principios activos que hayan demostrado actividad contra *M. pachydermatis* en los modelos experimentales *in vitro*, para ser utilizados en modelos animales haciendo la evaluación de su eficacia terapéutica a nivel clínico y mediante análisis histopatológicos.
- g) Elaborar un producto con base a los principios activos del propóleo con actividad terapéutica antifúngica para el tratamiento tópico de la otitis y dermatitis ocasionadas por *M. pachydermatis*.

LITERATURA CITADA

- Ahearn, D. G. y Simmons R. B. (1998). *Malassezia* Baillon, p 782-784, en: C. P Kurtzman y J. W. Fell (eds). The yeasts, a taxonomic study, 4° ed. Elsevier, Amsterdam.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. (2015). Molecular Biology of The Cell. (6th ed). Garland Science.
- Allen HB, Goyal K, Ogrich L, Joshi S (2015). Biofilm Formation by *Malassezia Furfur/Ovale* as a Possible Mechanism of Pathogenesis in Tinea Versicolor. J Clin Exp Dermatol Res 6:3-11
- Al-Sweih, N, Ahmad S, Josep L, Khan S, Khan Z. (2014). *M. pachydermatis* fungemia in a preterm neonate resistant to fluconazole and flucytosine. Med Mycol Case Rep. Jul; 5: 9-11.
- Atre AN, Surve SV, Shouche YS, Joseph J, Patole MS, Deopurkar R.L. (2009). Association of small Rho GTPases and actin ring formation in epithelial cells during the invasion by *Candida albicans*. FEMS Immunol Med Microbiol, 55: 74-84
- Amal K, Saabeh H, Al-Mayah H, Athbi M (2011). *In vitro* activity of alkaloids extracted of Chlorophyta and Cyanophyta against the hydatid disease compared with albendazole. Thi Qar Medical Journal Vol (5) No (3): 56-70.
- Bankova V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. J Etnopharmacol. 100: 114-117.
- Baroni A, Perfetto B, *et al.* (2001). *Malassezia furfur* invasiveness in a keratinocyte cell line (HaCat): effects on cytoskeleton and on adhesión molecule and cytokine expression. Arch dermatol Res 293: 414-419
- Boekhout T, Guého-Kellermann E, Mayser P, Velegraki A. (2010). *Malassezia* and the skin. Science and Clinical Practice. Springer Verlag Berlin.
- Bond R, Anthony RM (1995). Characterization of markedly lipid-dependent *M. pachydermatis* isolates from dogs. J Appl Microbiol 78:537-542.
- Bonifaz A. (2015). Micología Médica Básica, 5ta ed. McGraw-Hill.
- Bracho J. (2003). Calidad de propóleos de origen argentino. I. Propiedades organolépticas. Vida Apícola 118:52-59.
- Burdock G. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. Food Chem Toxicol 36(4): 347- 363.
- Cafarchia C, De Laurentis N, Milillo M, Losacco V, Puccini V. (1999). Antifungal activity of Apulia Region propolis. Parassitologia. 41(4): 587-590.
- Canizzo F, Eraso E, Ezkurra P. *et al.* (2007). Biofilm development by clinical isolates of *Malassezia pachydermatis*. Med Mycol 45: 357-361

- Cardoso RL. (2009). Atividade antimicrobiana do extracto do própolis frente a isolados de *Staphylococcus coagulase positiva* de *M. pachydermatis* de otite canina. Tesis de Maestría. Universidad Federal de Santa María, Brasil.
- Carlier MF, Pernier J, Sankara B. (2013). Control of Actin Filament Dynamics at Barbed Ends by WH2 Domains: From Capping to Permissive and Processive Assembly. *Cytoskeleton*, 70:540–549.
- Chang HJ, Miller HL, Watkins N, Arduino MJ, Ashford DA, Midgley G, *et al.* (1998). An epidemic of *Malassezia pachydermatis* in an intensive care nursery associated with colonization of health care workers pet dogs. *N Engl J Med*. 338: 706.
- Cheng MF, Yang YL, Yao TJ, Lin CY, Liu JS, Tang RB (2005). Risk factors for fatal candidemia caused by *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species. *BMC Infect Dis* 5: 22.
- Coutinho SD, Paula CR. (2000). Proteinase, phospholipase, hyaluronidase and chondroitin-sulphatase production by *Malassezia pachydermatis*. *Med Mycol*. 38: 73–76.
- Cushnie T. y Lamb A. (2005). Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. *Journal of Ethnopharmacology*. 101: 243–248.
- Delanote V, Vandekerckhove J, Gettemans J. (2005). Plastins: versatile modulators of actin organization in (patho)physiological cellular processes. *Acta Pharmacologica Sinica* 26 (7): 769–779.
- Desai, J. V., Mitchell, A. P., & Andes, D. R. (2014). Fungal Biofilms, Drug Resistance, and Recurrent Infection. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(10).
- Erra R. (2004). Del volar de las proteínas y de cómo lograrlo (espectrometría de masa UV-MALDI). *Química viva* 3 (2)
- Fierro W. (2000). Capacidad antioxidante de los polifenoles del propóleos. Congreso Internacional sobre Propóleos. Buenos Aires. 75-85.
- Figueredo L, Cafarchia C, Desantis S, Otranto D. (2012). Biofilm formation of *Malassezia pachydermatis* from dogs. *Veterinary microbiology* 160: 126-131.
- Flores I, Moreno M, Londoño A, Cruz T. (2016). Use of Mexican Propolis for the Topical Treatment of Dermatofytosis in Horses. *Op Jour of Vet Med* 6: 1-8.
- Galkin V, Orlova A, Egelman E. (2012). Actin Filaments as Tension Sensors. *Current Biology* 22: 96-101.
- García E, Jay D. (2006). Filamina plaquetaria: Una proteína del citoesqueleto integradora de la función celular. *Arch Cardiol Mex* 76: 67-75.
- Giusiano G. (2006). *Malassezia*: Estado del conocimiento y perspectivas en su estudio. *Revista Argentina de Microbiología* 38: 41-48.

- Gouin, E., Welch, M., Cossart, P. (2005). Actin-based motility of intracellular pathogens. *Current Opinion in Microbiology* 8:35-45.
- Guého, E., Midgley, G., Guillot, J. (1995). The diversity of *Malassezia* yeasts confirmed by rRNA sequence and nuclear DNA comparisons. *Anton Leeuw Int J.* 67 (3), 297-314
- Gupta A, Kohli Y, Summerbell R. (2000). Molecular differentiation of seven *Malassezia* species. *J Clin Microbiol* 38: 1869-1875.
- Gutiérrez E. (2011). Actividad antibacteriana y perfil químico de propóleos mexicanos sobre cepas de *Pasteurella multocida* aisladas de Conejos. Tesis de Mestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gutiérrez M, Droguet M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín Intexter* 122: 35-41.
- Heckman C, Plummer H. (2013). Filopodia as sensors. *Cellular Signalling* 25: 2298–2311.
- Helgeson L, Prendergast J, Wagner A, Rodnick-Smith M, Nolen B. (2014). Interactions with actin monomers, actin filaments and Arp2/3 complex define the roles of WASP family proteins and cortactin in coordinately regulating branched actin networks. *JBC Papers in Press*.
- Imhof M, Lipovac M, Kurz C, Barta J, Verhoeven H, Huber J. (2005). Propolis solution for the treatment of chronic vaginitis. *Int J Gynaecol Obstet* 89(2): 127- 132.
- Jiménez A. (2016). Importancia del biofilm bacteriano en la otitis externa. *Vang Veterin.* Disponible en:
<http://www.vanguardiaveterinaria.com.mx/importancia-del-biofilm-bacteriano>
- Kamatou P, Viljoen, M. (2010). A review of the application and pharmacological properties of α -Bisabolol and α -Bisabolol-rich oils. *Chemists' Society.* 87 (1): 1–7.
- Kopecka M, Yoshida S, Yamaguchi M. (2012). Actin ring formation around the cell nucleus of long-neck yeast. *J Electron Microsc* 61(4): 249-255.
- Kopecka M, Kawamoto S, Yamaguchi M. (2013). A new F-actin structure in fungi: actin ring formation around the cell nucleus of *Cryptococcus neoformans*. *Microscopy (Oxf).* 62(2): 295-301.
- Kroon, P.A. y Williamson, G. (1999). Hidroxicinnamates in plants and food: current and future perspective. *Journal of Food Science and Agriculture.* 79: 355-361.
- Kumar A, Singh K, Sharma A. (2002). Prevalence of *Malassezia pachydermatis* and other organisms in healthy and infected dog ears. *Israel J Vet Med* 57, 145-148.
- Kumar A, Nair M, Hema P, Mohan J, Santhoshkumar T. (2007). Pinocembrin trigger Bax - dependent mitochondrial apoptosis in colon cancer cells. *Molecular carcinogenesis*, vol 46-3: 231-241.

- Kuzan A. (2016). Thymosin β as an Actin-binding Protein with a Variety of Functions. *Adv Clin Exp Med* 25 (6): 1331-1336.
- Kuskoski, E. M., *et al.* (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar la capacidad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia y Tecnología de Alimentos* 25(4): 726-732.
- León Gonzáles, V. (2012). Estudio químico de un propóleo recolectado en la zona rural del Distrito Federal. Evaluación de su actividad antibacteriana contra bacterias patógenas orales. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Leoncini I, Le Conte Y, Costagliola G, Plettner E, Toth AL, Wang M, Huang Z, Bécard JM, *et al.*, (2004). Regulation of behavioral maturation by a primer pheromone produced by adult worker honey bees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (50): 17559–17564.
- Londoño A, Penieres J, García C. G, Carrillo L, Quintero L, García S, Mendoza S, Cruz T. A. (2008). Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja *Apis mellifera* proveniente del Estado de México. *Tecnología en Marcha*, Vol. 21-1.
- Londoño A. (2010). Estudio comparativo de la actividad antifúngica de un extracto mexicano de propóleo y de tres plantas que la *Apis mellifera* usa para su producción. Tesis de Doctorado. Universidad de Costa Rica.
- López, M.G. (2001). Una sinfonía de aromas. Avance y perspectiva, Unidad Irapuato, CINVESTAV. vol. 20. p. 421-424
- Lorch J, Palmer J, Vanderwolf K, Schmidt K, Verant L, Weller T, Blehert D. (2018). *Malassezia vespertilionis* sp. nov.: a new cold-tolerant species of yeast isolated from bats. *Persoonia* 41: 56-70.
- Lozina, L., Acosta, O., Boehringer, S., Teibler, P. (2004). Acción del propóleos sobre levaduras (*Malassezia pachydermatis*) asociadas a otitis externas en caninos. Universidad Nacional del Nordeste, Comunicaciones Científicas y Tecnológicas.
- Martín J, Tejedor M, Lupiola P, Morales M, González Z. (2001). Relación entre la presencia de *Malassezia pachydermatis* y los signos clínicos encontrados en cuadros de otitis crónicas caninas en una población de perros de raza Podenco canario. *Clin Vet Peq Anim.*; 21(2): 103-111.
- Martínez Y. (2017). Evaluación in vitro de la actividad antiviral de dos propóleos del Estado de México contra el virus del distemper canino. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México. pág. 30-31.
- Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras J. y Tuñón M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Revisión. *Nutrición Hospitalaria*. 8(6): 271-278.
- Mauldin E, Scott D, Miller W, Smith C. (1997). *Malassezia* dermatitis in the dog: A retrospective histopathological and immunopathological study of 86 cases (1990-1995) *Vet Dermatol.*; 8(3): 191-202.

- Maurya AK, Singh M, Dubey V, Srivastava S, Luqman S, Bawankule DU. (2014). α -(-)-bisabolol reduces pro-inflammatory cytokine production and ameliorates skin inflammation. *Curr Pharm Biotechnol.* 15(2):173-81.
- Montenegro G, Timmermann B, Valcic S, Avila G, Sotolongo L, Mujica A (1997). Origen botánico y composición química de propóleos de la Zona Central de Chile. XL Reunión Anual Soc. Biol. Chil Pucón, Chile, 25-34.
- Morse N. (2015). Are some health benefits of palmitoleic acid supplementation due to its effects on 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)? *Lipid Technology*, 27: 278-281
- Muñoz A, Castrejón N *et al.* (2016). *Candida glabrata* survives and replicates in human osteoblasts. *Pathogens and Diseases*, 74: 1-11.
- Nakagaki K, Hata K, Iwata E, Takeo K. (2000). *Malassezia pachydermatis* isolated from a South American Sea Lion (*Otaria byronia*) with dermatitis. *Journal of veterinary Medical Science.* 62(8): 901-903.
- Naumanen P, Lappalainen P, Hotulainen P. (2008). Mechanism of actin stress fibre assembly. *Journal of Microscopy*, 231: 446-454.
- Nowakiewics A., Ziolkowska G. (2013). Comparative analysis of protein profiles of *Malassezia pachydermatis* strains isolated from healthy dogs and dogs with otitis externa. *Poland Bull Vet Inst Palawy*, 57: 41-46.
- Ochoa A, Escalona J, Fehine J, García J, *et al.* (2015). Estudio fitoquímico de un extracto apolar de las hojas de *Excoecaria lucida* Sw *Euphorbiochoaaceae*. *Cienc amaz Iquitos* 5(2): 175-236.
- Oliver, G.M.R., García T.C.G., Juárez M.L, and Navarro, G.F. (2008). Infection of rabbit kidney cells (RK13) by enteropathogenic *Escherichia coli* as a model to study the dynamics of actin cytoskeleton. *Can. J. Microbiol.* 54: 748-757.
- Olivry T, Deboer DJ, Lloyd DH. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis: forewards and lexicon. *Vet Immunol Immunopathol* 81:143146.
- Ortega, G. (2016). Evaluación de los cambios observados en los filamentos de actina de la línea celular RK13 durante la infección con *Candida albicans*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Passey S, Pellegrin S, Mellor H. (2004). What is in a filopodium? Starfish versus hedgehogs. *Biochemical Society Transactions Volume 32*, part 6: 1115-1117.
- Patel A, Forsythe P. (2008). Otitis externa and otitis media in a dog. *Saunders Solutions in Veterinary Practice-Small Animal Dermatology* pág. 325.
- Pereira, N. J. (2003). Determinación de la presencia y número de *Malassezia pachydermatis* en el canal auditivo externo de perros clínicamente sanos de la Ciudad de México. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

- Plascencia, G. (2010). Curso de métodos. Espectrometría de masas. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, UNAM.
- Pollard T, Borisy G. (2003). Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments. *Cell* 112: 453-465. Pollard T, Earnshaw W. (2008). *Cell biology*. Elsevier Saunders. 9: 571-692.
- Quintero, M. L., Londoño, A., Soto, C. I., García, C. G., Carrillo, L., Penieres, J. G., Cruz, T. A. (2011) Structural and genetic alterations of fungal cells caused by mexican propolis. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances* 1066-1073
- Radlinsky M, Mason D, (2005). Diseases of the ears, nose and throat. In: *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 7th Ed, W. B. Saunders Co, pp.: 1011- 1030.
- Razul A, Millimouno F, Eltayb W, Ali M, Li J, Li X. (2013). Pinocembrin: a novel natural compound with versatile pharmacological and biological activities. *Biomed Research International* 1-9.
- Rodríguez, B. (2015). Perfil químico de propóleos mexicanos para su aplicación en medicina veterinaria. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Roubinet C, Tran P, Piel M. (2012). Common Mechanisms Regulating Cell Cortex Properties During Cell Division and Cell Migration. *Cytoskeleton*, 69:957–972.
- Rouessec A., Rouesseac F., (2003). *Análisis Químico: Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas*, Madrid: Mc Graw Hill, 464 pp.
- Salah S, Makni F, Marrakchi S, Sellami H, Cheikhrouhou F, Bouassida S, Zahaf A, Ayadi A. (2005). Identification of *Malassezia* species from Tunisian patients with pityriasis versicolor and normal subjects. *Mycoses*; 48: 242-245.
- Salbreux G, Charras G, Paluch E. (2012). Actin cortex mechanics and cellular morphogenesis. *Trends in Cell Biology*, Vol. 22, No. 10 536-545.
- Schindler B, Segal E (2008). *Candida albicans* metabolite affects the cytoskeleton and phagocytic activity of murine macrophages. *Med Mycol.* 46 (3): 251-8.
- Scott G, Leopardi S, Printup S, Madden B. (2002). Filopodia are conduits for melanosome transfer to keratinocytes. *Journal of Cell Science* 115, 1441-1451.
- Shaheen, S. A., M.H. Zarga, I.K. Nazer, R.M. Darwish, H.I. (2011). Chemical constituents of Jordanian propolis, *Nat. Prod. Res.*, 25(14), 1312-1318.
- Shekhar S, Pernier J, Carlier. (2016). Regulators of actin filament barbed ends at a glance. *Journal of Cell Science* 129, 1085-1091
- Small J, Auinger S, Nemethova M, *et al.* (2008). Unravelling the structure of the lamellipodium. *Journal of Microscopy*, 231: 479–485.

- Sulaiman G, Al-Sammarrae A, Ad'hiah, M. Zucchetti, R. Frapolli, E. Bello *et al.* (2011). Chemical characterization of Iraqi propolis samples and assessing their antioxidant potentials, *Food Chem. Toxicol.*, 49(9), 2415-2421.
- Sherer N, Mothes W. (2008). Cytonemes and tunneling nanotubules in cell–cell communication and viral pathogenesis. *Trends Cell Biol.* 18(9): 414–420.
- Tártara G. (2016). *Malassezia spp* en perros y gatos: relevamiento bibliográfico: casos, tratamientos. - 1a ed. - Rosario: UNR Editora.
- Thayikkannu, A. B., Kindo, A. J., & Veeraraghavan, M. (2015). *Malassezia*—Can it be Ignored? *Indian Journal of Dermatology*, 60(4), 332–339.
- Tojkander S, Gateva G, Lappalainen P. (2012). Actin stress fibers – assembly, dynamics and biological roles. *Journal of Cell Science* 125, 1855–1864
- Tovar N. (2016). Evaluación antimicótica *in vitro* del propóleo mexicano sobre *Malassezia pachydermatis*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Vallance, B., Finlay, B. (2000). Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 8799-8806.
- Walia M, Mann T, Kumar D, Agnihotri V, Singh B. (2012). Chemical composition and In vitro cytotoxic activity of essential oil of leaves of *Malus domestica* growing in Western Himalaya (India). *Evid Based Complement Alternat Med.*:649-727.
- Wang Q, Theelen B, Groenewald M, *et al.* (2014). Moniliellomycetes and Malasseziomycetes, two new classes in the Ustilaginomycotina. *Persoonia* 33: 41–47.
- Weidman, F.D. (1925). Exfoliative dermatitis in the Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*), with description of a new species: *Pityrosporum pachydermatis*. En: Fox, H. (ed). *Rep lab Museum Com Pathol Zoo Soc Philadelphia*. Philadelphia, 36-43.
- Yang W, Yan L, Wu C, Zhao X, Tang J. (2014). Fungal Invasion of Epithelial Cells. *Microbiol Res* 169: 803-810.
- Zachary JF, McGavin MD. (2012). *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. (5th ed). Elsevier.
- Zhang A, Robins P, Averill P, Weber D, Linn C, Roelofs W, Villani M. (2003). Identification of the female-produced sex pheromone of the scarab beetle, *Hoplia equina*. *J Chem Ecol.* Jul;29 (7): 1635-42.

Anexo 1

Publicación del artículo Evaluation of Changes in Actin Filaments of RK13 Cells Infected With *Malassezia pachydermatis*, el 18 de febrero de 2018.

Disponible en: http://file.scirp.org/pdf/OJVM_2018022714574777.pdf



Open Journal of Veterinary Medicine, 2018, 8, 15-24
<http://www.scirp.org/journal/ojvm>
ISSN Online: 2165-3364
ISSN Print: 2165-3336

Evaluation of Changes in Actin Filaments of RK13 Cells Infected with *Malassezia pachydermatis*

Iris del Socorro Flores Rodríguez¹, Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez¹, José Luis Nieto Bordes², Francisco Rodolfo González Díaz², Carlos Ignacio Soto Zárate², Carlos Gerardo García Tovar^{2*}

¹Laboratorio 6 de Biotransacción Microbiológica, Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, Cuautitlán Izcalli, México

²Laboratorio 4 de Morfología Veterinaria y Biología Celular, Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, Cuautitlán Izcalli, México

Email: *cgarciatov@yahoo.com.mx

How to cite this paper: Flores I, Cruz, T.A., Nieto, J.L., González, F.R., Soto, C.I. and García, C.G. (2018) Evaluation of Changes in Actin Filaments of RK13 Cells Infected with *Malassezia pachydermatis* *Open Journal of Veterinary Medicine*, 8, 15-24.

<https://doi.org/10.4236/ojvm.2018.82003>

Received: December 14, 2017

Accepted: February 25, 2018

Published: February 28, 2018

Copyright © 2018 by authors and Scientific Research Publishing Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Abstract

Background: *Malassezia pachydermatis* is the main causative agent of canine otitis and also of a myriad of dermatological problems in companion animals; its interaction mechanisms with host cells are still unclear. **Objectives:** To establish an *in vitro* infection model of *M. pachydermatis*-exposed RK13 cells in order to evaluate cell morphological changes as well as changes in the structure of actin filaments. **Methods:** Cultures of RK13 cells were infected with *M. pachydermatis*; alterations caused by the yeast were evaluated by optical and fluorescence microscopy. **Results:** *M. pachydermatis* adheres itself to the cell and produces the formation of multiple agglomerates that cause changes in cell morphology, formation of cell aggregates in overlays, presence of syncytia and destruction of cell culture structure. The damaged cells presented changes in the actin filaments consisting of thickening of the cell cortex and loss of stress fibers. On the other hand, the formation of perinuclear actin rings in the yeasts was observed. **Conclusions:** An *in vitro* infection model was established with *M. pachydermatis* and alterations in cell morphology were observed consisting of changes in the structure of the actin filaments, overgrowth of the cells and the presence of syncytia.

Keywords

Malassezia pachydermatis, RK13 Cells, Actin Filaments

1. Introduction

Malassezia pachydermatis is a yeast of great importance in veterinary medicine, it is part of the skin's normal microbiota of many animals and it is associated with changes in the immunological mechanisms of its host; the proliferation of this yeast can result in the clinical presentation of otitis, seborrhea, atopy and allergic dermatitis [1]. The external acoustic meatus represents a fragile environment in which inflammatory changes are capable of causing alterations in the skin's microbiota such that the uncontrolled proliferation of *M. pachydermatis* becomes a perpetuating factor of canine external otitis. By itself, this yeast is responsible for about 30 to 80% of canine otitis externa cases and is also associated with about 30% of seborrhetic dermatitis and atopy cases in dogs [2] [3]. In humans, *M. pachydermatis* can cause fungaemias, especially in newborns that are kept in intensive therapy [4] and in immunocompromised patients; moreover, it has been observed that it can even cause alterations in immunocompetent patients, thus revealing its zoonotic potential [5].

In spite of being one of the main causative agents responsible for a number of cutaneous problems in animals, many of its pathogenic mechanisms are still poorly understood, especially those relating to its normal presence as part of the skin's microbiota, which creates immunological tolerance.

Recent studies have mainly focused on determining the events of the interactions between pathogens and host cells that give rise to colonization and the creation of a specialized niche that ensures pathogen survival [6] [7]. A common target of these studies is the host cell's cytoskeleton, which is utilized by different pathogens (virus, bacteria and fungi) for several purposes, including attachment, internalization, movement between and inside cells, vacuole formation, remodeling and avoidance of phagocytosis [8] [9].

Actin filaments are a part of the cytoskeleton that are related to the maintenance and changes in cell shape and movement by means of structures that are formed by the rearrangements of the filaments induced as a response to diverse intra and extracellular signals. In mammal cells these filaments form bundles and networks that give rise to structures such as the cellular cortex, stress fibers and lamellipodia [10] [11] [12]. In yeasts they form patches and cables [13].

Little is known about the pathogenic mechanisms that this yeast exerts on the tissues it affects. During colonization and diffusion of the pathogen, a key role is played by the changes induced in actin filament organization, which is a mechanism that has already been demonstrated by other yeast such as *Sporothrix schenckii*, *Candida albicans*, *Candida glabrata* y *Malassezia furfur*, therefore, it is possible that *Malassezia pachydermatis* also exhibits such mechanism [9] [14] [15] [16].

The objective of the present study was to establish an *in vitro* model of RK13-cell infection with *M. pachydermatis* and to evaluate the capacity of this yeast to colonize the culture, as well as the alterations in cell morphology and in the actin filaments.

2. Materials and Methods

2.1. *M. pachydermatis* Culture and Growth Conditions

M. pachydermatis (reference strain ATCC-14522), generously donated by Dr. Tonatuh Cruz from the laboratory 4 of the Multidisciplinary Research Unit, UNAM, Cuauttlán was cultured for 72 hours at 33°C in Sabouraud dextrose agar (BD Bioxon), containing 1% casein and 4% dextrose. Yeasts were recollected from solid medium, washed three times with PBS and resuspended in SDA liquid medium.

2.2. RK13 Cell Culture

RK13 cells (ATCC CCL-37) were cultured in DMEM medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and were kept at 37°C in an atmosphere with 5% CO₂ and 95% humidity.

2.3. RK13 Cell Infection with *M. pachydermatis*

Cells were seeded in 24-well culture plates that contained previously sterilized rounded coverslips. Cellular cultures were divided into three groups: Group I, uninfected control culture; Group II, cells cultured in SDA medium only, and group III, cellular culture infected with *M. pachydermatis*. Cells were infected at a ratio of 10:1 (1×10^6 yeasts). Each assay was performed three times and each time was monitored at 24, 48 and 72 hours post incubation at 37°C.

2.4. Evaluation of Adherence Capacity and Damage to the Cellular Monolayer

Evaluation of *M. pachydermatis*-infected RK13 cells was realized by optical microscopy with the intention of determining the presence of morphological changes in the cellular cultures, as well as the formation of yeast colonies. In order to do this, coverslips containing the cultures from each of the three groups were taken from the wells at 24, 48 and 72 hours and washed with PBS in order to remove any non-adhered yeasts. After this, all cultures were fixed with 10% aqueous formalin in PBS, mounted on microscope slides and observed.

2.5. Evaluation of the Changes Induced on the Actin Filaments

Interaction between the yeast and culture cells was evaluated by double-staining direct fluorescence. Coverslips with RK13 culture cells from control and infected groups were removed from their medium, fixed with 10% aqueous formalin in PBS during 20 minutes, permeated with 0.5% Triton X-100 in PBS for 5 minutes, and to help reduce nonspecific binding the cells were incubated with 1% BSA in PBS during 20 minutes. For detection of the actin filaments, we use Tetramethyl Rhodamine-IsoThioCyanate (TRITC) labeled Phalloidin (Sigma-Aldrich*), diluted 1:100 in PBS during 20 min in a humid chamber under conditions of darkness. Finally, the coverslips were mounted on slides using mounting medium with 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI), to detect the nuclei (Ultracruz*

Mounting Medium for Fluorescence, Santa Cruz, CA, USA).

2.6. Fluorescence Microscopy

In order to evaluate the changes induced by the yeast on the actin cytoskeleton, observation by fluorescence microscopy was performed (Zeiss Axiovert 40, coupled to an Evolution VF Cooled Color camera from Media cybernetics). Alterations encountered in cellular cultures and actin filaments were also analyzed by confocal microscopy (Nikon A1R STORM confocal microscope).

3. Results

Optic microscopy revealed that uninfected cells formed monolayers with normal structure and normal cellular morphology (Figure 1(a)), the same as the cells in SDA medium (data not shown). In contrast, yeast-infected cells displayed numerous changes in the structure of the monolayer as well as alterations in cellular morphology such as rounded cells and loss of the monolayer integrity. Formation of yeast colonies in grape-like clusters was also observed (Figure 1(c)).

Results from fluorescence microscopy revealed that infection by *M. pachydermatis* induces changes in the actin cytoskeleton. Uninfected cells (groups I and II) displayed a normal structure of the actin cytoskeleton (Figure 1(b)). Infected cells exhibited loss of cellular morphology on the yeast attachment sites to the cell, apparently overgrown cellular clusters in circular arrangements were formed, cells were elongated and rounded with loss of stress fibers and thickened cellular cortex (Figure 1(d)). When performing the analysis of the cultures in which actin filaments and nuclei were detected by the direct fluorescence assay, autofluorescence was observed in the yeasts.

An infected culture was examined by confocal microscopy, observing the formation of syncytia and small circular actin structures that corresponded to the yeast's attachment sites. These circular structures collocate with yeast's nuclei position when merge is performed, each nucleus is surrounded by actin filaments ring (Figure 2).

In order to demonstrate that *M. pachydermatis* was stimulating cellular culture overgrowth beyond that of a monolayer, uninfected and infected cellular cultures were analyzed by confocal microscopy, orthogonal view Z-stack. In Figure 3 we show uninfected and infected cellular cultures that correspond to the images obtained after they were merged.

Uninfected cellular cultures in the XY plane can be observed in Figure 3(a) and Figure 3(c), here we can appreciate the formation of an unaltered cellular monolayer, with normal cellular morphology and actin filaments with no structural changes. In Figure 3(b) an infected cellular culture is shown, here we can observe grape-like clusters of yeasts in their sites of attachment to the cells. Overgrown cellular aggregates with loss of normal morphology are also noticed (Figure 3(d)). In Figure 3(c) and Figure 3(d) orthogonal Z-stack views are shown, they further demonstrate the overgrowth of the monolayer. Uninfected

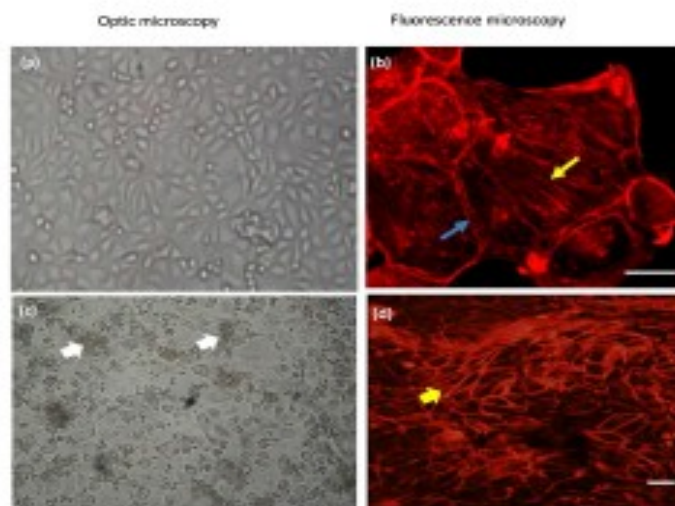


Figure 1. RK13 cells infected with *M. pachydermatis* (a) and (b): Uninfected control group; (c) and (d): *M. pachydermatis*-infected cellular culture. (b) and (d): Actin filaments detected with TRITC labeled phalloidine (direct fluorescence). (b): Cellular cortex (blue arrow), stress fibers (yellow arrow); (c): *M. pachydermatis* colonies (white arrow); (d): Circular cellular aggregates on the sites of yeast attachment (yellow arrow). (a), (c) and (d) (40 \times); b (100 \times). Barr = 10 μ m.

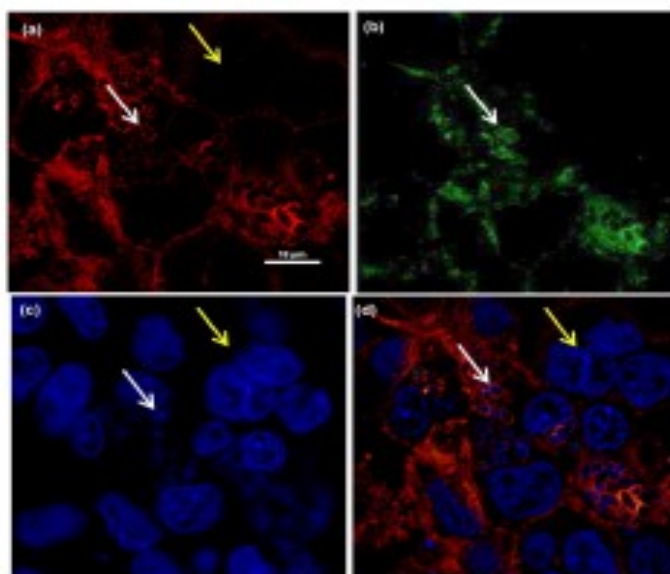


Figure 2. RK13 cells infected with *M. pachydermatis* showing syncytia formation and presence of yeast's perinuclear rings. (a) Actin filaments detected with TRITC labeled phalloidine; (b) *M. pachydermatis*; (c) Nuclei detected with DAPI; (d) Merge. Syncytia formation (yellow arrow) and yeast's perinuclear rings (white arrow). Confocal microscopy (60 \times). Barr = 10 μ m.

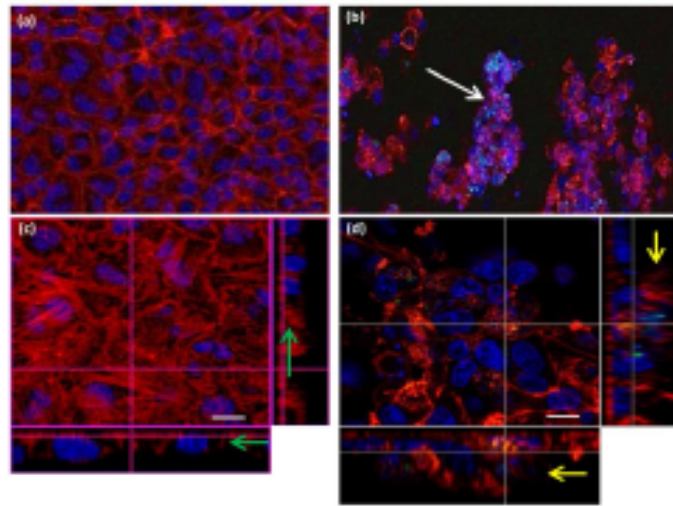


Figure 3. RK13 cells displaying overgrowth of the cellular monolayer during infection by *M. pachydermatis*. Direct fluorescence; actin filaments detected with TRITC labeled phalloidine, nuclei detected with DAPI and autofluorescent *M. pachydermatis* using a green wavelength. (a) and (c) Uninfected RK13 cells; (b) and (d) RK13 cells infected with *M. pachydermatis*. (a) and (b) correspond to the images obtained in the XY plane; (c) and (d), lateral and inferior boxes correspond to the orthogonal view Z-stack. B: Yeast colony (white arrow); (c) Orthogonal view Z-stack showing a 16 µm thick monolayer (green arrow); (d) Orthogonal view Z-stack showing an overgrown monolayer with a 32 µm thickness (yellow arrow). Confocal microscopy. Barr = 10 µm.

cellular cultures have a thickness of 16 µm and the presence of a single monolayer is clearly appreciated by the observation of all nuclei in a single plane (Figure 3(c)), in contrast, a thickened cellular layer of 32 µm can be observed in infected cultures, which correlates with a cellular overgrowth of several layers, this can also be easily noted by the observation of the nuclei in different strata (Figure 3(d)).

4. Discussion

In the last few years there has been an increasing interest in the study of the ability of the pathogens to invade and reproduce in non-phagocytic cells in order to ensure their survival. Yeasts such as *Candida albicans*, *C. glabrata* and *Malassezia furfur* are associated with chronic infections that are difficult to eliminate and their internalization in non-phagocytic cells by modulation of the actin cytoskeleton has been reported [14] [15] [16] [17]. However, *M. pachydermatis* capacity to invade epithelial cells and infect them through alterations of the actin filaments has not been studied.

The present study provides evidence that helps in the understanding of the interactions between a fungal pathogen and epithelial cells following an *in vitro* model. Our results show that *M. pachydermatis* induces alterations of the epi-

thelial cell monolayer's structure, causing changes in cell morphology and overgrowth of the cells, these extra-layers present changes in morphology and alterations in their actin filaments, as evidenced by the loss of stress fibers; syncytia formation was also observed. All of the previously mentioned alterations point to the fact that the cells are undergoing changes that are being induced by the yeasts.

In a previous work [17], it was pointed that the proliferation rate was similar for infected cells and those belonging to the control group, nonetheless, we observed an increase in cellular proliferation on the attachment sites of the yeast. According to that observed by confocal microscopy, such cellular aggregates supporting the theory that *M. pachydermatis* *in vivo* causes hyperkeratosis and hyperplasia, both of which are evident as macroscopic and histologic lesions [18] [19] and, hypothetically, the outcome of an inflammatory and/ or an hypersensitivity reaction to the substances secreted by the yeasts and its antigens [20] [21] [22], such as: alkaline and acid phosphatase, sulfatase chondroitin, esterase, galactosidase, glucosidase, hialuronidase, lipase, lectinase, peroxidase, protease and urease, among others that have been the target of great interest and may be pathogenically involved [23] [24]. The damage caused by the presence of the yeast, according to our observations, could relate to the release of such enzymes instead of being a consequence of an immune reaction, given the fact that during the course of this study only an infected culture was used and cellular proliferation was observed in the attachment sites between the yeasts and cells, which in turn suggest that changes are induced in order to act as means by which the yeast protects itself and avoids immune responses. These findings could help to understand the pathogenic mechanism of this yeast and to explain the presence of epidermic hyperkeratosis observed in biopsies obtained from infected tissues, as well as the difficulties encountered during the therapeutic management of otitis and dermatitis caused by *M. pachydermatis*.

Small circular actin structures limiting the nucleolus of the yeasts were also observed, such structures could correlate to the presence of actin rings that have been previously reported in *Falcomyces fuzhouensis* [25] and *Cryptococcus neoformans* [26].

5. Conclusion

In conclusion, we were able to establish an infection model of RK13 cells by *M. pachydermatis*. Yeasts adhered themselves to culture cells forming grape-like colonies. The more relevant findings were: alterations in cellular morphology and in the structure of the actin filaments; monolayer overgrowth in the sites of yeast attachment and syncytia formation. Also of relevance, is the fact that, to our knowledge, this constitutes the first study to report the presence of perinuclear rings in *M. pachydermatis*. These findings will help to further clarify the pathogenic mechanism of this yeast and to explain the presence of epidermic hyperkeratosis observed in biopsies obtained from infected tissues as well as the

difficulties encountered during the therapeutic management of otitis and dermatitis caused by *M. pachydermatis*.

Acknowledgements

We are grateful to the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) México for grant # 71312, afforded for the carrying out of Master in Science studies, as well as for projects PAPIIT IT 200915 (DGAPA-UNAM), PIAPI 1632 and PIAPI 1602 (FES-Cuauttlán UNAM).

Conflict of Interest

The authors declare that this article has not been send to nor published by other journals and that no conflict of interest exists.

References

- [1] Hnilica, K.A. and Patterson, A.P. (2017) *Small Animal Dermatology*. 4th Edition, Elsevier, Amsterdam.
- [2] Kumar, A., Singh, K. and Sharma, A. (2002) Prevalence of *Malassezia pachydermatis* and Other Organisms in Healthy and Infected Dog Ears. *Brazil Journal of Veterinary Medicine*, 57, 145-148.
http://www.fcrarian.net/navon/paper/PREVALENCE_OF_MALASSEZIA_PACHYDERMATIS_AND_OTHER_.pdf?paperid=19497534
- [3] Nowakiewicz, A. and Ziolkowska, G. (2013) Comparative Analysis of Protein Profiles of *Malassezia pachydermatis* Strains Isolated from Healthy Dogs and Dogs with Otitis Externa. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 57, 41-46.
<https://www.degruyter.com/downloadpdf/j/bvtp.2013.57.issue-1/bvtp-2013-0008/bvtp-2013-0008.pdf>
- [4] Al-Sweth, N., Ahmad, S., Josep, L., Khan, S. and Khan, Z. (2014) *Malassezia pachydermatis* Fungemia in a Preterm Neonate Resistant to Fluconazole and Flucytosine. *Medical Mycology Case Reports*, 5, 9-11.
<https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2014.04.004>
- [5] Fan, Y.M., Huang, W.M., Li, S.F., Wu, G.F., Lai, K. and Chen, R.Y. (2006) Granulomatous Skin Infection Caused by *Malassezia pachydermatis* in a Dog Owner. *Archives of Dermatology*, 142, 1181-1184.
<https://doi.org/10.1001/archderm.142.9.1181>
- [6] Goutin, E., Welch, M.D. and Cossart, P. (2005) Actin-Based Motility of Intracellular Pathogens. *Curr Opin Microbiol*, 8, 35-45. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2004.12.013>
- [7] Wallace, B.A. and Finlay, B.B. (2000) Exploration of Host Cells by Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 8799-8806. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.16.8799>
- [8] Gruenheid, S. and Finlay, B.B. (2003) Microbial Pathogenesis and Cytoskeletal Function. *Nature*, 422, 775-781. <https://doi.org/10.1038/nature01603>
- [9] Sabanero, L.M., Tsutsumi, F.V., Barbosa, S.G., López, R.E. and Sandoval, B.G. (2006) Interaction of Yeasts of *Sporothrix schenckii* with Epithelia. *Research and Science*, 36, 10-14.
<http://www.uaa.mx/investigacion/revista/archivo/revista36/REVISTA%2036.pdf>
- [10] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2015) *Molecular Biology of the Cell*. 6th Edition, Garland Science, New York.

- [11] Roubtnef, C., Tran, P.T. and Piel, M. (2012) Common Mechanisms Regulating Cell Cortex Properties during Cell Division and Cell Migration. *Cytoskeleton*, 69, 957-972. <https://doi.org/10.1002/cm.21086>
- [12] Tojkander, S., Gateva, G. and Lappalainen, P. (2012) Actin Stress Fibers—Assembly, Dynamics and Biological Roles. *Journal of Cell Science*, 125, 1855-1864. <https://doi.org/10.1242/jcs.098087>
- [13] Moseley, J.B. and Goode, B.L. (2006) The Yeast Actin Cytoskeleton: From Cellular Function to Biochemical Mechanism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70, 605-645. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00013-06>
- [14] Baroni, A., Perfetto, B., Paoletti, I., De Martino, L., Buommino, E., Ruocco, E. and Ruocco, V. (2001) Uptake of *Malassezia furfur* by Human Dermal Fibroblasts: Effect of Ketoconazole and Cytoskeleton Inhibitors. *Archives of Dermatological Research*, 293, 407-413. <https://doi.org/10.1007/s004030100242>
- [15] Muñoz, D.A.R., Castrejón, J.N.S., Baltierra, U.S.L., Pérez, R.S.J., Carapia, M.N., Castañeda, S.J.I., Luna, H.J., López, S.R., Rodríguez, T.A.V. and García, P.B.E. (2016) *Candida glabrata* Survives and Replicates in Human Osteoblasts. *Pathogens and Disease*, 74, 1-11. <https://academic.oup.com/femspd/article/74/4/ftw030/2197983>
- [16] Ortega, G. (2016) Evaluation of the Changes Observed in the Actin Filaments of the RK13 Cell Line during Infection with *Candida albicans*. Thesis of Degree, National Autonomous University of Mexico, Ciudad de México.
- [17] Baroni, A., Perfetto, B., Paoletti, I., Ruocco, E., Canozo, N., Orlando, M. and Buommino, E. (2001) *Malassezia furfur* Invasiveness in a Keratinocyte Cell Line (HaCat): Effects on Cytoskeleton and on Adhesion Molecule and Cytokine Expression. *Archives of Dermatological Research*, 293, 414-419. <https://doi.org/10.1007/s004030100248>
- [18] Martín, J.L., Tejedor, M.T., Luptola, P., Morales, M. and González, Z. (2001) Relationship between the Presence of *Malassezia pachydermatis* and the Clinical Signs Found in Chronic Canine Otitis in a Population of Dogs of the Canarian Podenco Breed. *Clínica Veterinaria Pequeños Animales*, 21, 103-111. <https://ddd.uab.cat/pub/clinvetpeqant/11307064v21n2/11307064v21n2p103.pdf>
- [19] Zachary, J.F. and McGavin, M.D. (2012) Pathologic Basis of Veterinary Disease. 5th Edition, Elsevier, Amsterdam.
- [20] Gupta, A., Kohli, Y. and Summerbell, R. (2000) Molecular Differentiation of Seven *Malassezia* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 1869-1875. <http://jcm.asm.org/content/38/5/1869.full.pdf>
- [21] Coutinho, S.D. and Paula, C.R. (2000) Proteinase, Phospholipase, Hyaluronidase and Chondroitin-Sulphatase Production by *Malassezia pachydermatis*. *Medical Mycology*, 38, 73-76. <https://doi.org/10.1080/mm.38.1.73.76>
- [22] Mauldin, E., Scott, D., Miller, W. and Smith, C. (1997) *Malassezia* Dermatitis in the Dog: A Retrospective Histopathological and Immunopathological Study of 86 Cases (1990-1995). *Veterinary Dermatology*, 8, 191-202. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3164.1997.d01-15.x>
- [23] Cheng, T.A. and Hill, P.B. (2005) The Biology of *Malassezia* Organisms and Their Ability to Induce Immune Responses and Skin Disease. *Veterinary Dermatology*, 16, 4-26. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2005.00424.x>
- [24] Mathieson, I., Fixter, I. and Little, C. (1998) Enzymatic Activity of *Malassezia pachydermatis*. In: Kwochka, K.W., Willemse, T. and von Tscharner, C.V., Eds., *Advances in Veterinary Dermatology*, Vol. 3, Butterworth Heinemann, Oxford, 532.

- [25] Kopecka, M., Yoshida, S. and Yamaguchi, M. (2012) Actin Ring Formation around the Cell Nucleus of Long-Neck Yeast. *Journal of Electron Microscopy*, 61, 249-255. <https://doi.org/10.1093/jmicro/dfs049>
- [26] Kopecka, M., Kawamoto, S. and Yamaguchi, M. (2013) A New F-Actin Structure In Fungi: Actin Ring Formation around the Cell Nucleus of *Cryptococcus neoformans*. *Microscopy*, 62, 295-301. <https://doi.org/10.1093/jmicro/dfs074>

Anexo II

Durante la realización de este trabajo se logró la publicación del artículo: Use of Mexican Propolis for the Topical Treatment of Dermatomycosis in Horses

Disponible en: https://file.scirp.org/pdf/OJVM_2016011415325142.pdf

Open Journal of Veterinary Medicine, 2016, 6, 1-8
Published Online January 2016 in SciRes. <http://www.scirp.org/journal/ojvm>
<https://dx.doi.org/10.4236/ojvm.2016.61001>



Use of Mexican Propolis for the Topical Treatment of Dermatomycosis in Horses

Iris del Socorro Flores Rodríguez, Maxs Moreno Monteagudo, Amparo Londoño Orozco, Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez

Facultad de Estudios Superiores Cuscutitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuscutitlán Izcalli, México

Email: iflores@comunidad.unam.mx, tonatiuh85@hotmail.com

Received 6 November 2015; accepted 11 January 2016; published 14 January 2016

Copyright © 2016 by authors and Scientific Research Publishing Inc.
This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Five horses with lesions compatible with dermatomycosis were selected and skin scrapings were taken from all affected areas. Samples were then treated with 10% KOH and observed by direct microscopic examination; fungal cultures using Mycobiologic Agar and Borelli Agar were also performed; *Trichophyton mentagrophytes* was identified in two cases, whereas *Candida albicans* was identified in the other three. Skin lesions in cases 1 and 2 were treated topically with ketoconazole ointment, while in the remaining cases a weekly bath with propolis-based shampoo and application of propolis-based ointment on the lesions 2 to 3 times a week were implemented. Treatment in all cases lasted 4 weeks. Pictures were taken before and after treatment and, making use of the Image Pro-Express[®] software, therapy efficacy was determined by measurement of lesion area diameter and a significant reduction in lesion size was observed by the end of the 4 weeks of treatment with ketoconazole and propolis-based products. Thus proving the effectiveness of such propolis-based products, making them a natural therapeutic alternative for the treatment of cutaneous mycoses in horses, and carrying none of the toxic side effects of conventional pharmaceuticals.

Keywords

Mexican Propolis, Horses, Dermatomycosis, Treatment

1. Introduction

Superficial and cutaneous mycoses are fungal infections that involve the superficial layers of the skin, hair, and claws/hoofs. The microorganisms involved are often keratinophilic dermatophytes, such as those belonging to

How to cite this paper: Flores Rodríguez, I.S., Moreno Monteagudo, M., Londoño Orozco, A. and Cruz Sánchez, T.A. (2016) Use of Mexican Propolis for the Topical Treatment of Dermatomycosis in Horses. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 6, 1-8. <https://dx.doi.org/10.4236/ojvm.2016.61001>