

Daño estructural en *Cryptococcus neoformans* producido por un propóleo mexicano

Structural damage in *Cryptococcus neoformans* caused by a Mexican propolis

José Alberto Mateo Aldama¹

Betsabé Rodríguez Pérez¹

Sofía González Gallardo²

Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez¹

¹ Universidad Nacional Autónoma de México, Laboratorio de Bioprospección Microbiológica, Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

² Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad de Microscopía Electrónica, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Autora para correspondencia: Betsabé Rodríguez Pérez, berope380@hotmail.com

Resumen

El propóleo es un producto de las abejas que recolectan de la vegetación y que muestra acción antifúngica por la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides. *Cryptococcus neoformans* es una levadura encapsulada que produce una infección micótica oportunista en hospederos inmunocompetentes como inmunocomprometidos. Debido a la resistencia que *C. neoformans* ha presentado a los antimicóticos comerciales, es necesario estudiar otras sustancias de origen natural con acción fungicida.

En este estudio se evaluó el daño a la estructura de *C. neoformans*, proveniente de un aislamiento clínico, producido por un extracto etanólico de propóleo mexicano mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). Se cuantificaron los compuestos fenólicos y flavonoides de la resina; la evaluación de la actividad antifúngica se realizó mediante la prueba de inhibición del crecimiento radial y para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria y Fungicida (CMI y CMF) se utilizó el método de macrodilución.

El extracto de propóleo mexicano demostró tener un contenido óptimo de fenoles y flavonoides; una concentración de 2.5 mg/mL del extracto de propóleo provoca la formación de invaginaciones e irregularidades en la superficie del hongo produciendo una disminución del tamaño.

Se demuestra la actividad anticriptocócica de un extracto de propóleo al evidenciar el daño en la estructura celular, lo cual puede proporcionar la perspectiva de alternativa terapéutica para pacientes con diversas enfermedades producidas por este hongo, considerando ampliar la investigación del mecanismo de acción del propóleo como antifúngico.

Palabras clave: propóleo; *Cryptococcus neoformans*; microscopía electrónica de barrido; actividad antifúngica; *Apis mellifera*; compuestos fenólicos; flavonoides; criptococosis; abejas; salud; compuestos; antimicóticos

Abstract

Propolis is a product of bees that collect from vegetation and that shows antifungal action due to the presence of phenolic compounds and flavonoids. *Cryptococcus neoformans* is an encapsulated yeast that produces an opportunistic fungal infection in immunocompetent hosts such as immunocompromised. Due to the resistance that *C. neoformans* has presented to commercial antifungals, it is necessary to study other substances of natural origin with fungicidal action.

In this study the damage to the structure of *C. neoformans*, from a clinical isolation, produced by an ethanolic extract of Mexican propolis was evaluated by means of Scanning Electron Microscopy (SEM). The phenolic compounds and flavonoids of the resin were quantified; the evaluation of antifungal activity was carried out by means of the radial growth inhibition test and the macrodilution method was used to determine the Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Fungicidal Concentration (MIC and MFC).

The Mexican propolis extract proved to have an optimal content of phenols and flavonoids; a concentration of 2.5 mg/mL of the propolis extract causes the formation of invaginations and irregularities on the surface of the fungus, causing a decrease in size.

The anticryptococcal activity of a propolis extract is demonstrated by showing damage to the cellular structure, which may provide the prospect of a therapeutic alternative for patients with various diseases caused by this fungus, considering expanding research on the mechanism of action of propolis as an antifungal.

Keywords: propolis; *Cryptococcus neoformans*; scanning electron microscopy; antifungic activity; *Apis mellifera*; phenolic compounds; flavonoids; cryptococcosis; bees; health; compounds; antifungals

Recibido en: 23-06-2020

Aceptado en: 09-10-2020

Introducción

Cryptococcus neoformans es la levadura responsable de la criptococosis, micosis oportunista que ha sido un importante problema de salud pública mundial. *C. neoformans* es una levadura de forma oval a esférica de 20 a 30 μ de diámetro, que se destaca por presentar dos factores de virulencia, la cápsula y la melanina. Ambas están estrechamente asociadas con la pared celular de los hongos, una estructura compleja que es esencial para mantener la morfología y la viabilidad celular en condiciones de estrés.

La cápsula compuesta por α -1,3-glucanos y quitina, propiedad que le confiere ventajas para evadir el sistema inmune de su hospedero, pues es un antagonista de la fagocitosis provocada por los macrófagos, interfiere en la presentación del antígeno, así también facilita la invasión a cerebro debido a modificaciones en la estructura antigénica al momento de cruzar barrera hematoencefálica (Bonifaz, 2012; Araujo *et al.*, 2016).

Esta levadura afecta mayormente a pacientes con inmunocompromiso de forma oportunista, y a pacientes inmunocompetentes como una entidad primaria. A lo largo de las últimas dos décadas, la criptococosis ha sido la segunda infección micótica más reportada en personas con VIH/SIDA y la tercera infección micótica invasiva más común en pacientes que se someten a trasplante de órgano sólido. La incidencia en pacientes postransplantados se calcula en 2.8%, se estima que la afectación en la piel ocurre en 17.8% de todos los casos, se asocia con infección sistémica en 69% y cutánea primaria en 31%. Habitualmente se presenta en un promedio de 16 a 21 meses después del trasplante. Algunos estudios reportan que la incidencia de criptococosis en pacientes que no

tienen VIH/SIDA es de aproximadamente 0.2-0.8% por 100,000, dependiendo del área geográfica; es más frecuente en las mujeres en una relación aproximada de 2:1; en grupos de alto riesgo, como los pacientes con SIDA, predomina en el género masculino en una proporción de hasta 4:1. Existen otros factores de riesgo para adquirir la enfermedad son el uso de esteroides en dosis altas, enfermedades como lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus, linfocitopenia CD4 idiopática, neoplasias hematológicas, así como el uso de algunos anticuerpos monoclonales (Arenas, 2008; Bonifaz, 2012; Barbosa-Zamora *et al.*, 2017; Cortés *et al.*, 2018).

En la actualidad, se ha utilizado ampliamente un régimen para el tratamiento de la criptococosis, sin embargo, la elección del antifúngico depende de la forma clínica. En general, los tratamientos están basados en el uso de la anfotericina B, el fluconazol, la 5-fluocitosina, el ketoconazol y el itraconazol, más útiles en casos pulmonares o cutáneos primarios, y recientes derivados azólicos, como el poscanazol y el voriconazol que han de mostrar tener buena acción *in vitro* contra *Cryptococcus* sp (Arenas, 2008). El amplio uso de fluconazol, especialmente en los pacientes positivos con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) pudiera generar una presión selectiva que derive en la resistencia de esta levadura a este fármaco y otros azoles (Illnait *et al.*, 2009), aunado a esto, los efectos nefrotóxicos de la anfotericina B y la 5-fluorocitosina como hepatotóxico (Catalán & Montejó, 2006), por lo cual es necesario buscar alternativas más seguras para el paciente que no comprometan más su estado de salud y que no contribuya a la creación de resistencia por parte de la levadura, como el propóleo.

El propóleo es un producto complejo que las abejas de diferentes especies obtienen al combinar resinas y bálsamos colectados de plantas, cera y secreciones salivales. Las colonias de abejas utilizan el propóleos para recubrir y aislar objetos o restos de animales al interior de su colmena, para cubrir grietas o vías de acceso a su colmena reduciendo así la entrada de frío y plagas y para barnizar las celdillas donde alojan a sus crías (Bankova, 2005; Rodrigues, 2012).

Se han identificado más de 180 compuestos del propóleos siendo los principales componentes, metabolitos secundarios de la vegetación como son resinas y bálsamos, flavonoides, ácidos fenólicos o sus ésteres, aceites volátiles, además de ceras, polen e impurezas (Londoño, 2010) presentando un efecto sinérgico entre ellos para las actividades biológicas como antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antioxidante, antiinflamatorias e inmunoestimulador (Hee, 2002; Rebaza *et al.*, 2016).

Se han realizado investigaciones sobre el efecto fungicida y fungistática de los propóleos en diferentes levaduras y hongos filamentosos (Rodríguez *et al.*, 2019), en donde se coincide que el blanco de acción se localiza en la pared y en la membrana celular al observar daños estructurales como son la ruptura de la superficie celular, invaginaciones y perforaciones en la envoltura celular (Hee, 2002; Mello, 2006; Gómez, 2018). Se han realizado estudios de la composición química y del efecto antifúngico del propóleo del estado de México proveniente de la FES Cuautitlán contra cepas de *Candida albicans* y por medio de microscopía electrónica se demostró la inhibición del tubo germinativo y cambios en la pared celular con sitios de gemación irregulares provocados por compuestos como el ácido cafeico, flavonoides y ésteres fenólicos (Londoño *et al.*, 2008). En un estudio realizado por Quintero *et al.* (2011), se concluyó que en *C. albicans*, se afectan los genes ADH1 y PIK1 que están relacionados con los cambios de la inhibición de la formación del tubo germinativo, la formación de blastoconidias y el cambio morfológico de la levadura.

Thammasit *et al.* (2018) reportan la alteración en la morfología del *C. neoformans* y la atenuación de la virulencia con el tratamiento de propóleo. Mammon *et al.* (2020) reportan el uso de propóleos de abejas nativas sin aguijón (*Tetragonula laeviceps* y *Tetrigona melanoleuca*) para la reducción en la producción de quitina/quitosano y melanina de una manera dependiente de la dosis contra la misma levadura.

Sin embargo, es necesario profundizar en el mecanismo de acción de los componentes presentes en los propóleos y asociarlos para describir el efecto antifúngico.

Es por ello que se ha demostrado que los extractos etanólicos de propóleos poseen actividad antifúngica en diferentes especies de levaduras, como propiedad de importancia por ser una opción terapéutica económica y poco tóxica respecto a los antimicóticos tradicionales (Joya y Bastida-Pacheco, 2017). La inclinación del ser humano hacia el aprovechamiento de los productos naturales, se ha convertido en la actualidad en una opción insuperable para ser empleados en el tratamiento de diversas enfermedades (Londoño-Orozco *et al.*, 2008).

Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar la estructura de *Cryptococcus neoformans* mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), al exponerlo a un extracto etanólico de propóleo.

Método

Productos químicos. Los reactivos y solventes utilizados en este estudio fueron obtenidos de Sigma-Aldrich México: alcohol etílico (# 792780), reactivo de Folin-Ciocalteu (# F9252), tricloruro de aluminio (# 449598), metanol (# 179957), ácido gálico (# 91215), quercetina (# 1592409), Dimetilsulfóxido (DMSO) (Merk #67-68-5). Los medios de cultivo fueron adquiridos en Becton Dickinson, México.

Propóleo. Se utilizó un extracto etanólico de propóleo (EEP) proveniente del municipio de Toluca (Estado de México) con localización geográfica al norte 9°17'16.3" y al oeste 99°39'11.7", con altura de 2649 msnm, proporcionado por el Laboratorio Bioprospección Microbiológica de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

Obtención del extracto etanólico de propóleo (EEP)

La obtención del extracto etanólico se realizó como lo establece la Norma Oficial Mexicana: NOM-003-SAG/GAN-2017, Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento (Diario Oficial de la Federación [DOF], 2017). Se pesaron 25 g de los propóleos en greña libres de impurezas en una balanza analítica (marca AND, modelo HR200, Japón), se añadieron 75 ml de etanol al 70%, sometiendo la mezcla a extracción utilizando un ultrasonicador (Branson, CPX1800H, Danbury, Estados Unidos) con dos ciclos de 30 min. El extracto obtenido se separó por filtración, y el filtrado resultante se concentró utilizando un rotavapor (Science MED, SM100-PRO, Finlandia); posteriormente, se dejó a sequedad utilizando una bomba de vacío para eliminar los residuos de etanol. El extracto seco se mantuvo almacenado protegido de la luz y en refrigeración a 4 °C hasta su utilización (DOF, 2017; Rodríguez *et al.*, 2019).

Cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides. Las determinaciones se realizaron conforme a lo establecido en la NOM-003-SAG/GAN-2017. Para medir la cantidad de compuestos fenólicos se utilizó el método de Folin-Ciocalteu (FC) con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción, utilizando una longitud de onda de 765 nm y empleando ácido gálico como solución estándar. Se utilizó el método colorimétrico del tricloruro aluminio (AlCl_3) para la cuantificación de flavonoides, utilizando quercetina como estándar de referencia y se determinó la absorbancia utilizando una longitud de onda de 415 nm. Las lecturas de absorbancia se realizaron utilizando un espectrofotómetro de absorción UV-VIS (DLAB, SP-UV1000, China). Los resultados se interpolaron en la gráfica de la curva de calibración y ambas determinaciones se expresaron en porcentaje (DOF, 2017).

Evaluación de la actividad antifúngica

Microorganismo. La evaluación antifúngica se realizó empleando una cepa de *Cryptococcus neoformans* proveniente de un aislamiento clínico, proporcionada por el Laboratorio de Bioprospección Microbiológica de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FES Cuautitlán, UNAM. La cepa se mantuvo en placas de Agar Dextrosa y Papa (ADP) a 37 °C.

Prueba de inhibición del crecimiento radial. Esta prueba se realizó utilizando discos de papel filtro de 6 mm de diámetro (Whatman No. 5) previamente esterilizados y que se impregnaron con 64 mg/10 μL de EEP. Como testigos negativos se utilizaron discos impregnados con 10 μL de alcohol etílico al 70% y otros con 10 μL de DMSO; como testigo positivo se utilizó Fluconazol (25 μg) (Bio Rad #62802). Se sembró a la levadura en caldo Dextrosa Sabouraud, se incubó a 37 °C por 48 h, se ajustó al tubo 0.5 de la escala del nefelómetro de MacFarland utilizando un espectrofotómetro, con una absorbancia entre 0.08–0.12 a una longitud de onda de 625 nm. A partir del inóculo preparado, se realizó un sembrado masivo sobre placas de agar Mueller-Hinton suplementado con 2 % de glucosa y 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de azul de metileno. Se colocaron los discos impregnados con las muestras a evaluar, se incubaron por 48 h a 37 °C y se midieron los halos de

inhibición. Los resultados se expresaron como el promedio del diámetro de los halos de inhibición para cada tratamiento (Pfaller *et al.*, 2004; DOF-2017).

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Fungicida (CMF). Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Fungicida (CMF) del extracto de propóleo utilizando el método de macrodilución para levaduras descrito por Cantón *et al.* (2007).

Microscopía Electrónica de Barrido. Para la realización de esta técnica se realizaron tres preparaciones a partir de un inóculo de la levadura (1.5×10^8 UFC/mL): *C. neoformans* sin tratamiento (caldo SDA e inóculo); *C. neoformans* con tratamiento de Fluconazol a 250 μ g/mL (Sigma Aldrich 86386-73-4) y *C. neoformans* con tratamiento de EEP (2.5 mg/mL); posteriormente se incubaron por 48 h a 37 °C. Las muestras se prefijaron con glutaraldehído al 2% en un buffer de fosfatos (pH 6.0) por un lapso de 2 h; pasado este tiempo, se realizaron lavados con buffer de fosfatos e incubaron a 4 °C hasta la observación en el microscopio electrónico de barrido. Después de recubrir las muestras con partículas de oro en un cobertor iónico (Denton Vacuum DESKV) se realizó la observación y la medición de las estructuras de interés en el microscopio electrónico de barrido JOEL, JSM-6010LA (Tovar, 2016; Gómez, 2018).

Análisis estadístico. Los datos obtenidos se analizaron mediante la prueba estadística de Análisis de varianza (ANOVA), utilizando el Programa Estadístico GraphPad Prism 7.04.

Resultados y Discusión

Cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides. Se estima que existen más de 300 compuestos químicos que se han detectado en los propóleos de diversos orígenes de la República Mexicana y que el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides es un parámetro importante que determina su actividad antifúngica (Bankova *et al.*, 2016). Es por ello, que las Normas de calidad nacionales e internacionales establecen valores mínimos de aceptación, cuanto mayor sea el porcentaje de estos compuestos, mejor será la calidad del producto (Rodríguez *et al.*, 2019). La

muestra estudiada cumple las especificaciones de calidad establecidas por la normatividad mexicana (**Tabla 1**) (DOF, 2017).

Tabla 1. Valores medios (\pm DE) de fenoles y flavonoides del extracto de propóleo utilizado en el experimento ($n = 3$).

Table 1. Mean values (\pm SD) of phenols and flavonoids of the propolis extract used in the experiment ($n = 3$).

Especificación química	Resultado	Parámetros establecidos por la NOM
% de Compuestos fenólicos	22.7 % \pm 0.007	> 5 %
% de Flavonoides	5.3 % \pm 0.480	> 0.5 %

Autores como Londoño *et al.* (2008), Quintero-Mora *et al.* (2008), Vargas *et al.* (2014), Tovar (2017) y Rodríguez *et al.* (2019), han realizado estudios del efecto antifúngico de propóleos del Estado de México contra cepas de hongos levaduriformes como *Candida albicans* y *Malassezia pachydermatis*. En dichos propóleos detectaron la presencia de compuestos químicos como el ácido cafeico, flavonoides (pinocembrina, kaempferol, crisina, quercetina, galangina, pinobanksina, naringenina, acacetina), ésteres fenólicos y el éster fenílico del ácido cafeico (CAPE, por sus siglas en inglés); los cuales son considerados responsables de la actividad antifúngica. Para este trabajo de investigación es necesario completarlo mediante la identificación de los componentes principales que le confieren actividad en nuestro propóleo de estudio utilizando técnicas de cromatografía.

Evaluación de la actividad antifúngica

El fluconazol es un antifúngico que inhibe la actividad de la enzima lanosterol 14- α desmetilasa, provocando la alteración en la permeabilidad de la membrana y a los sistemas enzimáticos involucrados en la síntesis de la pared celular (Catalán *et al.*, 2006).

Los resultados de la prueba de inhibición de crecimiento radial muestran la sensibilidad del hongo frente a este fármaco, con un promedio de halo de inhibición de 17 mm y en el caso del EEP un promedio de 9.3 mm, con una diferencia significativa entre los tratamientos ($p < 0.01$).

Los disolventes utilizados no inhibieron el crecimiento de la levadura (**Tabla 2, Fig. 1**). En la evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se obtuvo un valor de 1.25 mg/mL y una Concentración Mínima Fungicida (CMF) de 2.5 mg/mL, mostrando que el propóleo posee actividad antifúngica.

Tabla 2. Valores medios (\pm DE) de la prueba de inhibición de crecimiento radial contra *Cryptococcus neoformans* ($n = 3$).

Table 2. Mean values (\pm SD) of radial growth inhibition test against *Cryptococcus neoformans* ($n = 3$).

Muestra evaluada	Promedio de halo de inhibición (mm)
DMSO	0.0
Alcohol etílico 70 %	0.0
Extracto de propóleo (64 mg)	9.3 ± 0.577^a
Fluconazol (25 μ g)	17 ± 0.041^b

Las medias con diferentes superíndices (ab) entre las muestras indican diferencias significativas ($p < 0.01$).

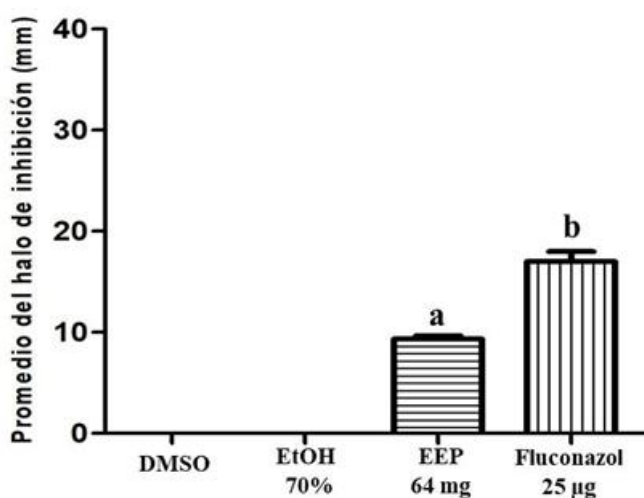


Fig. 1. Evaluación de la sensibilidad de *Cryptococcus neoformans*. Las medias con diferentes superíndices (ab) entre las muestras indican diferencias significativas ($p < 0.01$).

Fig. 1. Sensitivity assessment of *Cryptococcus neoformans*. The means with different superscripts (ab) between the samples indicate significant differences ($p < 0.01$).

Se ha estudiado el efecto del propóleo sobre *C. neoformans* por diferentes investigadores, Londoño *et al.* (2008) reportan una CMI de 0.128 mg/mL con un propóleo del Estado de México (Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM); Fernandes *et al.* (2007) con un propóleo brasileño reportan una CMI en un rango de 0.2 a 1.6 mg/mL; Hee (2002) utilizando propóleo Coreano obtuvo una CMI de 2 mg/mL de EEP, Thammasit *et al.* (2018) reportan concentraciones que van de 0.5 a 0.125 mg/mL de un propóleo tailandés. Mammon *et al.* (2020) probaron propóleos de Tailandia recolectados por abejas nativas sin aguijón (*Tetragonula laeviceps* y *Tetrigona melanoleuca*), a una concentración de 2 mg/mL obteniendo una reducción en la producción de quitina/quitosano y melanina de una manera dependiente de la dosis. Por lo que los resultados obtenidos en este estudio de una CMI de 1.25 mg/mL, se comparan con los reportados por otros autores e indican que se requieren concentraciones similares a las reportadas para obtener buena actividad contra la levadura.

La composición química de los propóleos es un rico conjunto de compuestos fenólicos y flavonoides que determinan su bioactividad y depende del origen botánico, la época y del método de recolección (Bankova, 2009), es por ello por lo que se han reportado diferentes concentraciones fungistáticas y fungicidas para *Cryptococcus neoformans*, pues cada propóleo es único aun cuando haya sido recolectado en el mismo apiario (Suarez *et al.*, 2013; Bernal, 2016; Rodríguez *et al.*, 2019).

Microscopía Electrónica de Barrido

Los resultados de la Microscopía Electrónica de Barrido obtenidos en este trabajo de investigación se muestran a continuación.

***C. neoformans* sin tratamiento.** Los resultados mostraron que el hongo sin ningún tratamiento presentó la morfología característica con una medida en promedio de 5.289 μm de diámetro, sin alteraciones perceptibles (**Fig. 2**).

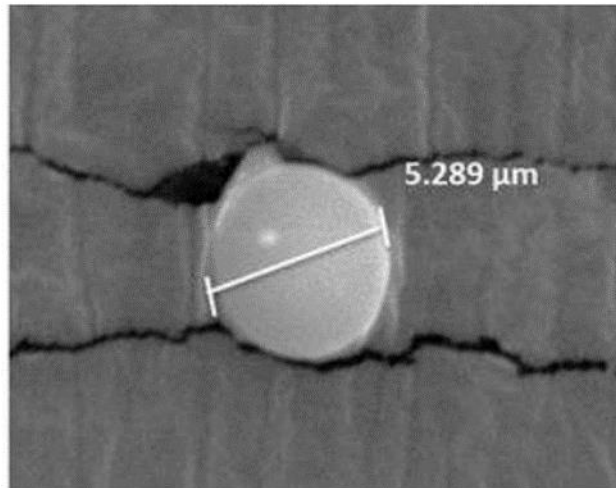


Fig. 2. Microscopía Electrónica de Barrido de la superficie celular de *Cryptococcus neoformans* sin ningún tratamiento (5000x).

Fig. 2. Microscopic structure by scanning electron microscopy of the cell surface of *Cryptococcus neoformans* without any treatment (5000x).

***C. neoformans* con tratamiento de Fluconazol.** Respecto a las alteraciones producidas por el antifúngico, se observó la formación de poros en la superficie celular, así mismo, se observa la disminución de tamaño en el diámetro de la levadura (3.596-4.560 μm) por la alteración en la permeabilidad de la membrana y formación de poros (con un promedio de 1.700 μm) corroborando la acción antifúngica del fármaco (**Fig. 3**).

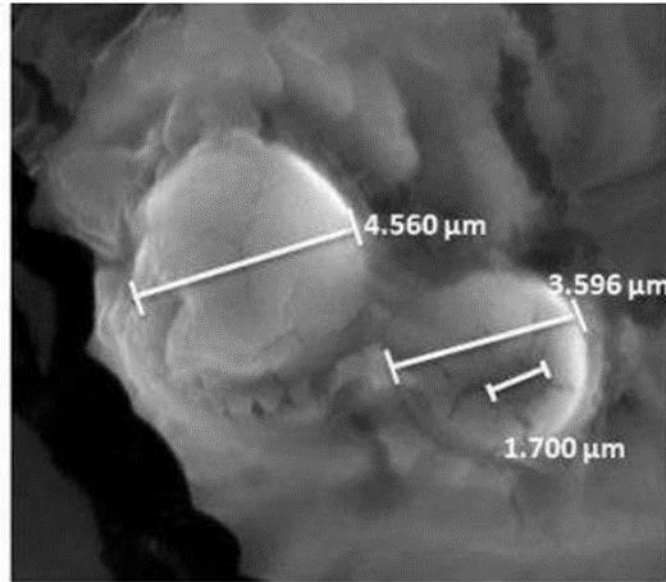


Fig. 3. Estructura microscópica por Microscopía Electrónica de Barrido de la superficie celular de *Cryptococcus neoformans* con Fluconazol (250 µg/mL) (5000X).

Fig. 3. Microscopic structure by scanning electron microscopy of the cell surface of *Cryptococcus neoformans* with Fluconazole (250 µg/mL) (5000x).

***C. neoformans* con tratamiento de EEP.** Con el tratamiento de extracto etanólico de propóleo, el daño producido en una concentración de 2.5 mg/mL se muestra en la **Fig. 4**. Se observa agrupamiento de la levadura, cambios en la morfología y disminución en el tamaño (promedio de 2.186 µm), formación de poros (en promedio de 0.651 µm) e invaginaciones en la superficie de la levadura.

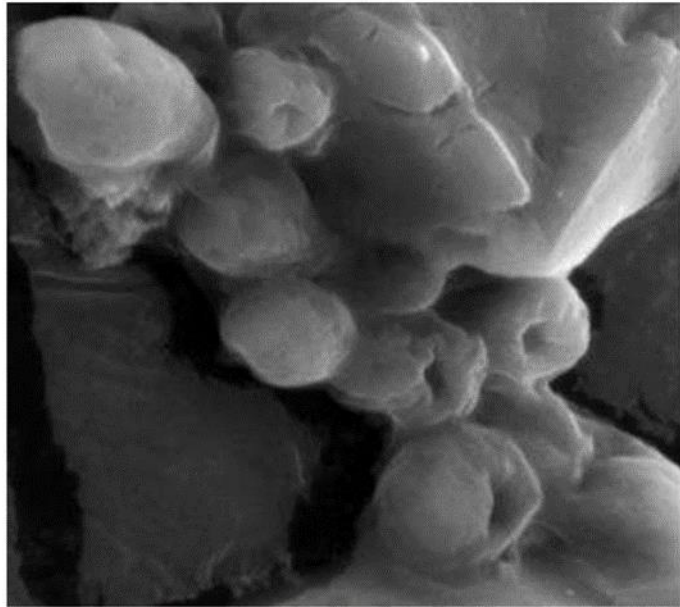


Fig. 4. Microscopía Electrónica de Barrido de la superficie celular de *Cryptococcus neoformans* con extracto de propóleo (2.5 mg/mL) (5000X).

Fig. 4. Microscopic structure by scanning electron microscopy of the cell surface of *Cryptococcus neoformans* with propolis extract (2.5 mg/mL) (5000X).

En la **Fig. 5**, se muestra la comparación en el tamaño de la levadura sin tratamiento (a), con tratamiento con Fluconazol (b) y con tratamiento con el EEP (c). Se observan las diferencias significativas entre ellos.

Los resultados obtenidos con el tratamiento de propóleo con alteraciones en la estructura de la superficie de *C. neoformans* es similar a lo descrito por Hee, C. (2002). Por otro lado, Londoño (2010) en un estudio utilizando Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) describió la destrucción de organelos subcelulares, salida de componentes internos, así como la contracción del contenido intracelular, lo que puede explicar la disminución de tamaño de la levadura. Mello *et al.* (2006) describen alteraciones en la superficie celular de *C. albicans* atribuido a la interacción entre los compuestos sulfhidrilo de la levadura con el propóleo, imitando a los imidazoles.

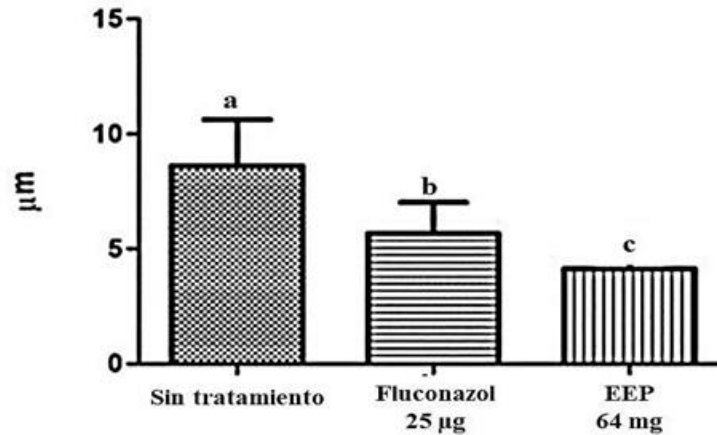


Fig. 5. Comparación en el tamaño de *Cryptococcus neoformans* (µm). Diferentes superíndices (a - c) indican diferencias significativas ($p < 0.01$) entre muestras.

Fig. 5. Comparison in the size of *Cryptococcus neoformans* (µm). Different superscripts (a - c) indicate significant differences ($p < 0.01$) between samples.

En el caso de *M. pachydermatis*, otra levadura, se ha demostrado la alteración de la morfología de forma ovoide a esférica, con aspecto grumoso y formación de invaginaciones y perforaciones en la envoltura celular, y en casos más severos la destrucción celular, que fueron atribuibles a la presencia de pinocembrina y ácidos benzoicos que provocan la lisis y destrucción celular (Tovar, 2016). Estos trabajos sobre el daño celular del propóleo convergen en su mayoría en el tipo de lesión generada, lo que da paso a suponer que el mecanismo de acción se lleva a cabo en la pared y membrana celular, sin embargo, es necesario caracterizar los compuestos químicos que contenga el propóleo y estos a su vez, asociarlos para describir el modo en que actúan para generar el efecto antimicótico.

Conclusiones

El extracto de propóleo mexicano demostró tener un contenido óptimo de fenoles y flavonoides, corroborando actividad anticriptocócica al evidenciar el daño en la estructura celular con la formación de invaginaciones e irregularidades en la superficie y disminución del tamaño, lo cual puede representar una alternativa terapéutica para pacientes con diversas enfermedades producidas por este hongo.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo recibido de los proyectos: UNAM-DGAPA, PAPIIT IT200915 PAPIIT IN223719, PIAPI 2011.

Referencias

- Araujo, G., Fontes, G., Leão, D., Miranda, G., Pontes, B., Sant'Anna, C., Souza, W. y Frases, S. (2016). *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharides form branched, and complex filamentous networks viewed by high-resolution microscopy. *Journal of Structural Biology* 193, 75-82. DOI: 10.1016/j.jsb.2015.11.010
- Arenas Guzmán, Roberto. (2008). *Micología Medica Ilustrada*. 5° ed. México: McGraw-Hill Interamericana Editores.
- Arnold, N., Zepeda, R., Vásquez, M. y Aldasoro, M. (2018). *Las abejas sin aguijón y su cultivo en Oaxaca, México*. 1° ed. Chiapas, México: El Colegio de la Frontera Sur.
- Bankova, Vassia. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 114-117. DOI: 10.1016/j.jep.2005.05.004
- Bankova, V. (2009). Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds. *Journal of Apiculture Product and Apiculture Medical Science*, 1(2), 23–28.
- Bankova, V., Bertelli, D., Borba, R., Conti, B., Barbosa da-Silva, I., Danert, C., Nogueira, E., Falcão, S., Isla, M., Nieva, M., Papotti, G., Popova, M., Basso, S. K., Salas, A., Frankland, S. A., Vilczaki, S., Sforcin, J., Simone-Finstrom, M., Spivak, M., Trusheva, B., Vilas-Boas, M., Wilson, M. y Zampini, C. (2016). Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. *Journal of Apicultural Research*, 56(SI3), 1-49. DOI: 10.1080/00218839.2016.1222661

- Barbosa-Zamora, A., de la Herrán-Millán, P. y Bonifaz, A. (2017). Criptococosis cutánea: una revisión. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 14(4), 330-341.
- Bernal, María. (2016). *Evaluación de efecto inhibitorio del propóleo sobre Nocardia brasilliensis*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Bonifaz, Alejandro. (2012). *Micología Médica Básica*. 5° ed. México: McGraw-Hill Interamericana Editores.
- Catalán, M. y Montejó, J. (2006). Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. *Revista Iberoamericana de Micología*, 23, 39-49.
- Cantón Lasaca, E., Martín-Mazuelos, E. y Espinel-Ingroff, A. (2007). Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (Documentos M27-A3, M38-A y M44-A). *Revista Iberoamericana de Micología*, 15a.1-15a.17.
- Cortés, Jorge., Kral, Alejandro y Wilson, Gonzalo. (2018). Criptococosis en el Hospital Carlos Van Buren de Valparaíso: una serie de casos. *Revista Chilena de Infectología*, 35(4), 420-423. DOI: 10.4067/s0716-10182018000400420
- Diario Oficial de la Federación (DOF). (2017). *Norma Oficial Mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017, Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento*. <https://dof.vlex.com.mx/c/Norma-Oficial-Mexicana> (6 octubre 2019)
- Fernández, F., Días, A., Ramos, C., Ikegaki, M., Siqueira, A. y Franco, M. (2007). The *in vitro* antifungal activity evaluation of propolis G12 ethanol extract on *Cryptococcus neoformans*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 49, 93-95. DOI: 10.1590/s0036-46652007000200005
- Gómez, R. (2018). *Evaluación mediante microscopia electrónica de barrido del daño sobre la estructura celular de Candida albicans producido por propóleo mexicano*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hee, C. (2002). *In vitro* evaluation of the antifungal activity of propolis extracts on *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. *The Korean Society of Mycology*, 30, 93-95. DOI: 10.4489/MYCO.2002.30.2.093
- Illnait, M., Marie, J., Martínez, G., Breuker, I., Fernández, M. y Perurena, M. (2009). Susceptibilidad *in vitro* frente a Fluconazol y voriconazol de cepas de *Cryptococcus* aisladas en Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 6, 70-74.

- Londoño, A. (2010). *Estudio comparativo de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo mexicano y de tres plantas que Apis mellifera usa para su producción*. Tesis de Doctorado en Ciencias, Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Londoño-Orozco, A., Penieres-Carrillo, J. G., García-Tovar, C. G., Carrillo-Miranda, L., Quintero-Mora, M. L., García-Vásquez, S. E., Mendoza-Saavedra, M. A. y Cruz-Sánchez, 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*, 21(1), 49–55.
- Mamoon, K., Thammasit, P., Iadnut, A., Kitidee, K., Anukool, U., Tragoolpua, Y. & Tragoolpua, K. (2020). Unveiling the Properties of Thai Stingless Bee Propolis via Diminishing Cell Wall-Associated Cryptococcal Melanin and Enhancing the Fungicidal Activity of Macrophages. *Antibiotics (Basel)*, 9(7), 420. DOI: 10.3390/antibiotics9070420.
- Mello, A., Tomaz, R., Resende, S., Gomes, L., Bento, J., Esperanza, M., Lemos, S. y Rodrigues, V. (2006). The effect of Brazilian propolis on the germ tube formation and cell Wall of *Candida albicans*. *Pharmacology online*, 3, 352-358.
- Pfaller, M. A., Messer, S. A, Boyken, L., Rice, C., Tendolkar, S., Hollis, D. y Diekema D. J. (2004). Evaluation of the NCCLS M44-P Disk Diffusion Method for Determining Susceptibilities of 276 Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans* to Fluconazole. *Journal of Clinical Microbiology*, 380-383. DOI: 10.1128/JCM.42.1.380-383.2004
- Quintero-Mora, M. L., Londoño-Orozco, A., Hernández-Hernández, F., Manzano-Gayoso, P., López-Martínez, R., Soto-Zarate, C. I., Carrillo-Miranda, L., Penieres-Carrillo, J. G., García-Tovar, C. G. y Cruz-Sánchez, T. A. (2008). Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25, 22-26.
- Rebaza, R., Amaya, L., Gutiérrez, A., Haro, R., Tumbajulca, M., Valera, F., Vargas, Y., Barraza, G., León, J. y Sánchez, J. (2016). Aplicación del propóleo en envasado activo. *Agroindustrial Science*, 6, 239-252. DOI: 10.17268/agroind.science.2016.02.09
- Rodrigues, Vagner. (2012). *Propolis: Alternative Medicine for the Treatment of Oral Microbial Diseases*, *Alternative Medicine Hiroshi Sakagami*, Intech Open. <https://www.intechopen.com/books/alternative-medicine/antifungal-activity-of-propolis-oral-clinical-studies-in-humans> (10 noviembre 2019). doi: 10.5772/54003

- Rodríguez Pérez, B., Penieres Carrillo, J. G., Canales Martínez, M. M., Luna Mora, R. A. y Cruz Sánchez, T. A. (2019). Potencialización de la actividad antifúngica de propóleos mexicanos con la adición de chalconas sintetizadas. *Biocetnia*, 21(3), 76-84. DOI: 10.15174/au.2020.2849
- Suarez, M., Rosende, R. y Finten, S. (2013). Propiedades del Propóleo y su relación con la salud y la práctica odontológica. *Revista Facultad de Odontología*, 6, 21-26. DOI: 10.30972/rfo.611684
- Thammasit, P., Iadput, A., Mammon, K., Khacha-ananda, S., Chupradit, K., Tayapiwatana, C. Kasinrerak, W., Tragoolpua, Y. y Tragoolpua, K. (2018). A potential of propolis on major virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. *Microbial Pathogenesis*, 123, 296-303. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.07.028
- Tovar, N. (2016). *Evaluación antifúngica in vitro del propóleo Mexicano sobre Malassezia pachydermatis*. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Vargas-Sánchez, R. D, Torrescano-Urrutia, G. R., Mendoza-Wilson, A. M., Vallejo-Galland, B., Acedo-Félix, E., Sánchez-Escalante, J. J., Peñalba-Garmendia, M. C. y Sánchez-Escalante, A. (2014). Mecanismos involucrados en la actividad antioxidante y antibacteriana del propóleos. *Biocetnia*, 26(1), 32-37.