



## **INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MÉRIDA**

# **TESIS**

**“Efecto de la miel de *Melipona beecheii* y de sus componentes proteicos en la expresión de genes relacionados con la virulencia de *Candida albicans*”.**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y  
BIOTECNOLOGÍA.**

PRESENTA:

**IBQ. NIDIA ESTHER HAU YAMA.**

ASESOR:

**DRA. ELIZABETH DE LA LUZ ORTIZ VÁZQUEZ**

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

13 NOVIEMBRE 2017





DEPENDENCIA: DIV. DE EST. DE POSG. E INV.  
No. DE OFICIO: X-456/2017

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

MÉRIDA, YUCATÁN A 18 DE OCTUBRE DE 2017

C. Hau Yama Nidia Esther  
Pasante de Maestría en Ciencias de los  
Alimentos y Biotecnología  
P r e s e n t e.

De acuerdo al fallo emitido por su asesora la Dra. Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez, su co-asesor el Dr. Denis Israel Magaña Ortiz, y la comisión revisora integrada por el M.C. Jesús Manuel Ramón Sierra y la Dra. Marianne Soledad Luna Rivero, considerando que cubre los requisitos establecidos en el Reglamento de Titulación de los Institutos Tecnológicos le autorizamos la impresión de su trabajo profesional con la TESIS:

"EFECTO DE LA MIEL DE *Melipona beecheii* Y DE SUS COMPONENTES PROTEICOS EN LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA VIRULENCIA DE *Candida albicans*".

ATENTAMENTE  
IN NOC SIBIQ VINCES

M.C. DANIEL ARCÁNGEL LÓPEZ SAURI  
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS  
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

C.p. Archivo  
DALS/je



S. E. P.  
INSTITUTO TECNOLÓGICO  
DE MÉRIDA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO E INVESTIGACIÓN



*“Cada día sabemos más y  
entendemos menos.”*

Albert Einstein.

## **DEDICATORIA**

Este trabajo está dedicado:

En primer lugar a DIOS, que siempre nos pone en el lugar y momento en el que debemos estar.

A mi familia, que ahora es más grande y más fuerte. Mis padres Juana Yama y Jorge Hau que guían mis pasos para hacer de mí todo lo que soy, su apoyo en todo momento de mi vida, me ha permitido salir adelante en todo. A mis futuros suegros (Mildred Leon y Juan C. Dzib), quienes en este tiempo han forjado otro faro de llegada cuando todo se torna oscuro. A mis hermanos, Alex Hau y Karely Dzib que sus sueños y ambiciones sean tan grandes como sus ocurrencias.

Y finalmente este documento está dedicado a mi prometido, quien ha estado no solo en los momentos de mayor goce sino también en esos momentos difíciles cuando nada tiene sentido pero tiene ciencia, Rubiel, tu apoyo es infinito, como mi amor por ti.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero agradecerle a la Dra. Elizabeth Ortiz y al Dr. Denis Magaña, quienes confiaron en mi talento y me guiaron en la realización de esta tesis.

A la Dra. Marianne Luna, quien me ayudo a darle mejor presentación a mis ideas. Espero que todos sus consejos y motivaciones se vean reflejados en este trabajo.

Al M.C Jesús Ramón, que no solo ha sido un revisor y técnico en este trabajo, también ha sido un gran amigo y compañero en toda esta travesía. Maestro, no cabe duda que logrará todo lo que se proponga, su camino aún es muy extenso.

Al Dr. Alejandro Yam, que sin darse cuenta me ha ayudado a entender tantas cosas que no habían tenido sentido, muy pocas personas expresan tanto en la enseñanza.

A mis amigos y compañeros de generación Paola, Mónica, Jair, Enrique, Carlos, Santos y Rubiel, a todos los chicos del LMAM: Isela, Aarón, Harumi, Gabo, Elva, Roberto, Ezequiel, Fabiola y Ángel, solo ustedes saben cuán difícil y peligroso puede ser este viaje, el camino ha sido largo pero su compañía ha sido lo máximo.

Un agradecimiento especial a la M.C Dora Huerta Quintanilla del CINVESTAV Mérida, por su apoyo y ayuda en la realización de las fotos en el microscopio electrónico de barrido.

Finalmente gracias al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca con n°**694530/583609**, sin duda el apoyo económico es vital para que la ciencia siga siendo una prioridad.

¡Gracias a todos!

# ÍNDICE GENERAL.

DEDICATORIA .....	iv
AGRADECIMIENTOS .....	v
ÍNDICE GENERAL.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN .....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	2
2. La Meliponicultura y la miel.....	2
2.1 La meliponicultura.....	2
2.1.1 Impacto social.....	4
2.1.2. Impacto económico.....	5
2.2 La miel de abejas sin aguijón.....	5
2.2.1 Composición de la miel y su efecto antimicrobiano.....	6
2.2.2 La miel de melipona como alternativa medicinal. ....	8
2.3 Género <i>Candida</i> . ....	9
2.3.1 Enfermedades causadas por <i>C. albicans</i> . ....	10
2.3.2 Factores de virulencia de <i>C. albicans</i> .....	11
2.3.2.1 La función de las adhesinas en el reconocimiento del huésped. ....	12
2.3.2.2 Formación de biofilm.....	13
2.3.2.3 Morfogénesis/ dimorfismo morfológico. ....	14
2.3.2.4 Producción de enzimas extracelulares.....	15
2.3.2.5 Cambio fenotípico. ....	16
2.4 Antifúngicos y su resistencia. ....	16

CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS.....	19
3.1 Justificación.....	19
3.2 Hipótesis.....	19
CAPÍTULO IV. OBJETIVOS.....	20
4.1 Objetivo general.....	20
4.2 Objetivos específicos.....	20
CAPÍTULO V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
5.1 Materia prima y microorganismo.....	21
5.2 Extracción de compuestos proteicos de la miel de <i>M. beecheii</i> .....	21
5.3 Cuantificación del extracto proteico de la miel de <i>M. beecheii</i> .....	21
5.4 Determinación del perfil proteico.....	21
5.5 Determinación de actividad antifúngica de la miel y el extracto proteico.....	22
5.6 Determinación de CMI y CMF.....	22
5.7 Extracción de ADN de <i>C. albicans</i> .....	23
5.8 Detección de genes housekeeping y virulencia de <i>C. albicans</i> .....	24
5.9 Extracción de ARN de <i>C. albicans</i> .....	25
5.10 Síntesis de primera cadena de ADN complementario (ADNc).....	26
5.11 Análisis de expresión de los genes de virulencia de <i>C. albicans</i> .....	26
CAPÍTULO VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
6.1 Evaluación de la actividad antifúngica de la miel de <i>M. beecheii</i> .....	28
6.2 Cuantificación del extracto proteico y determinación de perfil.....	30
6.3 Evaluación de la actividad antifúngica del extracto proteico.....	31



6.4 Extracción de ADN de <i>C. albicans</i> .....	35
6.5 Detección de genes housekeeping y virulencia.....	35
6.6 Validación de la expresión de los genes housekeeping y virulencia.....	37
6.7 Extracción y cuantificación de ARN de <i>C. albicans</i> ATCC 10231.....	38
6.8 Análisis de la curva de disociación (curva melting). .....	39
CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES .....	45
REFERENCIAS. ....	46

## ÍNDICE DE TABLAS.

<b>Tabla 1.</b> Estándares sugeridos para mieles de abeja sin aguijón.....	7
<b>Tabla 2.</b> Reportes de actividad antifúngica de miel contra hongos/levaduras. ....	9
<b>Tabla 3.</b> Enfermedades asociadas a <i>C. albicans</i> .....	11
<b>Tabla 4.</b> Adhesinas de <i>C. albicans</i> y ligandos asociados a la célula huésped .....	13
<b>Tabla 5.</b> Clasificación de agentes antifúngicos .....	17
<b>Tabla 6.</b> Oligos diseñados para detección de genes.....	24
<b>Tabla 7.</b> Mezcla de reacción para la detección de genes.....	25
<b>Tabla 8.</b> Condiciones de PCR.....	25
<b>Tabla 9.</b> Mezcla de reacción para síntesis de primera cadena de ADNc.....	26
<b>Tabla 10.</b> Mezcla de reacción para análisis de expresión. ....	26
<b>Tabla 11.</b> Condiciones de RT-qPCR.....	27
<b>Tabla 12.</b> Diámetro del halo de inhibición .....	32
<b>Tabla 13.</b> Porcentaje de sobrevivencia .....	33
<b>Tabla 14.</b> Cuantificación ARN por Nanodrop .....	39
<b>Tabla 15.</b> Valores de Ct de los genes housekeeping .....	40
<b>Tabla 16.</b> Análisis de expresión gen HWP1 y SAP6 .....	41

## ÍNDICE DE FIGURAS.

<b>Figura 1.</b> Clasificación simplificada de las abejas sin aguijón.....	2
<b>Figura 2.</b> Distribución geográfica de las abejas meliponini .....	3
<b>Figura 3.</b> Usos de las abejas sin aguijón. ....	4
<b>Figura 4.</b> Actividad antifúngica de la miel de <i>Melipona beecheii</i> .....	28
<b>Figura 5.</b> Efecto de la miel de <i>M. beecheii</i> vs <i>C. albicans</i> ATCC 10231 .....	29
<b>Figura 6.</b> Perfil proteico de la miel de <i>M. beecheii</i> .....	31
<b>Figura 7.</b> Actividad antifúngica del extracto proteico.....	32
<b>Figura 8.</b> Conteo de células sobrevivientes .....	33
<b>Figura 9.</b> Visualización en SEM. ....	34
<b>Figura 10.</b> Gel de Agarosa ADN <i>C. albicans</i> .....	35
<b>Figura 11.</b> Detección de genes housekeeping.....	36
<b>Figura 12.</b> Detección de genes de virulencia. ....	36
<b>Figura 13.</b> Validación de oligos housekeeping.....	37
<b>Figura 14.</b> Validación de oligos virulencia.....	38
<b>Figura 15.</b> Extracción de ARN total de <i>C. albicans</i> . ....	39
<b>Figura 16.</b> Curva melting.....	40
<b>Figura 17.</b> Niveles de expresión relativa .....	42

# CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

## 1. INTRODUCCIÓN

La miel ha sido utilizada en la medicina tradicional desde tiempos ancestrales en el tratamiento heridas, úlceras, quemaduras, infecciones oculares, dolor de garganta y otras afecciones, ejemplos importantes de su aplicación terapéutica (Estrada *et al.*, 2005; Zamora *et al.*, 2011). Por lo que su empleo como producto natural con alta efectividad como antimicrobiano, así como sus características organolépticas han ocasionado un creciente interés en ella (Liberio *et al.*, 2011).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (2005), la alta tasa de incidencia de microorganismos resistentes a los antibióticos es una problemática a nivel global que año con año se agrava. Este fenómeno se ha debido a que los microorganismos han desarrollado diferentes mecanismos de resistencia contra casi todos los fármacos disponibles. Provocando un creciente número de infecciones bacterianas causales de enfermedades como la diarrea o infecciones en vías respiratorias; y en gran medida la proliferación de infecciones nosocomiales provocadas por especies como *Candida albicans* (Nassar *et al.*, 2012).

Este patógeno en particular, ha incrementado su importancia clínica debido a su diverso espectro patológico. *C. albicans* provoca lesiones no mortales en la piel y mucosas, además es causal de infecciones que pueden invadir órganos vitales y provocar la muerte sobre todo en pacientes inmunocomprometidos (McCullough *et al.*, 1996; Pappas *et al.*, 2015). Del mismo modo el incremento en su resistencia a gran cantidad de antibióticos y su capacidad para desarrollar factores de virulencia han limitado las estrategias para su tratamiento, por lo que el desarrollo de nuevos antifúngicos ha tomado gran importancia en los sistemas sanitarios a nivel global (Carrillo-Muñoz *et al.*, 2001; Naglik, *et al.*, 2011).

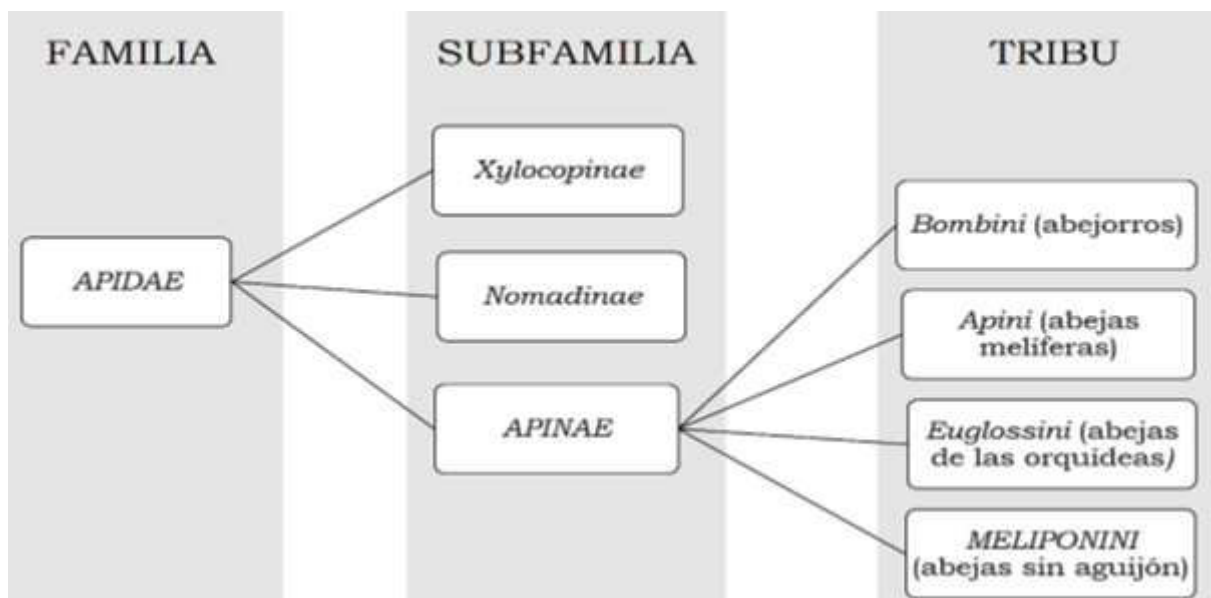
El estudio del efecto antifúngico de la miel de *M. beecheii* contra *C. albicans*, es un área de gran relevancia en las terapias naturales. Así como conocer la existencia de posibles efectos sinérgicos que podrían impedir el desarrollo de microorganismos resistentes a los antibióticos.

## CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

### 2. LA MELIPONICULTURA Y LA MIEL.

#### 2.1 La meliponicultura.

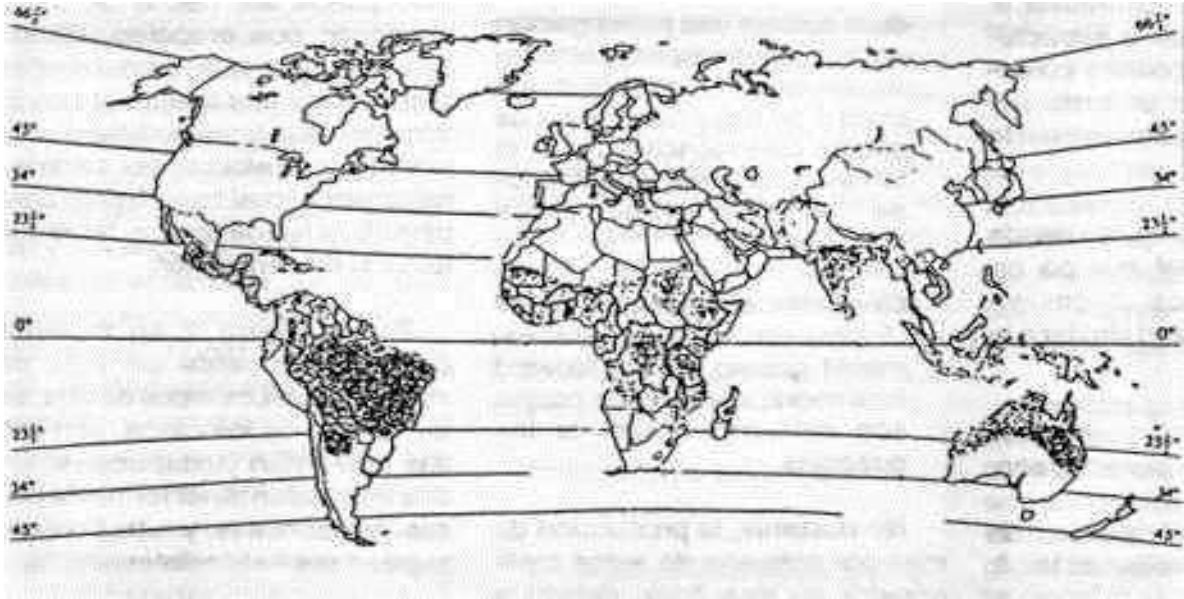
La meliponicultura es un tipo de apicultura caracterizada por el uso y manejo de abejas sin aguijón (Temaru *et al.*, 2007). Estas especies de insectos son altamente sociales, viven en colonias permanentes con una reina y varias docenas de abejas obreras, se caracterizan por poseer un aguijón escasamente desarrollado y no funcional, están clasificadas dentro de la familia Apidae y la tribu Meliponini (Figura 1) (Euán, 2005 & González *et al.*, 2010).



**Figura 1.** Clasificación simplificada de las abejas sin aguijón (Euán 2005).

Su distribución es muy amplia, abarcan lo largo de las áreas tropicales y subtropicales del mundo, desde los 30° latitud norte hasta los 30° latitud Sur (Figura 2).

En América, se han encontrado cerca de 30 géneros de estas abejas, dispersas desde México hasta Argentina; en África unos 10 géneros, en el sureste de Asia 14, mientras que en Australia sólo 2, de modo que la mayor concentración y diversidad de especies se encuentra en la cuenca amazónica en Sudamérica (Nieh 2004 & Ramírez *et al.*, 2010).



**Figura 2.** Distribución geográfica de las abejas meliponini, Imagen tomada de [http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas\\_tec/FonaiapDivulga/fd50/abejas.htm](http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/FonaiapDivulga/fd50/abejas.htm)

En nuestro país, se ha reportado la existencia de al menos 1,795 especies de abejas, de las cuales sólo 46 son abejas sin aguijón (Ayala *et al.*, 2013), mismas que son empleadas en la polinización controlada, el arte (Figura 3), la extracción de miel, cera y polen, así como en la medicina tradicional.

En la península de Yucatán, se han registrado al menos 16 especies de abejas sin aguijón, destacando dos: la *Melipona beecheii*, por su amplia distribución geográfica en el territorio nacional y por los diferentes usos que se le da a esta especie, y la *Melipona yucatanica*, considerada la única especie endémica de la región (Euán, 2005).

Entre los usos más importantes que se les da a las abejas sin aguijón en la península están la producción de miel y como polinizadores naturales particularmente en invernaderos, donde se han obtenido resultados positivos en cultivos de chile habanero (*Capsicum chinense*) y tomate (*Lycopersicum esculentum*) utilizando diferentes especies de abeja sin aguijón como la especie *Nannotrigona perilampoides* (González *et al.*, 2011).



**Figura 3** A) Artista huichol usando la cera de *Scaptotrigona hellwegeri*, en una pieza de madera para su trabajo con cuentas de chaquira, B) Arte huichol que representa a las abejas sin aguijón, C) Arte plumario. (Ayala *et al.*, 2013).

### 2.1.1 Impacto social.

La Meliponicultura, es reconocida popularmente en toda Latinoamérica donde es aprovechada por muchas culturas indígenas, como la región amazónica de Perú y Brasil, o en Colombia donde además de consumir la miel y la cera, también se consumen las larvas (Baquero *et al.*, 2007).

Es considerada una actividad de importante tradición ancestral, un ejemplo, es el estado de Yucatán, reconocido como el sitio de mayor concentración de Meliponicultura (Euán, 2005). De este modo se sabe que el cultivo de estas abejas data desde tiempos de la civilización maya, donde se ha postulado, surgió y difundió a otros grupos indígenas de Mesoamérica y más tarde a regiones geográficas fuera de ella (Euán, 2005 & González *et al.*, 2010). Pero no es el único sitio del país donde se realiza esta actividad, se cuenta con un considerable número de meliponicultores, distribuidos en La sierra Norte de Puebla (Cuetzalan), las Huastecas (sobre todo la potosina), el Totonacapan en Veracruz y la Sierra de Atoyac en Guerrero donde aún florece esta actividad aprovechando a diferentes especies sin aguijón pero con un patrimonio cultural menor debido con seguridad a la falta de información (González-Acereto, 2012).

### **2.1.2. Impacto económico.**

La meliponicultura es considerada una actividad económicamente viable, sencilla y de fácil establecimiento, ya que presenta diferentes ventajas (ASERCA, 2011) como son:

- ❖ Bajo costo de implementación, mantenimiento, equipos e insumos, ya que se requieren pocas herramientas para la construcción de colmenas y meliponarios.
- ❖ Baja inversión en tiempo y mano de obra.
- ❖ Fuente de ingresos complementaria.
- ❖ Presta servicios ambientales a los agroecosistemas a través de la polinización.

Además, la docilidad y fácil manejo de las abejas permite mantener las colmenas sin riesgo y obtener productos reconocidos y apreciados, con precios elevados y con una fuerte demanda local, nacional y mundial (Tierra, 2012).

No obstante, de acuerdo a los Censos Agropecuarios (2007) del INEGI y reportes de la SAGARPA (ACERCA 2011), la Meliponicultura es una actividad en peligro de desaparecer, debido al escaso conocimiento y a la actualización en el manejo de estas especies de abeja, provocando el deterioro del cultivo de las abejas locales, así como a la escasa obtención de recursos económicos, muy diferente a lo que sucede con la explotación de *Apis mellifera*, por lo que su uso se ha limitado a órdenes religiosos o propósitos medicinales por parte de los productores.

### **2.2 La miel de abejas sin aguijón.**

La miel de abejas sin aguijón es una fuente de alimento muy valorada, considerada exótica por su sabor agridulce y aspecto característico, catalogándola como un producto de alta demanda, alcanzando precios más altos que la miel producida por abejas del género *Apis* (de Queiroz Pimentel *et al.*, 2013).

Se ha empleado de forma tradicional tanto la miel de Melipona como de otras especies sin aguijón en el tratamiento de desórdenes digestivos, enfermedades de los ojos como cataratas y pterigión, recuperación post-parto, así como en infecciones respiratorias y heridas en la piel (Vit *et al.*, 2004).

Todo esto ha sugerido que la miel de abejas sin aguijón mejora varios sistemas de control digestivo, respiratorio, desórdenes visuales y de la piel, mediante el bloqueo de



la adherencia de microorganismos patógenos causales de estas afecciones (Vit *et al.*, 2004; Ramón-Sierra, *et al.*, 2016). Y al mismo tiempo ha relacionado la composición de la miel con las propiedades medicinales que puede presentar (Vit *et al.*, 2004 & Dardón *et al.*, 2008).

### **2.2.1 Composición de la miel y su efecto antimicrobiano.**

A diferencia de la miel de *Apis mellifera*, la información que se tiene acerca de la miel de abejas sin aguijón es escasa, por lo que no está incluida en los estándares internacionales de miel (Codex Alimentario y la Comisión Internacional de Miel) y por tanto no está especificado por autoridades alimentarias (Moo-Huchin *et al.*, 2015).

Incluso en muchas regiones de Latinoamérica la miel de meliponinos no tiene clasificación botánica, ni cuenta con la identificación de los compuestos principales asociados con las propiedades medicinales (Vit *et al.*, 2004).

Aunque los métodos oficiales para el control de calidad de la miel se han limitado a la miel de *A. mellifera*, diferentes autores han reportado la composición de la miel de diferentes especies sin aguijón (Tabla 1). Sin embargo, las diferencias marcadas entre los niveles estándar permitidos por la Codex alimentaria para la miel de *A. mellifera* y los valores obtenidos para las diferentes mieles de especies sin aguijón, sugiere la gran importancia en la modificación de los estándares de calidad de la miel (Vit *et al.*, 2004; Moo-Huchin *et al.*, 2016).

Por otro lado, estas diferencias señalan que la composición de la miel dependerá además de la abeja productora, de factores como la fuente de polen, el clima, las condiciones ambientales y geográficas (Noori *et al.*, 2013).

Entre las diferencias más importantes destacan el contenido de agua, una característica importante en la miel, ya que esto determina en gran medida su grado de conservación, maduración y vida media, otra característica importante es su acidez, que contribuye a su sabor, olor, mejora su actividad antioxidante y su efectividad contra la acción de microorganismos (Moo-Huchin *et al.*, 2016).

**Tabla 1. Estándares sugeridos para mieles de abeja sin aguijón. comparados con el Codex Oficial de la Comisión de estándares Alimentarios para la miel de *Apis mellifera***

<b>Especie</b>	Contenido de agua (g/100g)	Azúcares reductores (g/100g)	Acidez (meq/100g)	Cenizas (g/100g)	HMF (hidroxi-metilfurfural) (mg/kg)	Referencia.
<i>Apis mellifera</i>	Max. 20	Min 65	Max 40	Max 0.5	Max 40	Codex alimentario.
<i>Scaptotrigona</i> spp.	Max. 30	Min 50	Max. 85	Max. 0.5	Max 40	Vit <i>et al.</i> , 2004
<i>Trigona</i> spp.	Max 30	Min. 50	Max. 75	Max. 0.5	Max. 40	Vit <i>et al.</i> , 2004
<i>Tetragonista angustula</i>	17.5	65.8	17.4	0.3	0.2	Dardón <i>et al.</i> , 2008.
<i>Nannotrigona perilampoides</i>	16.54	-	9.93	0.3	0.1	Dardón <i>et al.</i> , 2008.
<i>Melipona</i> spp.	Max. 30	Min 50	Max 70	Max 0.5	Max. 40	Vit <i>et al.</i> , 2004
<i>Melipona beecheii</i>	17.3	68	23	0.07	0.1	Dardón <i>et al.</i> , 2008
<i>Melipona beecheii</i>	21-25	57-74	Max. 71	Max. 0.6	Max. 45	Moo-Huchin <i>et al.</i> , 2016.

El efecto antimicrobiano de la miel de las abejas sin aguijón también ha sido relacionado con sus propiedades fisicoquímicas, factores como la alta concentración de azúcares, la acidez, la generación de peróxido de hidrógeno, así como la presencia de ciertos compuestos han sido identificados como los responsables en la inhibición de patógenos (Noori *et al.*, 2013).

La alta osmolaridad y el bajo pH de la miel fueron los primeros factores que se postularon como responsables de su actividad antimicrobiana, hasta que se observó que mieles con pH>5 también pueden inhibir el crecimiento de microorganismos (Bogdanov, 1997), otros factores como el contenido de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el metilglioxal reportados en miel de Manuka, son importantes en la actividad, teniendo un efecto aditivo o sinérgico, ya que se ha observado la persistencia de la actividad aún después de la eliminación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ortiz-Vázquez *et al.*, 2013).

El contenido de compuestos fenólicos también ha jugado un papel importante para la actividad de la miel (Wahdan, 1998 & Kwakman *et al.*, 2010), muchos estudios han

determinado que los flavonoides muestran un rango muy amplio de actividad biológica, incluida un potente efecto inhibitorio contra bacterias y hongos (Magaña-Ortiz *et al.*, 2016). En especial estos últimos que han mostrado mayores dificultades en su tratamiento, Candiracci y colaboradores (2012) demostraron que los flavonoides presentes en la miel pueden ocasionar daños en la membrana e impidiendo la conversión levadura a hifa de *C. albicans*.

Otros autores han propuesto la participación de compuestos proteicos en la actividad antimicrobiana (Ramón-Sierra *et al.*, 2016). Kwakman y colaboradores (2011), propusieron la presencia de péptidos catiónicos antimicrobianos (AMP), como la defensina-1, también conocida como royalisina, estas moléculas son conocidas por su potente, rápido y amplio espectro de actividad antimicrobiana, capaces de perturbar o penetrar la membrana celular causando la muerte del microorganismo.

### **2.2.2 La miel de melipona como alternativa medicinal.**

El control y el conocimiento de los microorganismos han sido un tema importante para la prevención y el tratamiento de enfermedades que pueden provocar la muerte. Por lo que la medicina moderna ha dependido en gran medida del descubrimiento de productos microbianos o derivados que tengan la capacidad de inhibir y eliminar el crecimiento de microorganismos patógenos, sin dañar al huésped ni provocar resistencias (Prescott *et al.*, 2004; Shekh & Roy, 2012).

Actualmente se ha visto un incremento en la incidencia de microorganismos resistentes a los tratamientos con antimicrobianos, ocasionando un problema grave de salud pública que se acrecienta día con día. Esta resistencia es debida a factores como el empleo incorrecto de los antibióticos, abuso en su utilización o el uso prolongado, provocando la sobreinfección (Prescott *et al.*, 2004).

Diversos estudios han evaluado el efecto inhibitorio *in vitro* de la miel de *Apis mellifera* y la miel de especies sin aguijón, contra algunas especies bacterianas patógenas para los humanos como *Staphylococcus aureus* o *Escherichia coli*, que han tomado un fuerte interés clínico por presentar multirresistencia (Zamora *et al.*, 2011; Noori *et al.*, 2012; Ortiz-Vazquez *et al.*, 2013). Sin embargo, el efecto de la miel contra hongos o levaduras, ha sido poco estudiado (Irish *et al.*, 2006; Estevinho *et al.*, 2011).

El aumento en la incidencia de infecciones fúngicas, causadas por especies del género *Candida* (como *C. albicans* o *C. krusei*), *Cryptococcus* (*Cryptococcus neoformans*) y *Aspergillus* (*Aspergillus fumigatus*), además del lento desarrollo de antifúngicos debido a los problemas de toxicidad, ha llevado al análisis de la capacidad antifúngica de productos naturales como la miel para el tratamiento de estas infecciones (Prescott *et al.*, 2004; Irish *et al.*, 2006; Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009; Campoy & Adrio, 2017).

Entre los pocos estudios relacionados con este efecto inhibitorio *in vitro* de la miel contra hongos y levaduras, ha tomado interés la inhibición de especies de *Candida* especialmente *C. albicans* (Tabla 2), debido a su creciente incidencia y resistencia.

<b>Tabla 2. Reportes de actividad antifúngica de miel contra hongos/levaduras.</b>			
<b>Tipo de miel</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>CMI (v/v)</b>	<b>Referencia</b>
<b>Especies sin aguijón de Guatemala</b>	<i>Candida albicans</i> <i>Cryptococcus neoformans</i>	2.5-10%	Dardón <i>et al.</i> , 2008
<b>Miel de Turquía</b>	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> y <i>Trichosporon</i> .	>35%	Koc <i>et al.</i> , 2009
<b><i>Trigona carbonaria</i> y <i>Apis mellifera</i></b>	<i>C. albicans</i> y <i>C. glabrata</i>	>32%	Boorn <i>et al.</i> , 2010
<b>Miel monofloral (<i>Erica sp.</i>)</b>	<i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i>	60%	Feás & Estevinho, 2011
<b><i>Apis mellifera</i> (miel de manuka)</b>	<i>C. albicans</i>	30%	Alzahrani <i>et al.</i> , 2012
<b>Miel de acacia</b>	<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>Aspergillus nidulans</i>	>30%	Noori <i>et al.</i> , 2013
<b>Miel monofloral de <i>Apis mellifera</i></b>	<i>C. glabrata</i> , <i>C. albicans</i>	3-15%	Ahmed <i>et al.</i> , 2014

### 2.3 Género *Candida*.

En años recientes las infecciones nosocomiales relacionadas con hongos han ido en aumento, siendo los diagnósticos más frecuentes las especies pertenecientes al género *Candida* (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009).

Estas especies de levadura pueden provocar simples infecciones invadiendo la superficie de la mucosa o atravesarla resultando en infecciones sistémicas que afectan diferentes órganos llevando a la muerte (Pappas *et al.*, 2015 & Du *et al.*, 2009).

Los pacientes inmunocomprometidos, es decir, aquellos que se encuentran gravemente débiles y tienen disminuida su resistencia a infecciones, debido a problemas como la malnutrición, el alcoholismo, el cáncer, la diabetes, leucemia o

cualquier enfermedad infecciosa; por traumatismo quirúrgico, trasplantes o incluso por alteraciones en la microbiota por el uso prolongado de antibióticos, son los más susceptibles dando lugar a una severa morbilidad en millones de individuos en el mundo (Herman *et al.*, 2002 & Prescott *et al.*, 2004).

Existen más de 200 especies en el género *Candida* pero sólo unas pocas son especies patógenas oportunistas en humanos (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009). *Candida albicans* es la especie más frecuente, su capacidad de interacción huésped-hongo y sus atributos putativos de virulencia, contribuyen a su sobrevivencia y persistencia en el huésped (Herman *et al.*, 2002 & Naglik *et al.*, 2011).

### **2.3.1 Enfermedades causadas por *C. albicans*.**

*C. albicans* es una especie de levadura con particular interés clínico porque a diferencia de otros hongos o levaduras patógenas, ésta puede encontrarse como miembro de la microbiota normal de las personas, siendo aislada en el tracto digestivo, las vías respiratorias, el área vaginal y la boca de aproximadamente el 70% de la población (Han *et al.*, 2011), donde mayormente es inofensiva, pero si la persona está inmunocomprometida rápidamente puede ser un patógeno oportunista (Calderone *et al.*, 2001; Brunke *et al.*, 2013).

La presencia de *C. albicans* en diferentes nichos biológicos le proporcionan la capacidad de producir un espectro patológico muy diverso, la mayoría de las infecciones que provoca *C. albicans* son en mucosas oral, esofágica y genital (Tabla 3) (Prescott *et al.*, 2004), pero a la vez es la causa principal de infecciones en el torrente sanguíneo, atribuyéndole hasta un 44% de las muertes en pacientes severamente inmunocomprometidos (Han *et al.*, 2011; Mayer *et al.*, 2013).

Uno de los principales problemas que representa las infecciones por *C. albicans*, son su difícil diagnóstico por ser parte de la microbiota normal del cuerpo, es común encontrarla como microbiota mixta (microbiota con invasor) en los tejidos enfermos o confundirla como un invasor secundario por contagio después de una infección previa y al no disponer de procedimientos inmunológicos totalmente específicos, la identificación de la especie invasora puede tardar de 15 días a un mes (Prescott *et al.*, 2004).

Estas infecciones pueden ocurrir como resultado de un desbalance en la inmunidad del huésped, pero también es debido a la capacidad del hongo para adaptarse a nuevos nichos, dependiendo de la presencia de factores que contribuyen a su patogenicidad (Calderone *et al.*, 2001).

**Tabla 3. Enfermedades asociadas a *C. albicans***

Enfermedad	Características	Causa de contagio
Candidiasis bucal o muguet	Es una enfermedad bastante común en recién nacidos, se observa en forma de numerosas manchas blancas sobre la lengua y la boca.	Se da debido a que al nacer, los bebés carecen de microbiota normal en el área bucofaríngea, por lo que si la vagina materna está infectada, al pasar por el canal de parto, se coloniza la vía respiratoria del recién nacido.
Paroniquia y onicomicosis	Se asocian a infecciones por <i>Candida</i> de los tejidos subcutáneos de la punta de los dedos y de las uñas, respectivamente.	Éstas suelen ser consecuencia de la inmersión continua de los dedos en agua.
Candidiasis intertriginosa	Afecta a zonas del cuerpo, calientes y húmedas.	Generalmente se presenta en superficies cutáneas enfrentadas: axilas, ingles y pliegues cutáneos.
Candidiasis del pañal	Se produce en lactantes a los que no se les cambia a menudo el pañal.	Al no estar secos, producen una atmosfera idónea para su proliferación.
Vaginitis por <i>Candida</i>	Su principal síntoma es la producción de una secreción blanco-amarillenta, en la zona vaginal, puede transmitirse a los varones durante relaciones sexuales, por lo que puede considerarse también una enfermedad de transmisión sexual.	Puede ser consecuencia de diabetes, tratamiento con antibióticos, anticonceptivos orales, embarazo o cualquier otro factor que comprometa las defensas.
Balanitis	Comienza en forma de vesículas sobre el pene, que se convierten en manchas y se acompañan de intenso picor y quemazón.	Infección por <i>Candida</i> del glande del pene masculino y se da fundamentalmente en varones no circuncidados.

Fuente: Prescott *et al.*, 2004

### 2.3.2 Factores de virulencia de *C. albicans*.

La transición que *C. albicans* experimenta de especie comensal a especie patógena ha sido atribuida a ciertos factores de virulencia que le permiten persistir tanto en el huésped sano, como en los que sufren de deficiencias inmunológicas (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009; Nailis *et al.*, 2010). La transición morfológica de levadura a hifa, la expresión de moléculas de adherencia e invasión al huésped, el cambio fenotípico y la secreción de enzimas hidrolíticas son considerados los factores de virulencia más importantes en *C. albicans* (Mayer *et al.*, 2013).

Estos factores le proporcionan a *C. albicans* su capacidad para invadir diversos sitios del cuerpo, donde cada uno de estos presentará sus propios factores de protección y por tanto la invasión dependerá tanto de los atributos del hongo como de la pérdida total o parcial de las defensas del huésped (Herman *et al.*, 2002).

### **2.3.2.1 La función de las adhesinas en el reconocimiento del huésped.**

La adhesión a las células huésped es una de las características más importantes en organismos comensales y patógenos que poseen sistemas que detectan la presencia del huésped por señales ambientales y permiten la expresión de adhesinas específicas (Brunke *et al.*, 2013). En *C. albicans* la adhesión representa el paso inicial en el proceso de invasión e infección, y es crucial para su sobrevivencia en el huésped (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009).

La adhesión es un proceso complejo y multifactorial, donde primero existe una interacción entre las células de la pared del hongo y la superficie de las células que generalmente están cargados negativamente, involucrando factores no específicos como las fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas así como efectos de la repulsión eléctrica contribuyendo con la energía libre total de la interacción (Naglik *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2013). Posteriormente, la adherencia está mediada por proteínas especializadas de la superficie del hongo llamadas adhesinas, que se unen a ligandos específicos (Tabla 4) sobre la superficie de la célula huésped (Sardi *et al.*, 2013).

Un grupo importante de adhesinas son codificadas por los genes de la familia ALS (Aglutinin-Like Sequence, por sus siglas en inglés), esta familia codifica 8 proteínas glicosiladas, tienen 3 dominios característicos: un dominio N-terminal, donde se cree reside la función adhesina; un dominio central que consiste de una secuencia repetida de 36 aminoácidos y un dominio C-terminal de longitud variable (Zhao *et al.*, 2005). Están asociadas con el  $\beta$ -1,6-glucano de la pared celular de *C. albicans* (Williams *et al.*, 2013).

**Tabla 4. Adhesinas de *C. albicans* y ligandos asociados a la célula huésped**

<b>Adhesina de <i>Candida</i></b>	<b>Receptor de la célula huésped</b>
Análogo de Integrina (INT)	Tripéptido Arginina-Glicina-Acido aspártico (RGD)
Adhesina de fibronectina (FN)	Receptores de fibronectina y vitronectina.
Adhesina de unión a fucósidos	Receptores de glucósidos, glicoproteínas y glicolípidos
Familia ALS	Múltiples receptores incluyendo E-cadherina, N-cadherina y ferritina.
Proteína de la pared de la hifa (HWP1)	Un sustrato de la célula epitelial asociada con la transglutaminasas facilitando el entrecruzamiento con células epiteliales.

Fuente: (Williams *et al.*, 2013)

Las diferencias entre estas proteínas no han sido totalmente investigadas a detalle, pero se ha visto que están involucradas en diferentes procesos; por ejemplo, la proteína Als3 juega un rol importante no sólo en la adhesión a las células epiteliales orales, si no también está relacionada con la extensión del daño epitelial y la inducción de las citoquinas epiteliales (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009; Williams *et al.*, 2013).

La proteína de la pared de la hifa 1 (Hwp1) codificada por el gen HWP1, es otra proteína involucrada en la adhesión epitelial; ésta se une a las células epiteliales por medio de sus residuos de glutamina del dominio N-terminal mediante la actividad transglutaminasa del propio huésped uniéndose covalentemente a la levadura (Williams *et al.*, 2013). Además se ha demostrado que las proteínas Als3 y Hwp1 están involucradas en la formación de biofilm (Mayer *et al.*, 2013).

#### **2.3.2.2 Formación de biofilm.**

La capacidad de *C. albicans* para formar biofilm sobre superficies abióticas o bióticas es otro factor importante involucrado en su virulencia. Estos biofilm consisten en comunidades específicas y organizadas de micro-colonias de levadura, hifas y pseudo-hifas dispuestas en una estructura compleja bajo el control de moléculas de señalización y no acumulaciones aleatorias de células en división celular (Hasan *et al.*, 2009 & Sardi *et al.*, 2013). Por lo que su formación es un proceso que ocurre de manera secuencial, iniciando con la adherencia (Etapa de adherencia) de las células planctónicas a la superficie de la célula epitelial o dispositivo mediante la intervención de adhesinas. Una vez adheridas, las células de levadura proliferan a través de la superficie mediante proyecciones alargadas en forma de hifas y pseudo-hifas principalmente en la parte superior del biofilm (Etapa de iniciación), la acumulación de



la matriz extracelular permite la maduración del biofilm (Etapa de maduración), para finalmente las células de levadura que no están adheridas sean liberadas del complejo al medio circundante (Etapa de dispersión) (García-Sánchez *et al.*, 2004 ; Finkel *et al.*, 2011; Mayer *et al.*, 2013).

Reportes recientes han sugerido no sólo que la mayoría de las enfermedades producidas por *C. albicans* están asociadas con el crecimiento del biofilm, sino que son mucho más resistentes a los agentes antimicrobianos y a factores inmunes del huésped en comparación con las células individuales (Hasan *et al.*, 2009, Mayer *et al.*, 2013 & Sardi *et al.*, 2013).

### **2.3.2.3 Morfogénesis/ dimorfismo morfológico.**

*C. albicans* al igual que otros hongos polimórficos, poseen la capacidad de crecer en diferentes formas morfológicas (Han *et al.*, 2011). Estas incluyen la forma típica de levadura, hasta hifa y pseudohifa de acuerdo a las condiciones ambientales. De aquí que se le aplique el término de dimorfismo, aunque el término más apropiado es el de polimorfismo, donde las hifas y pseudohifa se refieren a las formas filamentosas (Herman *et al.*, 2002 & Han *et al.*, 2011).

A través de su forma de levadura o blastosporas, es como se encuentra comúnmente en el laboratorio, mientras que su forma de pseudohifa o hifas, se encuentran bajo variadas condiciones que pueden reflejar el ambiente encontrado durante las infecciones (Magee, 1988). Por lo que esta habilidad de cambiar entre una forma de crecimiento u otra se ha considerado un factor de virulencia crítico en este microorganismo (Han *et al.*, 2011), porque se cree le confiere ciertas ventajas durante la infección.

Sin embargo, el estudio del proceso de conversión ha sido complicado ya que diversas condiciones ambientales pueden desencadenarlo, incluidas la temperatura (>30°C), pH (mayormente alcalino), la proporción CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> o el requerimiento de nutrientes específicos en el medio, como la prolina, N-acetil glucosamina, suero o diferentes fuentes de carbono; aunque también se ha observado la morfogénesis en medios pobres en nutrientes (Pla *et al.*, 1996; Herman *et al.*, 2002 & Han *et al.*, 2011).

#### **2.3.2.4 Producción de enzimas extracelulares.**

La invasión de los tejidos por *C. albicans* está acompañada por la producción y secreción de tres clases de enzimas: proteasas, fosfolipasas y lipasas (Mayer *et al.*, 2013), siendo las más importantes las proteasas y las fosfolipasas debido al rol que juegan no sólo en la nutrición, sino también en el daño al tejido y la posterior diseminación durante la infección, contribuyendo fuertemente a la patogenicidad (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009).

Las fosfolipasas son enzimas que hidrolizan los enlaces éster de los glicerofosfolípidos, liberando ácidos grasos. Existen cuatro tipos de ellas PLA, PLB, PLC y PLD cada una específica para enlaces éster individuales (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009). Sin embargo, sólo los miembros de la clase B han mostrado ser requeridos para la patogenicidad en modelos de infección sistémica en ratones (Calderone *et al.*, 2001; Mayer *et al.*, 2013), mientras que el rol de las otras clases aún no está claro, ocasionando discusión sobre la correlación entre la actividad fosfolipasa y la virulencia (Herman *et al.*, 2002; Sardi *et al.*, 2013).

Las Aspartil Proteasas Secretadas (SAP; por sus siglas en inglés) son descritas como proteínas de 42-45 kDa, que tienen una amplia especificidad de sustratos que incluyen: queratina, colágeno dérmico, albúmina, hemoglobina y proteínas de la matriz extracelular (Herman *et al.*, 2002). Se han incluido al menos 10 genes diferentes (SAP1-SAP10), que codifican para enzimas con funciones y características similares, pero que presentan diferencias moleculares y químicas (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009).

Su función en el desarrollo de la enfermedad ha sido evaluado usando diversos enfoques experimentales, incluyendo microscopía de inmunoelectrones, RT-PCR e incluso la construcción de cepas con genes suprimidos (Calderone *et al.*, 2001; Herman *et al.*, 2002).

Ambas clases de enzimas han sido relacionadas con la patogénesis de *C. albicans*, y aunque se desconoce el rol específico de cada una de ellas (Herman *et al.*, 2002), se han reportado su participación en funciones especializadas como la digestión de

moléculas proteicas para adquirir nutrientes, así como su participación en la adherencia y daño del tejido huésped (Sardi *et al.*, 2013).

#### **2.3.2.5 Cambio fenotípico.**

El cambio fenotípico o también llamado cambio de alta frecuencia (Scherer *et al.*, 1990), es definido como el cambio espontáneo en la morfología de una colonia que es heredable y ocurre con mayor frecuencia que una mutación espontánea (Herman *et al.*, 2002). Este cambio es parte importante del proceso de adaptación a las modificaciones ambientales durante el proceso de invasión (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009).

Los cambios fenotípicos que ocurren incluyen la morfología, las propiedades de la superficie celular, apariencia de la colonia e incluso propiedades bioquímicas y/o metabólicas para volverse más virulentas o más efectivas durante la infección (Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009).

Sin embargo, no se tiene claro cuál es el mecanismo que lleva a cabo este cambio. Siendo el sistema más estudiado de cambio el blanco-opaco de la cepa de *C. albicans* WO1, donde el fenotipo cambia de colonias lisas, blancas y ovaladas a grises (opacas) y rugosas, además cada fenotipo presenta diferencia en su virulencia siendo las cepas con fenotipo blanco más virulentas en análisis con sistemas animales (Yang, 2003; Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009).

Se ha visto además que la mayoría de las cepas de *C. albicans* son capaces de presentar un cambio fenotípico, pero serán diferentes entre cepas aún en las mismas condiciones (Herman *et al.*, 2002).

#### **2.4 Antifúngicos y su resistencia.**

El desarrollo de nuevas terapias contra los hongos ha supuesto un reto mayor en comparación con el desarrollo de las terapias bacterianas, por lo que sólo hay un número restringido de productos químicos (Tabla 5) empleados actualmente de manera oral, tópica o intravenosamente para contrarrestar las infecciones causadas por hongos (Prescott *et al.*, 2004; Delarze *et al.*, 2015 & Campoy *et al.*, 2016).

**Tabla 5. Clasificación de agentes antifúngicos de acuerdo con su objetivo en el tratamiento.**

Clase química	Antifúngico	Mecanismo de acción.
Azoles	Imidazol (Clotrimazol, miconazol y ketoconazol) Triazoles (Itraconazol y fluconazol) 2° generación (Posoconazol y Voriconazol)	Inhiben la síntesis de ergosterol mediante el bloqueo de la 14 $\alpha$ -demetilasa, resultando en la acumulación de esteroides 14 $\alpha$ -metilados tóxicos que son responsables de la inhibición del crecimiento.
Polienos	Anfotericina B y Nistatina	Forman complejos con el ergosterol y alteran la membrana plasmática del hongo provocando un incremento en la permeabilidad de la membrana, la fuga del contenido citoplasmático y finalmente la muerte.
Equinocandinas	Caspofungina, micofungina y anidulungina	Inhiben el complejo (1-3)- $\beta$ -D-glucano sintasa, provocando la ruptura del crecimiento de la pared celular, resultando en la inestabilidad osmótica y la muerte celular.
Pirimidina	Flucitosina	La 5-FC o 5-Fluorocitosina es un análogo de la pirimidina fluorada que interfiere con el metabolismo de la pirimidina. Las células fúngicas la absorben transformándola primero en 5-Fluoridina (5FU) y luego en 5-fluoridina monofosfato (5-FUMP) que es incorporado al ARN en lugar de UTP, resultando en la inhibición de la síntesis proteica, mientras que el 5FU, inhibe la síntesis de ADN.

Fuentes: (Odds *et al.*, 2003; Akins *et al.*, 2017; Kathiravan *et al.*, 2012; Campoy *et al.*, 2016)  
Esta limitante en el número de agentes fúngicos se ha debido principalmente a que los hongos al ser organismos eucarióticos que parasitan huéspedes eucarióticos presentan muchas similitudes entre ellos, llevando a que muchos de los objetivos clave de los antifúngicos también se encuentran en humanos, ocasionando grandes riesgos de toxicidad y dificultan el desarrollo de agentes antifúngicos seguros y de amplio espectro, ya que en su mayoría presentan actividad fungistática (Morace *et al.*, 2014; Campoy *et al.*, 2016).

La resistencia a los agentes antimicrobianos es otra problemática creciente en el manejo de las infecciones. La resistencia es un proceso evolutivo debido a eventos multifactoriales basado en la selección natural de los organismos, aumentando su habilidad para sobrevivir y crecer en presencia de fármacos. Involucra modificaciones moleculares que a menudo relacionan el mecanismo de acción del fármaco y les permite contrarrestar los efectos del mismo (Morace *et al.*, 2014). Esta resistencia

puede desarrollarse mediante diferentes mecanismos: El primero se basa en la reducción de la concentración efectiva del fármaco y es conocida como resistencia primaria o intrínseca; El segundo mecanismo involucra la alteración del objetivo del antifúngico o la modificación del metabolismo para desviar el efecto toxico del fármaco, es conocida como resistencia adquirida y es resultado de una o varias alteraciones genéticas (Sanglard *et al.*, 2002; Campoy *et al.*, 2016).

De aquí la importancia en la identificación de nuevos compuestos con los que estos microorganismos no hayan tenido contacto, que además tengan objetivos específicos que sean críticos para el desarrollo del hongo evitando así dañar las células huésped y el desarrollo de la resistencia.

La evaluación de la capacidad antifúngica de la miel ha tomado particular relevancia como una alternativa al uso de antifúngicos convencionales, sobre todo la miel de especies sin aguijón, ya que se ha observado diferencia en los porcentajes de miel de Apis y meliponinos empleados para inhibir diferentes especies fúngicas (Tabla 2). De ahí el interés de evaluar la capacidad antifúngica de la miel producida por especies sin aguijón especialmente la *M. beecheii*.

## **CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS.**

### **3.1 Justificación.**

La automedicación, la falta de conciencia en los tratamientos y sobre todo la inexactitud de los procedimientos de detección de enfermedades fúngicas, ha provocado que aumente el número de muertes por estas enfermedades. Que en conjunto con la variabilidad genética y morfológica intrínseca que presentan especies como *Candida albicans* junto con la resistencia natural que muchas veces exhibe ante los tratamientos disponibles, han provocado que la incidencia de enfermedades causadas por este patógeno se extienda, sobre todo en ambientes hospitalarios.

El uso tradicional de la miel de abejas sin aguijón al igual que su amplia gama de propiedades terapéuticas ha sido reportado y documentado para algunas especies, sin embargo, aunque se tiene indicios del efecto antifúngico de mieles de *Apis mellifera* se cuenta con poca información acerca de la capacidad antifúngica de abejas sin aguijón especialmente de la miel *Melipona beecheii*.

Ante el problema de resistencia a los antimicrobianos y conociendo la efectividad de la miel de *M. beecheii* para contrarrestar el crecimiento de otros patógenos humanos, se ha propuesto el estudio de la actividad antifúngica de la miel de *M. beecheii* del estado de Yucatán y de su extracto proteico contra *Candida albicans*; Así como la relación del efecto inhibitorio de la miel en la expresión de genes relacionados con la virulencia de este patógeno.

### **3.2 Hipótesis.**

La miel de *Melipona beecheii* tiene efecto sobre el crecimiento de *Candida albicans*, esta inhibición puede ser resultado de la acción de los componentes proteicos presentes en ésta. Además el efecto inhibitorio de la miel puede estar relacionado con cambios en la expresión de genes involucrados en la virulencia de este patógeno.

## **CAPÍTULO IV. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto antifúngico de la miel de *Melipona beecheii* y los componentes proteicos; así como el efecto de esta miel en la expresión de genes involucrados con la virulencia de *Candida albicans*.

### **4.2 Objetivos específicos**

- Evaluar la actividad antifúngica de la miel de *Melipona beecheii* y de su extracto proteico contra *C. albicans* ATCC 10231.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la miel y del extracto proteico.
- Analizar el efecto de la miel sobre la expresión de los genes HWP1 y SAP6, genes involucrados en la virulencia de *C. albicans*.

## **CAPÍTULO V. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Materia prima y microorganismo.**

La miel de *Melipona beecheii* se obtuvo del municipio de Maní, Yucatán. Esta fue recolectada de manera tradicional, es decir, sin ningún tratamiento o proceso, se tomó directamente del jobón (tronco hueco; nido tradicional de las abejas) y se mantuvo almacenada a temperatura ambiente y oscuridad.

La cepa empleada fue *Candida albicans* ATCC 10231, la cual se mantuvo en cajas de medio Sabouraud Dextrosa Agar (SDA), durante un máximo de 45 días y se conserva en glicerol al 20% a -80°C.

### **5.2 Extracción de compuestos proteicos de la miel de *M. beecheii*.**

Para la extracción se empleó el método de Schmitzova *et al.*, (1998) con algunas modificaciones, brevemente se disolvió la miel en una proporción de 1g miel/10mL de buffer de fosfato de sodio pH 7.0 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, con 10mM NaCl), la mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos con intervalos de agitación cada 5 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 4000 g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue transferido a columnas Amicon® ultra -15 (3K) y centrifugado a 4000g por 40 min, la muestra fue concentrada y almacenada a -20°C hasta su posterior análisis.

### **5.3 Cuantificación del extracto proteico de la miel de *M. beecheii*.**

El contenido proteico se determinó por medio del método de Bradford, empleando una curva estándar de BSA (Albumina Sérica Bovina, SIGMA) con concentraciones de 1, 2.5, 5, 10, 15, 20 µg/µL, después de la reacción se leyó la absorbancia a 595nm.

Para la muestra se tomó 1µL del extracto diluido en 90µL de H<sub>2</sub>O, adicionando un 1mL de la solución de Bradford. La muestra se incubó por 10 min a temperatura ambiente y al finalizar el tiempo, fue también leída a 595nm, usando como blanco el buffer de fosfatos (Bradford, 1976). La cuantificación se realizó por triplicado.

### **5.4 Determinación del perfil proteico.**

El perfil proteico se realizó mediante un sistema desnaturalizante (SDS-PAGE) (Bizani *et al*, 2005). Se utilizaron dos tipos de geles, un gel de separación al 12% de acrilamida y uno de apilamiento al 4%, en buffer de corrida (Glicina-Tris-SDS). Para la



preparación de la muestra se tomaron 5 µg del extracto y diluido en 3µL de buffer de carga (5x) y agua destilada hasta un volumen de 15µL, posteriormente la muestra fue incubada por 5 min a 95°C para favorecer a la desnaturalización. El gel fue corrido a 80V durante 2h a temperatura ambiente y teñido con nitrato de plata.

### **5.5 Determinación de actividad antifúngica de la miel y el extracto proteico.**

Se utilizó medio SDA y un inóculo previamente ajustado a 0.5 en la escala McFarland para ambas determinaciones. Para el análisis de la capacidad antifúngica de la miel se empleó el método de agar dilución (Boorn *et al.*, 2010), para esto se mezcló una dilución de miel con medio Sabouraud Dextrosa liquido (SD) dos veces concentrado (2X) y agua estéril de acuerdo a la concentración a emplear (0-40% v/v de miel), posteriormente con ayuda de una punta estéril se añadió mediante un “pozo” una concentración final de 10<sup>6</sup> UFC/mL. Posterior a la incubación, se observaron mediante microscopia electrónica de barrido las células que crecieron en el control y bajo la influencia de miel a una concentración de 20%.

Para el extracto proteico se empleó el método de difusión en cajas (Espinell-Ingroff *et al.*, 2007) con medio SDA, a las cuales se esparció el inóculo con un hisopo estéril a una concentración de 10<sup>8</sup> UFC/mL. Se dejó secar y colocaron discos de papel filtro, a cada uno se adicionó diferentes concentraciones del extracto a evaluar. Se añadió en un disco el buffer y fenol al 30% como control negativo y positivo respectivamente.

Todas las placas fueron incubadas a 37°C de 24 a 48 horas.

### **5.6 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Fungicida (CMF).**

Para ambos casos se empleó un inóculo previamente ajustado a 0.5 escala McFarland y se añadió en tubos para una concentración final de 10<sup>6</sup> UFC/mL, para la miel se utilizó macro diluciones para esto se emplearon tubos de rosca de 20-25mL con mezclas de 5mL de medio SD 2X y la concentración correspondiente del stock de miel al 80%(v/v) para cada concentración analizada y agua destilada estéril para un volumen final de 10mL. Para el extracto se empleó el método de micro diluciones con tubos de 1.5 mL a los que se les adicionó 250 µL de medio SD 2X con la cantidad de extracto correspondiente a la concentración a evaluar y agua destilada para un

volumen final de 500µL. Cada evaluación se realizó por triplicado y con su respectivo blanco. Se incubaron a 37°C durante 12, 24 y 36 horas (Espinell-Ingroff *et al.*, 2007) leyendo la absorbancia a 600nm, después de cada tiempo de incubación.

Para el caso del extracto después de cada lectura se realizó conteo de colonias. Brevemente se tomaron 100µL del medio con células, se realizaron diluciones y se esparcieron en cajas de medio SDA para luego incubar por 24 horas y contar el número de colonias que crecían en cada dilución de las concentraciones evaluadas.

Se consideró CMI aquella concentración que presentará un 80% de inhibición del crecimiento con respecto al control a las 24h y CMF a aquella concentración que presentara el 99% de inhibición a las 48h.

### **5.7 Extracción de ADN de *C. albicans*.**

La extracción de ADN se realizó de acuerdo al método descrito por Scherer *et al.*, 1987, con algunas modificaciones. Para esto se empleó un inóculo de 36h a 37°C en medio SD (50mL).

Se centrifugó el medio y la pastilla se lavó 2 veces con Buffer de Sorbitol 1M. Posteriormente, la pastilla fue resuspendida en 1mL del Buffer Sorbitol 1M con 50mM de buffer de fosfato de potasio pH 7.5, 0.1% (v/v) de β-mercaptoetanol y 0.2 mg/mL de Proteinasa K, se incubó por 60min a 50°C. Luego se centrifugó y la pastilla fue suspendida en 500 µL de buffer EDTA (50mM pH 8.0) con 2% de SDS. Se mezcló y se incubó por 30 min a 70°C. Después se realizó un lavado con fenol:cloroformo:alcohol Isoamílico (25:24:1) y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, se realizó un lavado con Cloroformo. Posteriormente el sobrenadante se colocó en un tubo nuevo y se añadió 5 µL de RNasa (10 µL/mL) y se incubó a 37°C por 30 min. Luego de la incubación se realizó un lavado con fenol:cloroformo:alcohol Isoamílico y otro con cloroformo, posteriormente se añadieron 50µL de acetato de sodio 5M, se mezcló e incubó en hielo por 30min. Se centrifugó y el sobrenadante se mezcló con 1mL de etanol absoluto toda la noche. Se centrifugó nuevamente y al sobrenadante se le añadió un volumen de etanol al 70%, se removió el etanol y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente por 15 min. Finalmente la muestra se suspendió en 20 µL de agua estéril. La muestra fue visualizada en un gel de agarosa

al 1% y TAE 1X (Tris 2M, Ácido Acético EDTA 0.5M pH 8). Las muestras fueron almacenadas a -20°C.

### 5.8 Detección de genes housekeeping y virulencia de *C. albicans*.

Para la detección de genes se realizó el diseño de oligos de los genes constitutivos y los genes de virulencia a analizar empleando la base de datos del GENBANK. En la Tabla 6 se muestra el gen, su función, el número de acceso del GenBank, la secuencia del oligo generado y el tamaño del fragmento esperado.

**Tabla 6. Oligos diseñados para detección de genes.**

<b>OLIGOS PCR TIEMPO FINAL HOUSEKEPING</b>				
<b>GEN</b>	<b>Función</b>	<b># Acceso</b>	<b>Secuencias</b>	<b>Tamaño de fragmento</b>
<b>CEF1</b>	Factor de elongación transcripcional	NW_139421.1	F: CCTGCAAGACCAGATGACGA R: GGGTGCCTGGTTCTGGTAAG	523
<b>EFB1</b>	Factor de elongación transcripcional	NW_139477.1	F: ACTCAAGCTGATGTCACTGTCT R: CAGTAGATTGGACGTGGTCTTCA	526
<b>ACT1</b>	Beta actina	NW_139430.1	F: TGGTGATGAAGCCCAATCCAA R: ACGTTCAGCAATACCTGGGA	775
<b>TDH1</b>	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa	NW_139449.1	F: GGAAACATCGGTGGTTGGGA R: TGCTTCTGGTGACGACTTGG	541
<b>RIP1</b>	Ubiquinol reductasa	NW_139424.1	F: CGCCTCTGCTGATGTTTTGG R: ACCAACAAGCAAGGTTTCATCA	400
<b>RPP2B</b>	Proteína acida ribosomal citosolica	AACQ01000003.1	F: AATCCGTTGGTGTGAAGCC R: CTAATCGAATAAACCGAAACCCATA	254
<b>PMA1</b>	Adenosintrifosfatasa	M74075.1	F: CGTTGCCGAATTTGCTTCCA R: ACAACCTGGGGCCAAGAAA	512
<b>LSC2</b>	Succinil-CoA sintetasa	NW_139603.1	F: TCAGCAGCTGGGTCCAAATC R: CGGTGGTGAACCAGCCAA	300
<b>OLIGOS PCR TIEMPO FINAL (VIRULENCIA)</b>				
<b>GEN</b>	<b>Función</b>	<b># Acceso Gen Bank</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Tamaño de fragmento</b>
<b>ALS1</b>	Adhesina	L25902.1	F: CAGCACAACCTCCGATTTGTC R: GCAGGTGATGGAGCTTCTGT	870
<b>ALS 3</b>	Adhesina	U87956.1	F: AGTTCCACTGCCAAACCCAA R: GGGGCAATAACAGTGGTGGT	513
<b>SAP 5</b>	Aspartil proteasa	Z30191.1	F: AATGGCGTGGTGACAAAGGA R: TTCGGAAACAGGAACGGAGA	686
<b>SAP 6</b>	Aspartil proteasa	Z30192.1	F: CCGTTGGTATTGGTGGTGCT R: AATCCGAAGCAGGAACGGA	544
<b>PLB 2</b>	Fosfolipasa	AF045558.1	F: TCAACGAAGCGGTGTTGTCT R: AGTGAATGGACGTTTGCCA	509
<b>HWP1</b>	Pared celular de la hifa	U64206.1	F: TCCAGAAGCTTCCATTCCACC R: GCAGATGGTTGCATGAGTGG	528
<b>ERG11</b>	Largosterol 14-alfa desmetilasa	GQ202065.1	F: CACGGGGTTGCCAATGTTATG R: TGGCTTTAGCAGCAGCAGTAT	757
<b>EFG1</b>	Regulador positivo de hifa	NW_139529.1	F: CACCAGAAGCACCAGACACA R: TCACAACAGCCACCACTACC	664

Posteriormente se realizó la detección de los genes mediante PCR de punto final en las condiciones señaladas en la tabla 7 y 8.

**Tabla 7. Mezcla de reacción para la detección de genes.**

Reactivo	Volumen
Agua libre de nucleasas	7 $\mu$ L
Oligo F (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
Oligo R (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
2X Phusion Flash PCR Mater Mix	10 $\mu$ L
ADN	1 $\mu$ L
Volumen total x reacción	20 $\mu$ L

**Tabla 8. Condiciones de PCR**

Temperatura °C	Tiempo	Número de ciclos
98	30 segundos	1
98	30 segundos	25
57-63	1 minuto	
72	1 minuto	
72	10 minutos	1

Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1.2% en buffer TAE 1X corrido a 85V por 45 min.

### **5.9 Extracción de ARN de *C. albicans*.**

Para la evaluación de la expresión se realizó la extracción de ARN de la cepa en condiciones control y bajo dosis sub-letal (1/3 del CMF), empleando el protocolo propuesto por el proveedor de TRI-Reagent®. Brevemente, se utilizó un inóculo entre 18-22h a 37°C, se centrifugó y a la pastilla de células se le añadió 1mL del reactivo y una porción de perlitas de vidrio, agitando vigorosamente por 3min. Se dejó reposar por 10min, se realizó un lavado con 0.4 volúmenes de cloroformo posteriormente se tomó la fase acuosa y se transfirió a un tubo nuevo, se realizó un segundo lavado con cloroformo, se añadió 0.5 volúmenes de alcohol isopropílico. Se centrifugó y la pastilla se lavó con 1mL de etanol al 70%. Se agitó vigorosamente y centrifugó, la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente se resuspendió en 20 $\mu$ L de agua libre de nucleasas.

### 5.10 Síntesis de primera cadena de ADN complementario (ADNc).

Una vez obtenido el ARN íntegro y libre de impurezas se cuantificó mediante Nanodrop y se realizó la síntesis de ADNc, siguiendo el protocolo del kit Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis, en la Tabla 9 se detallan los componentes.

**Tabla 9. Mezcla de reacción para síntesis de primera cadena de ADNc.**

Reactivo	Volumen
Agua libre de nucleasas	10 µL
Oligo dT (10 µM)	1 µL
ARN (100ng-2 µg)	1 µL
5X reaction Buffer	4 µL
RiboLock RNase Inhibitor (20U/µL)	1 µL
10mM dNTP Mix	2 µL
RevertAid RT (200U/µL)	1 µL
Volumen total x reacción	20 µL

Se mezcló brevemente y se incubó a 42°C por 60min. Para terminar la reacción se calentó a 70°C por 5 min. Posteriormente se realizó una dilución 2:125 del ADNc en agua libre de nucleasas para las reacciones de PCR tiempo real.

### 5.11 Análisis de expresión de los genes de virulencia de *C. albicans*.

Para el análisis de qRT-PCR, se empleó el equipo StepOne™ de Applied Biosystems con placas de 48 pozos, los niveles de expresión de los genes de virulencia se midieron tomando como referencia genes housekeeping y el método de detección con el fluoróforo SYBR Green. En la Tabla 10 y 11 se detalla las condiciones de reacción

**Tabla 10. Mezcla de reacción para análisis de expresión.**

Reactivo	Volumen
Agua libre de nucleasas	5 µL
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	10 µL
Oligo F (2 µM)	2 µL
Oligo R (2 µM)	2 µL
ADNc (1:125)	1 µL
Volumen final x reacción	20 µL

Para este análisis, se emplearon los genes que resultaron específicos en la detección, con oligos específicos para un tamaño de fragmento de 100pb.

**Tabla 11. Condiciones de RT-qPCR**

Temperatura °C	Tiempo	Número de ciclos
95	10 min.	1
95	15 segundos	40
60	1 minuto	
72	30 segundos	
95	15 segundos	1
60	1 min	1
95	15 segundos	40

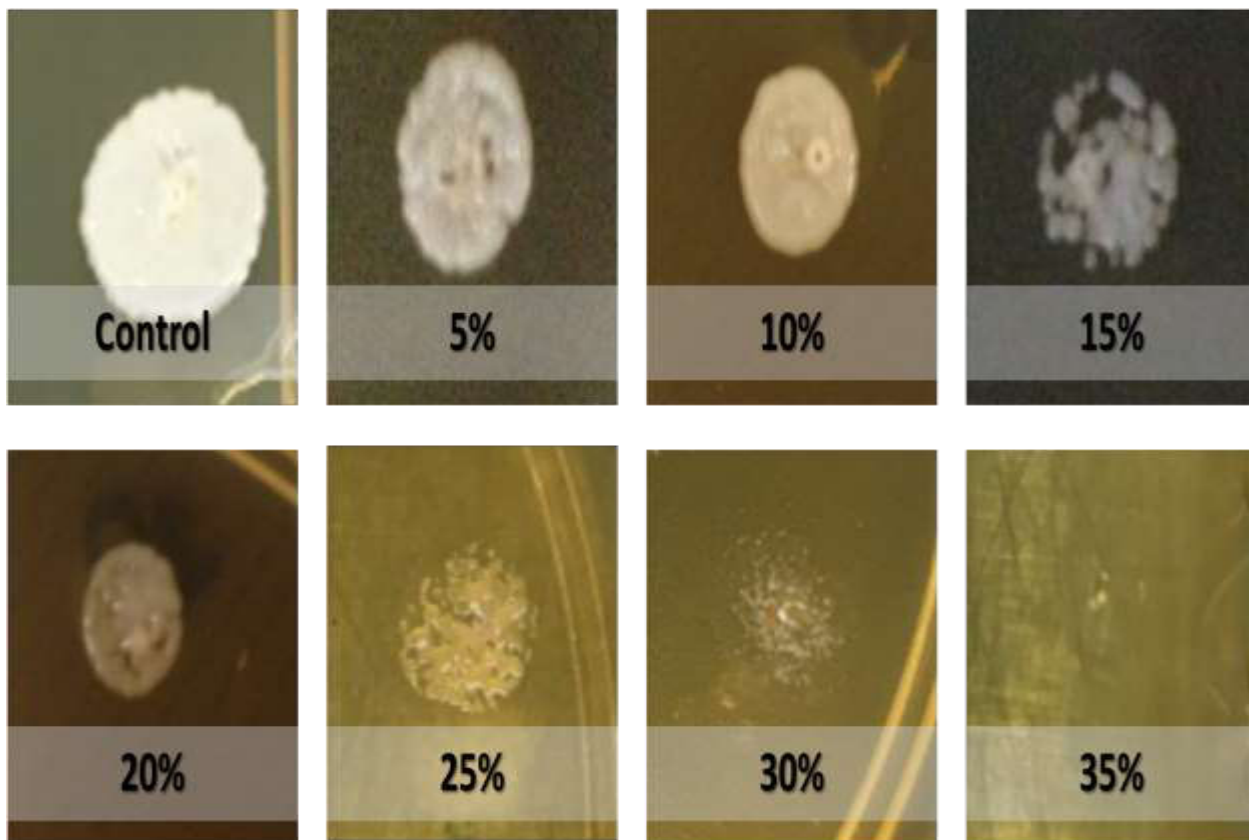
Después de los ciclos de amplificación, se realizaron 40 ciclos más para la curva de disociación, para corroborar que se tenía un solo producto de amplificación.

Las amplificaciones se realizaron por cuadruplicado y los niveles de transcripción relativa se calcularon usando el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak *et al.*, 2001).

## CAPÍTULO VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 6.1 Evaluación de la actividad antifúngica de la miel de *M. beecheii*.

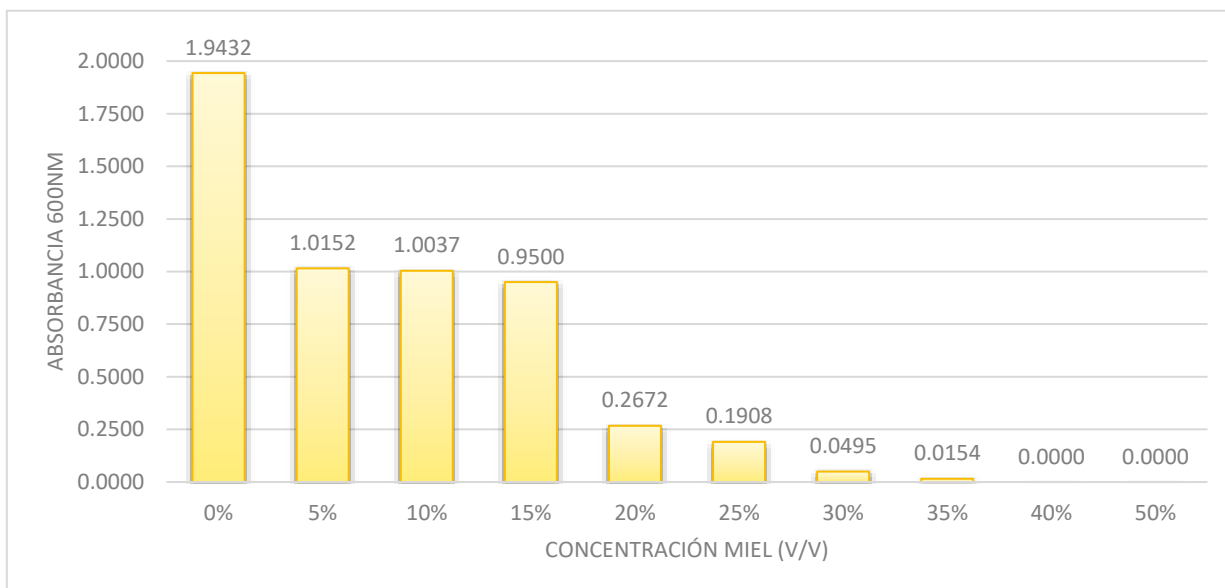
Para evaluar la actividad antifúngica de la miel se utilizó el método de agar dilución, con cajas a diferentes concentraciones de miel (Figura 4).



**Figura 4.** Actividad antifúngica de la miel de *Melipona beecheii*. Método de agar dilución, concentraciones en placa de 0-35% (v/v) de miel. Incubación 48h a 37°C.

La miel de *Melipona beecheii* presenta actividad antifúngica, esto se aprecia con la disminución en el número y tamaño de las colonias de *C. albicans* conforme la concentración de miel aumenta (Figura 4), este es un efecto permanente ya que aún después de 48h no se observó cambio en el crecimiento del microorganismo.

La determinación de la permanencia de la actividad es importante para la obtención de la CMI, para esto se realizaron lecturas de la absorbancia a las 24h, la Figura 5 representa la tendencia que se obtuvo de acuerdo a las concentraciones evaluadas.



**Figura 5. Efecto de la miel de *Melipona beecheii* en el crecimiento de *C. albicans* ATCC 10231. Lecturas de absorbancia a 600nm y 24h de incubación.**

De acuerdo con esto se determinó como CMI el 20% (v/v) de miel, ya que es la concentración mínima que se necesita para inhibir el crecimiento del microorganismo en un 80% con respecto al control (Espinell-Ingroff *et al.*, 2007) y como concentración fungicida el 35% (v/v) de miel donde se eliminó en el 99% del crecimiento de la levadura.

La capacidad de la miel para inhibir el crecimiento fúngico ha sido reportado principalmente usando mieles de *Apis mellifera* (Tabla 2), cuyo rango de actividad es muy variable, reportándose concentraciones que van desde el 2% hasta un 50%, donde la capacidad antifúngica ya no es considerada. Por otro lado, aunque existen pocos reportes sobre la actividad antifúngica de mieles de abeja sin aguijón, estas también presentan esta variabilidad en la concentración necesaria para esta actividad. Especies sin aguijón incluida *Melipona beecheii*, de diferentes regiones de Guatemala presentan efecto antifúngico entre el 5-10% (v/v) de miel (Dardón *et al.*, 2008), mientras que la miel de otras especies como *Trigona carbonaria* presentó concentraciones mínimas inhibitorias hasta porcentajes superiores del 40% (Boorn *et al.*, 2010), del mismo modo especies como *Tetragonula leviceps* presentó actividad contra bacterias gram positivas y negativas pero ninguna sobre *C. albicans* (Suntiparapop *et al.*, 2012).



De modo que la concentración obtenida para la miel de *Melipona beecheii* del estado de Yucatán, se encuentra entre los valores reportados para especies sin aguijón, demostrando que la concentración necesaria para inhibir a este patógeno dependerá del tipo de miel.

Esta variabilidad en la actividad antifúngica, se ha atribuido principalmente a las diferencias existentes en la composición de la miel, mismo que se ha relacionado estrechamente con el origen botánico (Noori *et al.*, 2013). Análisis de mieles monoflorales y multiflorales han mostrado actividad a concentraciones de 25% (Theunissen *et al.*, 2001), mientras que otros autores han reportado concentraciones inhibitorias que están por arriba del 50% de miel (Moussa *et al.*, 2015).

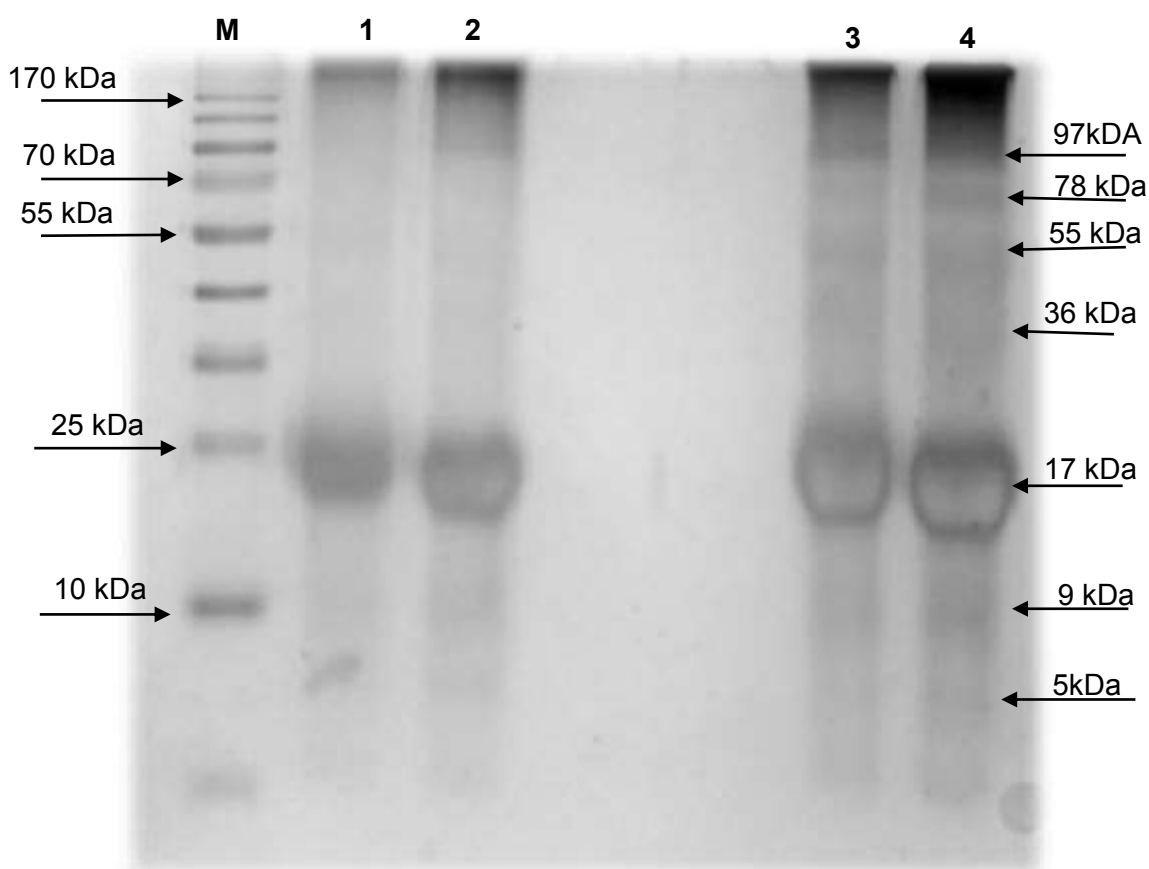
Esto significa que la relación del origen botánico con la composición de miel podría estar jugando un rol importante en las propiedades antifúngicas de la misma, ya que mieles de la misma región pero de diferente abeja productora han llegado a no ser efectivas para inhibir el crecimiento de *C. albicans* (Zamora *et al.*, 2014). Ante esto diversos autores han propuesto que la gran variedad de componentes incluidos los ácidos fenólicos, flavonoides y péptidos influyen en la actividad antifúngica (Moussa *et al.*, 2015).

## **6.2 Cuantificación del extracto proteico y determinación de perfil.**

Después de la extracción, se determinó el perfil proteico mediante un gel discontinuo de SDS-PAGE al 12% de poliacrilamida (Figura 6), con la finalidad de comprobar la efectividad del método y la integridad del extracto

Se determinó un perfil electroforético de 7 bandas, las cuales tuvieron un peso molecular entre 5 y 97 kDa; de acuerdo con Ramón *et al* 2015, es posible identificar una muestra de miel a partir de su perfil proteico de modo que el perfil obtenido si coincide con la miel de *Melipona beecheii*. El rendimiento proteico obtenido fue de 87mg de proteína/100g de miel.

El perfil sugiere la presencia de diferentes proteínas, enzimas o péptidos involucrados en la actividad antimicrobiana de miel. El rango de peso molecular obtenido en estas bandas indican la presencia de proteínas o péptidos con potencial antimicótico, ya que de acuerdo con Shekh y colaboradores (2012), muchos péptidos o proteínas con actividad antimicótica tienen un peso molecular alrededor de los 50kDa.



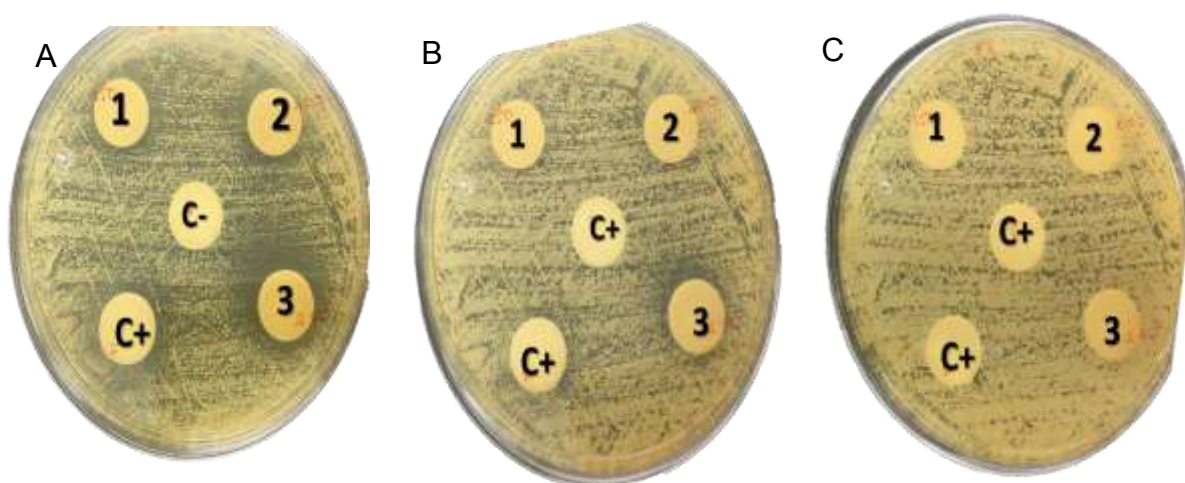
**Figura 6.** Perfil proteico de la miel de *Melipona beecheii*; M: Marcador de peso molecular, Carril 1-4: diferentes concentraciones del extracto, 4.4, 6.3, 6.8 y 10.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  respectivamente. Tinción con nitrato de plata.

### 6.3 Evaluación de la actividad antifúngica del extracto proteico

Para evaluar la actividad del extracto proteico, se empleó el método de agar difusión (Figura 7), observando la aparición del halo de inhibición a las 18h (Figura 7A) y su permanencia a las 24h (Figura 7B) y 36h (Figura 7C). En la Tabla 11, se presenta el diámetro promedio de cada concentración evaluada.

La Figura 7A muestra la aparición de un halo indicando que el extracto posee capacidad antifúngica y que al igual que ocurre con la miel el halo de inhibición aumenta conforme la cantidad de proteína agregada (Tabla 12).

Sin embargo, como se puede observar el halo de inhibición se va desvaneciendo después de las 24h (Figura 7B) y desaparece por completo después de las 36h (Figura 7C) inclusive en el control positivo (Fenol 30%). Esto indica que la actividad del extracto proteico es fungistático a diferencia del efecto que tiene la miel sobre el mismo microorganismo.



**Figura 7. Actividad antifúngica del extracto proteico.** Evaluación de la permanencia del halo de inhibición a las A.18h, B.24h y C.36h, con diferentes concentraciones del extracto 1:1500 µg, 2:1700 µg y 3: 2100 µg. Se usaron 2 controles, buffer de fosfatos y fenol al 30% como control negativo y positivo respectivamente.

**Tabla 12. Diámetro del halo de inhibición presentado por el extracto proteico a las 18h de incubación**

18 Horas	Cantidad añadida	Diámetro promedio* (mm)
1	1500 µg	1.42 ± 0.5
2	1700 µg	2.83 ± 0.3
3	2100 µg	6.13 ± 1.4
C-	BF**	0
C+	Fenol 30%	6.21 ± 1.1

\*Sin contar el diámetro del disco.

\*\*Buffer de fosfatos 0.05M pH 7

Ya que la actividad del extracto resultó fungistática para la determinación de la CMI se realizó conteo de colonias después de las lecturas de la absorbancia con la finalidad de obtener el número de sobrevivientes que proliferaban después del tratamiento.

En la Figura 8 se observa la disminución del número de sobrevivientes conforme aumenta la concentración del extracto y en la Tabla 13 se registraron los porcentajes de sobrevivencia, con lo que se obtuvo que la CMI del extracto fue de 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , donde se registró más del 80% de células muertas.

Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	% Sobrevivencia
0	100%
0.5	77%
1	28%
2	4%
3	1%
3.4	0%

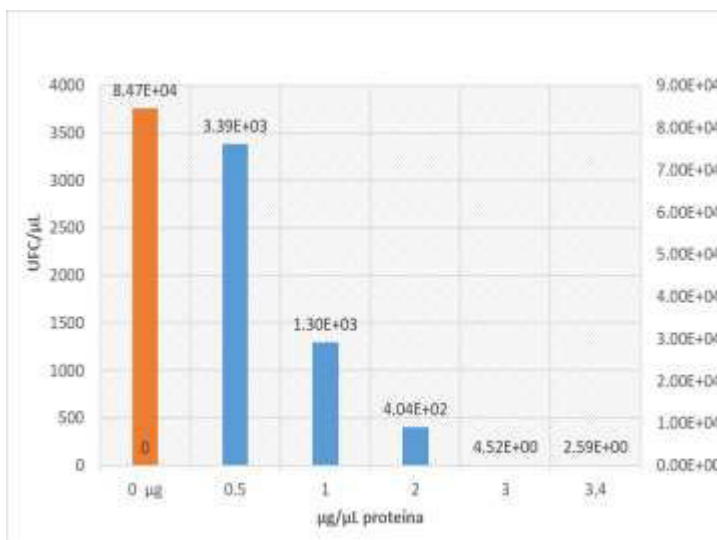
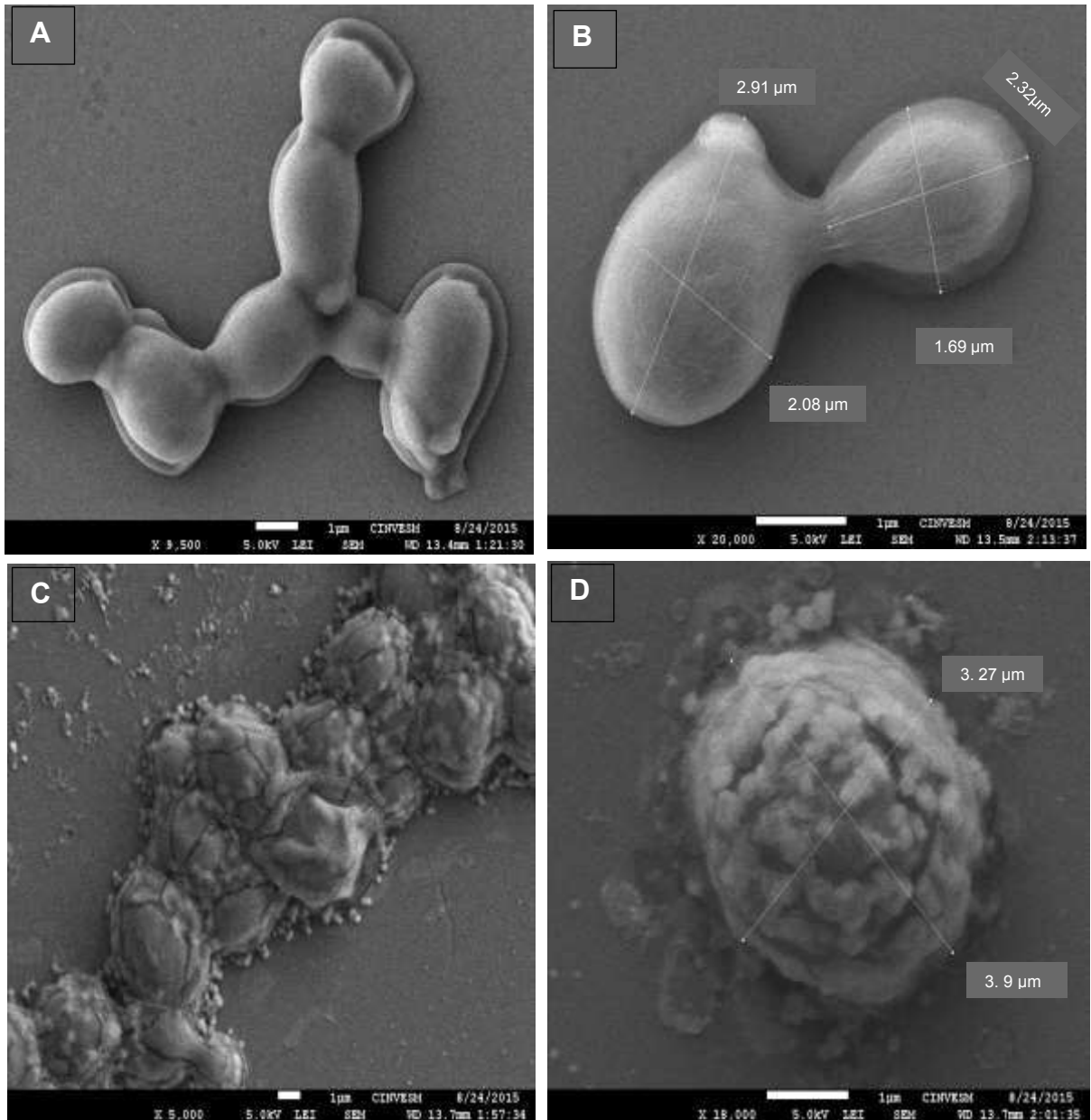


Figura 8. Conteo de células sobrevivientes. 24h de incubación.

En reportes previos se ha propuesto que el efecto fungicida de la miel pudiera estar relacionado con una sinergia de los compuestos activos presentes en ella (de Queiroz Pimentel *et al.*, 2013). En el caso de la miel de *Melipona beecheii* evaluada, este efecto sinérgico pudiera explicar por qué el extracto proteico presenta sólo actividad fungistática y propondría que es necesaria la participación de otras moléculas de la miel para el efecto fungicida que ésta presentó.

La visualización mediante microscopia electrónica de barrido en alta resolución permitió observar el efecto de la miel sobre las células de *C. albicans* (Figura 9), ya que actualmente no se tiene reporte del mecanismo por el cual la miel pueda inhibir hongos o levaduras. Se observó que la miel afectó dramáticamente la consistencia de la membrana plasmática de las células fúngicas (Figura 9A y 9C) provocando la aparición de material vesicular y el cambio en la superficie micro-morfológica, pasando de una morfología lisa y ovalada (Figura 9A y B) a una rugosa y redonda (Figura 9C y D). La presencia de este material vesicular, supondría que la miel tiene un efecto similar a algunos azoles y/o polienos (De Nollin *et al.*, 1975 ; Bastide *et al.*, 1982) ya

que ambas clases se caracterizan por causar cambios en la permeabilidad de la membrana de la célula promoviendo la ruptura y liberación de material citoplasmático (Figura 9C y D), difiriendo en la ruta de acción, mientras los azoles se encargan de inhibir la síntesis de ergosterol provocando la inestabilidad de la membrana y la acumulación de metilenos tóxicos; los polienos forman complejos con el ergosterol de la membrana resultando en la formación de poros que provoca la pérdida de la permeabilidad de la célula y la ruptura (Akins *et al.*, 2017).

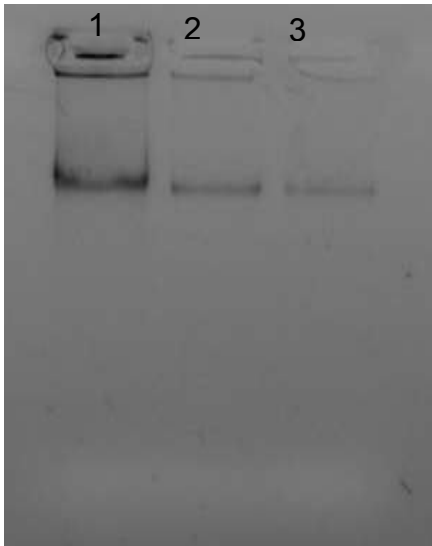


**Figura 9. Visualización en SEM, *C. albicans* A y B. células sin tratamiento. C y D en tratamiento con 20% (v/v) de miel.**

Ambos mecanismos involucrarían no sólo la ruptura de la membrana si no también el incremento en el tamaño de las células (Figura 9B y 9C), debida a la acumulación de compuestos o a la pérdida de la permeabilidad selectiva de la célula.

#### **6.4 Extracción de ADN de *C. albicans*.**

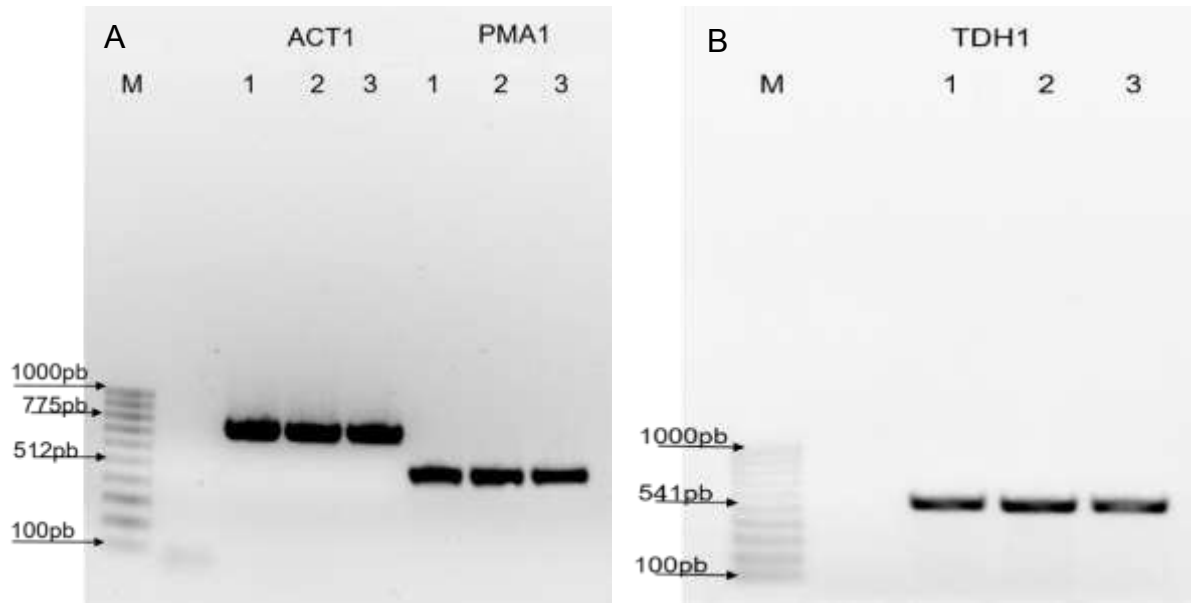
Para verificar la integridad de la muestra de ADN extraída se corrió en un gel de agarosa al 1% con buffer TAE 1X. En la Figura 10 se muestra el gel de electroforesis con la muestra a diferentes diluciones. En éste se observó que el método fue adecuado para obtener una buena extracción, ya que la muestra mostró una banda nítida y definida, sin residuos de otras moléculas o impurezas.



**Figura 10. Gel de Agarosa ADN *C. albicans*.**  
Carril 1. Muestra de ADN sin diluir, Carril 2.  
Dilución 1:1, Carril 3. Dilución 5:20.

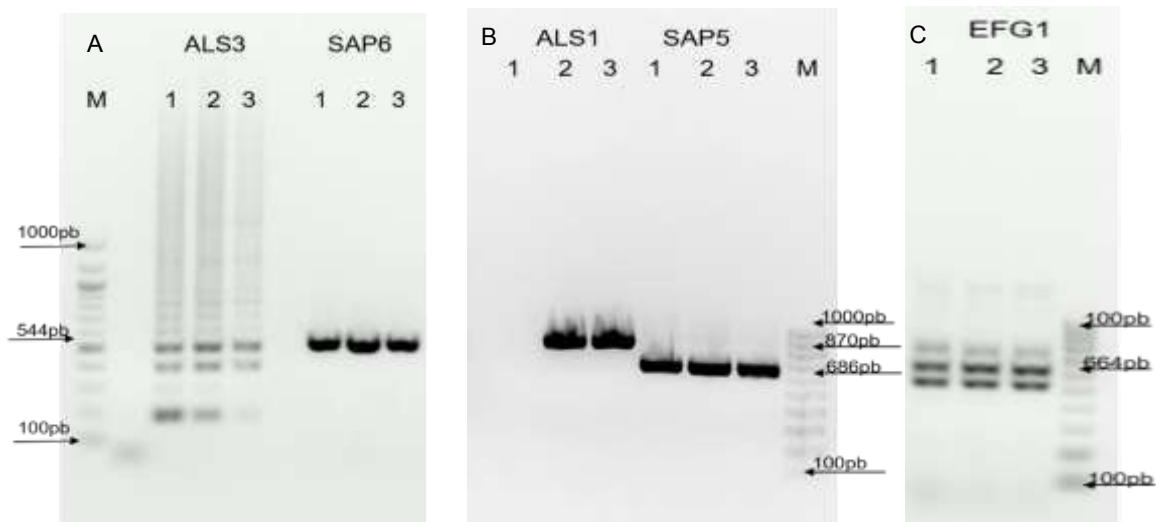
#### **6.5 Detección de genes housekeeping y virulencia.**

Para la detección de los genes se realizó un gradiente, con la finalidad de verificar que los oligos funcionarán en la temperatura de amplificación que se utilizaría para el análisis de RT-qPCR, en la Figura 11 se observa los productos de amplificación por PCR obtenidos para los genes housekeeping ACT1, PMA1 y TDH1, que amplificaron para las 3 temperaturas probadas con el tamaño de fragmento esperado. Se aprecia una banda nítida, específica e íntegra para cada gen analizado, ya que no se observó la presencia de otras bandas, por lo que estos genes también serán analizados para los oligos de 100pb específicos para el análisis de RT-qPCR.



**Figura 12. Detección de genes housekeeping.** 11<sup>a</sup>: genes ACT1 y PMA1, 11<sup>B</sup> gen: TDH1; gradiente de amplificación evaluando 3 temperaturas Carril 1: 57°C, carril 2: 61°C y carril 3: 63°C, M: Marcador de peso molecular

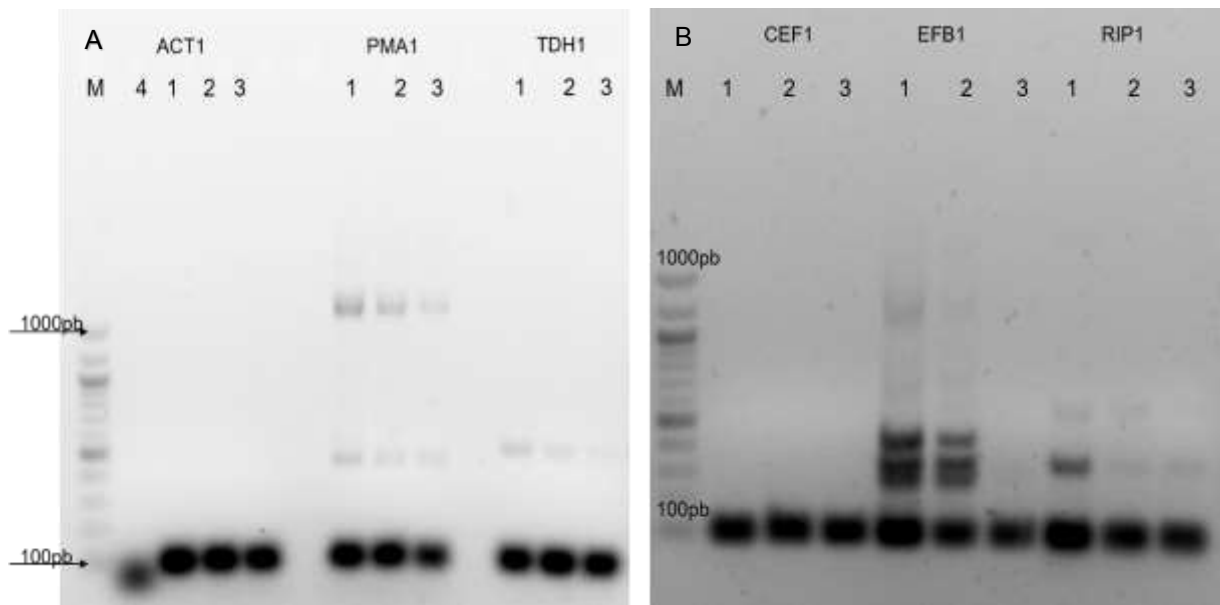
En la Figura 12A y C, se observa la amplificación de los genes de virulencia ALS3 y ERG11 los cuales no fueron específicos ya que presentaron múltiples bandas en las temperaturas probadas, por lo que se optó por descartar los oligos de estos genes para el análisis de RT-qPCR. En la Figura 12B se observa la amplificación de los genes ALS1 y SAP5 los cuales mostraron especificidad al menos a las temperatura de 61°C y 63°C (Carril 2 y 3 respectivamente) por lo que éstos pueden ser empleados para el análisis de RT-qPCR



**Figura 11. Detección de genes de virulencia.** A. Genes ALS3 y SAP6, B. Genes ALS1 y SAP5, C. Gen EFG1. Carril 1: 57°C, Carril 2: 61°C, Carril 3: 63°C, M: Marcador de peso molecular.

## 6.6 Validación de la expresión de los genes housekeeping y virulencia.

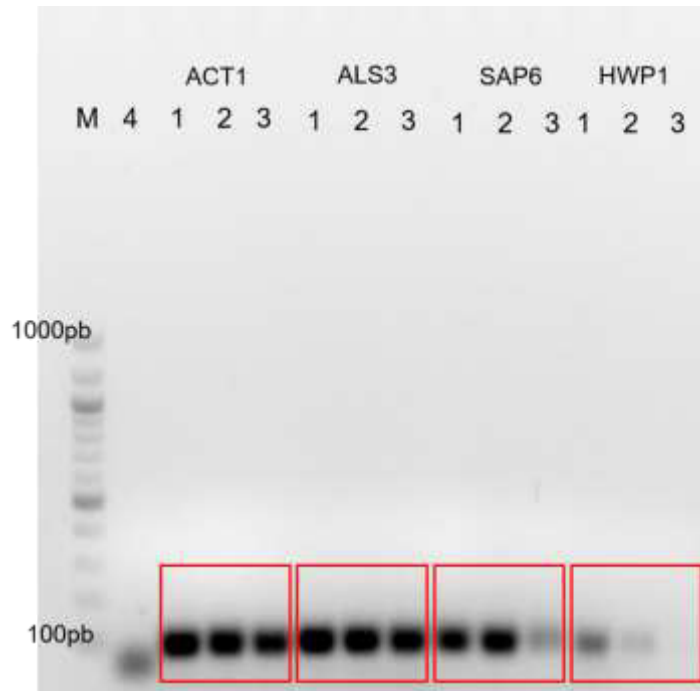
Una vez realizada la detección de los genes, se decidió validar los oligos para RT-qPCR correspondientes a los genes que habían resultado específicos al menos a dos temperaturas. En la Figura 13A y B, se muestra el resultado de la validación de los genes housekeeping ACT1, PMA1, TDH1, CEF1, EFB1 y RIP1 en los que se puede apreciar que aunque para la detección habían resultado específicos, para el tamaño de 100pb ya no fue así por lo que no fueron adecuados para el análisis en RT-qPCR, ya que podría aparecer más de un pico de amplificación.



**Figura 13. Validación de oligos de los genes housekeeping para RT-qPCR.** A: genes ACT1, PMA1 y TDH1. B: genes CEF1, EFB1 y RIP1. Carril 1: 57°C, carril 2: 61°C, Carril3: 63°C, M: Marcador de peso molecular, Carril 4. Blanco oligo ACT1 sin ADN a 57°C.

La Figura 14, muestra los productos de amplificación por PCR de los genes de virulencia ALS3, SAP6 y HWP1, se aprecia una sola banda indicando que existe especificidad, por lo que son candidatos para el análisis por RT-qPCR.





**Figura 14. Validación de oligos de los genes de virulencia ALS3, SAP6 y HWP1 para RT-qPCR.** Carril 1: 57°C, carril 2: 61°C, Carril 3: 63°C, carril 4: Blanco oligo ACT1 sin ADN a 57°C, M: Marcador de peso molecular.

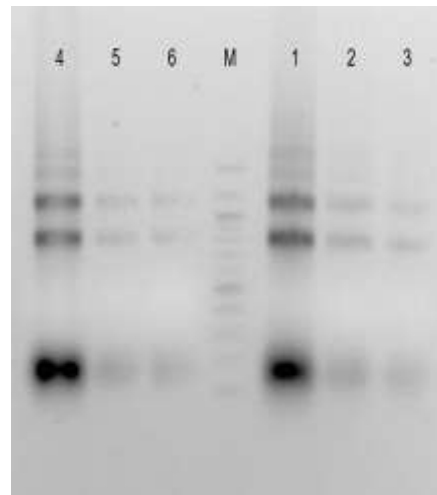
Finalmente para el análisis de RT-qPCR se emplearon como genes de referencia (housekeeping) ACT1 y CEF1, mientras que para los genes de virulencia se emplearon ALS3, SAP6 y HWP1.

### **6.7 Extracción y cuantificación de ARN de *C. albicans* ATCC 10231.**

Una vez determinado los genes para analizar y la dosis sub-letal de miel se realizó la extracción de ARN de *C. albicans* ATCC 10231, crecida tanto en medio SD sin ningún suplemento, como en medio SD con 12%(v/v) de miel de *Melipona beecheii* (1/3 CMF). En la Figura 15, se observa el gel de agarosa al 1% del ARN extraído en ambas condiciones. Se aprecian dos bandas nítidas, íntegras características de la extracción de ARN 28S y 18S, además se observa libre de ADN o impurezas que pudieran afectar las reacciones posteriores. En la Tabla 14, se muestra los datos obtenidos de la cuantificación mediante el equipo de Nanodrop. Una vez verificado el ARN y cuantificado, se realizó la síntesis de primera cadena del ADN complementario, mismo que sirvió para el análisis del RT-qPCR.

Tabla 14. Cuantificación ARN por Nanodrop		
Carril	Muestra	Concentración ng/ $\mu$ L
1	Control	NC
2	Control 1:10	112.6
3	Control 1:20	58.2
4	Marcador	-
5	Tratamiento	NC
6	Tratamiento	56.9
7	Tratamiento	29.4

NC: No Cuantificado



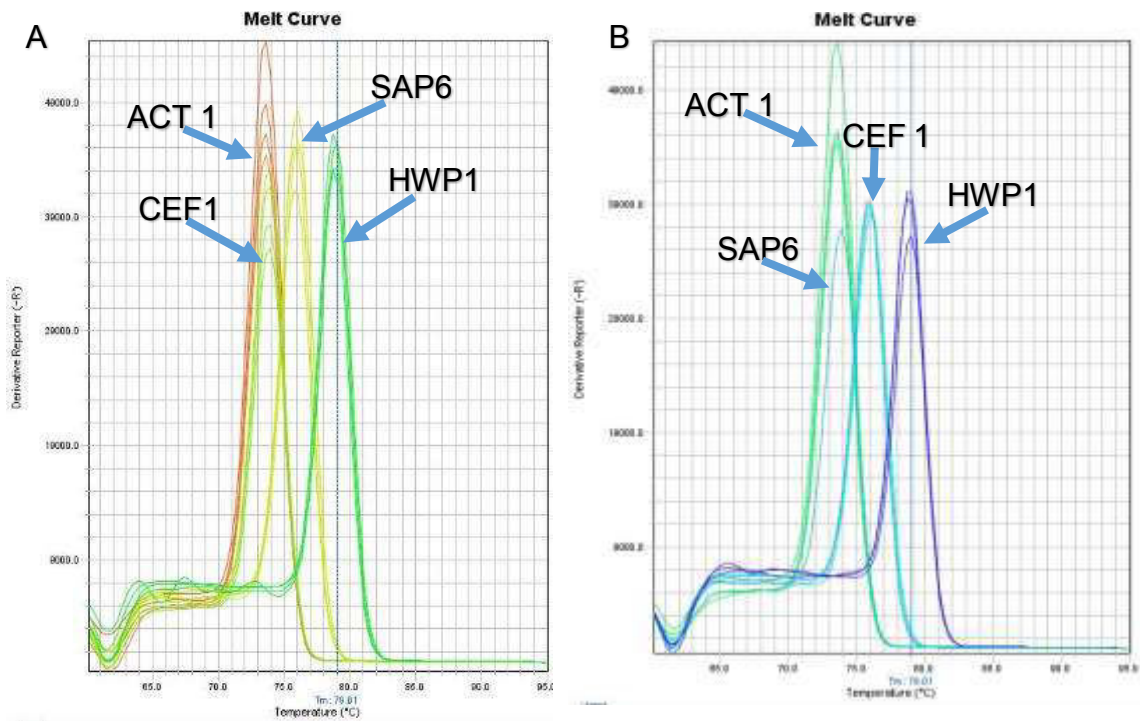
**Figura 15. Extracción de ARN total de *C. albicans*.** Gel de agarosa al 1% en TAE 1X, resuelto por 45min a 85V. Carril 1-3 ARN sin tratamiento, Carril 4-6 ARN en dosis sub-letal de miel. M: marcador de peso molecular.

### 6.8 Análisis de la curva de disociación (curva melting).

El análisis de la curva melting permite corroborar la especificidad de los oligos mediante la amplificación de un solo producto, de modo que la fluorescencia producida corresponda a un producto en particular y no a productos inespecíficos. La Figura 16A (Sin tratamiento) y 16B (con tratamiento) muestran una única temperatura de disociación para cada gen evaluado, esto se observa como un único pico en la misma temperatura sin “hombros” que pudieran indicar otras amplificaciones por lo que los oligos fueron específicos.

Una vez verificada la especificidad, se realizaron los cálculos mediante el modelo matemático  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , este modelo nos permitiría determinar el efecto de la miel sobre la expresión de los genes HWP1 y SAP6 con respecto a los genes de referencia ACT1 y CEF1. Sin embargo, el gen CEF1, resultó ser ineficiente como gen de referencia ya que sus valores de Ct resultantes indicaban que podría estar expresando en niveles

diferentes entre el tratamiento y el control, caso contrario con ACT1, donde se observó valores de Ct similares (Tabla 15).



**Figura 16. Curvas melting de los genes ACT1, CEF1, SAP6 y HWP1. A. Sin tratamiento de miel, B. Con tratamiento, dosis sub-lethal 12% v/v.**

**Tabla 15. Valores de Ct de los genes housekeeping (CEF1 y ACT1) en control y tratamiento.**

	CEF1 Ct	ACT1 Ct		CEF1 Ct	ACT1Ct
	Sin tratamiento	29.003		22.074	Tratamiento 12% miel.
28.876		22.057	34.107	25.798	
28.987		22.172	35.307	25.809	
28.892		22.054	34.913	25.794	
Promedio	28.939 ± 0.08	22.089 ± 0.07	Promedio	34.924 ± 0.8	25.781 ± 0.03

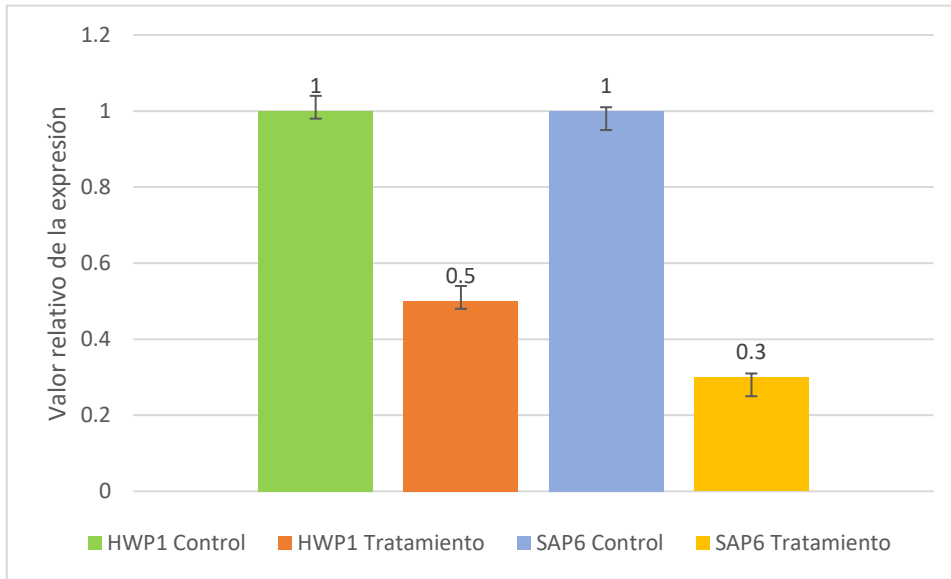
En Tabla 16, se muestra el análisis realizado para el gen HWP1 y SAP6 con respecto al gen housekeeping ACT1.

**Tabla 16. Análisis de expresión gen HWP1 y SAP6 con respecto a ACT1.**

	ACT1 Ct	HWP1 Ct	$\Delta$ CT*	$\Delta\Delta$ CT**	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$
Sin tratamiento	22.074	24.878	2.5277 $\pm$ 0.4	0 $\pm$ 0.4	1 $\pm$ 0.04
	22.057	24.849			
	22.172	24.331			
	22.054	24.41			
Promedio	22.0892 $\pm$ 0.07	24.617 $\pm$ 0.3			
	ACT1 Ct	Hwp1 Ct	$\Delta$ CT*	$\Delta\Delta$ CT**	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$
Tratamiento 12% Miel	25.724	29.697	3.3252 $\pm$ 0.4	0.7975 $\pm$ 0.4	0.5753 $\pm$ 0.02
	25.798	28.902			
	25.809	28.955			
	25.794	28.872			
Promedio	25.7812 $\pm$ 0.03	29.1065 $\pm$ 0.3			
	ACT1 Ct	SAP6 Ct	$\Delta$ CT*	$\Delta\Delta$ CT**	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$
Sin tratamiento	19.136	30.093	10.915 $\pm$ 0.01	0 $\pm$ 0.01	1 $\pm$ 0.01
	19.177	30.026			
	19.12	30.043			
	19.123	30.054			
Promedio	19.139 $\pm$ 0.02	30.054 $\pm$ 0.04			
	ACT1 Ct	SAP6 Ct	$\Delta$ CT*	$\Delta\Delta$ CT**	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$
Tratamiento 12% miel	22.501	34.908	12.6757 $\pm$ 0.2	1.7177 $\pm$ 0.2	0.3040 $\pm$ 0.05
	22.547	35.265			
	22.515	35.415			
	22.518				
Promedio	22.5202 $\pm$ 0.01	35.196 $\pm$ 0.2			

\*(Ct gen virulencia – Ct gen housekeeping) \*\* ( $\Delta$ CT -  $\Delta$ CT Sin tratamiento)

En la Figura 17, puede apreciarse la disminución en la expresión del gen HWP1 y en menor medida del gen SAP6 bajo tratamiento con miel por 22 horas, normalizando los valores con respecto al gen ACT1.



**Figura 17.** Niveles de expresión relativa de los genes de virulencia HWP1 y SAP6 con respecto al gen ACT1.

La expresión de los genes HWP1 y SAP6 ha sido relacionada con el proceso invasivo de *C. albicans*, la disminución en la expresión de estos genes observada bajo la influencia de la miel de *Melipona beecheii* a una dosis menor a la CMI y en menos de 24 horas, permitiría minimizar el proceso invasivo de este microorganismo; por un lado evitando la proliferación de células y por otro disminuyendo su capacidad de propagación (Finkel *et al.*, 2011).

Esto dado que tanto HWP1 como SAP6 son genes que expresan proteínas que participan en este proceso. HWP, es un gen específico de la hifa que codifica proteínas de la pared celular que le permiten a *C. albicans* el anclaje a la célula huésped como parte del proceso inicial de infección, además es una proteína esencial para la formación de biofilm, una característica importante durante el proceso invasivo (Semlali *et al.*, 2014). Por otro lado, la presencia de enzimas hidrolíticas como las aspartil proteasas contribuye tanto a la colonización como la infección sistémica mediante la degradación de componentes de la membrana huésped. SAP6 codifica una aspartil proteasa que ha sido asociada, junto con la SAP4, a la formación de la hifa aunque también se ha visto es dependiente del tejido infectado (Naglik *et al.*, 2008).

Este efecto de la miel sobre factores de virulencia es importante ya que las terapias anti-candidiasis se han basado en el bloqueo de procesos esenciales del desarrollo de *C. albicans*, provocando mecanismos de resistencias a los antifúngicos comerciales. Por lo que una nueva estrategia clínica es la creación de terapias capaces de inhibir factores de virulencia (Cui *et al.*, 2015).

Sin embargo, uno de los mayores problemas para la aplicación de agentes con sólo capacidad anti-virulencia es que la mayoría de estos factores no son esenciales para *C. albicans* y además se expresan más de uno durante el proceso de infección (Cui *et al.*, 2015).

Esto no ocurre con la miel de *Melipona beecheii*, ya que presentó capacidad de inhibir el crecimiento de *C. albicans* y además disminuyó la expresión de genes involucrados con dos factores diferentes de patogenicidad.

Actualmente, se desconoce el mecanismo por el cual es posible el efecto inhibitorio de la miel de *Melipona beecheii*, pero es posible que la naturaleza multifactorial de ésta permita que los compuestos bioactivos presentes en ella afecten la membrana (Figura 9) formando poros, que por un lado provoque la pérdida de permeabilidad de la membrana y por otro permita el acceso de éstos mismo u otros compuestos bioactivos a las células fúngicas, logrando afectar procesos como la síntesis de ADN o ARNm, provocando la desestabilización de los complejos que permiten la duplicación del material genómico.

Esta inestabilidad para mantener el proceso de permeabilidad explicaría la presencia de material celular observado en las Figura 9C y 9D, así como el aumento de tamaño de la célula observado en la Figura 9B y 9D. Por otro lado la afectación en los procesos de síntesis de ácidos nucleicos explicaría la disminución de la expresión de los genes de virulencia HWP1 y SAP6 que le confieren a *C. albicans* la capacidad para formar hifas, adherirse al huésped y comenzar su proceso de invasión.

Además, este último mecanismo también podría afectar genes relacionado con la síntesis de componentes de la pared y membrana lo que explicaría también el efecto observado en las Figura 9A-D, donde se aprecia la disgregación de la membrana

celular por ruptura o inestabilidad de la misma, pero que no es posible determinar si es debida a la interacción con los componentes o enzimas de la ruta de biosíntesis como ocurre con los antifúngicos comerciales, o si se debe a una síntesis defectuosa de los genes relacionados con estos componentes de membrana. De modo que sería necesario el análisis de genes que permita corroborar que el efecto inhibitorio de la miel de *Melipona beecheii* se debe sólo a la inestabilidad y formación de poros de la membrana o que además involucra el procesamiento de genes esenciales y de virulencia.

## CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES

La miel de *Melipona beecheii* tiene efecto antifúngico con una CMI del 20% (v/v), inhibiendo el 80% del crecimiento de *C. albicans* ATCC 10231 y a una concentración mínima fungicida del 35% (v/v) con la que inhibe el 100% del crecimiento.

La miel de *Melipona beecheii* afectó la estabilidad de la membrana de las células fúngicas, provocando la lisis y la pérdida de material vital para el microorganismo logrando su inhibición y muerte.

El extracto proteico presentó actividad antifúngica con una cantidad de proteína de 1500µg y una CMI de 2 µg/µL, lo que evidencia la participación de los compuestos proteicos en el efecto antifúngico de la miel de *Melipona beecheii*. Sin embargo, el efecto del extracto proteico por si solo resultó ser fungistático, ya que después de 24h se observó crecimiento del microorganismo, demostrando que la interacción con otros compuestos bioactivos de diferente naturaleza también son importantes en la actividad fungicida de la miel de *Melipona beecheii*.

El análisis de expresión de los genes de virulencia HWP1 y SAP6 en relación con el gen housekeeping ACT1 mediante RT-qPCR, mostraron que hay una disminución en la expresión de éstos bajo la influencia de la miel de *Melipona beecheii*. Siendo el primer reporte de este efecto por parte de la miel en genes relacionados con proceso de invasión y formación de biofilm.

Suponemos que la naturaleza multifactorial de la miel permite que los compuestos bioactivos presentes en ella actúen en sinergia provocando tanto la inestabilidad de la membrana fúngica como la pérdida de genes involucrados en el crecimiento y desarrollo de la virulencia de *C. albicans*.



## REFERENCIAS.

1. Ahmed, M., Aissat, S., & Djebli, N. (2014). Effect of heat treatment on antimycotic activity of Sahara honey. *Journal of Coastal Life Medicine*, 2(11), 876-881.
2. Akins, R. A., & Sobel, J. D. (2017). Antifungal targets, mechanisms of action, and resistance in *Candida albicans*. En D. Mayer, J. Sobel, M. Ouellette, K. Kaye, & D. Marchaim, *Antimicrobial Drug Resistance* (págs. (429-475)). Springer, Cham.
3. Alzahrani, H., Alsabehi, R., Boukraâ, L., Abdellah, F., Bellik, Y., & Bakhotmah, B. A. (2012). Antibacterial and antioxidant potency of floral honeys from different botanical and geographical origins. *Molecules*, 17 (9), 10540-10549.
4. ASERCA. (2011). *Melipona beecheii, una abeja sin aguijón en la Península de Yucatán*. México: SAGARPA.
5. Ayala, R., Gonzalez, V. H., & Engel, M. S. (2013). Mexican stingless bees (Hymenoptera: Apidae): Diversity, distribution, and indigenous knowledge. En P. Vit, S. R. Pedro, & D. W. Roubik, *Pot-Honey* (págs. 135-152). New York: Springer.
6. Baquero, L., & Stamatti, G. (2007). *Cría y Manejo de abejas sin aguijón*. Argentina: Fundación Pro Yungas. Ediciones del Subtrópico.
7. Bastide, M., Jouvert, S., & Bastide, J. M. (1982). A comparison of the effects of several antifungal imidazole derivatives and polyenes on *Candida albicans*: an ultrastructural study by scanning electron microscopy. *Canadian journal of microbiology*, 28(10), 1119-1126.

8. Bizani, D., Dominguez, A. P., & Brandelli, A. (2005). Purification and partial chemical characterization of the antimicrobial peptide cerein 8A. *Letters in applied microbiology*, 41(3), 269-273.
9. Bogdanov, S. (1997). Antibacterial substances in honey. *Artikel Swiss Bee Research Centre, Switzerland*.
10. Boorn, K. L., Khor, Y. Y., Sweetman, E., Tan, F., Heard, T. A., & Hammer, K. A. (2010). Antimicrobial activity of honey from the stingless bee *Trigona carbonaria* determined by agar diffusion, agar dilution, broth microdilution and time-kill methodology. *Journal of applied microbiology*, 108 (5), 1534-1543.
11. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1), 248-254.
12. Brunke, S., & Hube, B. (2013). Two unlike cousins: *Candida albicans* and *C. glabrata* infection strategies. *Cellular microbiology*, 15 (5), 701-708.
13. Calderone, R. A., & Fonzi, W. A. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in microbiology*, 9(7), 327-335.
14. Campoy, S., & Adrio, J. L. (2017). Antifungals. *Biochemical pharmacology*, 133, 86-96.
15. Candiracci, M., Citterio, B., & Piatti, E. (2012). Antifungal activity of the honey flavonoid extract against *Candida albicans*. *Food Chemistry*, 131(2), 493-499.

16. Carrillo-Muñoz, A., Brió, S., & Quindós, G. (2001). Una nueva generación de fármacos antifúngicos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 18 (1), 2-5.
17. Cui, J., Ren, B., Tong, Y., Dai, H., & Zhang, L. (2015). Synergistic combinations of antifungals and anti-virulence agents to fight against *Candida albicans*. *Virulence*, 6(4), 362-371.
18. Dardón, M. J., & Enríquez, E. (2008). Caracterización fisicoquímica y antimicrobiana de la miel de nueve especies de abejas sin aguijón (Meliponini) de Guatemala. *Interciencia*, Vol. 33, no. 12 , p. 916-922.
19. De Nollin, S., & Borgers, M. (1975). Scanning electron microscopy of *Candida albicans* after in vitro treatment with miconazole. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 7 (5), 704-711.
20. de Queiroz Pimentel, P. M., da Costa, C. A., Albuquerque, P. M., & Junior, S. D. (2013). Antimicrobial activity and rutin identification of honey produced by the stingless bee *Melipona compressipes manausensis* and commercial honey. *BMC complementary and alternative medicine*, 13 (1), 151.
21. Delarze, E., & Sanglard, D. (2015). Defining the frontiers between antifungal resistance, tolerance and the concept of persistence. *Drug resistance Updates*, 23, 12-19.
22. Du, C., & Calderone, R. A. (2009). Phagocytosis and killing assays for *Candida* species. En R. L. Cihlar, & R. A. Calderone, *Candida albicans Methods and Protocols* (págs. 17-26). Humana Press.

23. Espinel-Ingroff, A., & Cantón, E. (2007). Antifungal Susceptibility Testing of Yeast. En R. Schwalbe, L. Steele-Moore, & A. C. Goodwin, *Antimicrobial susceptibility protocols* (págs. 173-207). Crc Press.
24. Estevinho, M. L., Afonso, S. E., & Feás, X. (2011). Antifungal effect of lavender honey against *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Cryptococcus neoformans*. *Journal of food science and technology*, 48(5), 640-643.
25. Estrada, H., Gamboa, M., Chaves, C., & Arias, M. (junio de 2005). Evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel de abeja contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. enteritidis*, *Listeria monocytogenes* y *Aspergillus niger*. Evaluación de su carga microbiológica. *Archivos latinoamericanos de nutrición.*, 55 (2), 167-171.
26. Euán, J. J. (2005). Biología y uso de las abejas sin aguijón de la Península de Yucatá, México: Hymenoptera: Meliponini). 16, UADY.
27. Feás, X., & Estevinho, M. L. (2011). A survey of the in vitro antifungal activity of heather (*Erica sp.*) organic honey. *Journal of medicinal food*, 14(10), 1284-1288.
28. Finkel, J. S., & Mitchell, A. P. (2011). Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nature reviews. Microbiology*, 9(2), 109.
29. García-Sánchez, S., Aubert, S., Iraqui, I., Janbon, G., Ghigo, J. M., & d'Enfert, C. (2004). *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryotic cell*, 3(2), 536-545.

30. González Acereto, J. Á., & Quezada Euán, J. J. (2010). Producción tradicional de miel:abejas nativas sin aguijón (trigonas y meliponas). *CICY. Usos de la Biodiversidad. Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán.*, 382-384.
31. González-Acereto, J. A. (2012). La importancia de la meliponicultura en México, con énfasis en la Península de Yucatán. *Bioagrocencias*, 5(1), 34-41.
32. Hasan, F., Xess, I., Wang, X., Jain, N., & Fries, B. C. (2009). Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. *Microbes and infection*, 11(8), 753-761.
33. Herman, D., & Calderone, R. (2002). Pathogenic Development of *Candida albicans*. En H. Osiewacz, *Molecular Biology of Fungal Development* (págs. 483- 507). New York: Taylor & Francis Group LLC.
34. Irish, J., Carter, D. A., Shokohi, T., & Blair, S. E. (2006). Honey has antifungal effect against *Candida* species. *Medical Mycology*, 44 (3), 289-291.
35. Karkowska-Kuleta, J., Rapala-Kozik, M., & Kozik, A. (2009). Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochimica Polonica*, 56(2), 211.
36. Kathiravan, M. K., Salake, A. B., Chothe, A. S., Dudhe, P. B., Watode, R. P., Mukta, M. S., & Gadhwe, S. (2012). The biology and chemistry of antifungal agents: a review. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 20 (19), 5678-5698.

37. Koc, A. N., Silici, S., Ercal, B. D., Kasap, F., Hörmet-Öz, H. T., & Mavus-Buldu, H. (2009). Antifungal activity of Turkish honey against *Candida* spp. and *Trichosporon* spp: an in vitro evaluation. *Sabouraudia*, 47, 707-712.
38. Kwakman, P. H., de Boer, L., Ruyter-Spira, C. P., Cremers-Molenaar, T., Helsper, J., Vandenbroucke-Grauls, C., & Te Velde, A. (2011). Medical-grade honey enriched with antimicrobial peptides has enhanced activity against antibiotic-resistant pathogens. *European journal of clinical microbiology & Infectious*, 30(2), 251-257.
39. Kwakman, P. H., te Velde, A. A., de Boer, L., Speijer, D., Vandenbroucke-Grauls, C. M., & Zaat, S. A. (2010). How honey kills bacteria. *The FASEB Journal*, 24(7), 2576-2582.
40. Liberio, S. A., Pereira, A., Dutra, R., Reis, A., Araújo, M., Mattar, N., & Monteiro-Neto, V. (2011). Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *BMC complementary and alternative medicine*, 11 (1), 108.
41. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25(4), 402-408.
42. Lusby, P. E., Coombes, A. L., & Wikinson, J. M. (2005). Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria. *Archives of medical research*, vol. 36, no 5, p. 464-467.

43. Magaña-Ortiz, D., Martínez-Guevara, J., Ramón-Sierra, J., Ruiz-Ruiz, J., & Ortiz-Vázquez, E. (2016). Antimicrobial activity of flavonoids extracted from *Melipona beecheii* honey. En E. Ortiz-Vázquez, J. C. Ruiz-Ruiz, D. Magaña-Ortiz, & J. M. Ramon- Sierra, *Stingless Bee's Honey From Yucatán. Culture, traditional uses and nutraceutical potential*. (págs. 121-134). New York: Nova Science Publishers, Inc.
44. Magee, B., Koltin, Y., Gorman, J., & Magee, P. (1988). Assignment of Cloned genes to the seven electrophoretically separated *Candida albicans* chromosomes. *Molecular and cellular biology*, 8(11), 4721-4726.
45. Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119-128.
46. McCullough, M., Ross, B., & Reade, P. C. (1996). *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 25 (2), 136-144.
47. Moo-Huchin, V. M., González-Aguilar, G. A., Lira-Maas, J. D., Pérez-Pacheco, E., Estrada-León, R., Moo-Huchim, M., & Sauri-Duch, E. (2015). Physicochemical Properties of *Melipona beecheii* Honey of. *Journal of Food Research*, 4 (5), 25.
48. Moo-Huchin, V. M., Sauri-Duch, E., Ortiz-Vázquez, E., Cuevas-Glory, L., Moo-Huchim, M., & Lira-Maas, J. (2016). Composition of Stingless Bee Honey: The need for Quality Control. En E. Ortiz Vázquez, J. C. Ruiz Ruiz, D. I. Magaña Ortiz, & J. M. Ramon Sierra, *Stingless Bee's honey from Yucatan. Culture, traditional uses and nutraceutical potential*. (págs. 57-76). New York: Nova Science Publishers, Inc.

49. Morace, G., Perdoni, F., & Borghi, E. (2014). Antifungal drug resistance in *Candida* species. *Journal of global antimicrobial resistance*, 2(4), 254-259.
50. Moussa, A., Noureddine, D., Saad, A., Abdelmalek, M., & Salima, B. (2015). The influence of botanical origin and physico-chemical parameters on the antifungal activity of Algerian honey. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*.
51. Naglik, J. R., Moyes, D., Makwana, J., Kanzaria, P., Tsihlaki, E., Weindl, G., . . . Hube, B. (2008). Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. *Microbiology*, 154(11), 3266-3280.
52. Naglik, J., Moyes, D., Wächtler, B., & Hube, B. (2011). *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes and infection*, 13(12), 963-976.
53. Nailis, H., Kucharíková, S., Rídicová, M., Van Dijck, P., Deforce, D., Nelis, H., & Coenye, T. (2010). Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and-independent gene expression. *BMC microbiology*, 10(1), 114.
54. Nassar, H., Li, M., & Gregory, R. (2012). Effect of honey on *Streptococcus mutans* growth and biofilm formation. *Applied and environmental microbiology*, 78(2), 536-540.
55. Nieh, J. C. (2004). Recruitment communication in stingless bees (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Apidologie*, 35(2), 159-182.



56. Noori, A. L., Al Ghamdi, A., Ansari, M. J., Al-Attal, Y., Al-Mubarak, A., & Salom, K. (2013). Differences in composition of honey samples and their impact on the antimicrobial activities against drug multiresistant bacteria and pathogenic fungi. *Archives of medical research*, 44(4), 307-316.
57. Noori, A. L., Al-Ghamdi, A., Ansari, M. J., Al-Attal, Y., & Salom, K. (2012). Synergistic effects of honey and propolis toward drug multi-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* isolates in single and polymicrobial cultures. *International journal of medical sciences*, vol. 9, no 9, p. 793.
58. Odds, F. C., Brown, A. J., & Gow, N. A. (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends in microbiology*, 11(6), 272-279.
59. OMS, O. (2005). *Organización Mundial de la Salud*. Recuperado el Diciembre de 2014, de Farmacorresistencia : Preguntas frecuentes sobre la resistencia a los antimicrobianos: <http://www.who.int/drugresistance/faq/es/>
60. Ortiz-Vazquez, E., Cuevas-Glory, L., Zapata-Baas, G., Martinez-Guevara, J., & Ramon-Sierra, J. (2013). Which bee honey components contribute to its antimicrobial activity? A review. *African Journal of Microbiology Research*, 7(51), 5758-5765.
61. Pappas, P. G., Kauffman, C. A., Andes, D., Benjamin, D. K., Calandra, T. F., Edwards, J. E., & Sobel, J. D. (2009). Guías de práctica clínica para el manejo de la candidiasis: actualización del 2009, de la Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases*, Vol. 48, no 5, p 503-537.

62. Pla, J., Gil, C., Monteoliva, L., Navarro-García, F., Sánchez, M., & Nombela, C. (1996). Understanding *Candida albicans* at the molecular level. *Yeast*, 12(16), 1677-1702.
63. Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (2004). *MICROBIOLOGÍA* (Quinta Edición ed.). España: McGRAW-HILL.
64. Ramírez, S., Nieh, J., Quental, T., Roubik, D., Imperatriz-Fonseca, V., & Pierce, N. (2010). A molecular phylogeny of the stingless bee genus *Melipona* (Hymenoptera: Apidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56 (2), 519-525.
65. Ramón-Sierra, J. M., Magaña-Ortiz, D. I., Ortiz-Vázquez, E., & Ruiz-Ruiz, J. C. (2016). Medicinal Uses of *Melipona* Bee Honey in Mayan Communities of Yucatan. En E. Ortiz-Vázquez, J. C. Ruiz-Ruiz, D. Israel, Ortiz-Vázquez, & J. M. Ramón-Sierra, *Stingless Bee's Honey From Yucatán. Culture, Traditional Uses and Nutraceutical potential*. (págs. 11-26). New York: Nova Science publishers, Inc.
66. Ramón-Sierra, J. M., Ruiz-Ruiz, J. C., & de la Luz Ortiz-Vázquez, E. (2015). Electrophoresis characterisation of protein as a method to establish the entomological origin of stingless bee honeys. . *Food chemistry*, 183, 43-48.
67. Sanglard, D., & Odds, F. C. (2002). Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *The lancet infectious diseases*, 2(2), 73-85.
68. Sardi, J. C., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M., & Giannini, M. M. (2013). *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation,

- natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of medical microbiology*, 62(1), 10-24.
69. Scherer, S., & Magee, P. T. (1990). Genetic of *Candida albicans*. *Microbiological Reviews*, 54(3), 226-241.
70. Scherer, S., & Stevens, D. (1987). Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 25(4), 675-679.
71. Schmitzova, J. K. (1998). A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 54(9), 1020-1030.
72. Semlali, A., Killer, K., Alanazi, H., Chmielewski, W., & Rouabhia, M. (2014). Cigarette smoke condensate increases *C. albicans* adhesion, growth, biofilm formation, and EAP1, HWP1 and SAP2 gene expression. *BMC microbiology*, 14(1), 61.
73. Shekh, R. M., & Roy, U. (2012). Biochemical characterization of an anti-*Candida* factor produced by *Enterococcus faecalis*. *BMC microbiology*, 12(1), 132.
74. Suntiparapop, K., Prapaipong, P., & Chantawannakul, P. (2012). Chemical and biological properties of honey from Thai stingless bee (*Tetragonula leaviceps*). *Journal of Apicultural Research*, 51(1), 45-52.
75. Temaru, E., Shimura, S., Amano, K., & Karasawa, T. (2007). Antibacterial activity of honey from stingless honeybees (Hymenoptera; Apidae; Meliponinae). *Polish Journal of Microbiology*, 56 (4), 281-285.

76. Theunissen, F., Grobler, S., & Gedalia, I. (2001). The antifungal action of three South African honeys on *Candida albicans*. *Apidologie*, 32(4), 371-379.
77. Tierra, M. L. (2012). *Yucatán y su miel*. Recuperado el 1 de Septiembre de 2014, de México desconocido: <http://www.mexicodesconocido.com.mx/yucatan-y-su-miel.html>
78. Vit, P., Medina, M., & Enríquez, M. E. (2004). Quality standards for medical uses of Meliponinae honey in Guatemala, Mexico and Venezuela. *Bee World*, 85 (1), 2-5.
79. Wahdan, H. A. (1998). Causes of the antimicrobial activity of honey. *Infection*, 26(1), 26-31.
80. Williams, D. W., Jordan, R. P., Wei, X. Q., Alves, C. T., Wise, M. P., Wilson, M. J., & Lewis, M. A. (2013). Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. *Journal of oral microbiology*, 5(10), 340-358.
81. Yang, Y. L. (2003). Virulence factors of *Candida* species. *Journal of Microbiology Immunology and Infection*, 36(4), 223-228.
82. Zamora, G., Beukelman, K., van den Berg, B., Arias, M. L., Umaña, E., Aguilar, I., . . . Gross, N. (2014). The antimicrobial activity and microbiological safety stingless bee honeys from Costa Rica. *Journal of Apicultural Research*, 53(5), 503-513.
83. Zamora, L. G., & Arias, M. L. (2011). Calidad microbiológica y actividad antimicrobiana de la miel de abejas sin aguijón. *Revista Biomédica*, 22 (2), 59-66.

84. Zhao, X., Oh, S. H., Yeater, K. M., & Hoyer, L. L. (2005). Analysis of the *Candida albicans* Als2p and Als4p adhesins suggests the potential for compensatory function within the Als family. *Microbiology*, 151(5), 1619-1630.