



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DEL EFECTO DE AJOENE EN UN MODELO
EXPERIMENTAL MURINO DE CANDIDIASIS VAGINAL
(Modalidad: Investigación)

MARIELA DEL VALLE PÉREZ LÓPEZ

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

CUMANÁ, 2009

EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DEL EFECTO DE AJOENE EN UN
MODELO EXPERIMENTAL MURINO DE CANDIDIASIS VAGINAL

APROBADO POR:

Prof. Edgar Marchán Marcano

Asesor

Profa. Sara Centeno

Jurado

Prof. Anibal Lobo

Jurado

ÍNDICE

ÍNDICE	i
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	ix
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	14
Establecimiento del modelo experimental murino de candidiasis vaginal	14
Determinación de la citotoxicidad de Ajoene sobre el epitelio vaginal	15
Relación histológica dosis-dependiente del efecto de Ajoene en un modelo experimental murino de candidiasis vaginal	16
Estudio histológico	16
Análisis de los resultados	17
Análisis estadístico	18
RESULTADOS	19
Evolución de la infección en el modelo experimental murino de candidiasis vaginal	19
Cepa de Referencia	21
Aislado clínico	26
Evaluación de la citotoxicidad de ajoene	33
Tratamiento con ajoene	34
Cepa de referencia	34
Aislado clínico	41
DISCUSIÓN	50

CONCLUSIONES	61
RECOMENDACIONES	62
ANEXOS	74
HOJA DE METADATOS	76

DEDICATORIA

A mis padres, José y Magaly.

A mis hermanos, José Antonio y Rodrigo.

A mi esposo Freddy

Gracias a todos por su amor, apoyo, paciencia y confianza...

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por ser la fuerza que siempre me ayuda a levantarme en los momentos difíciles.

A mis padres, por su paciencia, amor y apoyo incondicional.

A mis hermanos, José Antonio y Rodrigo

A mis tíos, Hilda y Alberto, por abrirme un lugar en su familia.

A mi abuelita Marietta.

A mis amigas Cirlen, Marelvís y Estluz.

A mi esposo Freddy, por su amor, paciencia y apoyo; por ser la luz al final de este nuevo camino.

Al Dr. Edgar Marchán Marcano, por su paciencia y ayuda académica en el asesoramiento del presente trabajo.

Al Dr. Rafael Apitz-Castro, por facilitar los laboratorios y el ajoene utilizado en este trabajo de investigación.

Al Lic. Víctor Salazar por su asesoramiento y ayuda en el tratamiento de las muestras para microscopía de luz.

A la Lic. María Isabel Ramos y familia, por su amistad y donación de las cepas empleadas para este trabajo.

A todos, mil gracias...

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Frotis vaginal de ratones al 4^{to} día del tratamiento con estradiol. Leucocitos (L). Células superficiales (Cs). _____ 20
- Figura 2. Epitelio vaginal de ratones inoculados con solución salina 0,9%. Epitelio (E). Lumen vaginal (Lv). Tejido conectivo (Tc). _____ 20
- Figura 3. Epitelio vaginal de ratones inoculados con la CR A) Hifas a nivel medio de la vagina en ratones con 7 días de infección. B) Hifas al fondo del saco vaginal en ratones con 14 días de infección. Epitelio (E). Hifas (H). Lumen vaginal (Lv). ____ 22
- Figura 4. Epitelio vaginal de ratones inoculados con la CR a los 21 días de infección. A) Hifas a nivel medio de la vagina. B) Hifas al fondo del saco vaginal. Hifas (H). Epitelio (E). Células queratinizadas (Cq). Lumen vaginal (Lv). Tejido conectivo (Tc). _____ 23
- Figura 5. Epitelio vaginal de ratones inoculados con la CR. A) Neutrófilos en lumen vaginal a los 7 días de infección. B) Absceso al fondo del saco vaginal a los 14 días de infección. Neutrófilos (N). Hifas (H). Epitelio (E). Tejido conectivo (Tc). Abscesos (Ab). Lumen vaginal (Lv). _____ 24
- Figura 6. Epitelio vaginal de ratones inoculados con la CR a los 21 días de infección. A) Neutrófilos a nivel medio de la vagina. B) Microabscesos al fondo del saco vaginal. Epitelio (E). Neutrófilos (N). Tejido conectivo (Tc). Microabscesos (Ma). Lumen vaginal (Lv). _____ 25
- Figura 7. Epitelio vaginal de ratones inoculados con el AC a los 7 días de infección. A) Hifas a nivel medio de la vagina. B) Hifas al fondo del saco vaginal. Hifas (H). Epitelio (E). Lumen vaginal (Lv). Células queratinizadas (Cq). Tejido conectivo (Tc). _____ 28
- Figura 8. Epitelio vaginal de ratones inoculados con el AC a los 21 días de infección. A) Hifas a nivel medio de la vagina. B) Hifas al fondo del saco vaginal. Hifas (H).

Epitelio (E). Lumen vaginal (Lv). Tejido conectivo (Tc). Epitelio queratinizado (Eq).	29
Figura 9. Epitelio vaginal de ratones inoculados con el AC. A) Neutrófilos al fondo del saco vaginal a los 7 días de infección. B) Abscesos y microabscesos al fondo del saco vaginal a los 21 días de infección. Hifas (H). Neutrófilos (N). Epitelio (E). Abscesos (Ab). Tejido conectivo (Tc). Microabscesos (Ma). Lumen vaginal (Lv).	30
Figura 10. Niveles de infección en ratones inoculados con la CR y ratones inoculados con el AC a los 7,14 y 21 días (***) $p < 0,001$ vs 7 días).	32
Figura 11. Niveles de inflamación en ratones inoculados con la CR y en ratones	33
Figura 12. Epitelio al fondo del saco vaginal de ratones inoculados con DMSO-Gly. Epitelio (E). Neutrófilos (N). Tejido conectivo (Tc). Células queratinizadas (Cq).	34
Figura 13. Epitelio a nivel medio de la vagina de ratones inoculados con la CR y tratados con DMSO-Gly. Hifas (H). Lumen vaginal (Lv). Epitelio (E).	35
Figura 14. Epitelio vaginal de ratones inoculados con la CR y tratados con 0,3 mg/kg de ajoene. A) Hifas a nivel medio de la vagina. B) Hifas al fondo del saco vaginal. Hifas (H). Epitelio (E). Tejido conectivo (Tc). Lumen vaginal (Lv). Capa queratinizada (Cq).	36
Figura 15. Epitelio vaginal de ratones inoculados con la cepa de referencia. A) Hifas a nivel medio en ratones tratados con 0,59 mg/kg de ajoene. B) Hifas al fondo del saco vaginal en ratones tratados con 1,18 mg/kg de ajoene. Epitelio (E). Hifas (H). Lumen vaginal (Lv).	37
Figura 16. Epitelio vaginal de ratones inoculados con la CR y tratados con DMSO-Gly. A) Neutrófilos al fondo del saco vaginal. B) Absceso y microabscesos al fondo del saco vaginal. Hifas (H). Epitelio (E). Neutrófilos (N). Lumen vaginal (Lv). Tejido conectivo (Tc). Capa queratinizada (Cq). Abscesos (A). Microabscesos (Ma).	39
Figura 17. Epitelio vaginal de ratones inoculados con la CR y tratados con 1,18 mg/kg de ajoene. A) Neutrófilos a nivel medio de la vagina. B) Neutrófilos al fondo del saco. Hifas (H). Neutrófilos (N). Epitelio (E). Tejido conectivo (Tc). Lumen vaginal (Lv).	40

Figura 18. Epitelio vaginal de ratones inoculados con el AC y tratados con DMSO-Gly. A) Hifas a nivel medio de la vagina. B) Hifas al fondo del saco vaginal. Hifas (H). Lumen vaginal (Lv). Epitelio (E). Tejido conectivo (Tc). Células queratinizadas (Cq). _____	43
Figura 19. Epitelio vaginal de ratones inoculados con el AC y tratados con 0,59 mg/kg de ajoene. A) Hifas a nivel medio de la vagina. B) Hifas al fondo del saco vaginal. Hifas (H). Lumen vaginal (Lv). Epitelio (E). Tejido conectivo (Tc). _____	44
Figura 20. Epitelio vaginal de ratones inoculados con el AC y tratados con 1,18 mg/kg de ajoene. A) Hifas a nivel medio de la vagina. B) Hifas al fondo del saco vaginal. Hifas (H). Epitelio (E). Lumen vaginal (Lv). Tejido conectivo (Tc). Células queratinizadas (Cq). _____	45
Figura 21. Neutrófilos al fondo del saco vaginal de ratones inoculados con el AC y tratados con DMSO-Gly. (A) Neutrófilos solos y dispersos alrededor de las hifas. (B) Neutrófilos en masas. Neutrófilos (N). Epitelio (E). Tejido conectivo (Tc). _____	46
Figura 22. Niveles de infección en ratones inoculados con la cepa de referencia y en ratones inoculados con el aislado clínico tratados con DMSO-Gly y ajoene. (**p<0,001 vs DMSO-Gly) _____	48
Figura 23. Niveles de inflamación en ratones inoculados con la cepa de referencia y en ratones inoculados con el aislado clínico tratados con DMSO-Gly y ajoene. (**p<0,01 vs DMSO-Gly) _____	49

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC= American type culture collection

ATOE= Azul de toluidina-eosina

CVV= Candidiasis vulvovaginal

CVVR= Candidiasis vulvovaginal recurrente

DMSO= Dimetil sulfóxido

Gly= Glicerol

PAS= Ácido peryódico de Schiff

PMN's= Leucocitos polimorfonucleares

AC= Aislado clínico

CR= Cepa de referencia

RESUMEN

La candidiasis vulvovaginal es una infección que afecta a millones de mujeres en todo el mundo, cerca del 75% experimenta un episodio a lo largo de su vida. El agente causal aislado con más frecuencia de este tipo de infecciones es la *Candida albicans*. El uso de modelos experimentales murinos de candidiasis vaginal han sido utilizados en investigación como test *in vivo* en la búsqueda de nuevas drogas como posibles agentes antifúngicos. En este sentido, el objetivo de éste trabajo fue establecer un modelo experimental murino de candidiasis vaginal, para así evaluar la histopatología de la infección, y probar el efecto de ajoene, un compuesto aislado del ajo (*Allium sativum*), como posible agente antifúngico de bajo costo. Para ello se utilizaron ratones BALB/c hembras vírgenes de 4 a 6 semanas a las que se les indujo el estro mediante la aplicación intramuscular de 7,5 µg/g de estradiol por 3 días consecutivos. Al cuarto día se procedió a la inoculación interdiaria de 10⁷ blastoconidias de *C. albicans* y los controles fueron inoculados con NaCl 0,9% por periodos de 7, 14 y 21 días (n=6 c/grupo). Posteriormente se determinó el efecto de 3 dosis de ajoene (0,3; 0,58; 1,18 mg/kg) y su solvente DMSO-Gly sobre el epitelio vaginal de los ratones y por último se relacionó histológicamente el efecto de dichas concentraciones de ajoene en el modelo experimental murino de candidiasis vaginal. Los resultados demostraron que hay una disminución de los niveles de infección a medida que aumenta el número de días y que los niveles de inflamación están relacionados con los niveles de infección, notando además, que existen diferentes patrones de conducta entre las cepas debido a la virulencia de cada una de ellas. Sobre la base de estos resultados se tomó como tiempo óptimo el día 7 de infección. También se pudo comprobar histológicamente que el ajoene y su solvente (DMSO-Gly) no producen ningún tipo de citotoxicidad al epitelio vaginal de los ratones inoculados. Finalmente, se pudo observar que en la medida que aumenta la concentración de ajoene en el modelo experimental de candidiasis vaginal disminuyen significativamente los niveles de infección con respecto a los controles (**p<0,001), tanto en la CR como en el AC. Estos hallazgos demuestran la efectividad de ajoene como posible agente antifúngico contra la candidiasis vaginal pudiendo resultar una terapia eficiente a bajas concentraciones, de poca toxicidad y de bajo costo para el tratamiento de esta infección.

INTRODUCCIÓN

La candidiasis vulvovaginal (CVV) es una de las infecciones más comunes del tracto genital femenino y es *Candida albicans* el agente etiológico aislado con más frecuencia (85-90%) de infecciones vaginales sintomáticas (Saavedra y cols., 1999). Las micosis vulvovaginales son consideradas un problema de salud pública que afecta a millones de mujeres en todo el mundo (Black y cols., 1999; Barrenetxea, 2002; Fidel y cols., 2004). En las últimas décadas estas infecciones han adquirido gran importancia, ya que se han incrementado dramáticamente en hospederos inmunocomprometidos, afectando sus expectativas de vida (Marcilla y cols., 1998).

Observaciones clínicas indican que aproximadamente el 75% de las mujeres experimentan un episodio de CVV a lo largo de su vida y la mitad de ellas al menos dos o tres episodios en un año. En mujeres inmunocompetentes la susceptibilidad viene dada por diversos factores predisponentes, tales como la transmisión sexual, la modulación hormonal asociada al embarazo, ya que se produce aumento de glucógeno, la fase lútea del ciclo menstrual, altas dosis de anticonceptivos orales, terapias de reemplazo hormonal, el uso de antibióticos de forma prolongada, cambios en el pH vaginal, trauma local con pérdida de la integridad tisular, estados de mal nutrición, sobre todo en aquellas personas con dietas ricas en carbohidratos, los cuales aumentan los niveles de azúcar en sangre y en secreciones vaginales; y por último pero no menos importante la transmisión sexual. (Fidel y col., 2004; Panizzo y cols., 2000).

Por otro lado, tenemos a mujeres que sufren de candidiasis vulvovaginal recurrente (CVVR), representando el 5-10% de la población. Esta patología es definida cuando se presentan más de cuatro episodios sintomáticos de candidiasis aguda en un año, en ausencia de otra causa sintomática como vaginosis bacteriana,

tricomonas, reacciones químicas o alérgicas a tratamientos tópicos (White, 1993; Fidel, 2007). Actualmente no se conoce qué factores específicos predisponen la CVVR, pero se presume que es el resultado de cambios generados en la flora normal de la vagina. Por ejemplo, bajo condiciones normales los lactobacillus constituyen el elemento predominante de la flora vaginal junto a otros organismos tales como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corinebacterium* y *Gardnella vaginalis*. Estos mantienen una compleja interrelación de equilibrio, inhibiendo la adhesión de esporas patógenas a la superficie epitelial, mediante un proceso de co-agregación y competencia por los receptores.

También se habla de otros factores, tales como, la presencia de otras especies del género *Candida*, irritación mecánica del área vulvovaginal, contacto con el tracto gastrointestinal, tratamiento inadecuado en episodios anteriores (automedicación) y deficiencia del sistema inmune local, bien sea por linfocitos T o macrófagos (Fidel y cols., 1993; Black y cols., 1998; Marcilla y cols., 1998; Black y cols., 1999; Fidel, 1999; Saavedra y cols., 1999; Panizzo y cols., 2000; Panizzo y Reviákina, 2001b; Barrenetxea, 2002; Nomanbhoy y cols., 2002; Pardi y Cardozo, 2002; Steele y Fidel, 2002; Wozniak y cols., 2002; Xiaogang y cols., 2003; Fidel y cols., 2004).

C. albicans, del latín *candidus* y *albicans*, participio presente de *albicare* (blanco), es un organismo eucarionte, diploide, desprovisto de reproducción sexual que puede desarrollarse, multiplicarse y colonizar diferentes ambientes. Esta especie se ubica en el Phylum *Ascomycota*; Subphylum *Saccharomycotina*; Clase *Saccharomycetes*; Orden *Saccharomycetales* y Familia *Saccharomycetaceae* (<http://merops.sanger.ac.uk>). Habita en las membranas mucosas de la cavidad oral y vaginal, así como en el tracto gastrointestinal y respiratorio de los humanos formando parte de la flora microbiana normal de

estos tejidos. Es un patógeno oportunista por excelencia, ya que un descontrol o desequilibrio de los mecanismos de defensa del hospedero es aprovechado por este hongo para desarrollarse y establecer la infección (Senet, 1997; Sturtevant y Calderone, 1997; Marcilla y cols., 1998; Black y cols., 1999; Fidel, 1999; Panizzo y Reviákina, 2001a; Biasoli y cols., 2002; Forsyth y Mathews, 2002; Nomanbhoy y cols., 2002; Pardi y Cardozo, 2002; Steele y Fidel, 2002; Wozniak y cols., 2002).

Este hongo es un organismo polimórfico capaz de desarrollarse como células esféricas simples: blastosporas o blastoconidias; o como células alargadas, que pueden ser hifas multicelulares verdaderas o pseudohifas. Bajo ciertas condiciones ambientales las células sufren cambios morfogénicos tendiendo a adoptar alguna de las siguientes formas de crecimiento filamentoso: hifas verdaderas, formadas por células muy alargadas y cilíndricas que crecen por extensión apical continua, separadas por paredes septadas perpendiculares; y las pseudohifas que constituyen un estadio intermedio entre la levadura y el micelio, en donde las células que forman los filamentos son alargadas pero aun elipsoidales (Giacometti, 2005).

La pseudohifa a diferencia de la hifa verdadera crece por brotación unipolar: el brote se desarrolla como célula alargada permaneciendo unido a la célula madre, detiene su crecimiento y reanuda la brotación, dejando una constricción entre una célula y otra. Los micelios representan la forma germinativa del hongo, con capacidad invasora tisular y responsable de la sintomatología propia de la infección. Por otro lado, las blastosporas o blastoconidias son células esféricas u ovals de 3-5 micras, se reproducen por gemación y representan el fenotipo para la diseminación y transmisión. Este estadio, es la forma resistente del hongo el cual está asociado a las colonizaciones asintomáticas (Stenderup, 1990; Barrenetxea, 2002).

C. albicans posee un número de atributos celulares y moleculares que son importantes para el establecimiento de la infección. Entre este conjunto de múltiples características están, la adherencia del hongo a las células del hospedero, la producción de enzimas líticas, conversión morfo genética de la fase levaduriforme a la fase filamentosa o micelial, variabilidad antigénica y la inmunomodulación de los mecanismos de defensa del hospedero (Hostetter, 1994; Senet, 1997; Sturtevant y Calderone, 1997; Marcilla y cols., 1998; Martínez y cols., 1998; Panizzo y Reviákina, 2001a; Haoping, 2002).

La adherencia es el primer paso en la colonización microbial y un evento clave en el establecimiento de la infección. En tal sentido, la capacidad de adhesión de *C. albicans* es superior a la de otras especies y ello podría explicar la frecuencia de ésta en este tipo de infecciones (Kunze y cols., 1999; Panizzo y Reviákina, 2001a; Barrenetxea, 2002).

La pared celular de *C. albicans* es la responsable de su patogenicidad, la parte más externa de la célula, aquella que media la interacción física inicial entre el microorganismo y su ambiente. Es por esta razón, que la pared celular de *C. albicans* es blanco de estudio por numerosos investigadores (Hostetter, 1994; Chaffin y cols., 1998; Marcilla y cols., 1998; Panizzo y Reviákina, 2001b).

Aproximadamente, el 90% de la pared celular de *C. albicans* está compuesta de polisacáridos, y los principales constituyentes son: los β -glucanos (β -1,3-D-glucano, β -1,6-D-glucano), (50-60%), quitina (N-acetil-glucosamina) (10%) y manano (30%), éste último está asociado covalentemente a proteínas (mananoproteínas). En adición, también contiene un 5-20% de proteínas y 1-7% de lípidos. Los β -glucanos y la quitina son los implicados en la rigidez de la pared celular y su morfología, y las mananoproteínas (adhesinas) en la

adherencia a los tejidos del hospedero (Chaffin y cols., 1998; Marcilla y cols., 1998; López-Ribot y cols., 1999; Ohno, 2003).

C. albicans establece varias interacciones con su hospedero, los cuales componentes de la pared celular tales como las adhesinas. Virtualmente todas las adhesinas identificadas son proteínas de superficie, probablemente mananoproteínas, las cuales promueven la adhesión de *C. albicans* a los receptores o ligandos en las células del huésped. Dependiendo del tipo de receptor involucrado, se han descrito diferentes tipos de interacciones, tales como: interacciones proteína-proteína, interacciones proteína (con actividad de lectinas) - carbohidrato, que contienen fucosa o N-acetil-glucosamina, e interacciones no definidas completamente. Estas interacciones, involucran a un carbohidrato presente en la superficie celular de *C. albicans* que reconoce a un receptor desconocido del hospedero. Una cuarta interacción puede contribuir significativamente en la adherencia, y son las interacciones hidrofóbicas entre una proteína de superficie de las células del hongo y un receptor desconocido del huésped (Hostetter, 1994; Yu y cols., 1994; Sturtevant y Calderone, 1997; Jabra-Rizk y cols., 2001; Panizo y Reviákina, 2001a). Es importante mencionar que *C. albicans* no solo se adhiere a células epiteliales, sino también a células endoteliales, matriz extracelular y materiales inertes, implantados en el cuerpo del hospedero (Chaffin y cols., 1998).

Otro de los factores de virulencia que posee *C. albicans* es la conversión morfológica, esta habilidad de cambio cariotípico y fenotípico permite al hongo adaptarse a cualquier tipo de ambiente; partiendo de un simple medio de cultivo provisto de carbono y nitrógeno a temperatura ambiente al complejo cuerpo humano. Esta transición morfológica frecuentemente representa una respuesta del hongo a cambios en las condiciones ambientales o de cultivo. *In vivo*, estos cambios pueden ser generados por la microbiota que la rodea, tales como, el pH, oxígeno, altas concentración de glucosa, o como resultado del impacto iatrogénico (Chaffin y cols.,

1998; Senet, 1998), pero *in vitro*, la transición levadura-micelio puede ser inducida por incubación de los cultivos a 37°C. El pH del medio de incubación también puede actuar como inductor de la germinación; un pH cercano a 6,5 favorece el desarrollo del micelio mientras que un pH por debajo de 6 estimula el crecimiento levaduriforme (Giacometti, 2005).

La producción de enzimas líticas es otro de los factores de virulencia de *C. albicans*, bajo la forma micelial, este hongo incrementa sus propiedades adhesivas y penetra el epitelio mediante la producción de fosfolipasas y proteasas capaces de destruir o dañar las proteínas y los lípidos de las membranas (Hostetter, 1994; Sturtevant y Calderone, 1997; Chaffin y cols., 1998; Marcilla y cols., 1998; Mata y Perrone, 2000; Panizzo y Reviákina, 2001b; Barrenetxea, 2002; Steele y Fidel, 2002). Las proteasas son enzimas que hidrolizan los enlaces peptídico de las proteínas, son secretadas por las cepas más patógenas de la especie *Candida*, siendo *C. albicans* la más virulenta y la más proteolítica. Las proteasas pueden degradar cadenas pesadas de IgA disminuyendo las defensas del huésped contra la invasión. Por otro lado, las fosfolipasas intervienen en el mecanismo de invasión tisular del huésped ocasionando lisis y daño celular. Estas enzimas difieren a las secretadas por los mamíferos en la composición de los aminoácidos y se ha sugerido, que la contribución más importante radica en la relación de éstas enzimas con la patogenicidad (Ghannoum y Abu-Elteen, 1990; Ghannoum, 2000; Mata y Perrone, 2001).

Los mecanismos naturales de defensa de un hospedero ante la invasión del hongo involucran inicialmente al epitelio de la vagina como barrera física, estos, además secretan lisoenzimas, ácidos débiles y lípidos que contribuyen a destruir agentes extraños. La descamación del epitelio es otro de los mecanismos de defensa de la vagina. Todos los epitelios tienden a eliminar la capa superficial como un proceso de renovación y regeneración, el epitelio vaginal se renueva cada 8 días, y durante este proceso de exfoliación se elimina un gran número de microorganismos.

El pH ácido (3,8 y 4,4) de la vagina también dificulta el desarrollo de ciertos hongos patógenos que precisan de un medio menos ácido. Los *Lactobacillus acidophilus* son los que determinan el grado de acidez de la vagina, ya que degradan el glucógeno de las células epiteliales convirtiéndolo en glucosa y luego en ácido láctico. La presencia de estos no solo determina el grado de acidez de la vagina, factor importante para evitar el desarrollo de ciertos hongos patógenos, sino que además compiten fuertemente con el hongo por el espacio y también por el alimento (Boskey y cols., 2001).

Los lactobacillus o bacilos de Döderlein también secretan una serie de sustancias con acción antibiótica como el peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, lactacidina, acidolina, lactacin B y algunas defensinas que actúan sinérgicamente inhibiendo el desarrollo de ciertas bacterias, de esta forma los lactobacillus mantiene el equilibrio ecológico de la vagina.

Finalmente, el flujo vaginal se encarga de arrastrar hacia el exterior todos los desechos generados por la exfoliación del epitelio y los subproductos del metabolismo de la flora nativa (Lepargneur y Rousseau, 2002).

Otros elementos que forman parte activa y fundamental en la defensa de la mucosa vaginal son determinadas células inmunológicas, principalmente monocitos, linfocitos y macrófagos, estas poblaciones forman la inmunidad celular, y es parte fundamental en el control de *C. albicans*, de hecho, se pueden suponer problemas en la respuesta de estas células cuando existe candidiasis recurrente.

Las células epiteliales, también tienen participación en la defensa del hospedero al secretar citocinas, defensinas y quimiocinas que activan células inmunitarias específicas para luchar contra la infección. Los macrófagos y los leucocitos polimorfonucleares (PMN's), en particular, son la primera línea celular que acude al

área de invasión. Los leucocitos PMN's fagocitan al hongo, y además producen lactoferrina y productos intermediarios oxidativos, los cuales tienen una alta actividad antifúngica *in vitro*.

El papel de los macrófagos en el área inflamatoria es secundario, y su actividad fungistática o fungicida está asociada en mayor proporción a la producción de óxido nítrico (NO). Los macrófagos también pueden actuar como células asesinas de este hongo (Myrvang y Abrahamsen, 1993; Senet, 1997; Panizo y Reviákina, 2001a; Algarra y cols., 2002).

Una vez que el hongo ha penetrado hasta las capas superficiales del epitelio, prosigue hasta la membrana basal, la cual actúa como filtro, pudiendo en algunos casos permitir su entrada para finalmente culminar en una colonización sistémica dependiendo así del estado inmune del hospedero y la habilidad del hongo para proliferar y alterar su medio ambiente inmediato. Finalmente, podemos decir que la patogenicidad de *C. albicans* es una función de múltiples parámetros que trabajan juntos de una manera secuencial y cooperativa para establecer el proceso infeccioso. Si uno de estos factores no es dominante, su infectividad se ve afectada, particularmente en hospederos inmunocompetentes, más aún por la poca relación que existe entre ellos (Ghannoum y Abu-Elteen, 1990; Mata y Perrone, 2000).

En la actualidad se disponen de diversos medicamentos para el tratamiento de la CVV. Las fórmulas tópicas están disponibles en las formas de cremas o supositorios, que por lo general, no causan efectos colaterales sistémicos, pero, pueden generar alergias o intolerancias. Los agentes orales ocasionalmente pueden producir náusea, dolor abdominal y cefalea.

El tratamiento inicial usualmente consta de una terapia por 7 ó 14 días con cremas vaginales o supositorios, suplementado con algún antifúngico oral, también se

llevan a cabo tratamientos cortos empleando antifúngicos orales a dosis más altas y en ocasiones el paciente puede no responder al tratamiento, por lo que éste debe ser evaluado y requerir de un procedimiento más agresivo vía sistémica (Seidman y Skokos, 2005).

La disponibilidad de los antifúngicos y la automedicación han generado un incremento en la aparición de nuevas especies patógenas difíciles de diagnosticar y tratar; así como también, un incremento de la resistencia farmacológica que han mostrado varias especies de hongos a los diferentes antimicóticos que se utilizan en la práctica médica. Esta situación ha llevado a la búsqueda de nuevos antifúngicos de origen natural, como por ejemplo, en recursos naturales, como plantas, insectos, organismos marinos y terrestres, donde se han identificado una serie de moléculas con actividad antifúngica contra diferentes géneros y especies de hongos de importancia clínica para los humanos, convirtiéndose en una alternativa para el desarrollo y formulación de nuevos fármacos antimicóticos con menores efectos secundarios, mayor espectro de acción y menor costo que los disponibles actualmente para el tratamiento de estas infecciones (Arévalo y cols., 1994; García-Martos y cols., 2001; Mesa y cols., 2004). Un ejemplo interesante lo constituye el *Allium sativum* L., denominado en castellano Ajo. Esta especie pertenece a la familia *Liliaceae*, la cual comprende alrededor de 600 especies.

El ajo fue domesticado hace 7 mil años en los deltas del Nilo y el Ganges. Desde entonces, el ajo ha sido utilizado como especie, comida y medicina folklórica en el tratamiento de una variedad de dolencias (Ledezma y Apitz-Castro, 1998). Sus propiedades medicinales se remontan 5 000 años atrás en Asia central, donde las tribus nómadas lo utilizaban para aliviar ciertos malestares o padecimientos, tales como, picaduras de serpientes, hemorroides, reumatismos, dolor abdominal, tos, dolor de cabeza, dolor de dientes, diarrea y caspa. También era efectivo contra insectos, protozoarios, hongos, bacterias, virus entre otros usos (Moore y Atkins, 1977; Singh

y Pandey, 1990; Milner, 2001).

La abrumadora reputación que el ajo posee como agente terapéutico efectivo en el tratamiento de diversas enfermedades indujo a que numerosos investigadores se dedicaran al estudio de sus propiedades; algunas de ellas han sido descartadas y otras han encontrado sólidas bases que están asociadas a los diversos compuestos organosulfurados que lo constituyen (Ledezma y Apitz-Castro, 2006). De esta manera, actualmente están documentadas muchas de sus propiedades, entre las que destacan su acción antioxidante, hipolipemiante, antiaterogénica, antitrombótica, hipotensora, antimicrobiana, antifúngica, anticarcinogénica, antitumorogénica e inmunomoduladora (López, 2007).

Los primeros pasos para identificar los constituyentes activos del ajo datan de la mitad del siglo pasado, cuando Cavallito y Bailey (1944) descubrieron a la alicina (dialil sulfato), sustancia obtenida por destilación de vapor del extracto de ajo que poseía actividad antimicrobial a concentraciones muy bajas. Posteriormente, Stoll y Seebeck (1949) dilucidaron la vía por la cual la alicina era formada en el ajo, revelando que el bulbo fresco de ajo no contenía la alicina propiamente dicha, pero sí su precursor, la aliína, la cual es hidrolizada a alicina, piruvato y amonio, por la acción de una enzima aliinasa llamada fosfopiridoxal, al ser dañado el tejido del ajo.

En 1983, Apitz-Castro y colaboradores, reportaron el descubrimiento de una nueva molécula en extractos alcohólicos de ajo poseedora de una potente actividad antiplaquetaria. Posteriormente, esta molécula sería sintetizada en 1986 y se conocería con el nombre de ajoene (E - Z- 4,5,9-tritriadodeca-1,6,11-trieno 9-óxido) (Block y cols., 1986), una palabra compuesta que relaciona el origen de la molécula, es decir, el nombre popular de la planta “ajo”, en castellano, con la terminación “ene” indicativa de la presencia de dobles enlaces (Ledezma y Apitz-Castro, 1998). A partir de entonces, múltiples estudios han sido realizados para evaluar la efectividad

de ajoene. Actualmente se conoce a esta molécula como inhibidor de la agregación plaquetaria, antitumoral, antibacteriana, antimicótico, antiviral, antimutagénico, antiprotozoario y modulador de las funciones dependientes de membranas en células del sistema inmune (De González y cols., 1998; Ledezma y Apitz-Castro, 1998).

Yoshida y cols. (1987) fueron los primeros en reportar la actividad antifúngica del ajoene sobre una variedad de especies de hongos, entre ellas *C. albicans*. A partir de entonces, diversos trabajos han sido publicados demostrando la capacidad que éste novel compuesto posee para inhibir tanto *in vitro* como *in vivo* el crecimiento y proliferación de distintas especies de hongos; tales como: *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis*, *Alternaria solani*, *Alternaria tenuissima*, *Alternaria triticina*, *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium lini*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium udum* y *Tinea pedis* (San-Blas y cols., 1989; Singh y cols., 1990; San-Blas y cols., 1993; Sánchez-Mirt y cols., 1994; Ledezma y cols., 1996).

La acción de ajoene como agente antimicótico parece estar asociado a múltiples mecanismos. San-Blas y cols. (1989) reportaron importantes cambios estructurales en la membrana plasmática de *Paracoccidioides brasiliensis* al ser tratados con ajoene; inhibiendo en un 90% su desarrollo *in vitro* tanto en la fase levaduriforme como en la fase micelial. Ese mismo año, Debouzy y colaboradores, a su vez reportaron la generación de un desorden de empaquetamiento de los fosfolípidos en la membrana, que ocurre sin afectar la estructura principal del mosaico, aumentando la fluidez de las cadenas hidrocarbonadas, sin modificar la superficie hidrofílica de la bicapa.

Años más tarde, Urbina y cols. (1993) estudiaron los efectos del compuesto en la proliferación de *Trypanosoma cruzi*, el agente causal de la enfermedad de Chagas, encontrando que ajoene impide el crecimiento, y produce lisis de las formas epimastigote y amastigote del parásito, a través de la inhibición de la síntesis de

fosfatidilcolina y la consiguiente acumulación de fosfatidiletanolamina, generando además una dramática alteración de los ácidos grasos esterificados a esta fracción lipídica, que se enriquece con ácidos grasos saturados reduciendo marcadamente su contenido de linoleico. Por su parte, Marchán (1994) demostró que dichas alteraciones están asociadas a cambios en los perfiles de fosfolípidos y ácidos grasos, específicamente por bloqueo de la biosíntesis de fosfatidilcolina, reduciéndose sus niveles en un 18% en sus dos formas de vida, mientras que la fosfatidiletanolamina se incrementó un 38% en la fase levaduriforme y 44% en la fase micelial, acompañada de la reducción de ácidos grasos insaturados, de 69 a 62% en la fase levaduriforme con un incremento concomitante en los componentes saturados.

Gallwitz y cols. (1999) proponen un nuevo mecanismo de acción, la inhibición de la enzima glutation reductasa, enzima primordial en la regulación de la carga oxidativa que se genera durante el metabolismo celular y cuya inhibición conlleva a un desequilibrio que incrementa la aparición de radicales libres y conducen a la muerte celular. Adicionalmente, se ha reportado que ajoene reacciona con los grupos sulfidrilos de los residuos de cisteína en las proteínas de membrana que constituyen dominios relacionados con funciones de adhesión en la interacción parasito-hospedero, patogenicidad, receptores celulares de superficie y transductores de señalización celular (Ferri y cols., 2003). Entonces podemos decir que ajoene posee varias vías de acción con respecto a los agentes antifúngicos de uso comercial, que por lo general poseen un solo blanco de acción (Fortún, 1998).

Los azoles, como el fluconazol, itraconazol y ketoconazol interfieren con la síntesis del ergosterol, al inhibir la C14-alfa-desmetilasa, una enzima acoplada al citocromo P450, y que transforma al lanosterol en ergosterol. Esta inhibición altera la fluidez de la membrana, aumentando la permeabilidad, y produciendo inhibición del crecimiento celular. Además, cabe destacar que la inhibición no es completamente selectiva a la célula fúngica, sino que afecta la síntesis del colesterol en las células de

mamíferos (Fortún, 1998; Ledezma y Apitz-Castro, 2006). Hasta ahora las evidencias indican que el mecanismo de acción del ajoene sobre la célula fúngica parece estar dirigida a la membrana plasmática y se ha podido observar, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* que la efectividad de este compuesto se logra al emplear dosis muy bajas, por lo tanto, el tiempo de aplicación para un tratamiento es menor, lo cual es muy ventajoso, ya que se disminuyen considerablemente los riesgos de toxicidad sistémica (Ledezma y Apitz-Castro, 2006).

Según reportes no publicados por Apitz-Castro, ajoene no genera daño a las células de mamíferos al ser probado en perros y ratones a dosis por debajo de 25 mg/kg (San-Blas y cols., 1989). Con base en estos resultados, Ledezma y cols. (1996) decidieron evaluar la eficacia de ajoene contra *Tinea pedis*. Los resultados obtenidos demostraron su seguridad y eficacia en la terapia de corta duración contra esta infección; siete días continuos de tratamiento fueron suficientes para alcanzar la cura clínica y micológica en el 79% de los pacientes sin recidivas a los 90 días post tratamiento. Estos resultados también permitieron ampliar el espectro de acción de la molécula, aportando elementos importantes que demuestran su relativa inocuidad, al no presentar los pacientes efectos colaterales de importancia. Estos hallazgos conjuntamente con la ausencia de daño ultraestructural a nivel de las membranas en las células que fagocitan al hongo, soportan al ajoene como una posible droga antifúngica (Sánchez-Mirt y cols., 1994).

Con miras a ampliar los estudios en esta área, se propuso evaluar histológicamente el efecto de ajoene en un modelo experimental murino de candidiasis vaginal, el cual consistió inicialmente en el establecimiento del modelo experimental murino de candidiasis vaginal para luego determinar la citotoxicidad de este compuesto y su solvente sobre el epitelio vaginal de los animales. Finalmente relacionar histológicamente el efecto dosis-dependiente del mismo sobre la candidiasis vaginal experimental.

METODOLOGÍA

Establecimiento del modelo experimental murino de candidiasis vaginal

Se utilizaron ratones BALB/c hembras, vírgenes, de 4 a 6 semanas, con un peso aproximado de 15 a 20g suministrados por el bioterio del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) para establecer el modelo experimental murino de candidiasis vaginal y determinar el tiempo óptimo de infección.

Primeramente se indujo el estro en las ratonas, mediante la aplicación intramuscular de 7,5µg/g de estradiol en las extremidades posteriores por 3 días seguidos (según el método modificado de Fidel y cols., 1993); esta fase fue verificada al cuarto día a través de una citología vaginal, para ello, se tomó muestra del fluido vaginal, mediante la aplicación de un hisopo humedecido con solución salina estéril en la vagina de los animales. La muestra fue colocada en un portaobjetos desplazando el hisopo a todo lo largo del mismo y posteriormente fue fijado con metanol por 5 minutos. Cumplido el tiempo, las láminas fueron coloreadas con ácido peryódico-Schiff (PAS) y observadas en un microscopio óptico Nikon modelo E600 y fotografiadas con una cámara Nikon modelo E5000.

Una vez confirmada esta fase por la presencia de células epiteliales escamosas, se procedió a la inoculación de 10^7 blastoconidias de *C. albicans* suspendidas en 10µl de solución salina estéril 0,9% vía intravaginal. Esta aplicación se llevó a cabo de forma interdiaria para el mantenimiento de la infección a lo largo del estudio.

Para la inoculación se utilizó un catéter de polietileno de diámetro interno 0,08 cm unido a una aguja calibre 21x1_{1/2} pulgada y una jeringa de 1ml. Se utilizaron dos

cepas de *C. albicans* ATCC 90028 y 53AL, aislado de lavados vaginales de una paciente embarazada con candidiasis facilitada por la MSc. María Isabel Ramos del Laboratorio de Micología de la Facultad de Bioanálisis de la Universidad Central de Venezuela (UCV).

La preparación del inóculo en fase estacionaria de crecimiento se llevó a cabo tomando una muestra de un cultivo de agar glucosado Sabouraud y se colocó en 1ml de solución salina estéril, de esta suspensión de densidad desconocida se realizaron diluciones, el conteo celular se llevó a cabo en un hematocitómetro. Los animales fueron expuestos a *C. albicans* por períodos de 7, 14 y 21 días (n=18, 6 para cada período), y los controles (n=18, 6 para cada período) fueron tratados con solución salina estéril (NaCl al 0,9%).

Determinación de la citotoxicidad de Ajoene sobre el epitelio vaginal

Se determinó el efecto de 3 dosis de Ajoene (R. Apitz-Castro y M. K. Jain, US patente 4665088, Mayo 1987): 0,3; 0,59 y 1,18 mg/kg y su solvente, dimetil-sulfóxido (DMSO) y glicerol (Gly) (DMSO: Gly = 1:3 v/v). Con este propósito, se emplearon 6 ratonas para cada concentración y 9 ratonas para el grupo control, las cuales recibieron una mezcla de DMSO-Gly.

Primeramente se indujo el estro en los animales según la técnica descrita por Fidel y cols. (1993), confirmada esta fase se procedió a la inoculación de los ratones vía intravaginal con 10 μ l de Ajoene a las diferentes concentraciones, y 10 μ l de DMSO-Gly para el grupo control hasta el tiempo en que la infección es óptima, para ello se utilizó un catéter de polietileno de diámetro interno 0,08 cm unido a una aguja 21x1 $\frac{1}{2}$ pulgadas y a una jeringa de 1ml.

Relación histológica dosis-dependiente del efecto de Ajoene en un modelo experimental murino de candidiasis vaginal

Se relacionó histológicamente el efecto de 3 dosis de Ajoene (0,3; 0,59 y 1,18 mg/kg) en el modelo experimental murino de candidiasis vaginal. Para este experimento se emplearon 6 ratonas para cada dosis y 9 ratonas para el grupo control. Primeramente, se les indujo el estro a los animales tal como se describió arriba y posterior a ello, las ratonas fueron inoculadas vía intravaginal con 10^7 blastoconidias de *C. albicans* suspendidas en 10µl de solución salina estéril 0,9% por ratón. Los inóculos fueron aplicados interdiariamente hasta el tiempo en que la infección fue óptima (TO). Veinticuatro horas después de la última inoculación con blastoconidias de *C. albicans*, se procedió a la aplicación intravaginal de la concentración correspondiente de Ajoene a cada grupo, y DMSO-Gly al grupo control. El tratamiento fue aplicado por 7 días.

Estudio histológico

Para el análisis histológico los animales fueron sacrificados 24 horas después de aplicarles el último inóculo intravaginal de Ajoene; el sacrificio se llevo a cabo por dislocación cervical y la disección se realizó atendiendo el código de la Comisión de Bioética del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Previo al sacrificio se extrajo muestra de fluido vaginal a una ratona de cada grupo, es decir, a los 7, 14 y 21 días; las muestras fueron colocadas en portaobjetos, fijadas con metanol por 5 minutos y coloreadas con PAS.

La fijación de los órganos se realizó por perfusión a través del corazón con una aguja tipo insulina usando 1ml de formaldehído al 4% tamponizado con fosfato en un período de 5 minutos. A cada animal se le extrajo todo el aparato reproductor, estos fueron posteriormente colocados en frascos de plástico con formaldehído al 4%

tamponizado con fosfato por 24 horas, debidamente identificados. Cumplido el tiempo de fijación los órganos fueron lavados con agua por 8 horas, cortados longitudinalmente y colocados en viales de vidrio con etanol 70%.

El proceso de deshidratación de los órganos se llevo a cabo a través de una serie creciente de etanoles 70%, 90% y 100%, cada cambio tuvo una duración de 60 minutos, cumplido el tiempo requerido en cada concentración, se procedió a aclarar con xilol, para ello se efectuaron 3 cambios sucesivos de 5 minutos cada uno, y como último paso se efectuaron 3 cambios con parafina de 1 hora cada uno a 60°C en la estufa.

Posteriormente, se elaboraron bloques de parafina para cada órgano, una vez solidificados, los bloques fueron rebanados para eliminar el exceso de parafina y colocados en un micrótopo Leitz modelo 1212, donde se efectuaron cortes de 4 micras de espesor, los cuales fueron colocados en portaobjetos humedecidos con albúmina y llevados a la estufa por 24 horas a 56 °C para la adhesión del corte a la lámina. Cumplido el tiempo, las láminas fueron coloreadas con ácido peryódico de Schiff.

Análisis de los resultados

Los resultados fueron analizados mediante descripción histológica semi-cuantitativa de la vagina, según el método modificado de Black y cols. (1999), a través de la siguiente escala:

Niveles de infección:

0= Levaduras no detectables en secciones de la vagina.

1= Infección media: Incluye detección de hifas o blastoconidias esporádicas en el lumen vaginal y/o capa epitelial queratinizada.

2= Infección moderada: Presencia moderada de hifas y blastoconidias en lumen

vaginal y capa epitelial queratinizada.

3= Infección severa: Presencia abundante de hifas y blastoconidias en el lumen vaginal y capa epitelial queratinizada.

Niveles de inflamación:

Influjo de neutrófilos

0= Ningún neutrófilo presente en secciones de la vagina

1= Infiltración media: Escasos neutrófilos en el lumen vaginal y escasa presencia de microabscesos en la capa epitelial cornificada.

2= Infiltración moderada: Numerosos neutrófilos en el lumen y en la submucosa vaginal. Numerosos microabscesos en la capa epitelial cornificada.

3= Infiltración severa: Formación de largos abscesos y microabscesos en la capa epitelial cornificada. Numerosos neutrófilos en la submucosa.

Análisis estadístico

En este trabajo, los resultados fueron expresados como las medias \pm desviación estándar, indicándose el número total de observaciones. Las diferencias entre las medias en distintas condiciones se evaluaron a través de un análisis de varianza de 2 vías (ANOVA DOBLE). Se usó $p \leq 0,05$ como límite de significancia estadística, utilizando un programa comercial (Prisma 2,01 GraphPad Software, Inc).

RESULTADOS

Evolución de la infección en el modelo experimental murino de candidiasis vaginal

Este estudio se llevó a cabo para determinar el tiempo óptimo de infección; para ello la vaginosis fue inducida en los ratones bajo condiciones de estro (término utilizado por Black y cols., 1999), mediante la aplicación intramuscular de 7,5 µg/g de estradiol 72 horas antes a la inoculación vaginal con blastoconidias de *C. albicans*. Esta fase fue verificada al cuarto día a través de una citología vaginal, los frotis realizados fueron coloreados con ácido peryódico de Schiff (PAS) (Fig.1); mostrando escasos leucocitos y numerosas células superficiales anucleadas (queratinizadas) de bordes angulosos e irregulares, condición característica de éste estadio. Posteriormente se procedió a la inoculación interdiaria de *C. albicans* a cada grupo experimental y solución salina 0,9% al grupo control. Los resultados obtenidos del estudio histológico realizado al tejido vaginal de los ratones inoculados con solución salina estéril 0,9% mostraron ausencia completa de hifas y blastoconidias (Fig. 2), mientras que, en aquellos grupos a los que se les aplicó las esporas del hongo, mostraron presencia abundante de hifas y blastoconidias al día 7, 14 y 21.

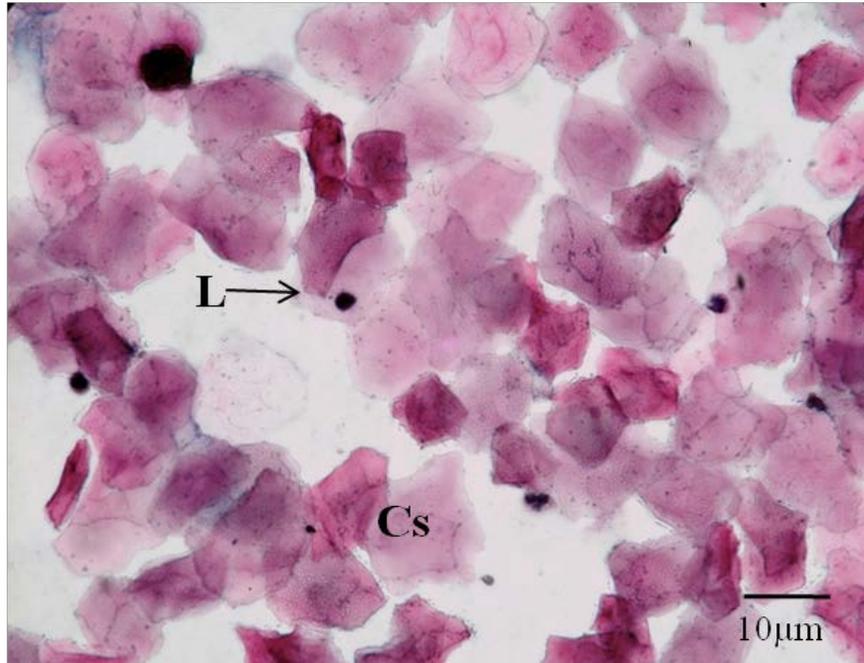


Figura 1. Frotis vaginal de ratones al 4^{to} día del tratamiento con estradiol. Leucocitos (L). Células superficiales (Cs).

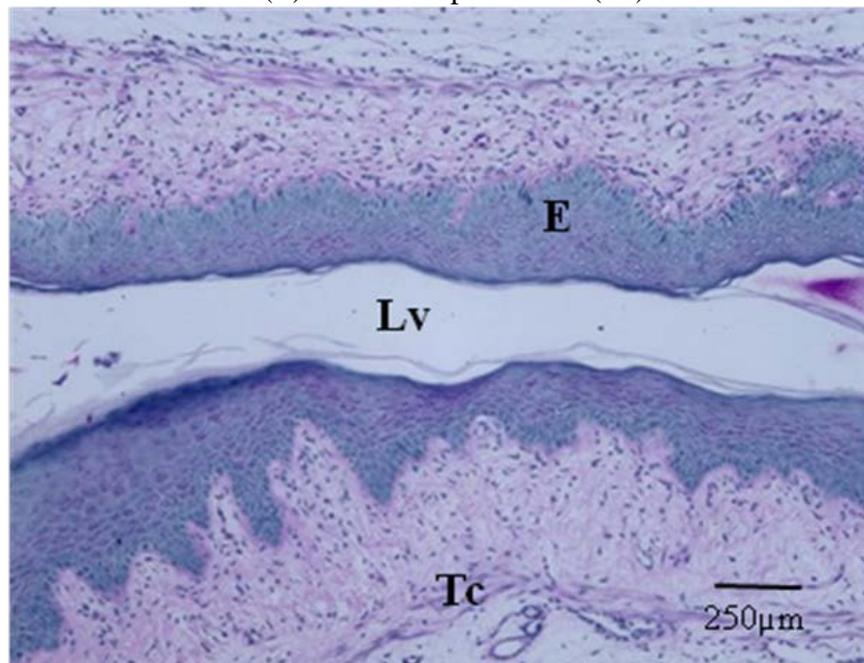


Figura 2. Epitelio vaginal de ratones inoculados con solución salina 0,9%. Epitelio (E). Lumen vaginal (Lv). Tejido conectivo (Tc).

Cepa de Referencia

En los ratones inoculados con la CR los niveles de infección fueron similares a los 7 y 14 días; en ambos grupos se observó presencia abundante de hifas y blastoconidias a todo lo largo de la vagina. Las hifas se encontraron en grandes masas formando redes entre sí tanto a nivel medio (Fig. 3A) como al fondo del saco vaginal (Fig. 3B). Sin embargo, a los 21 días se observaron pocas hifas tanto en lumen como penetrando el epitelio vaginal, ésta disminución fue altamente significativa ($p < 0,001$) con respecto al grupo de ratones a los 7 días de infección. Las hifas a los 21 días se observaron muy escasas en lumen y penetrando la capa queratinizada del epitelio a nivel medio (Fig. 4A) y al fondo del saco vaginal (Fig. 4B). Con respecto a la infiltración de neutrófilos podemos decir que se observó presencia abundante de éstos a los 7 y 14 días de infección. Los neutrófilos se encontraban tanto dispersos como en grandes grupos alrededor de las hifas presentes en el lumen vaginal (Fig. 5A). También se observaron largos abscesos y microabscesos al fondo del saco vaginal, así como, infiltración de neutrófilos hacia el lumen provenientes de la submucosa y desprendimiento de la capa queratinizada del epitelio al fondo del saco vaginal (Fig. 5B). A los 21 días la presencia de neutrófilos disminuyó significativamente con respecto al día 7 de infección ($p < 0,05$), sólo se observaron pocas células dispersas en el lumen a todo lo largo de la vagina (Fig. 6A), escasos microabscesos y ausencia de la capa queratinizada del epitelio en ciertas zonas de la vagina (Fig. 6B).

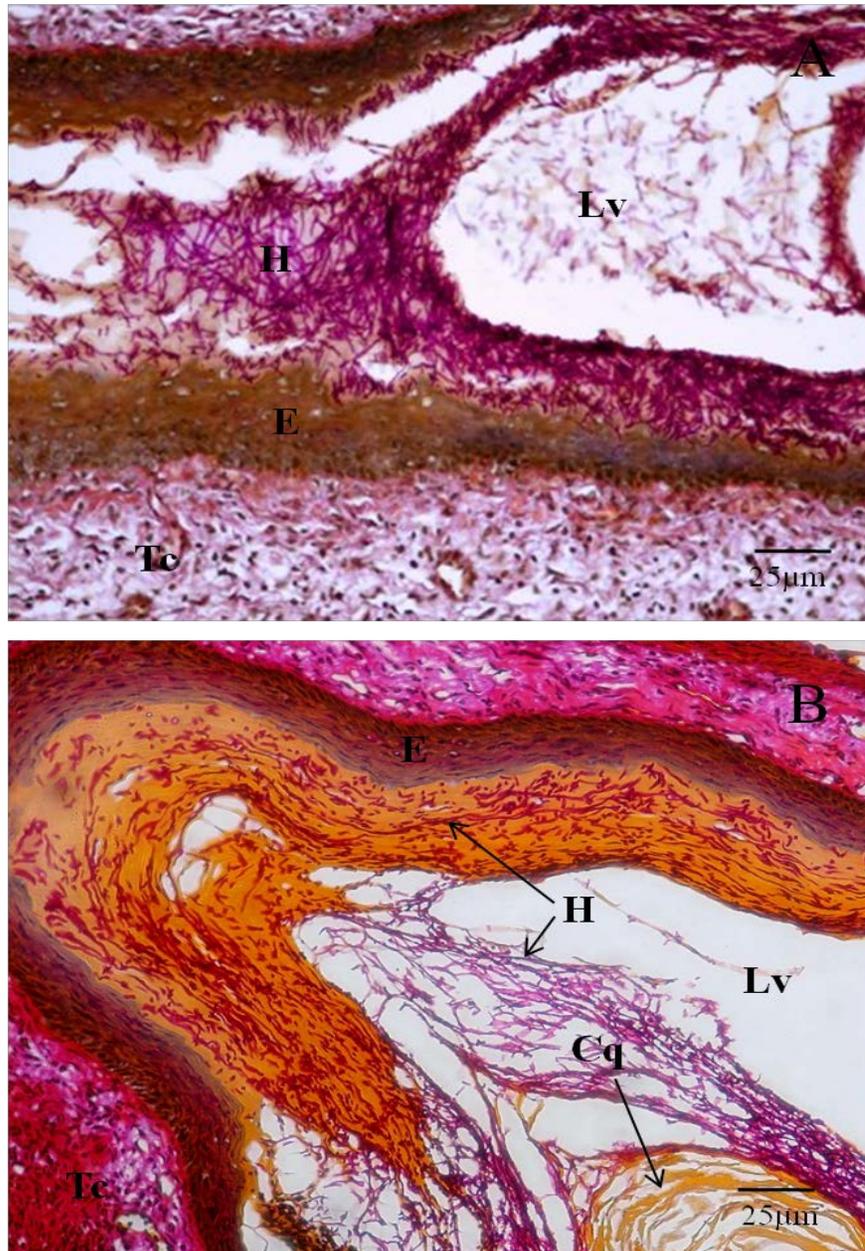


Figura 3. Epitelio vaginal de ratones inoculados con la CR A) Hifas a nivel medio de la vagina en ratones con 7 días de infección. B) Hifas al fondo del saco vaginal en ratones con 14 días de infección. Epitelio (E). Hifas (H). Lumen vaginal (Lv). Tejido conectivo (Tc). Células queratinizadas (Cq).

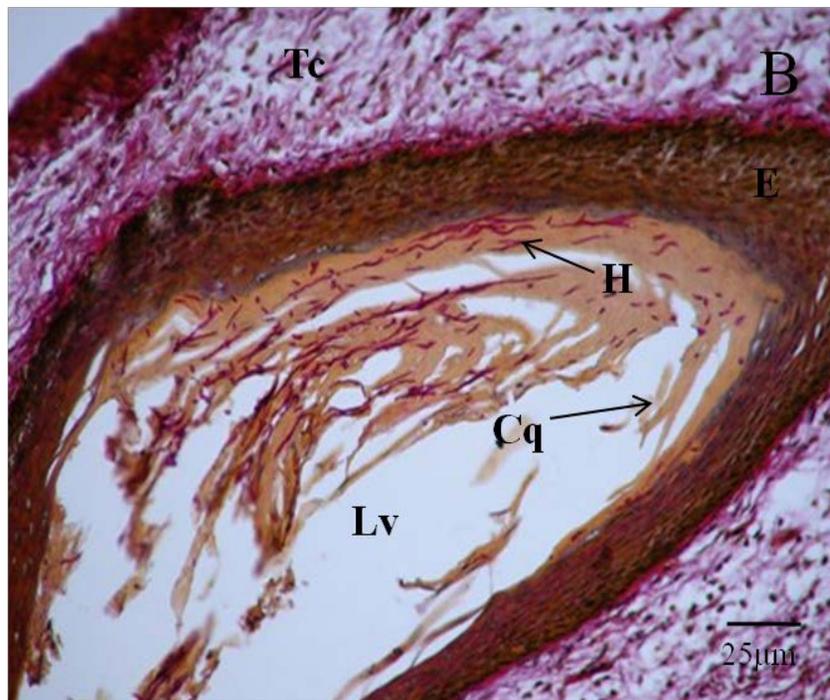
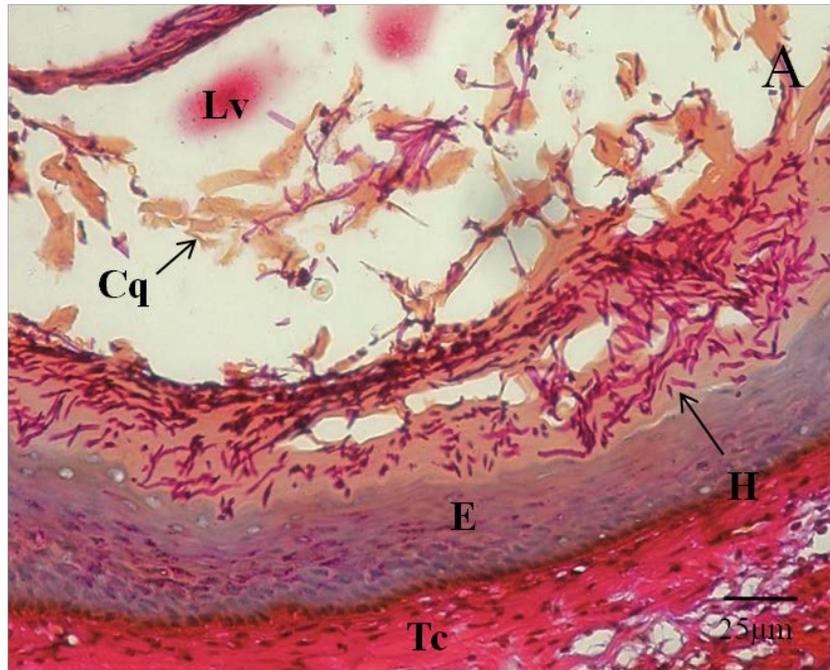


Figura 4. Epitelio vaginal de ratones inoculados con la CR a los 21 días de infección. A) Hifas a nivel medio de la vagina. B) Hifas al fondo del saco vaginal. Hifas (H). Epitelio (E). Células queratinizadas (Cq). Lumen vaginal (Lv). Tejido conectivo (Tc).

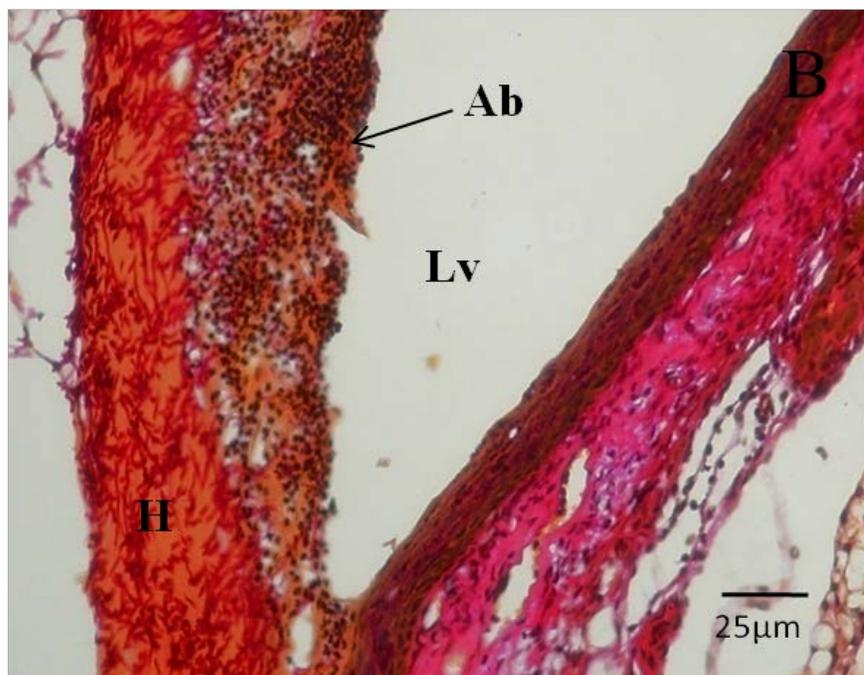
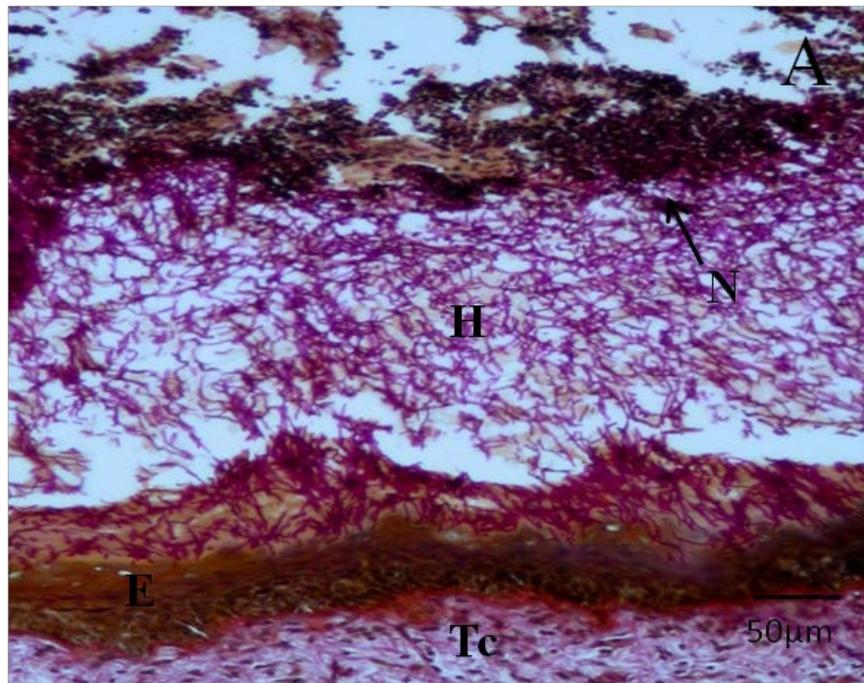


Figura 5. Epitelio vaginal de ratones inoculados con la CR. A) Neutr3filos en lumen vaginal a los 7 d3as de infecci3n. B) Absceso al fondo del saco vaginal a los 14 d3as de infecci3n. Neutr3filos (N). Hifas (H). Epitelio (E). Tejido conectivo (Tc). Abscesos (Ab). Lumen vaginal (Lv).

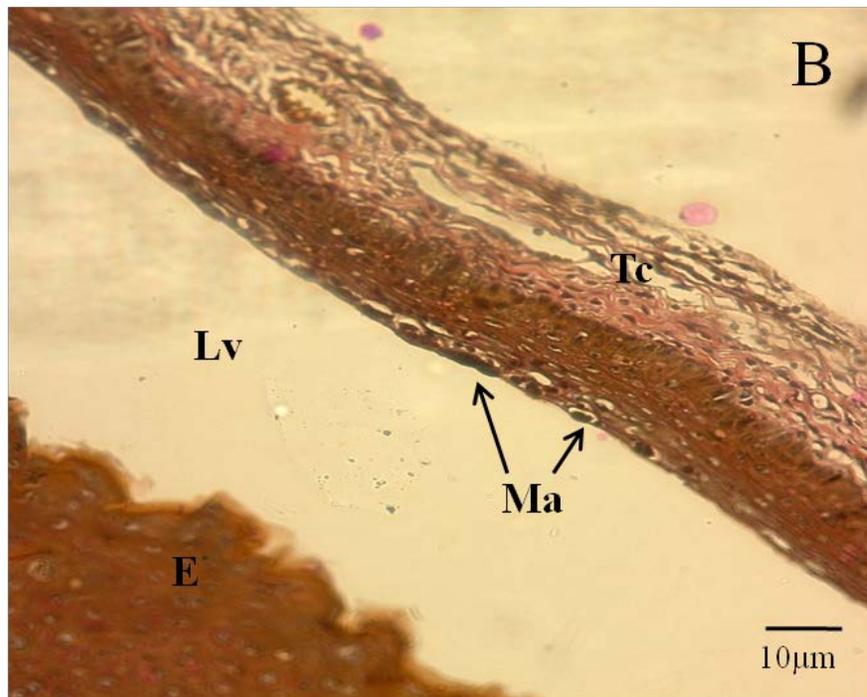
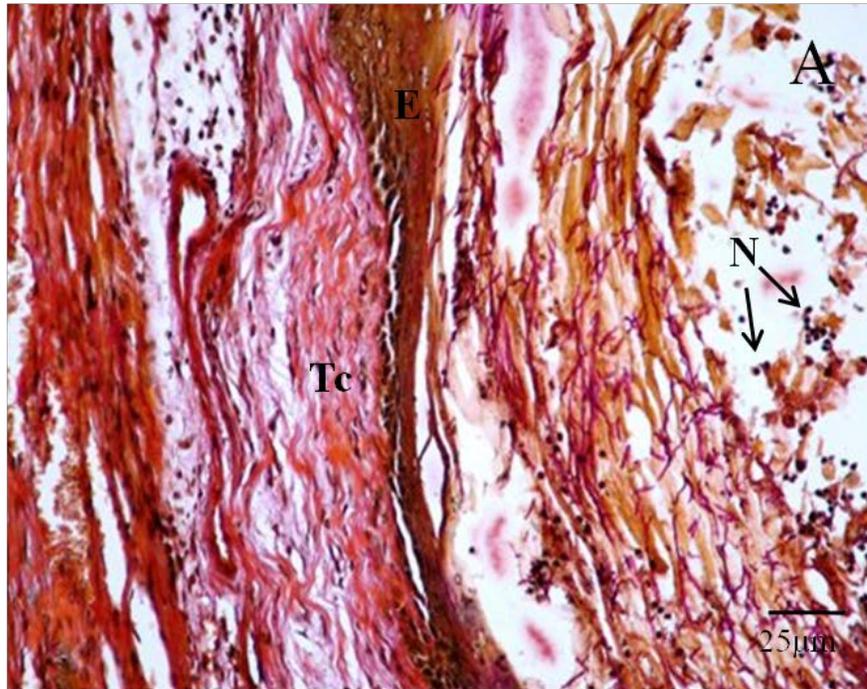


Figura 6. Epitelio vaginal de ratones inoculados con la CR a los 21 días de infección.
 A) Neutrófilos a nivel medio de la vagina. B) Microabscesos al fondo del saco vaginal. Epitelio (E). Neutrófilos (N). Tejido conectivo (Tc). Microabscesos (Ma). Lumen vaginal (Lv).

Aislado clínico

Los niveles de infección fueron similares en los grupos de ratones inoculados al día 7 y 14. Estos grupos mostraron abundante presencia de hifas y blastoconidias tanto a nivel medio como al fondo del saco vaginal; en el lumen las hifas se observaron formando masas de células densamente empaquetadas mezcladas con queratina y leucocitos provenientes de la submucosa (Fig. 7A), también, se observaron abundantes hifas penetrando la capa queratinizada del epitelio a nivel medio de la vagina como al fondo de esta. En la capa queratinizada las hifas se observaron muy abundantes y aglomeradas entre sí (Fig. 7B). En el grupo de ratones con 21 días de infección se pudo observar una disminución altamente significativa en la presencia de hifas y blastoconidias a todo lo largo de la vagina con respecto al grupo de ratones con 7 días de infección ($p < 0,001$). Las hifas se observaron escasas en lumen tanto en el fondo de la vagina como a nivel medio (Fig. 8A). Asimismo se observaron escasas hifas penetrando la capa queratinizada del epitelio (Fig. 8B). En este grupo de ratones no se observaron grandes aglomeraciones de hifas, solo pequeños grupos dispersos a todo lo largo de la vagina, además de pérdida completa de la capa queratinizada del epitelio.

En relación a la presencia de neutrófilos y su incidencia en los niveles de inflamación, en los ratones a los 7 días de infección se observó una disminución muy significativa de los niveles de inflamación en relación al grupo inoculado con la cepa de referencia ($p < 0,01$). En tanto que, a los 14 días se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) de éstos niveles con respecto a los ratones inoculados con la misma cepa pero a los 7 días de infección. Mientras que, a los 21 días de infección el grado de inflamación aumentó muy significativamente con respecto a los ratones inoculados con la cepa de referencia al mismo tiempo de exposición ($p < 0,01$).

Los neutrófilos a los 7 días se observaron escasos y dispersos en el lumen, tanto

a nivel medio como al fondo de la vagina (Fig. 9A). En cambio, en los ratones con 14 y 21 días de infección la presencia de neutrófilos fue abundante y fueron observados dispersos formando masas de distintos tamaños mezclados con hifas y la queratina del epitelio, éstos a todo lo largo de la vagina. En estos dos últimos grupos eventualmente se observaron abscesos y microabscesos al fondo del saco vaginal, además de, infiltración de neutrófilos hacia la submucosa (Fig. 9B).

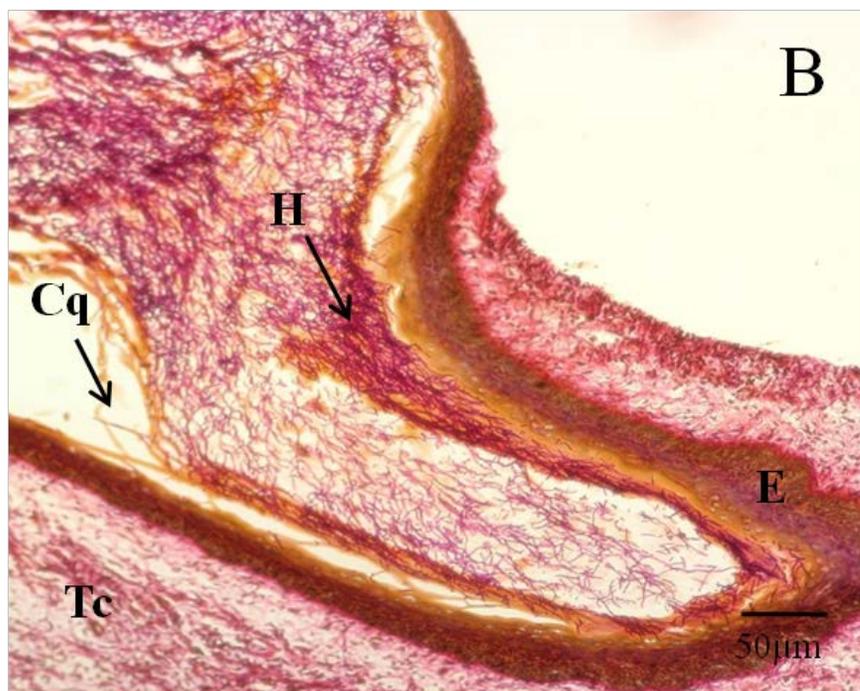
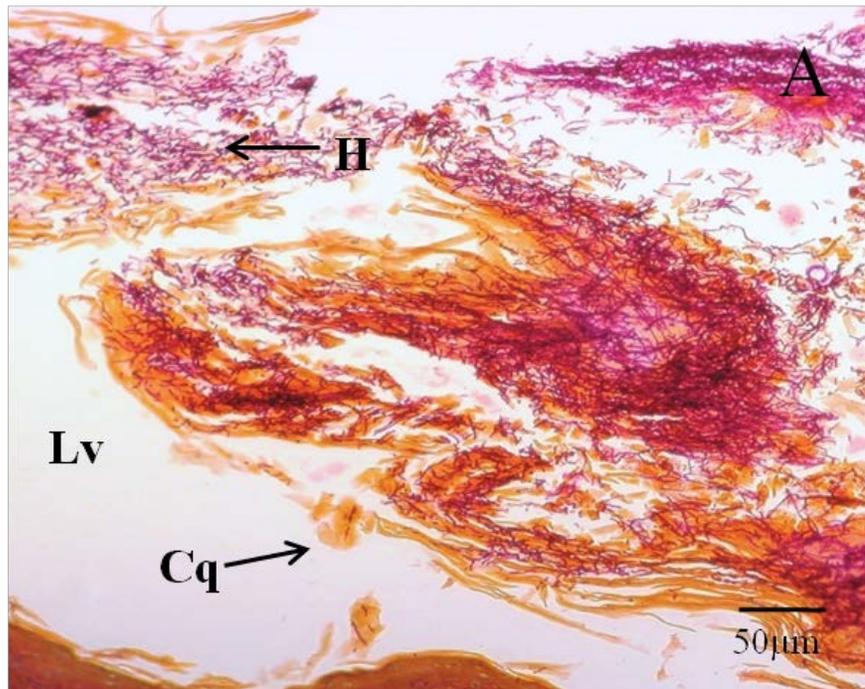


Figura 7. Epitelio vaginal de ratones inoculados con el AC a los 7 días de infección. A) Hifas a nivel medio de la vagina. B) Hifas al fondo del saco vaginal. Hifas (H). Epitelio (E). Lumen vaginal (Lv). Células queratinizadas (Cq). Tejido conectivo (Tc).

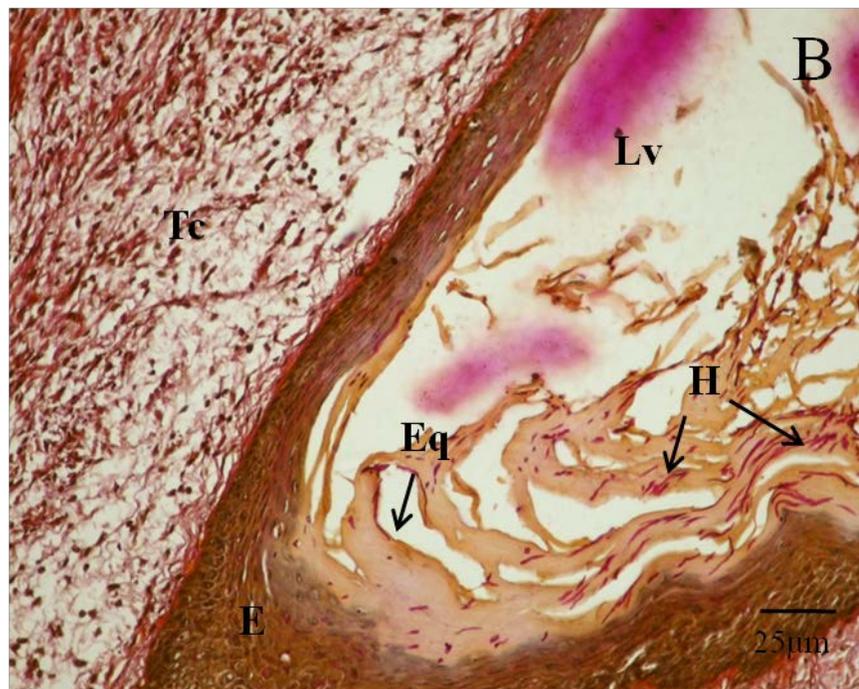
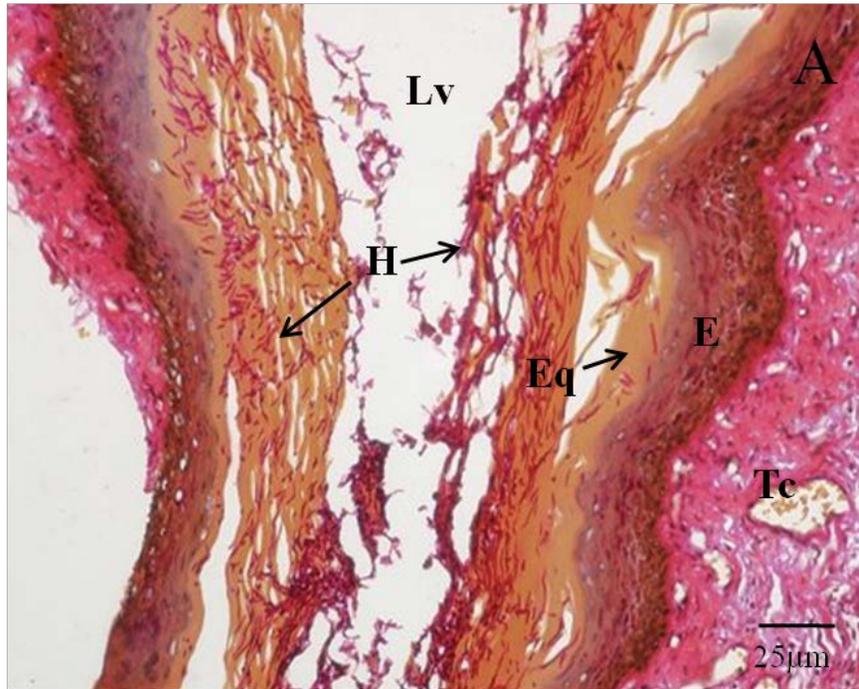


Figura 8. Epitelio vaginal de ratones inoculados con el AC a los 21 días de infección.
 A) Hifas a nivel medio de la vagina. B) Hifas al fondo del saco vaginal. Hifas (H).
 Epitelio (E). Lumen vaginal (Lv). Tejido conectivo (Tc). Epitelio queratinizado (Eq).

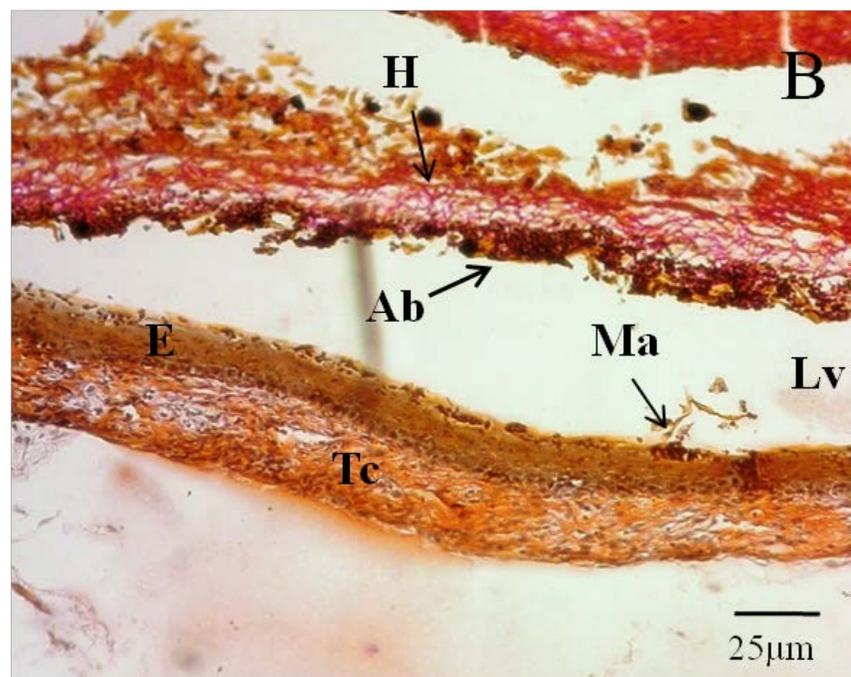
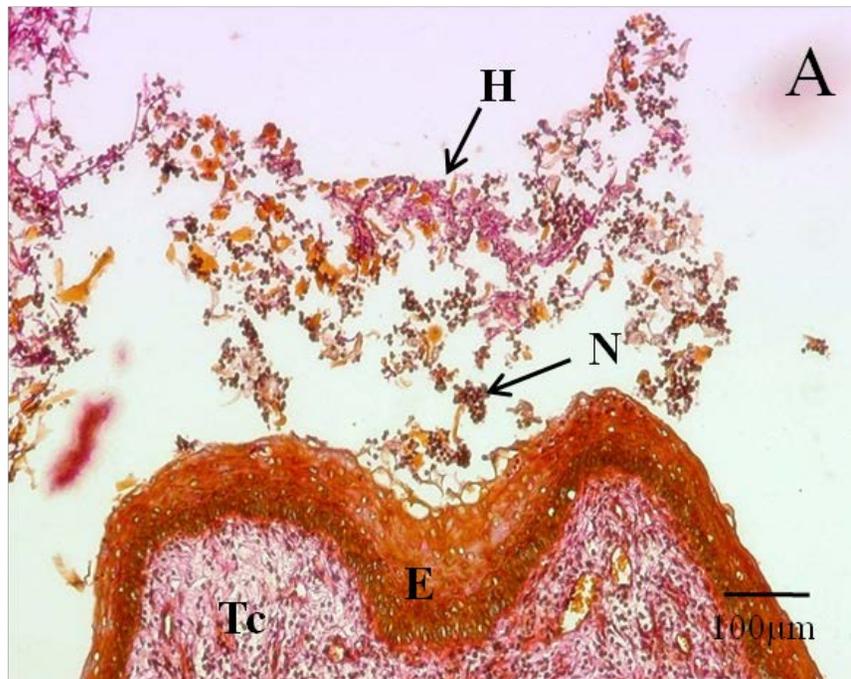


Figura 9. Epitelio vaginal de ratones inoculados con el AC. A) Neutrófilos al fondo del saco vaginal a los 7 días de infección. B) Abscesos y microabscesos al fondo del saco vaginal a los 21 días de infección. Hifas (H). Neutrófilos (N). Epitelio (E). Abscesos (Ab). Tejido conectivo (Tc). Microabscesos (Ma). Lumen vaginal (Lv).

De acuerdo a la escala propuesta por Black y cols. (1999), los niveles de infección en los ratones inoculados tanto con la CR como con el AC a los 7 y 14 días fueron de 2^{do} grado o infección moderada, observando una ligera disminución en la presencia de hifas en el grupo inoculado con la CR, lo que trajo consigo un leve descenso de los niveles de infección los cuales se vieron reflejados en el gráfico. Así mismo, se pudo evidenciar que los niveles fueron disminuyendo paulatinamente en el tiempo, llegando a ser altamente significativa a los 21 días de infección y mostrando niveles de 1^{er} grado o infección media, esto debido a la poca presencia de hifas que se observó en la vagina de los animales. En este último grupo también se observó una ligera disminución, no significativa estadísticamente en los ratones inoculados con la CR. Estos resultados demuestran claramente que la cepa de referencia es más susceptible a ser eliminada de forma natural más rápidamente en el tiempo que el aislado clínico. La interacción entre ambas cepas en cada período de tiempo no fue estadísticamente significativa (Fig. 10).

Con respecto a los niveles de inflamación podemos decir que en el grupo de ratones inoculados con la CR los niveles fueron elevados o de 2^{do} grado a los 7 y 14 días, mientras que a los 21 días de infección, los niveles de inflamación se vieron disminuidos significativamente. En cambio, en el grupo inoculado con el AC pudimos observar que la respuesta del sistema inmunológico del huésped fue diferente, mostrando un patrón de conducta opuesto al observado en los ratones inoculados con la CR. En vista de ello, a los 7 días de infección el flujo de células inflamatorias hacia el lumen vaginal se vio disminuido muy significativamente con respecto al grupo inoculado con la CR del mismo tiempo. Sin embargo, en el grupo de ratones con 14 días de infección se observó un aumento significativo en los niveles de inflamación, mostrando niveles de 2^{do} grado o infección moderada; y que estos niveles se mantuvieron en el grupo de ratones con 21 días de infección. Es importante mencionar que en este último grupo se observaron diferencias entre una cepa y otra en cuanto a los niveles de inflamación, ya que en los ratones inoculados con el AC los

niveles de inflamación fueron más elevados que en el grupo inoculado con la CR. Estos resultados sugieren que los niveles de inflamación están asociados a los niveles de infección, ya que a mayor presencia de hifas mayor es el infiltrado de células hacia el lumen vaginal, lo cual genera altos niveles de inflamación (Fig. 11). También es importante destacar, que el sistema inmunológico reaccionó de forma diferente en los ratones inoculados con el AC, debido a que en principio pudimos observar que la presencia de células inflamatorias hacia el lumen fue menor en este grupo a los 7 días con respecto al grupo inoculado con la CR, y que al transcurrir el tiempo los niveles aumentaron de forma significativa hasta el día 21 de infección. Estos hallazgos demuestran que el AC es una cepa más virulenta y se ha valido de ello para establecer un proceso infeccioso de más largo tiempo pasando desapercibida en un principio por el sistema inmunológico del ratón.

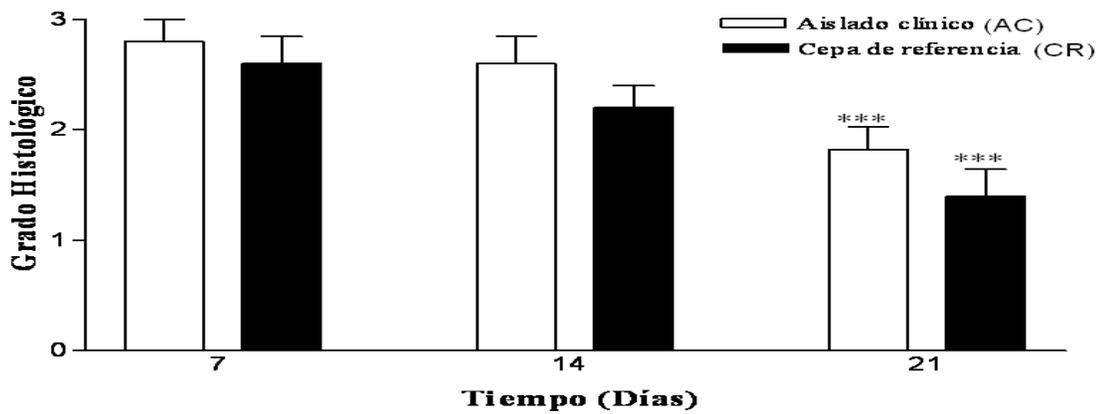


Figura 10. Niveles de infección en ratones inoculados con la CR y ratones inoculados con el AC a los 7,14 y 21 días (***) $p < 0,001$ vs 7 días).

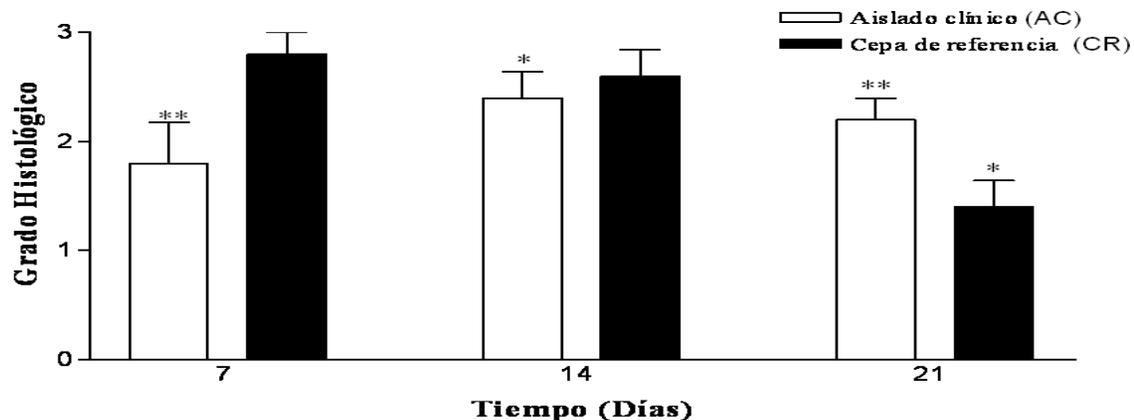


Figura 11. Niveles de inflamación en ratones inoculados con la CR y en ratones inoculados con el AC a los 7, 14 y 21 días de infección (* $p < 0,05$ vs 7 días) (** $p < 0,01$ vs CR).

Evaluación de la citotoxicidad de ajoene

Con base en los resultados anteriores se decidió tomar el día 7 como tiempo óptimo (TO), ya que se observó un nivel apropiado de infección e inflamación en el grupo inoculado con el aislado clínico. La decisión fue tomada debido a su frecuencia clínica. Otra de las razones por las cuales se tomó el día 7 como tiempo óptimo fue porque después de éste tiempo se observó pérdida en la integridad del epitelio debido a la acción de células inflamatorias, siendo ésta condición desfavorable para este modelo experimental.

Una vez establecido el tiempo óptimo de infección se procedió a determinar el efecto de 3 dosis de ajoene (0,3; 0,59 y 1,18 mg/kg de peso) y su control (DMSO-Gly) sobre el epitelio vaginal de animales sanos, con la finalidad de demostrar la inocuidad (citotoxicidad) de este compuesto a sus diferentes concentraciones. En términos generales, no se observaron daños o anomalías en el epitelio vaginal tanto en el grupo tratado con DMSO-Gly como el tratado con ajoene. En ambos grupos se observó que la capa queratinizada del epitelio se mantuvo presente a todo lo largo de la vagina; y sólo se pudo apreciar un leve engrosamiento de la misma. Hacia el fondo

del saco vaginal se apreció abundante queratina desprendida dispuesta en capas y escasos neutrófilos dispersos en el lumen (Fig. 12).

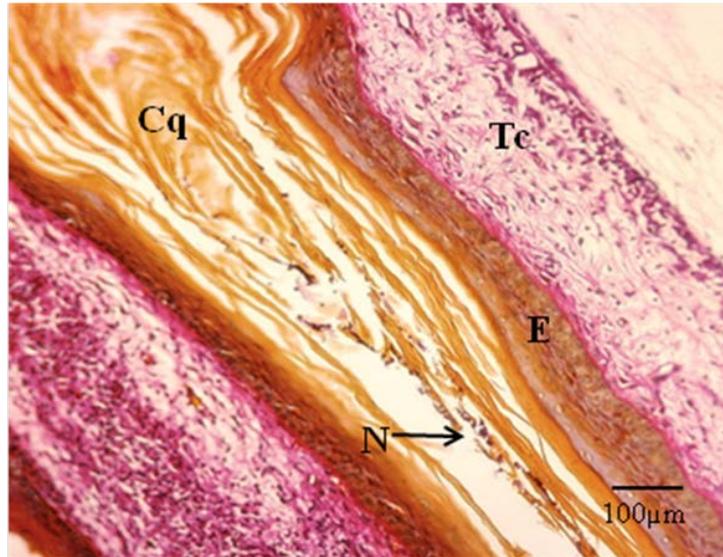


Figura 12. Epitelio al fondo del saco vaginal de ratones inoculados con DMSO–Gly. Epitelio (E). Neutrófilos (N). Tejido conectivo (Tc). Células queratinizadas (Cq).

Tratamiento con ajoene

Cepa de referencia

En los ratones inoculados con la cepa de referencia y tratados con DMSO-Gly se observaron abundantes hifas y blastoconidias, tanto en lumen como penetrando la capa queratinizada del epitelio desde la zona media de la vagina hasta el fondo del saco vaginal. En el lumen las hifas se observaron entremezcladas con queratina y leucocitos provenientes de la submucosa (Fig. 13).

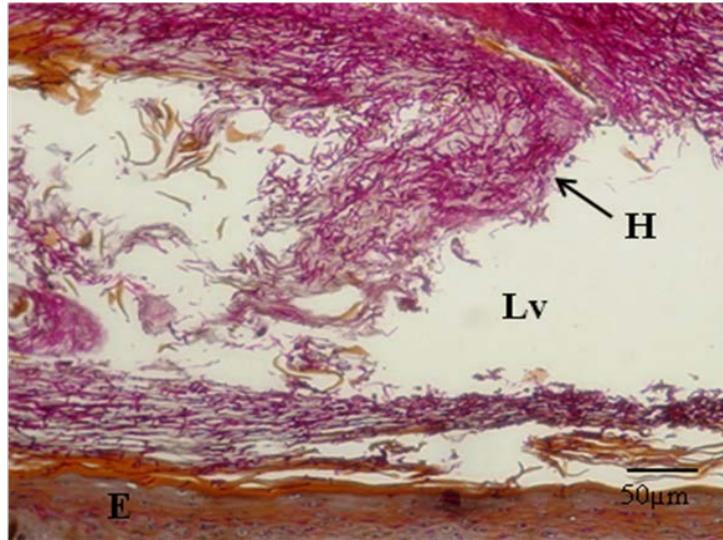


Figura 13. Epitelio a nivel medio de la vagina de ratones inoculados con la CR y tratados con DMSO-Gly. Hifas (H). Lumen vaginal (Lv). Epitelio (E).

En los ratones tratados con 0,3 mg/kg de ajoene, se observó que la presencia de hifas y blastoconidias tuvo una disminución altamente significativa con respecto al grupo control ($p < 0,001$). Las hifas y blastoconidias de este grupo se observaron escasas a nivel medio de la vagina tanto en lumen como penetrando la capa queratinizada (Fig. 14A), mientras que al fondo del saco vaginal ligeramente abundantes; y muy escasas penetrando la capa queratinizada del epitelio (Fig. 14B). Esta capa se mantuvo presente a lo largo del canal vaginal, en tanto que, hacia el fondo del saco se pudo apreciar ausencia completa de la misma en algunas zonas. En el grupo de ratones tratados con 0,59 mg/kg de ajoene la presencia de hifas y blastoconidias también mostró una disminución altamente significativa ($p < 0,001$) con respecto al grupo control. Las hifas se observaron ligeramente escasas a todo lo largo de la vagina tanto en lumen como penetrando la capa queratinizada del epitelio (Fig. 15A). Lo mismo se observó en el grupo tratado con 1,18 mg/kg. En este grupo de ratones, las hifas y blastoconidias se observaron escasas tanto en lumen como penetrando la capa queratinizada del epitelio al fondo del saco vaginal (Fig. 15B).

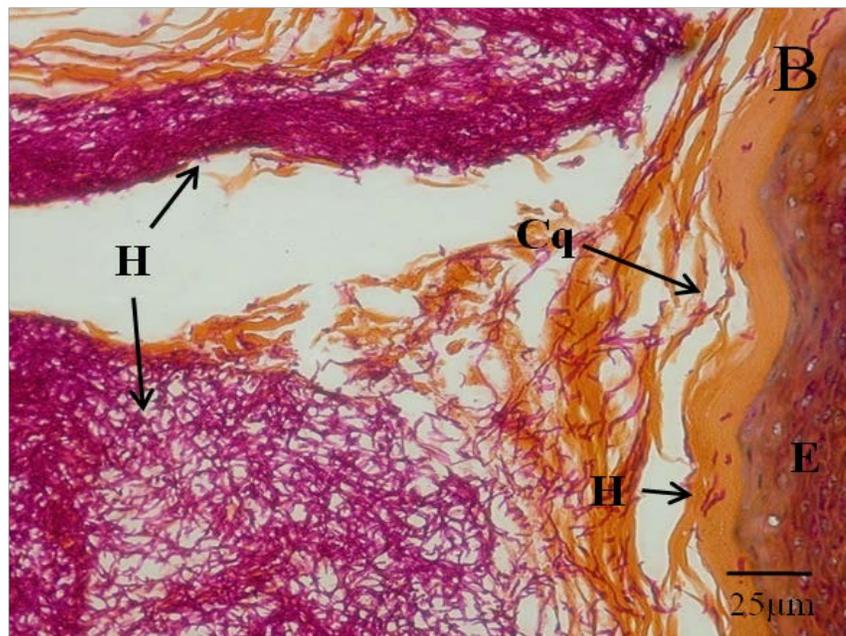
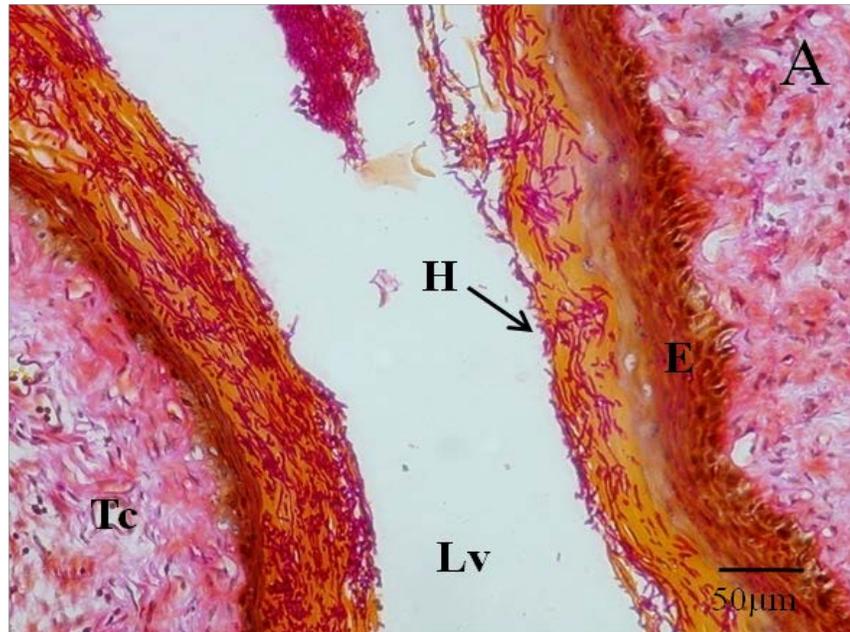


Figura 14. Epitelio vaginal de ratones inoculados con la CR y tratados con 0,3 mg/kg de ajoene. A) Hifas a nivel medio de la vagina. B) Hifas al fondo del saco vaginal. Hifas (H). Epitelio (E). Tejido conectivo (Tc). Lumen vaginal (Lv). Capa queratinizada (Cq).

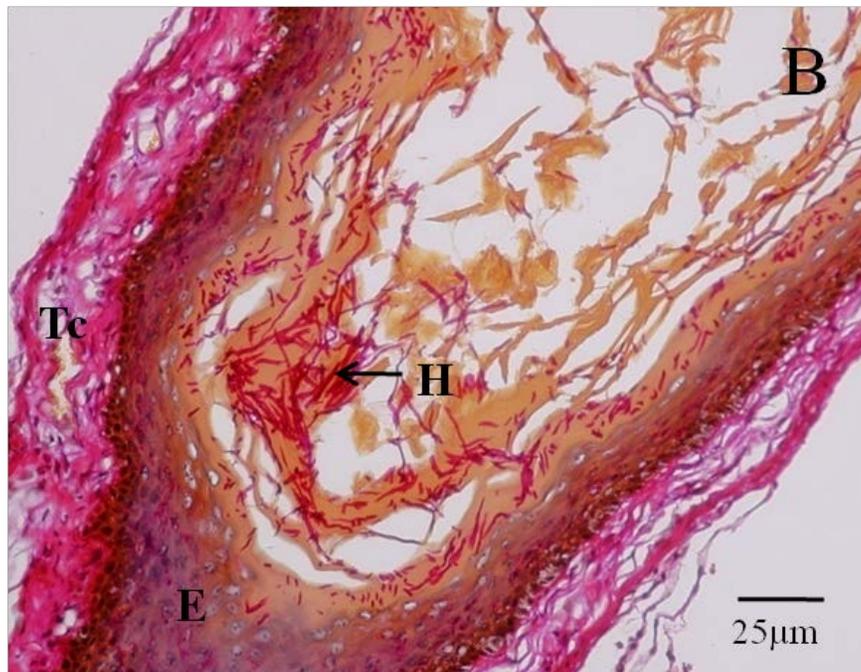
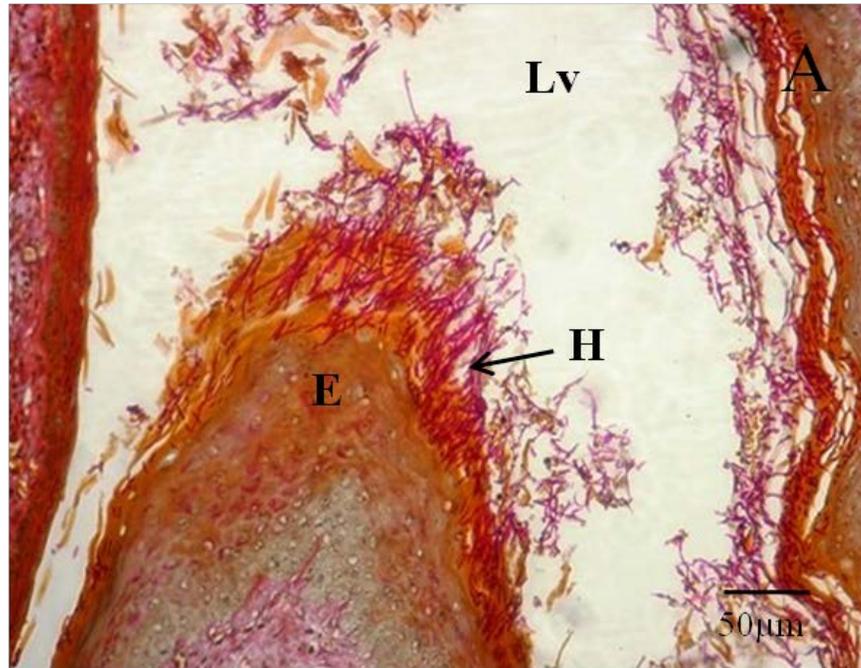


Figura 15. Epitelio vaginal de ratones inoculados con la cepa de referencia. A) Hifas a nivel medio en ratones tratados con 0,59 mg/kg de ajoene. B) Hifas al fondo del saco vaginal en ratones tratados con 1,18 mg/kg de ajoene. Epitelio (E). Hifas (H). Lumen vaginal (Lv).

Con respecto a la infiltración de células inflamatorias, en el grupo tratado con DMSO-Gly se observaron abundantes neutrófilos tanto dispersos como en grupos formando grandes masas, muy agrupados entre sí desde la zona media de la vagina hasta el fondo del saco vaginal, aquí en mayor proporción (Fig. 16A). También se pudo apreciar largos abscesos y microabscesos al fondo de la vagina e infiltración de neutrófilos desde la submucosa hacia el lumen vaginal (Fig. 16B). Estas mismas observaciones se evaluaron en los grupos tratados con las dosis 0,3 y 0,59 mg/kg de ajoene, mientras que en los ratones tratados con 1,18 mg/kg de ajoene sobrevino una disminución muy significativa del infiltrado celular hacia el lumen vaginal con respecto al grupo control ($p < 0,01$). Los neutrófilos se mostraron escasos tanto a nivel medio de la vagina (Fig. 17A) como al fondo del saco (Fig. 17B). Eventualmente podían observarse pequeñas masas de neutrófilos en el lumen o encontrarlos solos y dispersos.

Los niveles de inflamación en este grupo de ratones se vieron disminuidos gradualmente al aumentar la dosis de ajoene, y evidentemente obteniendo los mejores resultados a la dosis más alta de ajoene.

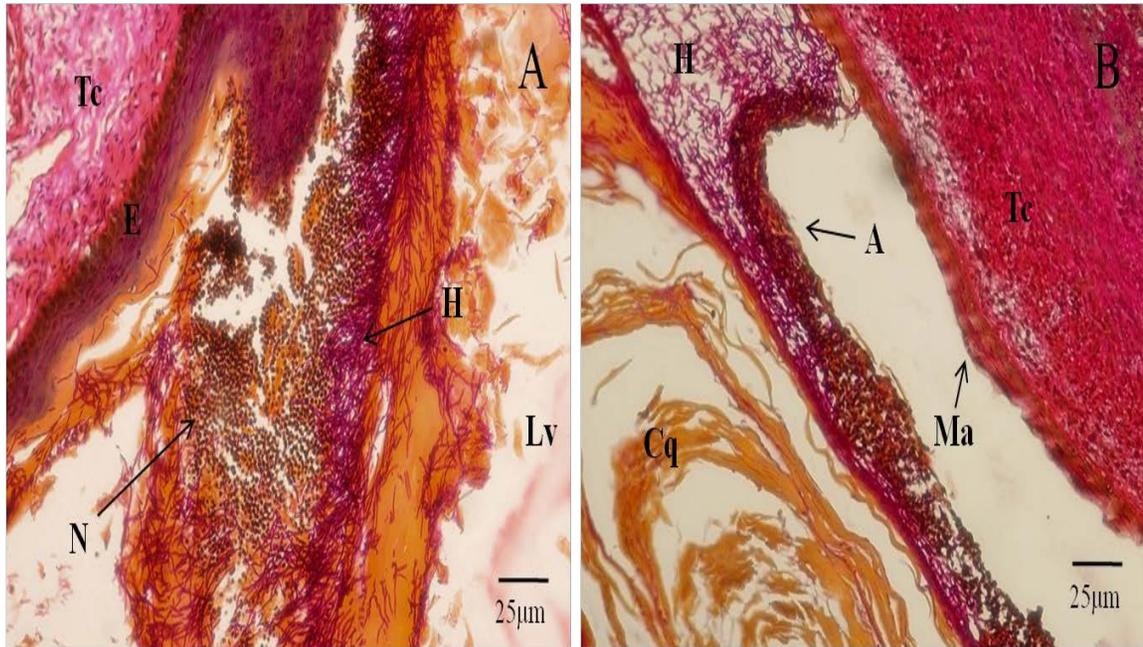


Figura 16. Epitelio vaginal de ratones inoculados con la CR y tratados con DMSO-Gly. A) Neutrófilos al fondo del saco vaginal. B) Absceso y microabscesos al fondo del saco vaginal. Hifas (H). Epitelio (E). Neutrófilos (N). Lumen vaginal (Lv). Tejido conectivo (Tc). Capa queratinizada (Cq). Abscesos (A). Microabscesos (Ma).

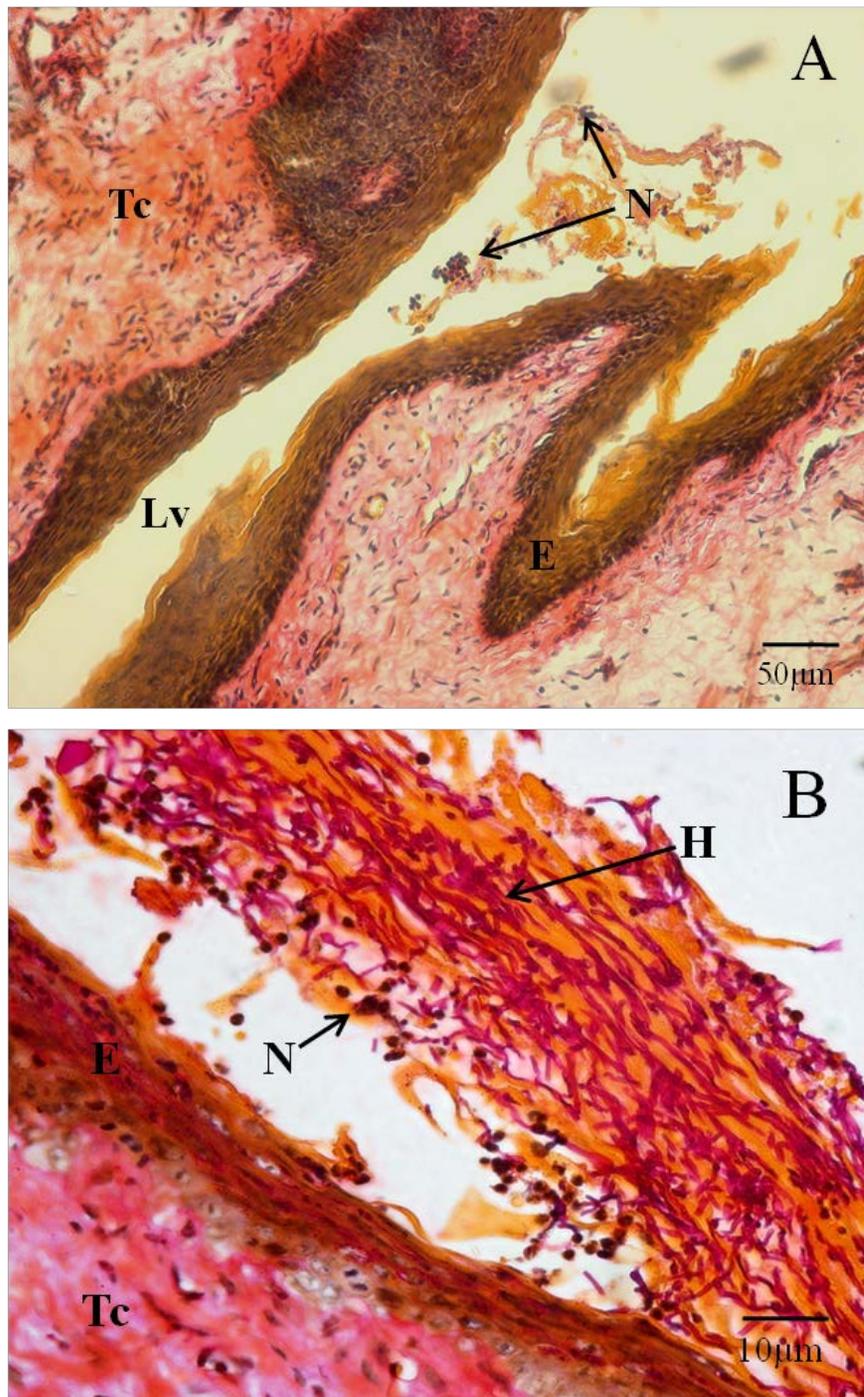


Figura 17. Epitelio vaginal de ratones inoculados con la CR y tratados con 1,18 mg/kg de ajoene. A) Neutrófilos a nivel medio de la vagina. B) Neutrófilos al fondo del saco. Hifas (H). Neutrófilos (N). Epitelio (E). Tejido conectivo (Tc). Lumen vaginal (Lv).

Aislado clínico

En el grupo de ratones inoculados con el aislado clínico y tratados con DMSO-Gly se observó abundante presencia de hifas y blastoconidias tanto en lumen como penetrando la capa queratinizada del epitelio, a nivel medio de la vagina (Fig. 18A) y al fondo del saco vaginal (Fig. 18B). En el lumen las hifas se encontraban formando masas de células adheridas a la queratina desprendida del epitelio, así como también abundantes hifas penetrando el epitelio queratinizado. Adicionalmente se pudo observar que la capa queratinizada se mantuvo continua en la mayoría de los casos observados, desde la vulva hasta la zona próxima al fondo del saco vaginal. Las características evaluadas en este grupo son muy similares a las observadas en el grupo de ratones a los que no se les aplicó el solvente. En el grupo de ratones tratados con 0,3 mg/kg de ajoene se evaluaron las mismas condiciones que el grupo control, aunque se observó una disminución en la presencia de hifas estadísticamente no significativa. En cambio, en el grupo de ratones tratados con 0,59 mg/kg de ajoene se observó una disminución en la presencia de las hifas y blastoconidias que resultó ser altamente significativa con respecto al grupo de ratones a los que se les trató con DMSO-Gly ($p < 0,001$). Las hifas se vieron disminuidas a nivel medio (Fig. 19A), éstas se observaron aglomeradas en pequeños grupos, las cuales se encontraron dispersos a lo largo de todo el lumen vaginal y también, se observaron pocas penetrando la capa queratinizada del epitelio. Al fondo del saco vaginal las condiciones fueron similares, pocas hifas tanto lumen como penetrando la capa queratinizada (Fig. 19B). Estas mismas observaciones fueron halladas en el grupo de ratones tratados con 1,18 mg/kg de ajoene, aunque se observó una leve disminución no significativa estadísticamente en las hifas presentes con respecto al grupo anteriormente mencionado. Con respecto a su control, éste grupo mostró diferencias altamente significativas en la presencia de hifas ($p < 0,001$), tanto en lumen (Fig. 20A) como penetrando la capa queratinizada del epitelio (Fig. 20B).

En cuanto a la infiltración de neutrófilos, se observó escasa presencia de éstas células en el grupo control tanto a nivel medio como al fondo del saco vaginal. Los neutrófilos se observaron solos y dispersos alrededor de las hifas (Fig. 21A), también se observaron formando pequeñas masas de células suspendidas alrededor de las hifas ubicadas en el lumen (Fig. 21B); y adicionalmente se observaron abscesos de corta longitud. En el grupo tratado con 0,3 mg/kg de ajoene se pudo observar un leve aumento no significativo en la presencia de neutrófilos, en cambio, en los grupos tratados con 0,59 y 1,18 mg/kg de ajoene la infiltración de neutrófilos fue similar al observado en el grupo control.

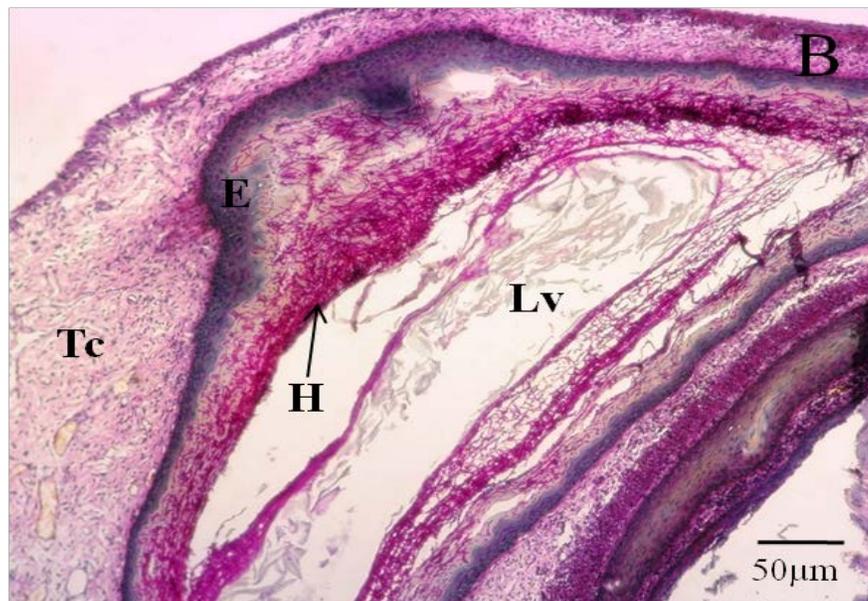
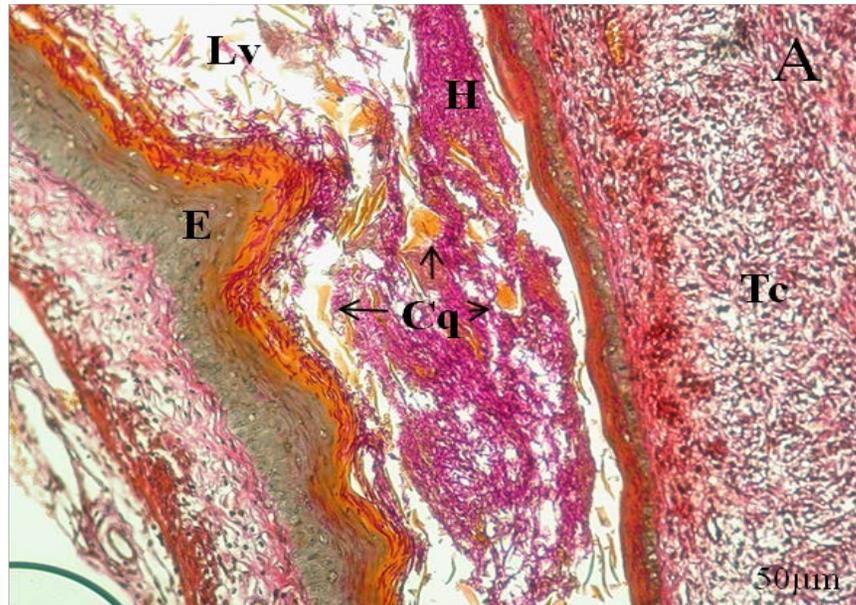


Figura 18. Epitelio vaginal de ratones inoculados con el AC y tratados con DMSO-Gly. A) Hifas a nivel medio de la vagina. B) Hifas al fondo del saco vaginal. Hifas (H). Lumen vaginal (Lv). Epitelio (E). Tejido conectivo (Tc). Células queratinizadas (Cq).

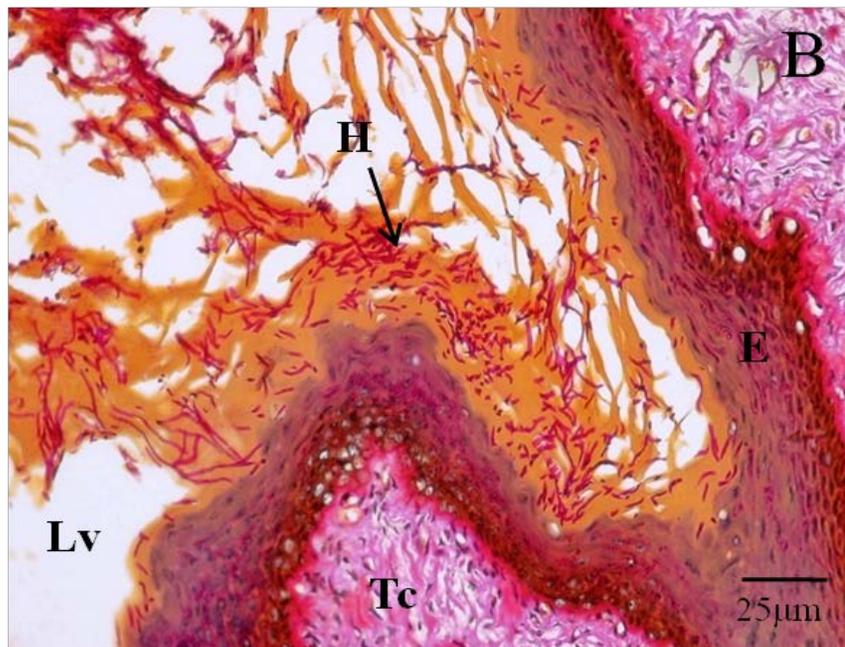
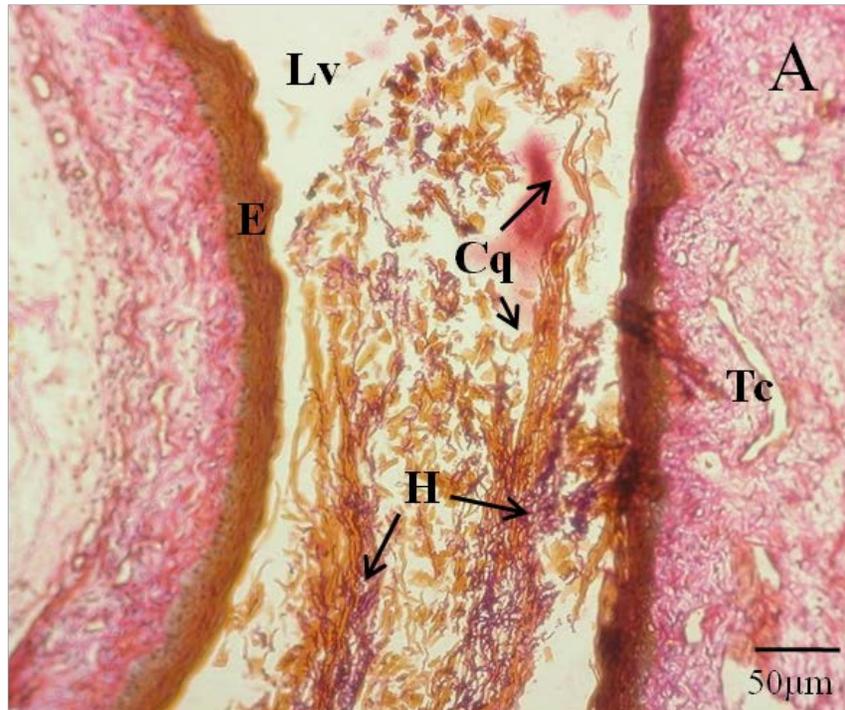


Figura 19. Epitelio vaginal de ratones inoculados con el AC y tratados con 0,59 mg/kg de ajoene. A) Hifas a nivel medio de la vagina. B) Hifas al fondo del saco vaginal. Hifas (H). Lumen vaginal (Lv). Epitelio (E). Tejido conectivo (Tc).

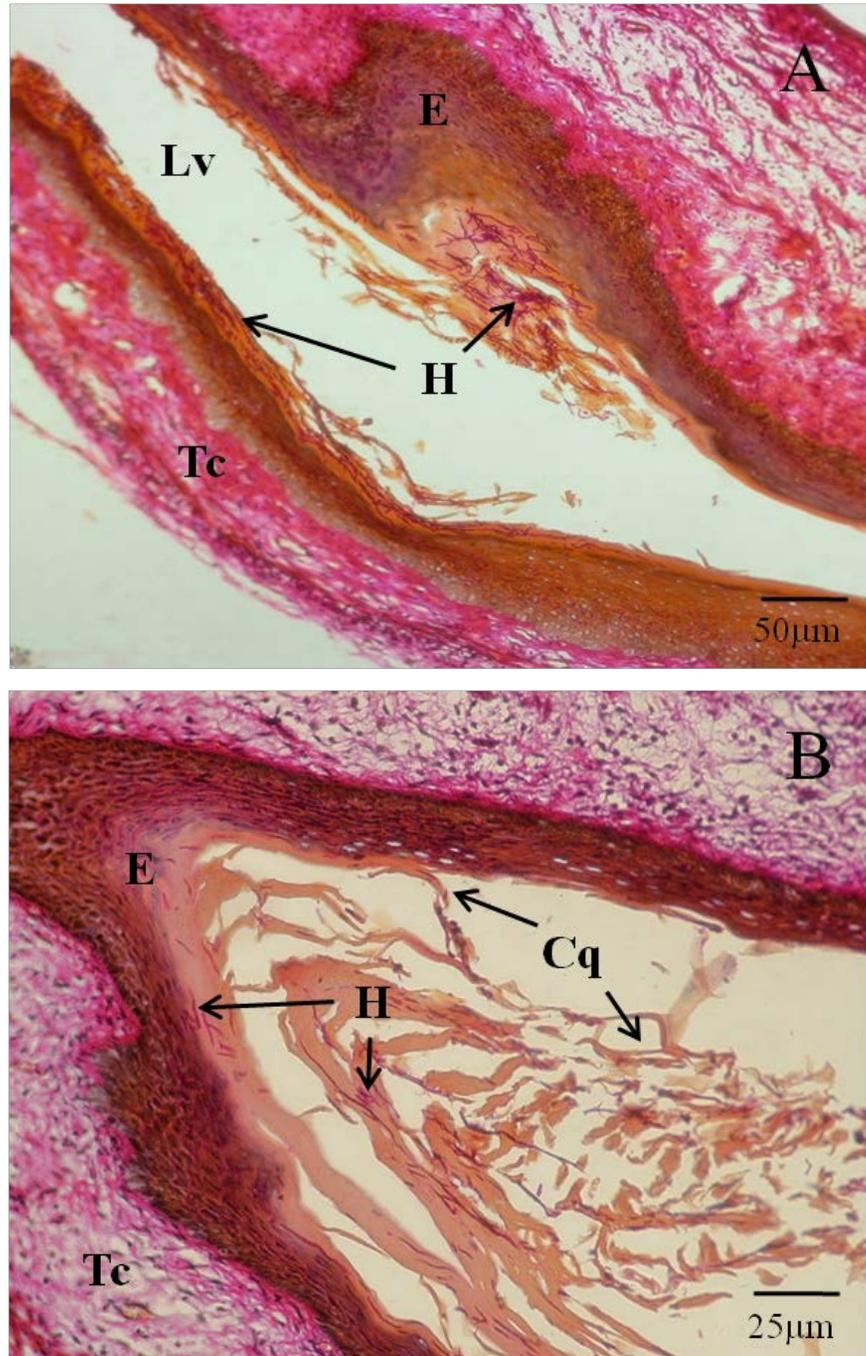


Figura 20. Epitelio vaginal de ratones inoculados con el AC y tratados con 1,18 mg/kg de ajoene. A) Hifas a nivel medio de la vagina. B) Hifas al fondo del saco vaginal. Hifas (H). Epitelio (E). Lumen vaginal (Lv). Tejido conectivo (Tc). Células queratinizadas (Cq).

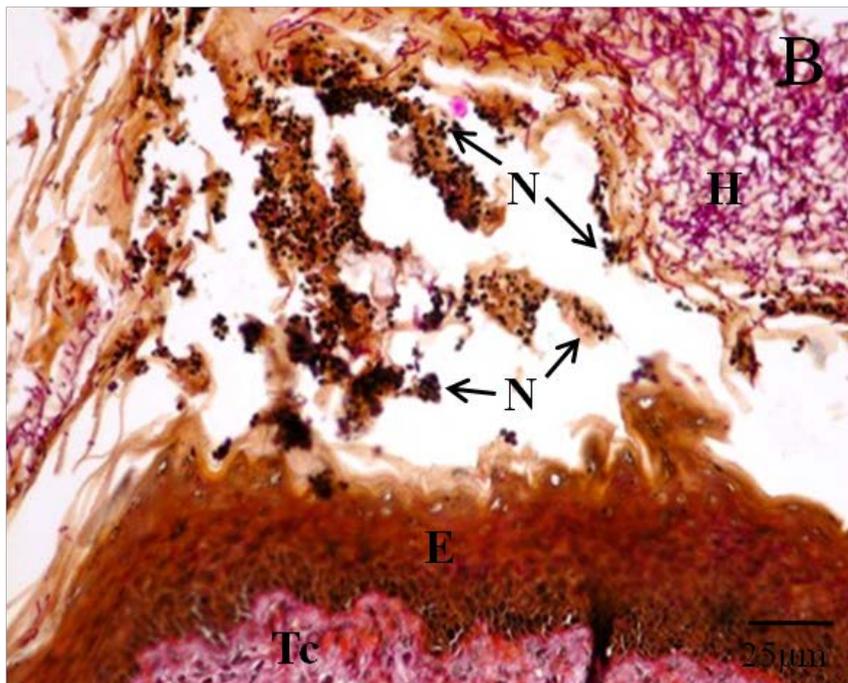
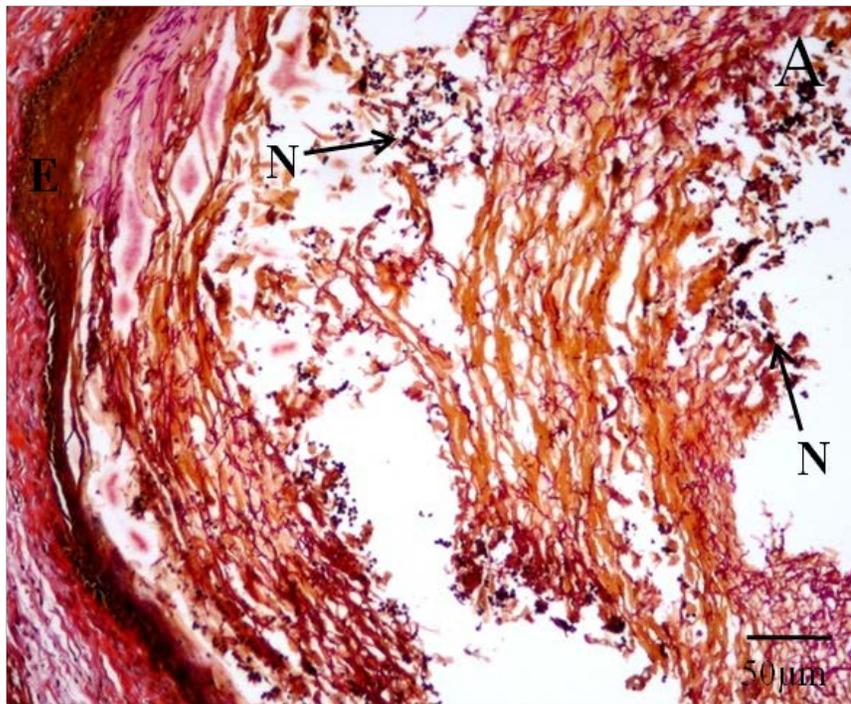


Figura 21. Neutrófilos al fondo del saco vaginal de ratones inoculados con el AC y tratados con DMSO-Gly. (A) Neutrófilos solos y dispersos alrededor de las hifas. (B) Neutrófilos en masas. Neutrófilos (N). Epitelio (E). Tejido conectivo (Tc).

De acuerdo a la escala propuesta por Black y cols. (1999) los grupos tratados con DMSO-Gly arrojaron niveles de infección de 2^{do} grado o infección moderada tanto en ratones inoculados con el AC como aquellos inoculados con la CR, observando una ligera disminución no significativa estadísticamente en el grupo de ratones inoculados con la CR.

En los grupos tratados con ajoene se observó una disminución altamente significativa de los niveles de infección con respecto a su control ($p < 0,001$), excepto en el grupo de ratones inoculados con el AC y tratados con 0,3 mg/kg de ajoene, en los cuales los niveles de infección fueron similares al grupo control. Es importante destacar que la respuesta del hongo al ajoene en sus diferentes concentraciones fue similar entre una cepa y otra, es decir, ocurrió una disminución progresiva en la presencia de hifas en ambas cepas al aumentar la concentración de ajoene, notando siempre una ligera disminución en los grupos inoculados con la CR, lo que trajo como consecuencia reducción de los niveles de infección (Fig. 22).

Los niveles de inflamación en los grupos de ratones inoculados con la CR fueron de 2^{do} grado o infiltración moderada, excepto en el grupo tratado con 1,18 mg/kg de ajoene, en los cuales se observó una disminución muy significativa en la presencia de neutrófilos y por consecuencia niveles de inflamación más bajos que los otros grupo, obteniendo así niveles de 1^{er} grado o infiltración media. En este caso, las concentraciones de ajoene, en cualquiera de sus dosis empleadas no afectaron directamente los niveles de inflamación, sino los niveles de infección y por consiguiente los niveles de inflamación, ya que a menor número hifas, menor es el infiltrado de células hacia el lumen vaginal. En general, en este grupo de ratones se observó que los niveles de inflamación fueron más elevados en los ratones controles y en los grupos tratados con 0,3 y 0,59 mg/kg de ajoene que aquellos inoculados con el AC, debido posiblemente a la detección inmediata del hongo por parte del sistema inmune. En el grupo tratado con 1,18 mg/kg de ajoene se observó una disminución

muy significativa en los niveles de inflamación con respecto a su control, ésta asociada directamente a la disminución de hifas causado por el ajoene.

En los grupos inoculados con el AC no se observaron cambios estadísticamente significativos en los niveles de inflamación, aunque se vio una leve disminución a partir del grupo tratado con 0,59 mg/kg de ajoene, esto posiblemente está estrechamente vinculado a la disminución de los niveles de infección observados en el gráfico anterior. En general, la presencia de neutrófilos se mantuvo en niveles de 1^{er} grado o infiltración media (Fig. 23).

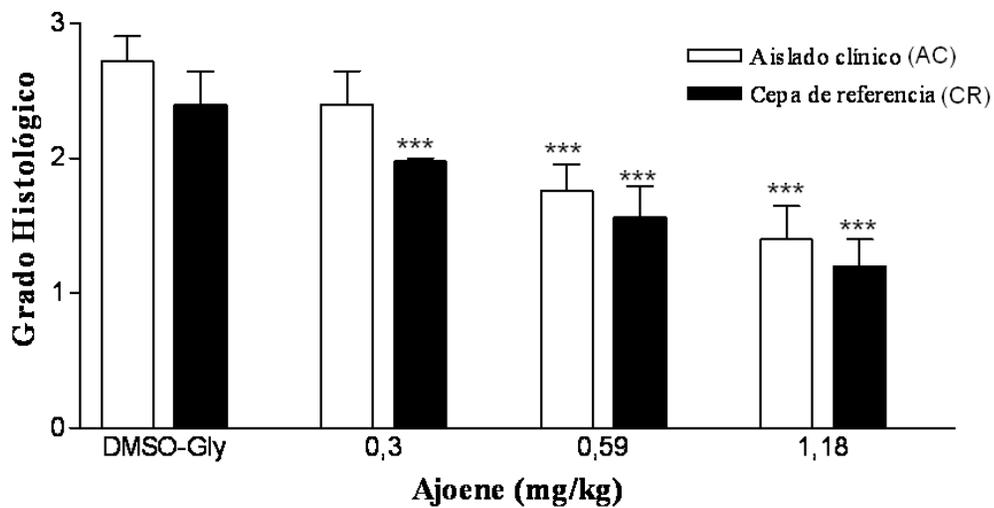


Figura 22. Niveles de infección en ratones inoculados con la cepa de referencia y en ratones inoculados con el aislado clínico tratados con DMSO-Gly y ajoene. (***) $p < 0,001$ vs DMSO-Gly)

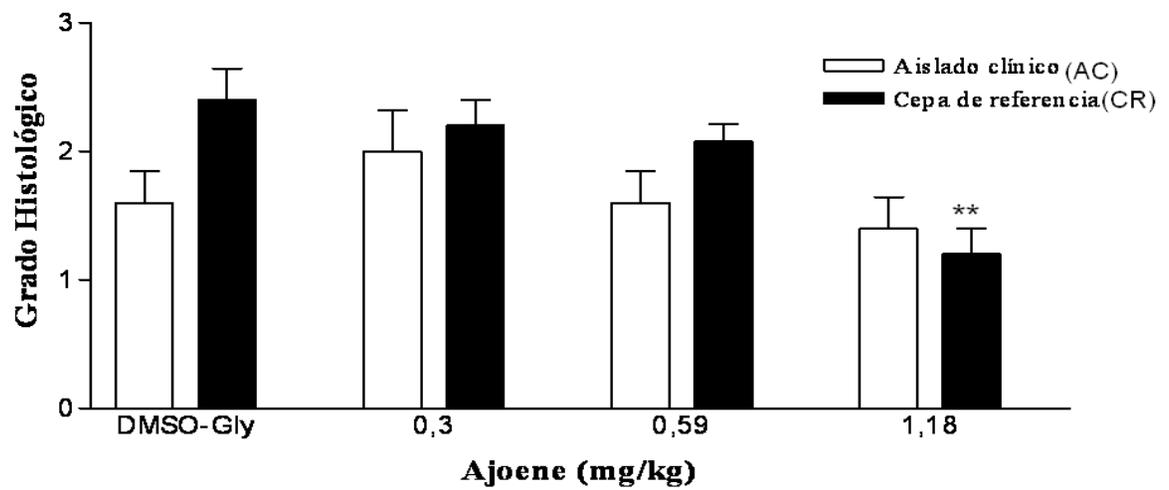


Figura 23. Niveles de inflamación en ratones inoculados con la cepa de referencia y en ratones inoculados con el aislado clínico tratados con DMSO-Gly y ajoene. (**p<0,01 vs DMSO-Gly)

DISCUSIÓN

El uso de modelos experimentales murinos de candidiasis vaginal ha sido ampliamente utilizado en investigación. Estos modelos se han empleado para identificar factores asociados con la susceptibilidad a la infección, en el estudio de la respuesta inmunológica del hospedero, en la identificación de factores de virulencia por parte del hongo y en la búsqueda de nuevas drogas como posibles agentes antifúngicos (Fidel y cols., 1993; Black y cols., 1999).

Trabajos previos demuestran que el requerimiento más importante para establecer el proceso infeccioso es la administración de estrógenos *a priori* vía subcutánea o intramuscular para así inducir un estado de pseudo-estro (Kinsman y Collard, 1986; Fidel y cols., 2000). Al parecer, el efecto permisivo de las hormonas reproductivas a la infección durante la fase del estro, en animales o en la fase lútea del ciclo menstrual, en mujeres, ha sido atribuido al alto contenido de glucógeno presente en secreciones vaginales, proporcionando una excelente fuente de carbono para el crecimiento y desarrollo del hongo. Experimentos *in vitro* han mostrado que las células epiteliales estimuladas con estrógeno proporciona un mejor sustrato al cual *C. albicans* tienen más habilidad para adherirse que las células no estimuladas (Sobel y cols., 1985; Clemons y cols., 2004).

Adicionalmente, estudios clínicos llevados a cabo en mujeres en edad reproductiva han demostrado que la infección vaginal por *C. albicans* es generalmente dependiente de la presencia de factores hormonales, tales como el embarazo, la fase lútea del ciclo menstrual, el uso de anticonceptivos orales y terapias de reemplazo hormonal (Fidel y cols., 1993). En tanto que, en mujeres premenárricas y postmenopáusicas es poco frecuente observar este tipo de

infecciones vaginales, debido a la ausencia de estos ciclos hormonales (Clemons y cols., 2004). Sin embargo, Fidel y cols. (2000) demostraron que existe gran flexibilidad en el uso de hormonas en modelos experimentales, ya que pudieron establecer la infección sin un tratamiento previo de estrógenos, aunque su mantenimiento requirió del suministro hormonal posterior, sugiriendo así un contacto inicial del hongo con células epiteliales de la capa columnar y no exclusivamente con células escamosas como anteriormente se creía. En este trabajo el estro fue inducido a través de la aplicación de estradiol intramuscular 3 días antes de el estro fue inducido a través de la aplicación de estradiol intramuscular 3 días antes de la inoculación de *C. albicans*, tal como lo demuestra Fidel y cols. (1993). En este modelo, se encontraron niveles elevados de infección a partir del día 7, así como lo reportó Fidel y cols. (2000) y Hamad, (2006), y se logró mantener la infección hasta el último período del estudio con la administración interdiaria del estrógeno, la cual es un requisito importante en estos modelos experimentales, ya que se ha observado un declive y resolución de la infección a partir del día 7 en ausencia de esta hormona (Fidel y cols., 2000).

Uno de los objetivos planteados en el siguiente estudio fue establecer un modelo experimental murino de candidiasis vaginal por *C. albicans*, para así evaluar la histopatología de la infección a los 7, 14 y 21 días, además, de probar al ajoene como posible agente antifúngico de bajo costo. Para ello, primeramente fue necesario establecer el tiempo óptimo de infección, tomando en consideración que la presencia de hifas y blastoconidias fuera abundante en lumen y penetrando la capa queratinizada del epitelio a lo largo de la vagina; aunado a los niveles de inflamación, siendo favorables para el estudio aquellos donde la infiltración celular fuera ligeramente escasa, al igual que los abscesos y el desprendimiento de la capa queratinizada del epitelio.

Al evaluar el tejido vaginal de los ratones al día 7, 14 y 21 se observó que los

niveles de infección se mantuvieron elevados a los 7 y 14 días tanto en los ratones inoculados con la cepa de referencia como para los inoculados con el aislado clínico, mientras que, a los 21 días los niveles de infección se vieron disminuidos significativamente en los ratones inoculados con la cepa de referencia. Probablemente esto se deba a que la cepa de referencia es menos virulenta, por tanto, es posible que alguna de sus características celulares como la adhesión, la producción de enzimas líticas, la conversión morfofénica de la fase levaduriforme a la fase micelial o la inmunomodulación de los mecanismos de defensa sean menos efectivos para el establecimiento y mantenimiento de la infección, lo que trae consigo la rápida eliminación de la misma en este modelo experimental. Resultados similares fueron reportados por Kinsman y Collard (1986) al comparar la habilidad de dos cepas en un modelo experimental de candidiasis vaginal en ratas. Ellos notaron que la cepa menos virulenta era eliminada en todas las ratas a las dos semanas de la infección mientras que la otra cepa no. Entretanto, estudios *in vitro*, llevados a cabo por estos mismos investigadores mostraron que la cepa más virulenta producía más tubos germinales que la cepa menos virulenta. La formación de tubos germinales es un factor de virulencia importante que le permite al hongo penetrar a los tejidos de su huésped para finalmente ejercer su patogenicidad. Es probable que esta sea una de las razones por la cual la infección de la cepa de referencia empleada en este estudio fue notablemente disminuida a los 21 días de infección.

Por otro lado, también se observó infiltrado celular hacia el área de la invasión, éste consistió principalmente de PMN's variando su presencia de una cepa a otra. La presencia de este tipo de células se vio incrementada al día 7 en las ratonas inoculadas con la cepa de referencia; a los 14 días para ambas cepas y al día 21 en las ratonas inoculadas con el aislado clínico, éstos con respecto a sus controles. Estos resultados sugieren que la cepa de referencia es detectada temprano y atacada de forma efectiva por el sistema inmune del huésped, en tanto que el AC aparentemente cuenta con un amplio arsenal de factores de virulencia que le permite permanecer en el tejido y

pasar desapercibido por el sistema inmunológico.

En nuestro modelo fue frecuente observar PMN's en los 3 períodos estudiados, aunque la presencia de éstos en el lumen vaginal de ratonas con candidiasis parece ser una controversia. Por ejemplo, Sobel y cols. (1985) observaron escasos PMN's en el lumen vaginal de ratas con candidiasis. Sin embargo, en humanos, Monif (1985) observó numerosos PMN's en el lumen vaginal de pacientes con candidiasis vaginal. Años más tarde, Sobel (1993) notó que los PMN's raramente migraban hacia el lumen vaginal a través del epitelio queratinizado. En nuestro modelo la presencia de PMN's fue frecuente y dependió de la cantidad de hifas presentes en la vagina tanto en lumen como penetrando la capa queratinizada del epitelio, notando que a mayor número de hifas, mayor infiltrado celular o viceversa, así como lo reportó Fidel y cols. (2004). Por motivos anatómicos, la presencia de hifas y blastoconidias se vieron concentradas hacia el fondo de la vagina, es por ello que el influjo de PMN's fue mayor a nivel del cérvix. También se pudo observar de forma periódica desprendimiento de la capa queratinizada del epitelio y largos abscesos en aquellos grupos donde el infiltrado celular era mayor.

Es probable que los neutrófilos tengan un efecto directo en la disminución de los niveles de infección observados a los 21 días, ya que se observó que estas células pueden actuar como promotores en el desprendimiento de la capa queratinizada, eliminando así aquellas hifas y blastoconidias que se encuentren penetrando dicha capa, para luego situarse en el lumen donde finalmente son eliminadas a través de secreciones vaginales.

Estos resultados concuerdan con lo planteado por Black y cols. (1998) al reportar que la presencia abundante de neutrófilos en la vagina trae consigo cambios estructurales y niveles de inflamación completamente severos. Ellos notaron que en

animales con déficit de neutrófilos los cambios estructurales asociados a la inflamación eran disminuidos significativamente, sugiriendo que el influjo de neutrófilos asociado a la infección contribuye a la inflamación, y que además, los neutrófilos contribuyen a la sintomatología propia de la infección; y que al mismo tiempo la inflamación podía incrementarse al quedar reclutados los PMN's dentro de la mucosa y no poder entrar al lumen vaginal a través de la capa queratinizada del epitelio, ocasionando así desintegración de éste sitio y desprendimiento completo de la capa.

Estos resultados ya habían sido brevemente descritos por Taschdjian y cols. (1960) quienes también observaron una marcada hiperqueratosis y exfoliación de la capa córnea de la vagina, con una leve reacción inflamatoria en ratones con candidiasis, adicionalmente, fueron los primeros en reportar que la candidiasis vaginal experimental en ratones era inducida normalmente durante la fase del estro y que el declive espontáneo de la infección se daba al iniciarse la siguiente fase del estro (diestro). Es evidente que el éxito de este hongo como patógeno no es atribuido a un solo factor sino a la suma de todos ellos. Es por ello, que la adherencia es el factor de virulencia más eficiente e importante de este hongo, y es el primer paso para la colonización microbial. Según Jabra-Risk y cols. (2001) la capacidad de adherencia de *C. albicans* es superior a la de otras especies de *Candida*, esto quizás podría explicar la frecuencia de esta cepa en este tipo de infecciones. También se ha mencionado el papel que desempeñan las enzimas que son producidas y excretadas por este hongo en la patogénesis de la infección. Estas enzimas tienen la capacidad de dañar la membrana celular de las células del huésped, al degradar los lípidos que la constituyen (Echeverría y cols., 2002). Otro factor importante documentado en *C. albicans*, es la capacidad que tiene de adoptar diversas formas, esto se manifiesta dependiendo del ambiente que la rodea y que indudablemente constituyen un mecanismo de adaptación, en tal sentido, la forma micelial es considerada más virulenta que la fase levaduriforme. Se postula que la capacidad de *C. albicans* para

formar tubos germinales es su mayor factor de virulencia pero no hay estudios que avalen este punto de vista (Fidel y cols., 2004).

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, se consideró al día 7 como tiempo óptimo de infección, ya que reunía las condiciones adecuadas en cuanto a niveles de infección e inflamación. Es importante mencionar que la decisión fue tomada con base en los resultados observados en el grupo de ratonas inoculadas con el aislado clínico, ya que es la cepa de interés principal en el estudio debido a su ocurrencia clínica.

Es sabido que el desarrollo de modelos murinos de candidiasis vaginal también permiten llevar a cabo test *in vivo* para posibles agentes antifúngicos. Estos modelos nos pueden indicar la eficacia del agente antifúngico, administrado de forma local o general. En los últimos 30 años los avances en la industria farmacéutica han sido notorios en la obtención de productos antimicrobianos. Sin embargo, se continúa tratando de optimizar el espectro de acción de los medicamentos y de minimizar los efectos secundarios durante el tratamiento (De González y cols., 1998). Actualmente, existe un amplio número de agentes antifúngicos en el mercado, su uso frecuente en el tratamiento de estas infecciones vaginales y el aumento en las dosis terapéuticas han originado en muchos casos la aparición de cepas resistentes, tal es el caso de *C. glabrata* y *C. krusei*, y esto ha llevado a la necesidad de efectuar estudios de sensibilidad *in vitro* para predecir la eficacia de los antifúngicos antes de instaurar un tratamiento (Arévalo y cols., 1994; García-Martos y cols., 2001; Maglioni y cols., 2002).

Desde tiempos inmemoriales, las plantas, han servido como fuente y modelo en el desarrollo de medicamentos, se ha podido observar que más del 25% de las drogas que se prescriben en los países desarrollados contienen compuestos bioactivos que todavía son extraídos de las plantas. Para el desarrollo de drogas derivadas de plantas

los investigadores utilizan 2 enfoques generales, la evaluación fitoquímica en búsqueda de determinados grupos químicos, tales como, alcaloides, triterpenos y glicósidos; y su selección basadas en el folklore, es decir, “en la sabiduría popular y en la tradición oral”. Este último enfoque es el que proporcionalmente ha dado los mejores resultados. Un ejemplo interesante lo constituye el *Allium sativum*, denominado en castellano Ajo (Ledezma y Apitz-Castro, 1998).

Para la década de los 80 Apitz-Castro y cols. (1983) lograron obtener un compuesto derivado del *Allium sativum* (ajo) a la que denominaron ajoene [E, Z]-4,5,9-tritriadodeca-1,6,11-trieno-9-óxido). A partir de entonces, han sido mucho los trabajos publicados acerca de la efectividad de este compuesto como posible agente antifúngico. *In vitro*, Yoshida y cols. (1987) fueron los primero en reportar la efectividad de ajoene como posible agente antifúngico en *C. albicans*, ellos observaron que ajoene inhibía el desarrollo de este hongo en un 95% a una concentración de 7,6 µg/ml, sugiriendo además, que dicho compuesto bloqueaba algunos pasos de la síntesis de la pared celular al observar severos daños o cambios morfológicos en las hifas, tales como, desaparición de la superficie ornamentada, espesamiento de la pared celular y destrucción de organelos celulares.

Años más tarde, San-Blas y cols. (1989) reportaron resultados similares en cuanto a la efectividad de ajoene como posible agente antifúngico contra *Paracoccidioides brasiliensis*, observando inhibición del desarrollo en un 90%, siendo la fase micelial más sensible que la fase levaduriforme a una concentración de 11,7 µg/ml (50 µM) y 100µM, respectivamente. Sing y cols. (1990) también observaron el efecto fungistático y fungicida del ajoene contra hongos patógenos de plantas. Así mismo, Urbina y col. (1993) contra amastigotes y epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, el agente causal de la enfermedad de Chagas.

En cuanto a los estudios *in vivo*, Sánchez-Mirt y cols. (1994) fueron los

primeros en probar la actividad antifúngica del ajoene en un modelo experimental murino de coccidioidomicosis, demostrando su efecto fungistático y fungicida a una concentración de 15 mg/kg. Años más tarde, Ledezma y cols. (1996) proponen al ajoene como posible agente antifúngico de uso tópico en la terapia de corta duración contra *Tinea pedis*; 7 días de tratamiento fueron suficientes para alcanzar la cura clínica y micológica en el 79% de los pacientes, aplicando el ajoene a una concentración de 0,4%. Estos resultados aportaron elementos importantes al demostrar su relativa inocuidad, al no presentar efectos colaterales de importancia, dando un buen margen de seguridad para su utilización tópica. Cabe mencionar que el presente trabajo es pionero al evaluar ajoene como agente antifúngico contra la candidiasis vaginal experimental, encontrando resultados favorables a concentraciones mucho más bajas a las reportadas por Sánchez-Mirt y cols. (1994) y Ledezma y cols. (1996).

En este modelo, se probaron 3 dosis diferentes de ajoene (0,3; 0,59 y 1,18 mg/kg), y el estudio histológico reflejó una notable disminución en la presencia de hifas y blastoconidias tanto en lumen como penetrando la capa queratinizada del epitelio en las ratonas tratadas con la dosis más alta del compuesto; mientras que, al utilizar las dosis más bajas la presencia de hifas estuvo ligeramente abundante a lo largo de la vagina, poniendo de manifiesto un efecto dosis dependiente del ajoene sobre la candidiasis vaginal. En cuanto a los niveles de inflamación, estos se vieron igualmente disminuidos al utilizar la concentración más alta de ajoene, lo cual corrobora lo anteriormente expuesto acerca de la dependencia que existe entre la infiltración de PMN's y la presencia de *C. albicans* en la vagina, mostrando nuevamente que a menor presencia de hifas y blastoconidias, menor infiltrado celular y por consiguiente menor daño estructural.

Es importante mencionar también, que en este estudio no se logró la erradicación completa de la infección a las dosis empleadas, aunque se observó una

notable disminución en los niveles de infección en las ratonas tratadas con 1,18 mg/kg de ajoene. De acuerdo a ello, queda abierta la posibilidad que al aumentar la dosis de ajoene, la infección pueda ser eliminada por completo de la vagina de los animales sin causar daño o citotoxicidad sobre el epitelio. Según reportes no publicados por Apitz-Castro, ajoene no genera ningún tipo de daño en células de perros y ratones al ser empleado a dosis por debajo de 25 mg/kg (San-Blas y cols., 1989). Este reporte ofrece un margen de seguridad, al saber que a dosis más altas a las empleadas en nuestro estudio, el compuesto no genera ningún efecto tóxico sobre las células del huésped. En efecto, las pruebas de citotoxicidad realizadas para las dosis de ajoene empleadas en este estudio no mostraron daño a nivel del epitelio vaginal, aunque se observó un ligero engrosamiento de la capa queratinizada que no fue observado en el grupo control. Algunos investigadores han confirmado la inocuidad de ajoene sobre células de mamíferos. Tal es el caso de, Pérez y cols. (1994) al probar el compuesto en ratones BALB/c infectados con el parásito *Plasmodium berghei*, el agente causal de la malaria en roedores; y Sánchez-Mirt y cols. (1994) en ratones blancos CD1 infectados con *Coccidioides immitis* al emplear una dosis de 15 mg/kg de ajoene.

Es evidente la efectividad de ajoene a bajas dosis y lo mejor aún es que hasta el momento no ha sido reportado ningún efecto colateral que genere daño a las células de los mamíferos. Sin embargo, la efectividad de otros compuestos o agentes antifúngicos de uso comercial sólo se logra a concentraciones o dosis mucho más altas, lo cual, es perjudicial para el huésped, ya que la mayoría de estos compuestos generan efectos colaterales comprobados.

A través de modelos experimentales se han llevado a cabo estudios para demostrar el efecto de ciertos compuestos con acción antifúngica sobre la candidiasis vaginal; las dosis empleadas en estos modelos generalmente son superiores a las reportadas con ajoene. Tal es el caso, de Katsuaki y cols. (1986) al aplicar una dosis

de 5 mg/kg de SM-4470, un derivado imidazólico, para el tratamiento de la candidiasis vaginal experimental, obteniendo sólo un 58% de efectividad en los animales tratados. Por otro lado, Hector y Schaller, (1992) también observaron disminución de la infección vaginal, pero al aplicar una dosis de 25 mg/kg de un complejo de nicomicina y R-3783 en ratas infectadas con *C. albicans*, siendo esta mezcla más efectiva que la aplicación individual de cada compuesto. Así mismo, Valentin y cols. (1993) demostraron la eficacia del butoconazol a concentraciones de 2,5 y 5% en el tratamiento de la candidiasis vaginal experimental en ratones. En humanos, las dosis empleadas para el tratamiento de la CVV son más altas, tenemos por ejemplo, al grupo de los azólicos como el clotrimazol, itraconazol, miconazol, fluconazol, econazol y el ketoconazol cuyas dosis prescritas son de 100-400 mg/kg/día.

Los compuestos azólicos interfieren en la síntesis de ergosterol, al inhibir la C14-alfa-desmetilasa, una enzima acoplada al citocromo P-450 que transforma lanosterol en ergosterol. Esta inhibición altera la fluidez de la membrana, acompañada de pérdida de la permeabilidad selectiva que conduce a una inhibición del crecimiento celular. Esta inhibición del citocromo P-450 es responsable de los efectos adversos que los azóles causan en los humanos (Barrenetxea, 2002). En contraste, el modo de acción de ajoene como agente antifúngico parece estar asociado a múltiples blancos celulares, tales como, la inhibición de la biosíntesis de fosfatidilcolina (Adetumbi y cols., 1986; San-Blas y cols., 1989; Urbina y cols., 1993; Marchán, 1994); la generación de un desorden en el empaquetamiento de los fosfolípidos de la membrana, que ocurre sin afectar la estructura principal del mosaico, aumentando la fluidez de las cadenas hidrocarbonadas sin modificar la superficie hidrofílica de la bicapa (Debouzy y cols., 1989); la inhibición de la enzima glutatión reductasa, una enzima primordial en la regulación de la carga oxidativa que se genera durante el metabolismo celular y cuya inhibición conlleva a un desequilibrio que incrementa la aparición de radicales libres y conduce a la muerte

celular (Gallwitz y cols., 1999); y por último, también se ha reportado que ajoene reacciona con los grupos sulfidrilos de los residuos de cisteína en las proteínas de membrana que constituyen los dominios relacionados con funciones de adhesión en la interacción parasito-hospedero, patogenicidad y receptores de señalización celular (San-Blas y cols., 1993; Ferri y cols., 2003). Al comparar la potencia antifúngica del ajoene con los derivados azólicos, podemos observar que éstos presentan un solo blanco celular, la biosíntesis del ergosterol. En cambio, ajoene presenta múltiples blancos celulares potenciales y sus efectos se manifiestan tempranamente en la proliferación del hongo (Ledezma y Apitz-Castro, 2006).

De lo anterior se desprende la necesidad de evaluar nuevos esquemas terapéuticos y seguir en la búsqueda del fármaco ideal. Para finalizar es importante destacar que es la primera vez que se prueba ajoene en un modelo experimental murino de candidiasis vaginal, con resultados muy prometedores que sugieren que ajoene debe seguir siendo evaluado como agente antifúngico, pudiendo resultar una alternativa terapéutica válida, eficiente, de poca toxicidad y de bajo costo para el tratamiento de la candidiasis vaginal en humanos.

CONCLUSIONES

El establecimiento del modelo experimental murino de candidiasis vaginal logrado mediante la inducción del estro por terapia hormonal con estradiol, permite la evaluación de drogas con potencial antifúngico.

Las dosis de ajoene probadas en el presente estudio no inducen efectos citotóxicos en el epitelio vaginal de los ratones en estudio.

Existe un efecto dosis-dependiente de ajoene sobre la candidiasis vaginal experimental en ratones. En la medida que aumenta la concentración de ajoene disminuyen los niveles de infección e inflamación, notando que la cepa de referencia es más susceptible al tratamiento.

Ajoene es un fármaco que abre nuevas posibilidades en el campo de la investigación clínica y farmacológica, constituyendo una alternativa quimioterapéutica eficaz y de bajo costo en el tratamiento contra la candidiasis vaginal.

RECOMENDACIONES

Evaluar el efecto de ajoene en el modelo murino de candidiasis vaginal experimental a concentraciones superiores a las utilizadas en este estudio.

Realizar la evaluación cuantitativa de hifas y neutrófilos en el modelo murino de candidiasis vaginal experimental.

Evaluar nuevos esquemas terapéuticos y seguir en la búsqueda del fármaco ideal.

Evaluar el efecto de ajoene sobre otras especies de *Candida*.

Realizar estudios clínicos en humanos.

BIBLIOGRAFÍA

- Algarra, I.; Ortega, E.; Serrano, M.; Álvarez, G. y Gaforio, J. 2002. Suppression of splenic macrophage *Candida albicans* phagocytosis following *in vivo* depletion of natural killer cells in immune competent BALB/c mice and T-cell deficient nude mice. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 33: 159-163.
- Apitz-Castro, R.; Cabrera, S.; Cruz, M.; Ledezma, E. y Jain, M. 1983. Effects of garlic extract and three pure components isolated from it on human platelet aggregation, arachidonate metabolism, release reaction and platelet ultrastructure. *Thrombosis Research*, 32:155-169.
- Arévalo, M.; Arias, A.; Andreu, A.; Rodríguez, C. y Sierra, A. 1994. Sensibilidad *in vitro* de *Candida* spp. Frente a amfotericina B, fluconazol e itraconazol. *Revista Iberoamericana de Micología*, 11: 40-43.
- Barrenetxea, G. 2002. Vulvovaginitis candidiásica. *Review Iberoamerican Micology*, 19:22-24.
- Black, A.; Eysers, F.; Russell, A.; Dunkley, M.; Clancy, R. y Beagley, K. 1998. Acute neutropenia decreases inflammation associated with murine vaginal candidiasis but has effect on the course of infection. *Infection and Immunity*, 66(3): 1273- 1275.
- Black, A.; Eysers, F.; Russell, A.; Dunkley, M.; Clancy, R. y Beagly, K. 1999.

- Increased severity of *Candida* vaginitis in BALB/c nu/nu mice versus the parent strain is not abrogated by adoptive transfer of T cell enriched lymphocytes. *Journal of Reproductive Immunology*, 45: 1-18.
- Boskey, E.; Cone, R.; Whaley, K. y Moench, T. 2001. Origins of vaginal acidity: high D/L lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source. *Human Reproduction*, 16(9):1809-1813.
- Cavallito, C. y Bailey, J. 1944. Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. Isolation, physical properties and antibacterial action. *Journal American Chemother Society*, 66:1950-1951.
- Chaffin, W .; López-Ribot, J.; Casanova, M.; Gozalbo, D. y Martínez, J. 1998. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: Identification, function and expression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(1): 130-180.
- Clemons, K.; Spearow, J.; Parmar, R.; Espiritu, M. y Stevens, D. 2004. Genetic susceptibility of mice to *Candida albicans* vaginitis correlates with host estrogen sensitivity. *Infection and Immunity*, 72(8): 4878-4880.
- Debouzy, J.; Neumann, J.; Herve, M.; Daveloose, D.; Viret, J. y Apitz-Castro, R. 1989. Interaction of antiaggregant molecule ajoene with membranes. An ESR and ¹⁴2H,³¹P NMR study. *European Biophysical Journal*, 17:211-216.
- De González, M.; Mendoza, M.; Bastardo, M. y Apitz-Castro, R. 1998. Efecto

del ajoene sobre dermatofitos, *Candida albicans* y *Malassezia furfur*. *Review Iberoamerican Micology*, 15:277-281.

Echeverría, A.; Durante, A.; Arechavala, A. y Negroni, R. 2002. Estudio comparativo de dos medios de cultivo para la detección de la actividad fosfolipasa en cepas de *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*. *Review Iberoamerican Micology*, 19:95-98.

Fidel, P.; Lynch, M. y Sobel, J. 1993. *Candida*- Specific cell – mediated - immunity is demonstrable in mice experimental vaginal candidiasis. *Infection and Immunity*, 61(5):1990-1995.

Fidel, P. 1999. Host defense against oropharyngeal and vaginal candidiasis: Site specific difference. *Reviews Iberoamerican Micology*, 16: 8-15.

Fidel, P.; Cutright, J. y Steele, C. 2000. Effects of reproductive hormones on experimental vaginal candidiasis. *Infection and Immunity*, 68(2):651-657.

Fidel, P.; Barousse, M.; Espinosa, T.; Ficarra, M.; Sturtevant, J.; Martin, D.; Quayle, A. y Dunlap, K. 2004. An intravaginal live *Candida* challenge in humans leads to new hypotheses for the immunopathogenesis of vulvovaginal candidiasis. *Infection and Immunity*, 72(5): 2939-2946.

Fidel, P. 2007. History and update on host defense against vaginal candidiasis. *Americam Journal of Reproductive Immunology*, 57:2-12.

Ferri, N.; Yokoyama, K.; Sadilek, M.; Paoletti, R.; Apitz-Castro,

- R.; Gelb, M. y Corsini, A. 2003. Ajoene, a garlic compound, inhibits protein prenylation and arterial smooth muscle cell proliferation. *British Journal Pharmacology*, 138:811-818.
- Fortún, J. 1998. Antifúngicos: Azoles, imidazoles, triazoles. *Medicine*, 7(91):4231-4241.
- Gallwitz, H.; Bonse, S.; Martínez-Cruz, A.; Schlichting, I; Schumacher, K. y Krauth-Siegel, R. 1999. Ajoene is an inhibitor and subversive substrate of human glutathione reductasa and *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductasa: Crystallographic, kinetic and spectroscopic studies. *Journal Medical Chemotherapy*; 42:364-372.
- García-Martos, P.; Domínguez, I.; Marín, P.; García-Agudo, R.; Aoufi, S. y Mira, J. 2001. Sensibilidad a antifúngicos de levaduras patógenas emergentes. *Enfermedades Infecciosas Microbiológicas Clínicas*, 19:249-256.
- Ghannoum, M. 1988. Studies on the anticandidal mode of action of *Allium sativum* (Garlic). *Journal Genecology Microbiology*, 134 (11):2917-2924.
- Ghannoum, M. y Abu-Elteen, K. 1990. Pathogenicity determinants of *Candida*. *Mycoses*, 33 (6):265-282.
- Ghannoum, M. 2000. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(1):122-143.
- Giacometti, R. 2005. Localización subcelular de la subunidad

regulatoria de la PKA de *C. albicans* mediante una técnica de fusión genómica. Estudio de la capacidad germinativa de una mutante carente de un alelo de la subunidad regulatoria de la PKA. Tesis de Pregrado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Belgrano, Argentina.

Hamad, M.; Mutaed, E.; Abu-Shagra, Q.; Fraij, A.; Abu-Elteen, K. y Yasin, S. 2006. Utility of the oestrogen-dependent vaginal candidosis murine model in evaluating the efficacy of various therapies against vaginal *Candida albicans* infection. *Mycosis*, 49:104-108.

Hanna, L. 1995. Vaginal candidiasis and other types of vaginitis. *Bulletin of Experimental treatments for AIDS*, 26:45-53.

Haoping, L. 2002. Co-regulation of pathogenesis with dimorphism and phenotypic switching in *Candida albicans*, a commensal and a pathogen. *International Journal Medical Microbiology*, 292:299-311.

Hostetter, M. 1994. Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. With epithelial and endothelial surfaces. *Clinical Microbiology Reviews*, 7 (1): 29- 42.

Jabra-Rizk, M.; Falkler, W.; Merz, W.; Baqui, A.; Kelley, J. y Meiller, T. 2001. Cell surface hydrophobicity associated adherence of *Candida dubliniensis* to human buccal epithelial cells. *Review Iberoamerican Micology*, 18:17-22.

Kinsman, O. y Collard, A. 1986. Hormonal factors in vaginal candidiasis in rats. *Infection and Immunity*, 53(3): 498-504.

- Kunze, R.; Schütz, B.; Schrödl, W. y Bernhardt, H. 1999. *Candida albicans* clinical isolates inactivated by formalin with different adherence to buccal epithelial cell induce proinflammatory and regulatory cytokines in human peripheral blood mononuclear cells. *Mycoses*, 42:529-538.
- Ledezma, E.; De Sousa, L.; Jorquera, A.; Sánchez, J.; Lander, A.; Rodríguez, E.; Jain, M. y Apitz-Castro, R. 1996. Efficacy of ajoene, an organosulphur derived from garlic, in the short-term therapy of *Tinea pedis*. *Mycoses*, 39:393-395.
- Ledezma, E. y Apitz-Castro, R. 1998. Del folklore al mecanismo molecular: el ejemplo de ajoene. *Interciencia*, 23(4):227-231.
- Ledezma, E. y Apitz-Castro, R. 2006. Ajoene, el principal compuesto activo derivado del ajo (*Allium sativum*), un nuevo agente antifúngico. *Revista Iberoamericana Micológica*, 23:75-80.
- López - Ribot, J.; McAtee, R.; Kirkpatrick, W.; La Valle, R. y Patterson, T. 1999. Low levels of antigenic variability in fluconazole susceptible and resistant *Candida albicans* isolates from Human Immunodeficiency Virus infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 6(5):665-670.
- López, M. 2007. El ajo. Propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas. *Ámbito Farmacéutico: Fitoterápia*, 26(1):79-81.

- Marcilla, A.; Valentín, E. y Sentandreu, R. 1998. The cell wall structure: developments in diagnosis and treatment of candidiasis. *International Microbiology*, 1:107-116.
- Maglioni, W.; Conti, S.; Salati, A.; Arseni, S.; Frazzi, R.; Ravanetti, L. y Polonelli, L. 2002. New strategies for treatment of *Candida* vaginal infections. *Revista Iberoamericana Micológica*, 19:144-148.
- Marchán. E. 1994. Estudio de la acción de inhibidores de la síntesis de lípidos sobre la proliferación de promastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Tesis Doctoral Escuela de Biología, Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela.
- Martínez, J.; Gil, M.; López-Ribot, J. Y Chaffin, W. 1998. Serologic response to cell wall mannoproteins and proteins of *Candida albicans*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1):121-141.
- Mata de Henning, M. y Perrone, M. 2001. Factores determinantes de patogenicidad en relación a la ecología de *Candida albicans* en cavidad bucal. *Acta Odontológica Venezolana*, 39(2):24-33.
- Mesa, A.; Bueno, J. y Betancur, L. 2004. Productos naturales con actividad antimicótica. *Revistas Española de Quimioterapia*, 17(4): 325-331.
- Monif, G. 1985. Classification and pathogenesis of vulvovaginal candidiasis. *American Journal Obstetric Gynecology*, 152:935-939.

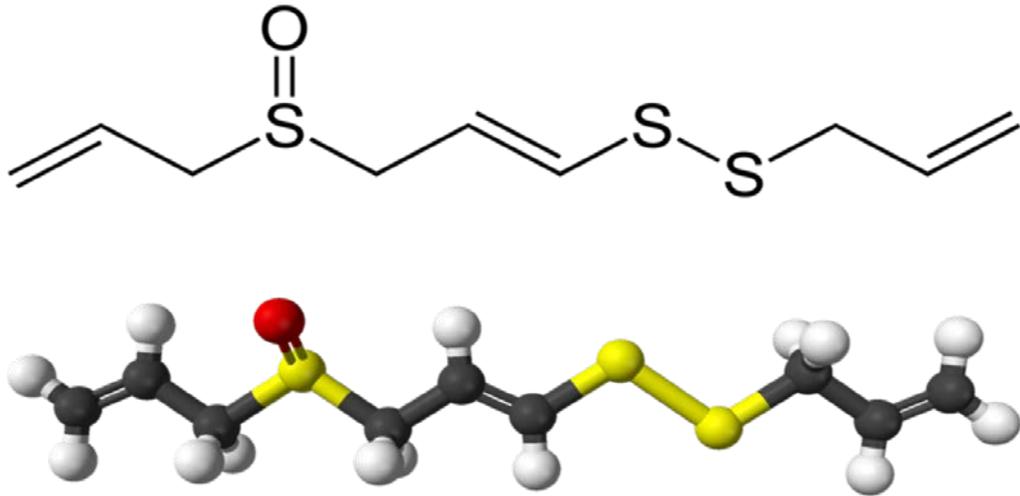
- Moore, G. y Atkins, R. 1977. The fungicidal and fungistatic effects of an aqueous garlic extract on medically important yeast-like fungi. *Mycology*, 69:341-348.
- Myrvang, A. y Abrahamsen, T. 1993. Increased C3 production in human monocytes after stimulation with *Candida albicans* is suppressed by granulocyte macrophage colony stimulating factor. *Infection and Immunity*, 61(5):1779-1785.
- Nomanbhoy, F.; Steele, C.; Yano, Y. y Fidel, P. 2002. Vaginal and oral epithelial cell anti-*Candida* activity. *Infection and Immunity*, 70(12): 7081-7088.
- Ohno, N. 2003. Chemistry and biology of angiitis inducer, *Candida albicans* water soluble mannoproteins- β -glucan complex (CAWS). *Microbiology Immunology*, 47(7):479-490.
- Panizzo, M.; Pérez, C. y Maniscalchi, M. 2000. Susceptibilidad *in vitro* a los antifúngicos de *Candida* sp. y serotipos de *Candida albicans* aisladas de pacientes con vaginitis primaria y recurrente. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 20(1):52-59.
- Panizzo, M. y Reviákina, V. 2001a. Adhesinas y receptores involucrados en el fenómeno de adherencia de *Candida albicans* a las células epiteliales. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 21(1): 11-17.

- Panizzo, M. y Reviákina, V. 2001b. *Candida albicans* y su efecto patógeno sobre las mucosas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 21(2):20-26.
- Pardi, G. y Cardozo, E. 2002. Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal. *Acta Odontológica Venezolana*, 40(1):55-59.
- Saavedra, M.; Taylor, B.; Lukacs, N. y Fidel, P. 1999. Local production of chemokines during experimental vaginal candidiasis. *Infection and Immunity*, 67(11):5820-5826.
- San-Blas, G.; San-Blas, F.; Gil, F.; Mariño, L. y Apitz-Castro, R. 1989. Inhibition of growth dimorphic fungus of *Paracoccidioides brasiliensis* by Ajoene. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 33(9):1641-1644.
- San-Blas, G.; Mariño, L.; San-Blas, F. y Apitz-Castro, R. 1993. Effect of ajoene on dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 31:13-141.
- Sánchez-Mirt, A.; Gil, F. y Apitz-Castro, R. 1994. Actividad *in vitro* e *in vivo* del ajoene sobre *Coccidioides immitis*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 1:99-104.
- Senet, J. 1997. Risk factors and physiopathology of candidiasis. *Review Iberoamerican Micology*, 14:6-13.
- Singh, U. y Pandey, V. 1990. Antifungal activity of ajoene, a constituent of garlic (*Allium sativum*). *Canadian Journal Botanical*, 68:1354-1356.

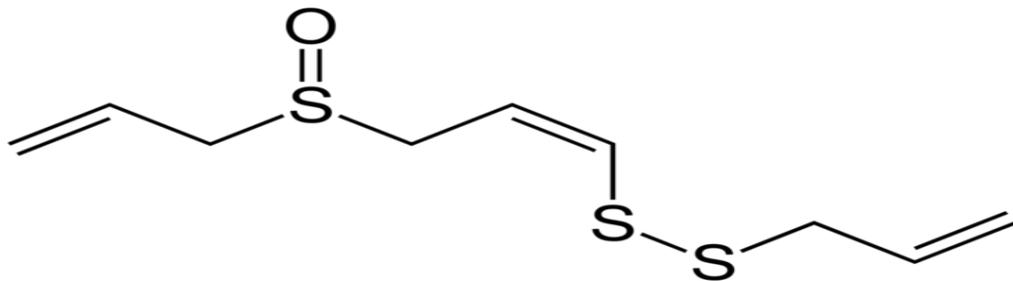
- Sobel, J.; Muller, G. y McCormick, J. 1985. Experimental chronic vaginal candidosis in rats. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 23:199-206.
- Sobel, J. (ed). 1993. *Genital candidiasis: pathogenesis, diagnosis and treatment*. Raven Press, New York.
- Stenderup, A. 1990. Oral micology. *Acta Odontológica Scand*, 48 (1):3-10.
- Steele, C. y Fidel, P.. 2002. Cytokine and chemokine production by human oral and vaginal epithelial cells in response to *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, 70 (2): 577-583.
- Stoll, A. y Seebeck, E. 1949. Uber Aliin, die genuine muttersubstanz des knoblauchols. *Helv Chim Acta*, 31:189-210.
- Sturtevant, J. y Calderone, R. 1997. *Candida albicans* adhesins: Biochemical aspects and virulence. *Reviews Iberoamerican de Micology*, 14: 90-97.
- Taschdjian, C.; Reiss, F. y Kozin, P. 1960. Experimental vaginal candidiasis in mice; its implications for superficial candidiasis in human. *Journal Investigation Dermatology*, 34: 89-93.
- Urbina, J.; Marchán, E.; Lazardí, K.; Visbal, G.; Apitz-Castro, R.; Gil, F.; Aguirre, T.; Piras, M. y Piras, R. 1993. Inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis and cell proliferation in *Trypanosoma cruzi* by ajoene, an antiplatelet compound isolated from garlic. *Biochemical Pharmacology*, 45(12): 2381-2387.

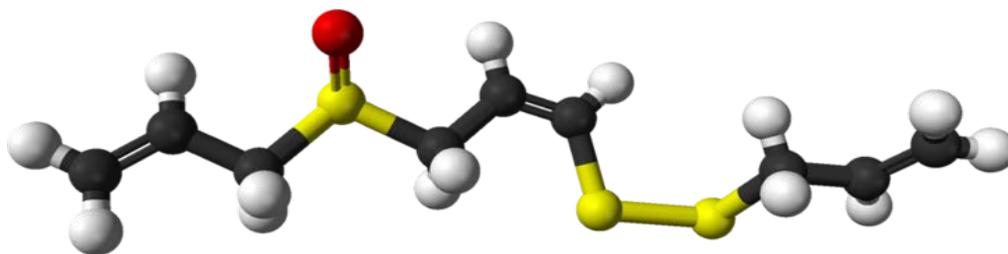
- Valentin, A.; Bernard, C.; Mallié, M.; Huerre, M. y Bastide, J. 1993. Control of *Candida albicans* vaginitis in mice by short-duration butoconazole treatment in situ. *Mycoses*, 36(11-12): 379-384.
- White, D.; Johnson, E. y Warnock, D. 1993. Management of persistent vulvovaginal candidosis due to azole-resistant *Candida glabrata*. *Genitourin Medical*, 69: 112-114.
- Wozniak, K.; Wormley, F. y Fidel, P. 2002. *Candida*-specific antibodies during experimental vaginal candidiasis in mice. *Infection and Immunity*, 70 (10): 5790-5799.
- Yoshida, S.; Kasuga, S.; Hayashi, N.; Ushiroguchi, T.; Matsuura, H. y Nakagawa, S. 1987. Antifungal activity of ajoene derived from garlic. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(3):615-617.
- Yu, L.; Lee, K.; Ens, K.; Doig, P.; Carpenter, M.; Staddon, W.; Hodges, R.; Parachych, W. y Irvin, R. 1994. Partial characterization of a *Candida albicans* fimbrial adhesin. *Infection and Immunity*, 62(7): 2834-2842.

ANEXOS



Estructura química del ajoene, isómero E - 4,5,9 - tritiododeca-1,6,11-trieno-9-óxido.





Estructura química del ajoene , isómero Z- 4,5,9- tritradodeca- 1,6,11-trieno-9-
óxido.

HOJA DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

Título	EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DEL EFECTO DE AJOENE EN UN MODELO EXPERIMENTAL MURINO DE CANDIDIASIS VAGINAL (Modalidad: Investigación).
---------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Pérez L., Mariela del V.	CVLAC	12.660.712
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

candidiasis vulvovagina, tratamiento infecciones vaginales

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Biología

Resumen (abstract):

La candidiasis vulvovaginal es una infección que afecta a millones de mujeres en todo el mundo, cerca del 75% experimenta un episodio a lo largo de su vida. El agente causal aislado con más frecuencia de este tipo de infecciones es la *Candida albicans*. El uso de modelos experimentales murinos de candidiasis vaginal han sido utilizados en investigación como test *in vivo* en la búsqueda de nuevas drogas como posibles agentes antifúngicos. En este sentido, el objetivo de éste trabajo fue establecer un modelo experimental murino de candidiasis vaginal, para así evaluar la histopatología de la infección, y probar el efecto de ajoene, un compuesto aislado del ajo (*Allium sativum*), como posible agente antifúngico de bajo costo. Para ello se utilizaron ratones BALB/c hembras vírgenes de 4 a 6 semanas a las que se les indujo el estro mediante la aplicación intramuscular de 7,5 µg/g de estradiol por 3 días consecutivos. Al cuarto día se procedió a la inoculación interdiaria de 10⁷ blastoconidias de *C. albicans* y los controles fueron inoculados con NaCl 0,9% por periodos de 7, 14 y 21 días (n=6 c/grupo). Posteriormente se determinó el efecto de 3 dosis de ajoene (0,3; 0,58; 1,18 mg/kg) y su solvente DMSO-Gly sobre el epitelio vaginal de los ratones y por último se relacionó histológicamente el efecto de dichas concentraciones de ajoene en el modelo experimental murino de candidiasis vaginal. Los resultados demostraron que hay una disminución de los niveles de infección a medida que aumenta el número de días y que los niveles de inflamación están relacionados con los niveles de infección, notando además, que existen diferentes patrones de conducta entre las cepas debido a la virulencia de cada una de ellas. Sobre la base de estos resultados se tomó como tiempo óptimo el día 7 de infección. También se pudo comprobar histológicamente que el ajoene y su solvente (DMSO-Gly) no producen ningún tipo de citotoxicidad al epitelio vaginal de los ratones inoculados. Finalmente, se pudo observar que en la medida que aumenta la concentración de ajoene en el modelo experimental de candidiasis vaginal disminuyen significativamente los niveles de infección con respecto a los controles (**p<0,001), tanto en la CR como en el AC. Estos hallazgos demuestran la efectividad de ajoene como posible agente antifúngico contra la candidiasis vaginal pudiendo resultar una terapia eficiente a bajas concentraciones, de poca toxicidad y de bajo costo para el tratamiento de esta infección.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Marchán, Edgar	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
Centeno, Sara	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input checked="" type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
Lobo Anibal	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input checked="" type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

2009	11	12
------	----	----

Lenguaje: SPA

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
TESIS-PLMV.doc	application / word

Alcance:

Espacial : **NACIONAL** (Opcional)

Temporal: _____ (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

LICENCIATURA Biología

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciatura

Área de Estudio: Biología

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

UNIVERSIDAD DE ORIENTE NUCLEO DE SUCRE

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/5

Derechos:

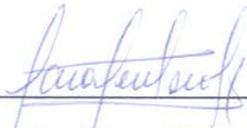
En mutuo acuerdo entre el autor y su asesor académico, se permite únicamente la publicación del resumen del presente Trabajo de Grado.



Br. Mariela Pérez L.
AUTOR



Prof. Edgar Marchán
TUTOR



Profa. Sara Centeno
JURADO 1



Prof. Anibal Lobo
JURADO 2



Profa. María Iabichella
POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS

