

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA**



**EFFECTO DE LA RADIACION DE LAS MICROONDAS
DE 2 450 MH Z SOBRE LA VIABILIDAD,
ULTRAESTRUCTURA Y ACTIVIDAD ENZIMATICA EN
CANDIDA ALBICANS**

POR

CONCEPCION MELBOZA CASTILLO

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGIA MEDICA**

AGOSTO, 1998

TM

QR201

.C27

M4

c.1



1080080872

70263

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



EFFECTO DE LA RADIACION DE LAS MICROONDAS DE 2 450 MHz SOBRE LA
EFECTO DE LA RADIACION DE LAS MICROONDAS
DE 2 450 MHz SOBRE LA VIABILIDAD,
ULTRAESTRUCTURA Y ACTIVIDAD ENZIMATICA EN
CANDIDA ALBICANS

POR

CONCEPCION MELGOZA CASTILLO

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGIA MEDICA

AGOSTO, 1998

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA

EFFECTO DE LA RADIACIÓN DE LAS MICROONDAS DE 2 450 MHz SOBRE LA
VIABILIDAD, ULTRAESTRUCTUTRA Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN
Candida albicans

Por

CONCEPCIÓN MELGOZA CASTILLO

Como requisito para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS con Especialidad en
Microbiología Médica

Agosto, 1998

TM
GR 201
C 27
M 4



RESUMEN

Concepción Melgoza Castillo

Fecha de Graduación: Agosto, 1998

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio: EFECTO DE LA RADIACIÓN DE LAS MICROONDAS DE
2 450 MHz SOBRE LA VIABILIDAD, ULTRAESTRUCTURA
Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN *Candida albicans*

Número de páginas: 55

Candidato para el grado de Maestro en
Ciencias con especialidad en
Microbiología Médica

Área de Estudio: Ciencias de la Salud

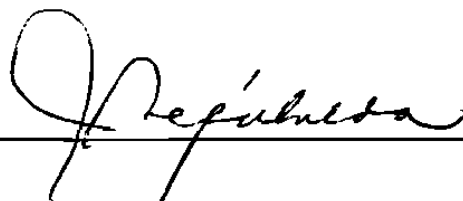
Propósito y Método del Estudio:

El presente trabajo se realizó para estudiar el efecto de la radiación de las microondas de 2 450 MHz sobre la viabilidad, ultraestructura y actividad enzimática en *Candida albicans*. Se realizaron experimentos, exponiendo las células de levadura, suspendidas en el medio de cultivo a diferentes tiempos de radiación de las microondas. Grupos de tubos fueron radiados por 15, 30, 45 y 60 s. Posteriormente se realizaron cuentas de células viables. Muestras controles y radiadas se procesaron para microscopía electrónica. Por medio de métodos espectrofotométricos, se determinó la actividad específica de las enzimas catalasa, fumarasa y lactato deshidrogenasa (LDH).

Contribuciones y Conclusiones:


Los resultados obtenidos indican la pérdida rápida de la viabilidad de la levadura, siendo las proteínas el principal blanco de la radiación. Este daño se traduce como la disminución de la actividad enzimática y la coagulación citoplásmica, y ofrece apoyo para el entendimiento de los mecanismos de la muerte en células de levadura y posiblemente para otros tipos de células eucarióticas por medio de la radiación de baja energía.

FIRMA DEL ASESOR:



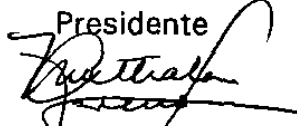
**EFFECTO DE LA RADIACIÓN DE LAS MICROONDAS DE 2 450 MHz SOBRE
LA VIABILIDAD, ULTRAESTRUCTURA Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN
*Candida albicans***

Aprobación de la Tesis:



DRA. MARIA DEL SOCORRO FLORES DE CASTAÑEDA

Presidente



DRA. MYRTHALA MORENO SEPULVEDA

Secretario



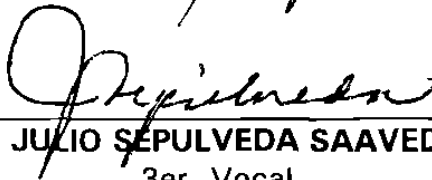
M.C. IRMA A. SALINAS GONZALEZ

1er. Vocal




DRA. HERMINIA G. MARTINEZ RODRIGUEZ

2do. Vocal



DR. JULIO SEPULVEDA SAAVEDRA

3er. Vocal



Dr. med. MA. ESTHELA MORALES PEREZ

Secretario Académico del Area Básica

Subdirección de Investigación y Estudios de Posgrado

AGRADECIMENTOS

A mi familia por el apoyo que siempre me ha brindado.

Al Dr. Manuel A. Rodríguez Quintanilla, por su visión y entusiasmo en la investigación.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Julio Sepúlveda Saavedra, asesor de mi tesis, Dra. Myrthala Moreno Sepúlveda, M.C. Irma A. Salinas González, Dra Herminia G. Martínez Rodríguez y Dra. Ma. del Socorro Flores de Castañeda, por formar parte de mi comisión de tesis.

A la Facultad de Enfermería por apoyarme bajo la dirección de la Lic. Mariana López de Laredo y actualmente por la Lic. Ma. Guadalupe Martínez de Dávila.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo brindado para la realización de mis estudios.

A todo el personal del Departamento de Microbiología, así como al personal del Departamento de Histología, por su colaboración.

A mis maestros por guiarme en mi formación.

A mis compañeras y amigas que han compartido conmigo sus experiencias, Wendy, Catalina y Agustina.

A Lupita muy especialmente por ayudarme en la elaboración de las gráficas.

Al M. C. Angel Enrique Alcorta Garza por su ayuda en el análisis estadístico utilizado en esta tesis.

A Normita Sánchez Reyes por todas sus atenciones, muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1 INTRODUCCION	1
2 MATERIAL Y METODOS	12
2.1 Material	12
2.1.1. Reactivos	12
2.1.2. Material biológico	12
2.1.3. Equipo	12
2.2 Métodos	13
2.2.1 Métodos de cultivo	13
2.2.2 Curva de crecimiento de <i>Candida albicans</i> en un sistema cerrado	14
2.2.3. Cinética de letalidad de <i>Candida albicans</i> después de la exposición a la radiación de las microondas	14
2.2.4. Conteo de colonias en placas de agar	14
2.2.5 Preparación del extracto celular crudo de <i>Candida albicans</i>	15
2.2.6 Métodos analíticos	15
2.2.6.1 Medición de la turbiedad del medio de cultivo	15
2.2.6.2 Determinación de la actividad de catalasa	16
2.2.6.3 Determinación de la actividad de fumarasa	16

2.2.6.4 Determinación de la actividad de LDH	16
2.2.6.5 Determinación de proteínas totales	16
2.2.7 Microscopía electrónica de transmisión	17
2.2.8 Análisis estadístico	17
3 RESULTADOS	18
3.1 Curva de crecimiento de <i>Candida albicans</i>	18
3.2 Cinética de letalidad de <i>Candida albicans</i>	18
3.3 Evaluación del efecto de la radiación por microscopía electrónica	22
3.4 Efecto de la radiación sobre la actividad enzimática de <i>Candida albicans</i> en extractos celulares crudos	25
4 DISCUSION	29
5 CONCLUSIONES	35
APENDICES	36
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	51

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Espectro electromagnético	2
2	Banda de las microondas	2
3	Moléculas polares y sus momentos dipolares	6
4	Molécula de agua	6
5	Efecto de las microondas en muestras clínicas	8
6	Cinética de crecimiento de <i>Candida albicans</i>	19
7	Cinética de letalidad de <i>Candida albicans</i>	21
8	Micrografías electrónicas de <i>Candida albicans</i>	24
9	Actividad específica de las enzimas en el extracto celular crudo de <i>Candida albicans</i>	27
10	Actividad restante de enzimas con respecto al tiempo de exposición a la radiación de las microondas	28

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Longitudes de onda y energía del espectro	4
II	Resultados de cuentas viables de <i>Candida albicans</i>	20
III	Actividad específica de las enzimas en el extracto celular crudo de <i>Candida albicans</i>	26
IV	Absorbancias de la cinética de crecimiento de <i>Candida albicans</i>	37
V	Determinación de la cinética de las enzimas catalasa, fumarasa y LDH	38
VI	Curva de calibración para la determinación de la concentración de proteínas totales	47

LISTA DE ABREVIATURAS

MHz	Megahertz
GHz	Gigahertz
nm	nanómetro
c	velocidad de la luz
cm	centímetro
m	metro
s	segundo
f	frecuencia
λ	longitud de onda
E	energía
hr	horas
min	minutos
mL	mililitro
rpm	revoluciones por minuto
D.O.	densidad óptica
°C	grados centígrados
CST	caldo soya tripticaseína
AST	agar soya tripticaseína
LDH	lactato deshidrogenasa
NADH	nicotinamida adenin dinucleótido
pH	potencial de hidrógeno

mM	milimolar
DTE	ditioeritrol
PMSF	fosfil-metil-sulfonil-fluoruro
EDTA	ácido etilendiamintetracético
μM	micromolar
μL	microlitros
mg	miligramos
U	unidades
M	Molar
t	tiempo
ΔA	cambio de absorbancia
ΔC	cambio de concentración
ε	coeficiente de absortividad molar
ec'n	ecuación
d	distancia
g	gramos

CAPITULO UNO

INTRODUCCIÓN

El espectro electromagnético está constituido por un gran número de franjas o bandas de manifestación de la energía, que se interrelacionan por su frecuencia y longitud de onda (Figura 1). Cada una de ellas posee una carga de energía que está regida por la ecuación de Maxwell, la cual relaciona electricidad y magnetismo¹.

Las ondas de radio, televisión, radar, infrarrojo, visible, ultravioleta, rayos X, y rayos gamma son ejemplos de las ondas del espectro electromagnético. El espectro visible representa solo una pequeña parte del espectro electromagnético. Las ondas pueden ser clasificadas de acuerdo a su frecuencia o alternativamente a su longitud de onda o energía. En el vacío las ondas electromagnéticas tienen la misma velocidad que las de la luz $c = 299\,792\,458\text{ m/s}^2$.

Las microondas están ubicadas entre las bandas usadas en la radio y las ondas infrarrojas (Figura 2). Si las ondas electromagnéticas viajan en el espacio la relación entre la frecuencia (f) y la magnitud de onda (λ) está dada por la ecuación $f \times \lambda = c$, donde c es igual a la velocidad de la luz. De esta ecuación se nota que la frecuencia y la longitud de onda son inversamente

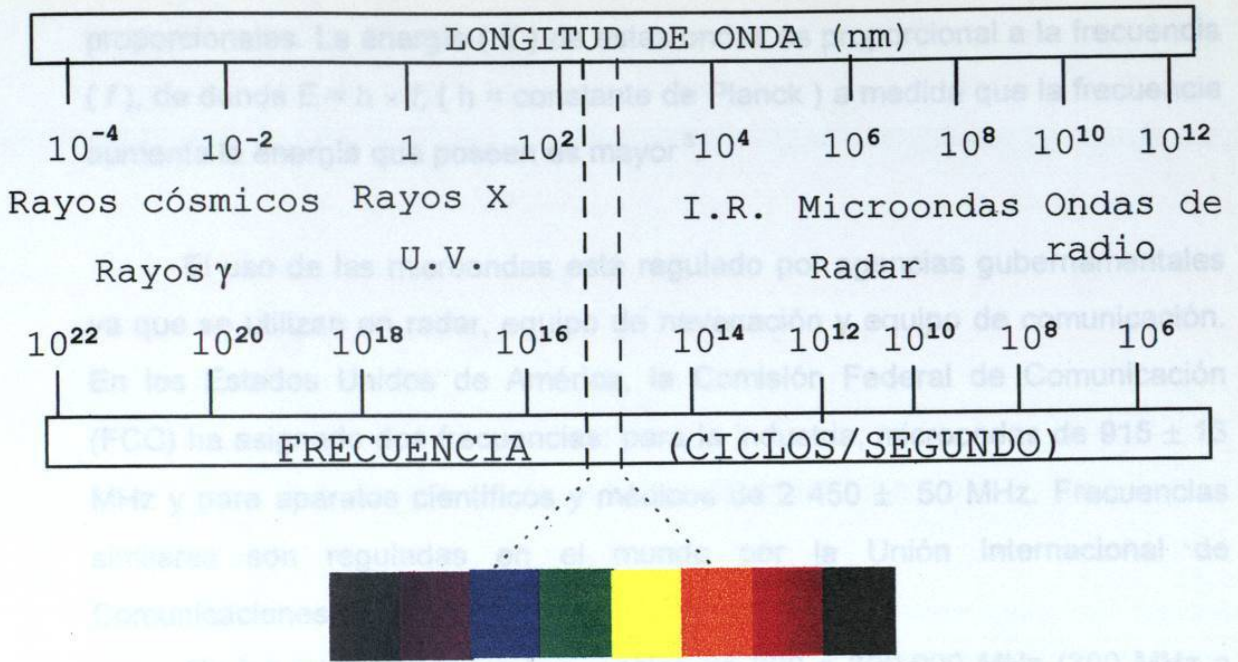


Fig. 1 Espectro electromagnético

Thuéry. Microwaves 1992

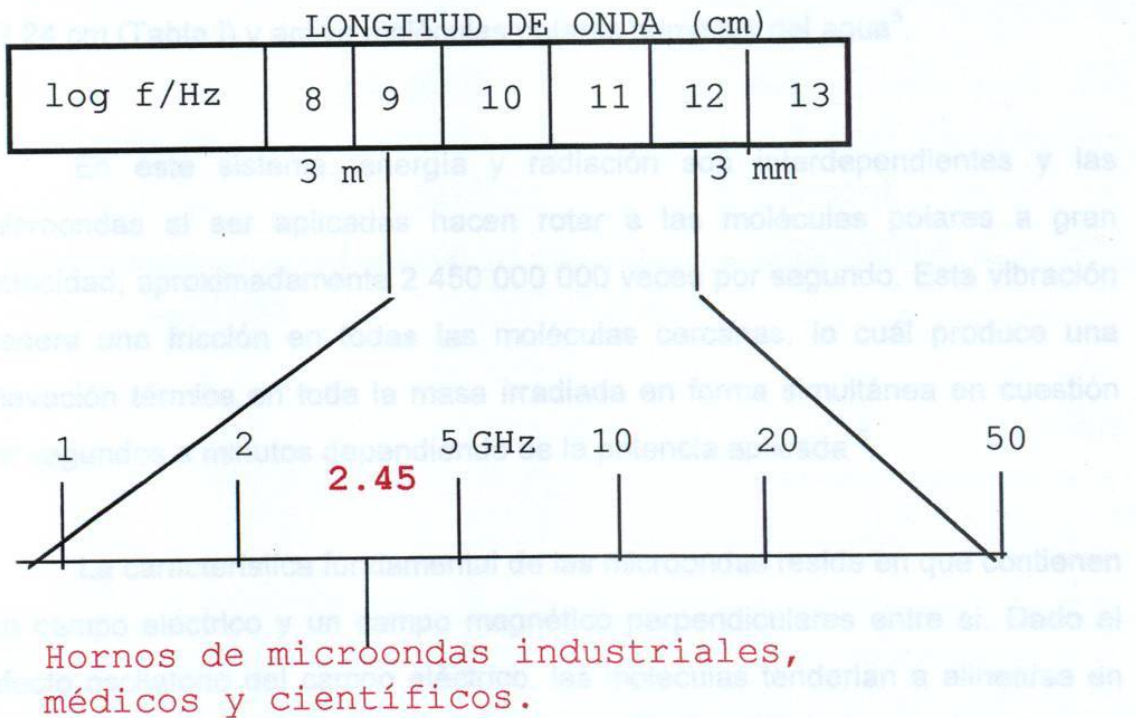


Fig.2 Banda de las microondas

Boon, Kok. Microwave Cookbook of Pathology 1988

proporcionales. La energía (E) de estas ondas es proporcional a la frecuencia (f), de donde $E = h \times f$, (h = constante de Planck) a medida que la frecuencia aumenta la energía que poseen es mayor³.

El uso de las microondas está regulado por agencias gubernamentales ya que se utilizan en radar, equipo de navegación y equipo de comunicación. En los Estados Unidos de América, la Comisión Federal de Comunicación (FCC) ha asignado dos frecuencias: para la industria, microondas de 915 ± 13 MHz y para aparatos científicos y médicos de $2\,450 \pm 50$ MHz. Frecuencias similares son reguladas en el mundo por la Unión Internacional de Comunicaciones⁴.

En las microondas las frecuencias de 300 a 300,000 MHz (300 MHz a 300 GHz) varían de un metro a un milímetro; la frecuencia más usada en los hornos de microondas es de 2 450 MHz (2.45 GHz). Esta radiación es de muy baja energía (menos de 0.00001 electrón-volt), produce ondas de 12.24 cm (Tabla I) y activa moléculas polares como las del agua⁵.

En este sistema, energía y radiación son interdependientes y las microondas al ser aplicadas hacen rotar a las moléculas polares a gran velocidad, aproximadamente 2 450 000 000 veces por segundo. Esta vibración genera una fricción en todas las moléculas cercanas, lo cuál produce una elevación térmica en toda la masa irradiada en forma simultánea en cuestión de segundos a minutos dependiendo de la potencia aplicada⁶.

La característica fundamental de las microondas reside en que contienen un campo eléctrico y un campo magnético perpendiculares entre sí. Dado el efecto oscilatorio del campo eléctrico, las moléculas tenderían a alinearse en él, dependiendo de su momento dipolar. Las moléculas de agua, por su estructura tienen un momento dipolar de 6.17×10^{-30} cm (Figura 3), y tienden a alinearse con las ondas. Esto se debe a que la posición de los átomos en la

TABLA I

Longitudes de onda y energía del espectro

Radiación emitida	Longitud de onda (cm)	Energía de cada cuanto (eV)
Rayos gama	1×10^{10}	1 240 000
Rayos X	1×10^9	124 000
U.V. (alta energía)	4×10^5	4.79
U.V. (baja energía)	3×10^5	3.11
Luz visible	5×10^3	2.5
Luz infrarroja	0.01	0.012
Microondas	12.24	0.000010
Ondas de radio	30 000	0.000000004

Thuéry. Microwaves 1992

molécula la presentan con una distribución de cargas que semeja un dipolo eléctrico (Figura 4). Estas moléculas se comportan como antenas, absorbiendo fácilmente energía. Este dipolo en su campo eléctrico de carácter oscilatorio, como en las microondas, es forzado a rotar. Así pues todos y cada uno de estos dipolos constituyen una especie de antena capaz de captar las microondas⁷.

Una molécula dipolar sujeta a la acción de las microondas, va a rotar para alinearse en el campo eléctrico. El tiempo necesario para hacerlo, se llama tiempo de relajación. Puesto que el campo eléctrico de las microondas es oscilatorio, los dipolos tenderán a oscilar al cambiar el sentido del campo eléctrico de las ondas en cada ciclo, de esta manera las sustancias dipolares (como el agua) absorben energía de las microondas, creando con la oscilación, una agitación molecular que por fricción eleva la temperatura de las mismas. Este es el principio físico que fundamenta el carácter térmico de la radiación con microondas ⁸.

Lo importante a considerar aquí, es que la oscilación de todas las moléculas de agua ocurre simultáneamente, generándose calor en toda la masa irradiada al mismo tiempo. De esta forma se presenta un diferencial térmico. Cuando se trata de células dicho diferencial deberá ocurrir tanto en el agua extracelular como en el agua intracelular. Este principio es válido también para una suspensión microbiana. Las células microbianas poseen un contenido citoplasmático de agua superior al 90%, y además contienen solutos que determinan presiones osmóticas que van desde 5 a 20 atmósferas. La rotación de las moléculas de agua intracelular determina que por fricción entre ellas, ésta se caliente y pueda alcanzar el punto de ebullición, ocasionando cambios en las células, que producen la muerte en tiempos muy cortos de exposición a la radiación con microondas. El agua extracelular simultáneamente ejerce un efecto similar ⁹.



METANOL μ 5.70×10^{-30} cm AGUA μ 6.17×10^{-30} cm

Fig. 3 Moléculas polares y sus momentos dipolares

Boon, Kok. *Microwave Cookbook of Pathology* 1988

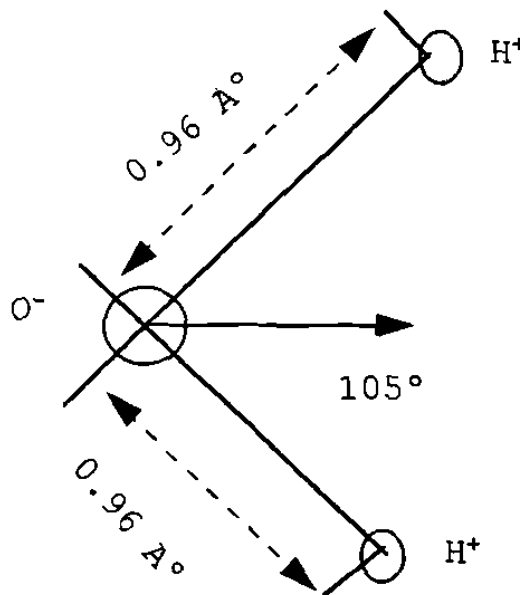


Fig. 4 Molécula de agua

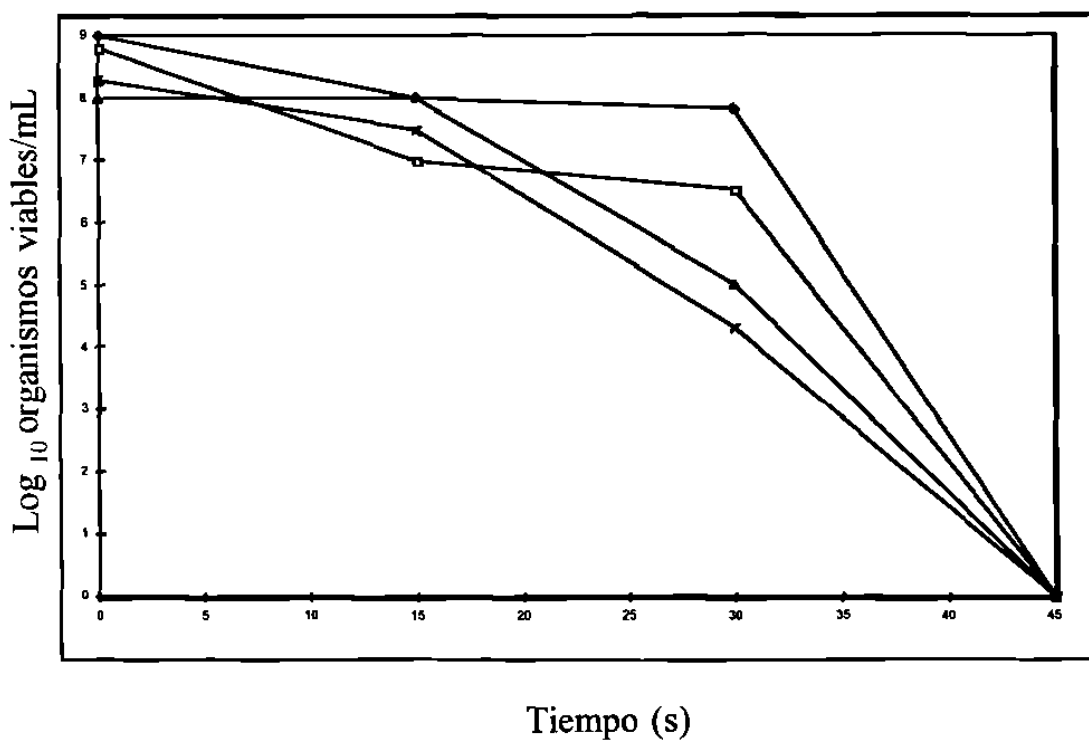
Thuéry. *Microwaves* 1992

La tecnología de las microondas ha evolucionado mucho, así también sus aplicaciones. En biomedicina, el uso de las microondas se ha aplicado en la técnica histológica, en química analítica, así como en termoterapia ¹. Su uso en microbiología, en los campos de esterilización de instrumentos y dispositivos diversos ha sido escaso y limitado debido a la falta de estudios de su cinética e interacción con la vida microbiana, evidenciado lo anterior por la escasa literatura sobre el tema ^{10,11,12}.

Los hornos de microondas aparecieron con patente americana en 1951. La aplicación de las microondas como método de esterilización se inicia en la década de los sesenta ¹. En el campo de la microbiología, como método de esterilización, se ha utilizado sobre bacterias tanto grampositivas como gramnegativas, bacterias esporuladas, micobacterias y algunas levaduras ^{13,14,15,16}.

Goldblith y Wang, aplicaron las microondas de 2 450 MHz a suspensiones de *Escherichia coli* y esporas de *Bacillus subtilis*, y encontraron que las microondas inactivaban el crecimiento de dichos microorganismos. Ellos concluyeron que la inactivación era solo debida al efecto térmico de las microondas ¹⁷.

Lechowich y col., evaluaron el efecto de las microondas de 2 450 MHz sobre *Streptococcus faecalis* (*Enterococcus faecalis*) ¹⁸ y *Saccharomyces cerevisiae*, y encontraron disminución de la viabilidad de los microorganismos a medida que se incrementaba el tiempo de exposición a las microondas ¹⁹. También Latimer y Matsen utilizaron las microondas como método de descontaminación para bacterias aisladas de laboratorio clínico microbiológico, y observaron que la radiación de las microondas asegura la completa esterilización de organismos comúnmente encontrados en especímenes



◇ *Klebsiella pneumoniae* □ *Pseudomonas aeruginosa*

× *Enterococcus* △ *Staphylococcus aureus*

Fig. 5 Efecto de las microondas en 4 muestras clínicas

Latimer and Matsen.. J. Clin. Microbiol. 1977

Abara y col. ²⁶ han utilizado las microondas en la industria alimenticia inactivando enzimas, ya que los tratamientos a los cuales se exponen frutas y vegetales (82°C por varios min), hacen que con frecuencia se pierda su aroma. Las microondas ofrecen la ventaja de hacer más cortos los tiempos de exposición, (hasta 60 s) para lograr el mismo efecto esterilizante.

La candidosis ^{27,28} es una micosis causada por diversas especies de levaduras oportunistas del género *Candida*, en especial *C. albicans*. Presenta una variedad de cuadros clínicos, desde infecciones en mucosas (boca, vagina, etc.), en piel, uñas y de manera excepcional otros órganos como pulmones e intestino ^{29,30}.

Se han reportado trabajos sobre la utilización de las microondas, como método de esterilización, en material dental contaminado con levaduras como *Candida albicans* y *Saccharomyces*, demostrándose que después de 8 y 10 min de exposición respectivamente, las levaduras ya no muestran crecimiento ^{31,32}. En lentes de contacto suaves, contaminados con *Candida albicans*, se ha encontrado que 2 min son suficientes para lograr la descontaminación ³³.

En este trabajo, el interés de estudiar el efecto de las microondas de 2 450 MHz sobre la viabilidad, ultraestructura y actividad enzimática en *Candida albicans*, se debe a que este microorganismo es de gran importancia médica, ya que es uno de los principales agentes que causan infecciones intrahospitalarias, en particular en pacientes inmunocomprometidos. La incidencia de candidosis está aumentando, siendo una causa la contaminación con fomites ^{34,35,36}. Además del hecho de ser *Candida albicans* una célula eucariótica.

OBJETIVO GENERAL

Demostrar que las radiaciones de microondas de 2 450 MHz afectan la viabilidad, ultraestructura y actividad enzimática de *Candida albicans*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la cinética de letalidad de *Candida albicans* expuesta a la radiación de las microondas de 2 450 MHz a diferentes tiempos.
2. Analizar la ultraestructura de las células de *Candida albicans* expuestas y no expuestas, a la radiación de las microondas de 2 450 MHz.
3. Determinar el efecto de la radiación de las microondas de 2 450 MHz sobre la actividad enzimática de *Candida albicans* en enzimas marcadoras de compartimentos celulares: citosol, mitocondria y peroxisoma.
4. Correlacionar los hallazgos morfológicos con la actividad enzimática y la viabilidad celular.

CAPITULO DOS

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1. Reactivos.

Los productos químicos utilizados fueron obtenidos comercialmente de las siguientes compañías: Productos Químicos Monterrey, Sigma, Biorad, Pelco.

2.1.2. Material Biológico.

Levadura *Candida albicans* cepa HU181.

2.1.3. Equipo.

Incubadora estática Sartorius

Incubadora con agitador mecánico Lab-line Shaking Bath

Horno de microondas Kelvinator

Espectrofotómetro Perkin-Elmer

Espectrofotómetro Spectronic 601 Milton Roy

Centrífuga Sol-Bat

Microcentrífuga Centrifuge 5415 C Eppendorf

Centrífuga con control de temperatura Beckman GPR

Balanza Analítica Sartorius

Microscopio de luz Carl-Zeiss

Ultramicrotomo Ultratome LKB V

Microscopio Electrónico de Transmisión Carl-Zeiss EM 109

Contador de Colonias Darkfield

2.2 MÉTODOS

2.2.1. Métodos de cultivo

Las células de la levadura *Candida albicans* se mantienen viables a través de la resiembra cada tres meses en viales de agar Dextrosa Saboraud (Apéndice), y se almacenan a 4°C.

Los cultivos líquidos de *C. albicans*, se realizaron de la siguiente forma: se tomó una colonia de la levadura y se inoculó en medio caldo soya tripticaseína (CST, Apéndice), después se incubó por 12 horas a 30°C, posteriormente se transfirieron alícuotas del cultivo a medio de propagación CST. Los cultivos de la levadura se iniciaron en todos los casos con una turbidez del medio de 0.1 D.O./mL. Todos los cultivos se incubaron a 25°C por 12 hr bajo agitación constante (20 rpm). Los cultivos se revisaron periódicamente por microscopía de luz para evaluar la pureza y descartar contaminación.

2.2.2. Curva de crecimiento de *Candida albicans* en un sistema cerrado

Para realizar la curva de crecimiento se inoculó una colonia de la levadura en medio caldo soya tripticaseína incubando a 30°C por 12 horas, se determinó la turbidez de este cultivo para posteriormente pasar una alícuota al medio de propagación en caldo soya tripticaseína, incubando a 25°C bajo agitación constante (20 rpm). Los cultivos se iniciaron con una turbidez de 0.1 D.O./mL, se tomaron alícuotas cada hora y se determinó la densidad óptica a 550 nm. Los resultados obtenidos se graficaron para obtener la curva de crecimiento de la levadura. La fase logarítmica tardía corresponde al punto del inicio de la fase estacionaria.

2.2.3. Cinética de Letalidad de *Candida albicans* Después de la Exposición a la Radiación de las Microondas de 2 450 MHz

Una vez que se determinó la fase logarítmica tardía se procedió a evaluar el efecto de la radiación de las microondas de 2 450 MHz sobre la viabilidad de la levadura. Se expusieron alícuotas de 5 mL de los cultivos de *Candida albicans* a diferentes tiempos: 15, 30, 45 y 60 s, como control se usó una muestra sin exponer. Posteriormente se realizaron cuentas de células viables de cada uno de los tiempos de exposición.

2.2.4. Conteo de Colonias en Placas de Agar

Para el conteo de colonias, de las alícuotas obtenidas después de la exposición a la radiación y del control, se realizaron diluciones seriadas en solución salina estéril. Las diluciones se colocaron en las placas y se procesaron por medio de la técnica de vaciado en placa con agar

tripticaseína³⁷: Las placas se incubaron a 30°C por 48 hr. Posteriormente se realizó el conteo de colonias en las placas de agar, en un contador de colonias

2.2.5. Preparación del Extracto Celular Crudo de *Candida albicans*.

En un tubo de ensaye se pesaron 400 mg (peso húmedo) de células de *C. albicans*. Se resuspendieron en amortiguador de fosfato de potasio (Apéndice) y se mezclaron con 3,5 g de perlas de vidrio. Las células se trituraron mecánicamente por medio de agitación en vortex 6 veces por 30 s, colocando la muestra a 4°C entre cada agitación durante 10 s. Las células trituradas se separaron de las perlas de vidrio por medio de una jeringa con un cartucho de algodón en el fondo y se centrifugaron a 6000 rpm por 3 min a 4°C. Las perlas de vidrio se lavaron con 0.5 mL del amortiguador de fosfato de potasio y se centrifugaron de nuevo bajo las condiciones antes mencionadas. Una vez separadas las células trituradas de las perlas de vidrio se centrifugó en una microcentrífuga durante 30 s. La fracción con el sobrenadante corresponde al extracto celular crudo y contiene las proteínas solubles. En este extracto celular se determinó la actividad de las enzimas: catalasa, fumarasa y LDH, así como proteínas totales.

2.2.6. Métodos Analíticos

2.2.6.1. Medición de la turbiedad del medio de cultivo

La turbiedad del medio de cultivo se determinó a través de su densidad óptica (D.O./mL). Para esto se tomaron alícuotas de los cultivos de la levadura y se midió su densidad óptica a una longitud de onda de 550 nm en un espectrofotómetro Perkin- Elmer.

2.2.6.2. Determinación de la actividad de Catalasa

La actividad de catalasa se determinó según el método descrito por Aebi³⁸. Este es un método espectrofotométrico basado en la medición de la disminución del peróxido de hidrógeno a 240 nm, pH de 7.4 y a 25°C (Apéndice).

2.2.6.3 Determinación de la actividad de Fumarasa

La actividad de fumarasa se determinó por medio de un método espectrofotométrico³⁸, basado en la medición de la formación del fumarato a 240 nm, pH 7.4 y a 25°C (Apéndice).

2.2.6.4. Determinación de la actividad LDH

La actividad de LDH se determinó a través de un método espectrofotométrico³⁸, basado en la medición de la disminución de la coenzima NADH a 340 nm, pH 7.0 y a 30°C (Apéndice).

2.2.6.5. Determinación de proteínas totales

La determinación de proteínas totales se efectuó por el método de Bradford³⁹, el cual se basa en la unión del colorante de Coomassie brillante G-250 a las proteínas, causando un cambio del pico máximo de absorción del colorante, de 465 nm a 595 nm. El incremento de absorbancia a 595 nm es proporcional a la concentración de proteínas. (Apéndice)

2.2.7. Microscopía Electrónica de Transmisión

De los cultivos de *C. albicans* incubados a 25°C por 12 hr bajo agitación constante (20 rpm), se tomaron alícuotas y se expusieron a la radiación de las microondas de 2 450 MHz a diferentes tiempos: 15, 30, 45 y 60 s. Posteriormente las muestras se procesaron por la técnica de inclusión en resina epóxica, obteniéndose cortes finos que se contrastaron con acetato de uranilo para ser posteriormente observados por medio de microscopía electrónica de transmisión (Apéndice).

2.2.8. Análisis Estadístico

Tanto el conteo de colonias en placas de agar, como las determinaciones analíticas: medición de turbiedad del medio, determinación de las enzimas catalasa, fumarasa y lactato deshidrogenasa, así como la determinación de proteínas totales se realizaron por triplicado y se sometieron a la prueba t de Student para determinar la posible diferencia significativa con respecto al control. La prueba t de student se realizó con un valor de $n = 3$, utilizando un grado de significancia de $p \leq 0.005$. El valor crítico de la prueba t fue de 2.77

CAPITULO TRES

RESULTADOS

3.1 Curva de crecimiento de *Candida albicans*

Los resultados obtenidos de la cinética de crecimiento del *C. albicans* mostraron que en un tiempo de 12 hr de incubación a 25° C, se llega a la fase logarítmica tardía (figura 6). Las lecturas de absorbancia obtenidas en la cinética de crecimiento, son el promedio de tres valores de experimentos independientes que no mostraron diferencia significativa entre sí (tabla V Apéndice).

3.2 Cinética de letalidad de *Candida albicans*

El efecto de la radiación de la microondas en *C. albicans* a diferentes tiempos de exposición, mostró que en 60 s se alcanza el 100 por ciento de letalidad de un inóculo de aproximadamente 1×10^7 UFC/ mL (Figura 7). Las cuentas de células viables realizadas de la levadura, después de la exposición

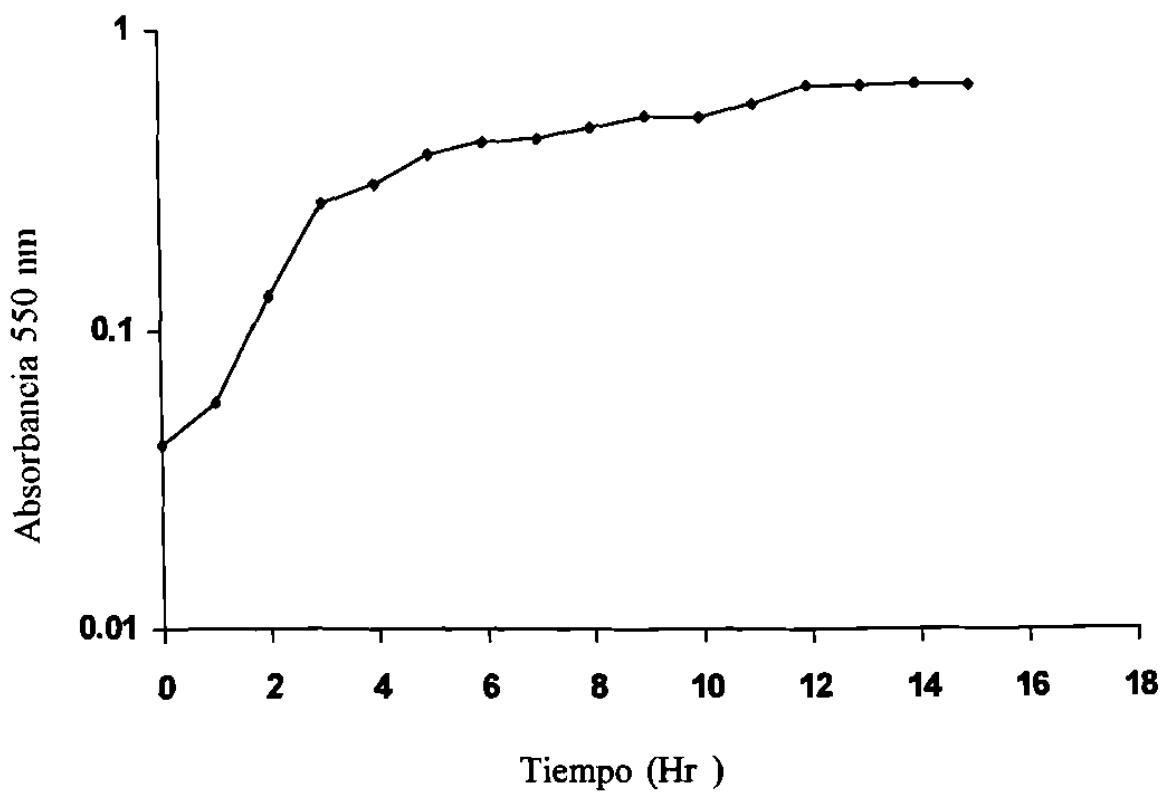


Fig. 6 Cinética de crecimiento de *Candida albicans*

Tabla II

Resultados de cuentas viables de *Candida albicans*
después de la exposición a las microondas

Tiempo (segundos)	U.F.C. /mL.	Log ₁₀ U.F.C. / mL.
0	$1.41 \times 10^7 \pm 4.1$	7.2
15	$1.27 \times 10^6 \pm 3.8$	6.1
30	$1.05 \times 10^4 \pm 4.5$	4.0
45	$<10 \pm 4.7$	1.0
60	0	0.0

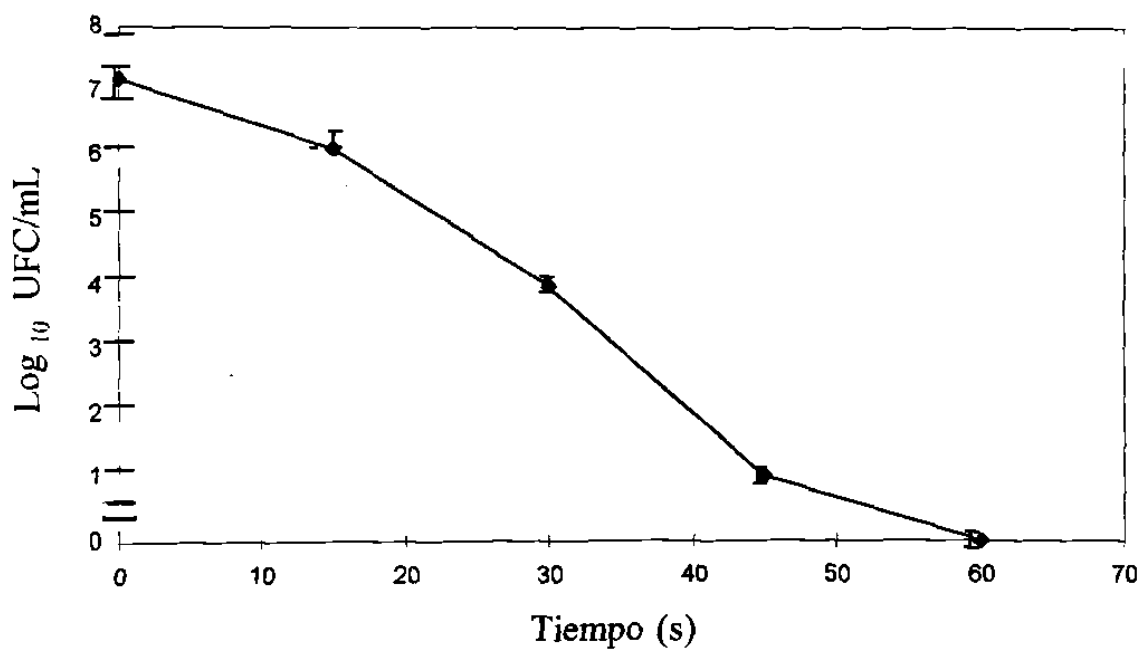


Fig. 7 Cinética de letalidad de *Candida albicans*

a la radiación muestran como va disminuyendo el número viable de microorganismos a medida que se incrementa el tiempo de radiación (tabla II).

3.3 Evaluación del efecto de la radiación por microscopía electrónica

La muestra control de *C. albicans*, presenta la estructura de la célula bien preservada (Figura 8-A). El citoplasma se observa homogéneo con apariencia finamente granular. La pared celular es continua, y los organelos: núcleo, mitocondria, y retículo endoplásmico, muestran membranas bien definidas

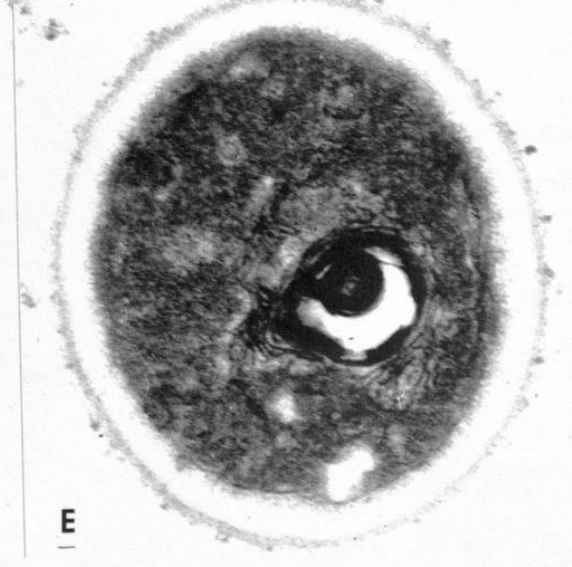
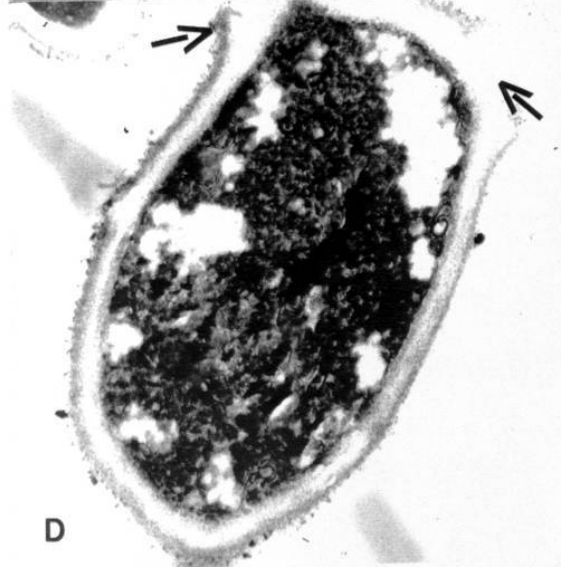
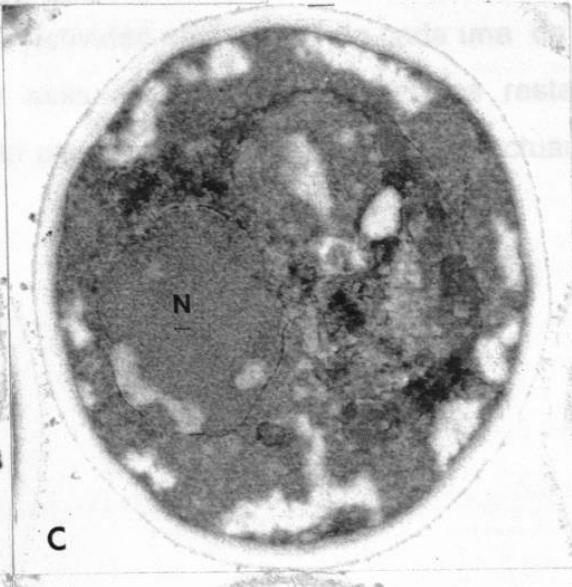
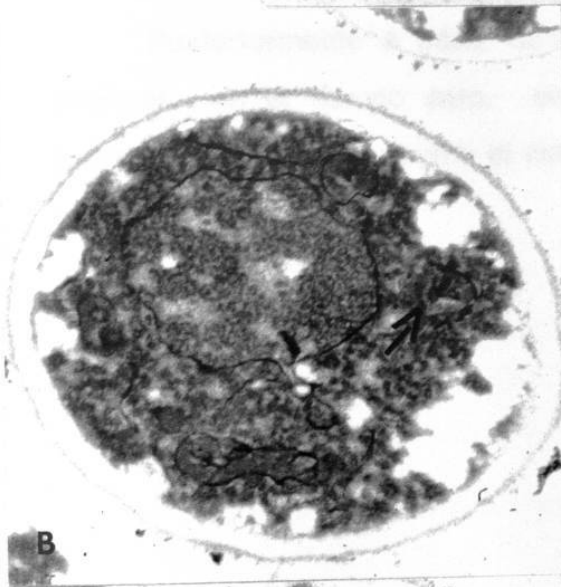
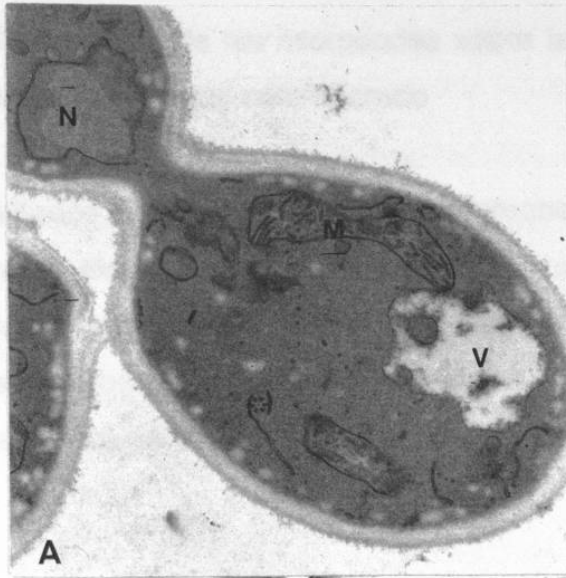
Las células de levadura, después de 15 s de exposición a la radiación de las microondas (Figura 8-B), muestran alteraciones en los compartimentos celulares, y las membranas de los organelos presentan fragmentación. La mitocondria ha perdido su estructura interna. El citoplasma presenta áreas vacías y electrodensidad aumentada con formación de gránulos gruesos. La pared celular no presenta modificaciones.

Después de 30 s de exposición a la radiación, la estructura normal de las células de levadura se pierde. El citoplasma presenta aumento en la condensación y electrodensidad. La pared celular continúa sin cambios y el compartimento nuclear aún puede ser identificado,(Figura 8-C).

Al incrementar el tiempo de exposición a las microondas hasta 45 s, las estructuras internas de la levadura no pueden ser identificadas, presentando una alta condensación citoplasmática y discontinuidad de la pared celular (Figura 8-D).

Después de 60 s de exposición a la radiación (Figura 8-E), aparecen cuerpos laminares en el citoplasma, formados por fosfolípidos extraídos de las membranas dañadas.

Fig.8 Micrografías electrónicas de *Candida albicans.*, (12 000x). (A) Control. Muestra la estructura fina de la célula, núcleo (N), mitocondria (M),retículo endoplásmico(*), vacuola (V), membranas bien definidas, citoplasma homogéneo con apariencia finamente granular, pared celular continua. (B), después de 15 s de exposición a la radiación de las microondas, todos los compartimentos celulares muestran alteraciones y las membranas de los organelos presentan fragmentación (flechas). El citoplasma muestra áreas extraídas y aumento de la electrodensidad con formación de gránulos gruesos. La pared celular no presenta modificaciones. (C), a los 30 s de exposición a la radiación, solo el compartimento nuclear (N) puede ser identificado, el resto de los organelos han perdido su estructura normal. (D) 45 s después, se observa una alta condensación citoplasmática y discontinuidad en la pared celular. (E), después de 60 s, se observan cuerpos laminares en el citoplasma formados por fosfolípidos extraídos de las membranas dañadas.



3.4 Efecto de la radiación de las microondas sobre la actividad enzimática de *Candida albicans* en el extracto celular crudo

Los resultados de la radiación de las microondas sobre la actividad de las enzimas en el extracto celular crudo de *C. albicans*, mostraron que las enzimas: catalasa, fumarasa y LDH, en los diferentes tiempo de exposición a la radiación de las microondas (Figuras 9-A, 9-B y 9-C, tablas III-A, III-B y III-C), su actividad específica se ve disminuída al incrementar el tiempo de exposición a la radiación.

Posteriormente a partir de la actividad enzimática de cada una de las enzimas en el tiempo cero, se calculó la actividad específica restante, tomando dicho tiempo como el cien porciento de actividad para efectuar los cálculos (Figura 10)

TABLA III

Actividad específica de las enzimas en el extracto celular crudo de
Candida albicans

Tiempo de exposición a la radiación (s)	Act. total de catalasa (U/mL)	Conc. de proteínas (mg/mL)	Act. específica de catalasa (U/mg)
0	913.9 ± 0.15	3.90 ± 0.10	234.33 ± 1.14
15	38.4 ± 0.11	0.61 ± 0.11	62.94 ± 3.11
30	3.8 ± 0.10	0.17 ± 0.10	22.62 ± 3.11

A) Catalasa

Tiempo de exposición a la radiación (s)	Act. total de fumarasa (U/mL)	Conc. de proteínas (mg/mL)	Act. específica de fumarasa (U/mg)
0	5.30 ± 0.20	3.90 ± 0.10	1.35 ± 0.06
15	0.20 ± 0.18	0.61 ± 0.11	0.26 ± 0.04
30	0.02 ± 0.10	0.17 ± 0.10	0.13 ± 0.01

B) Fumarasa

Tiempo de exposición a la radiación (s)	Act. total de LDH (U/mL)	Conc. de proteínas (mg/mL)	Act. específica de LDH (U/mg)
0	6.90 ± 0.15	3.90 ± 0.10	1.77 ± 0.11
15	0.15 ± 0.09	0.61 ± 0.11	0.26 ± 0.02
30	0.015 ± 0.05	0.17 ± 0.10	0.19 ± 0.01

C) LDH

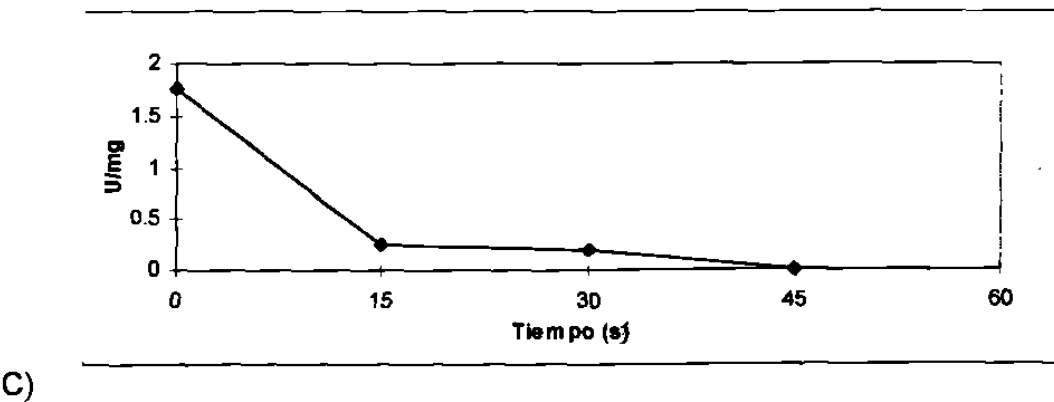
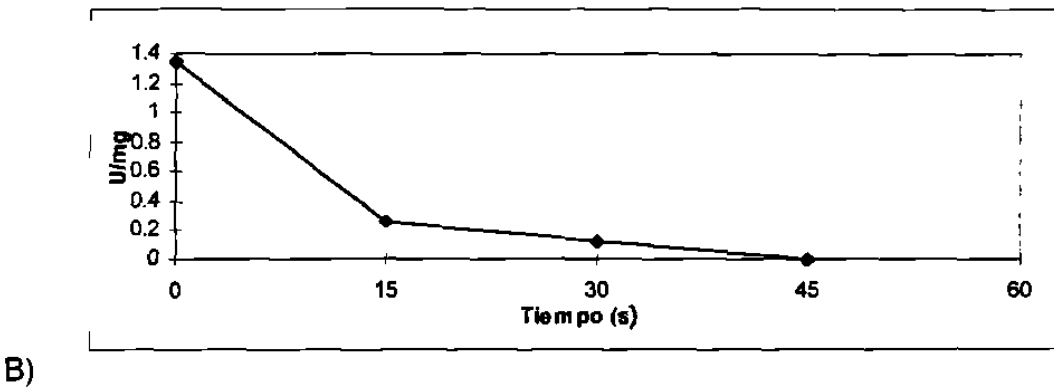
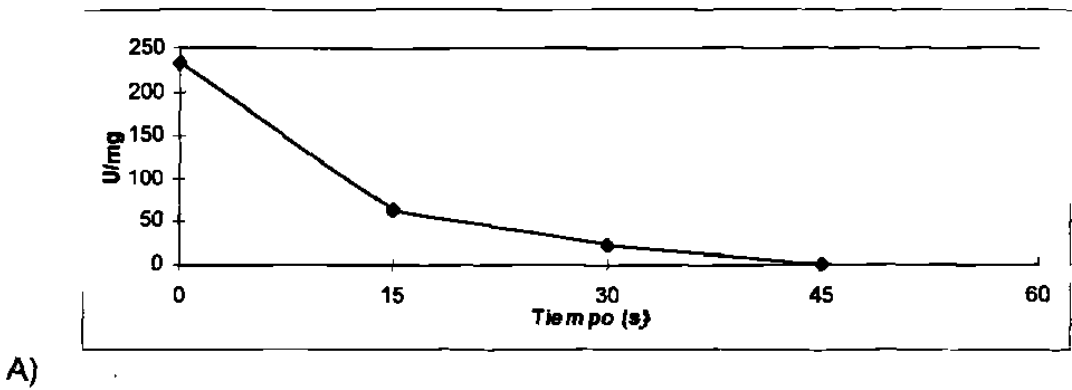


Fig. 9 Actividad específica de las enzimas en el extracto crudo celular, de acuerdo al tiempo de exposición a la radiación de las microondas. (A) catalasa, (B) fumarasa y C) LDH

CAPITULO CUATRO

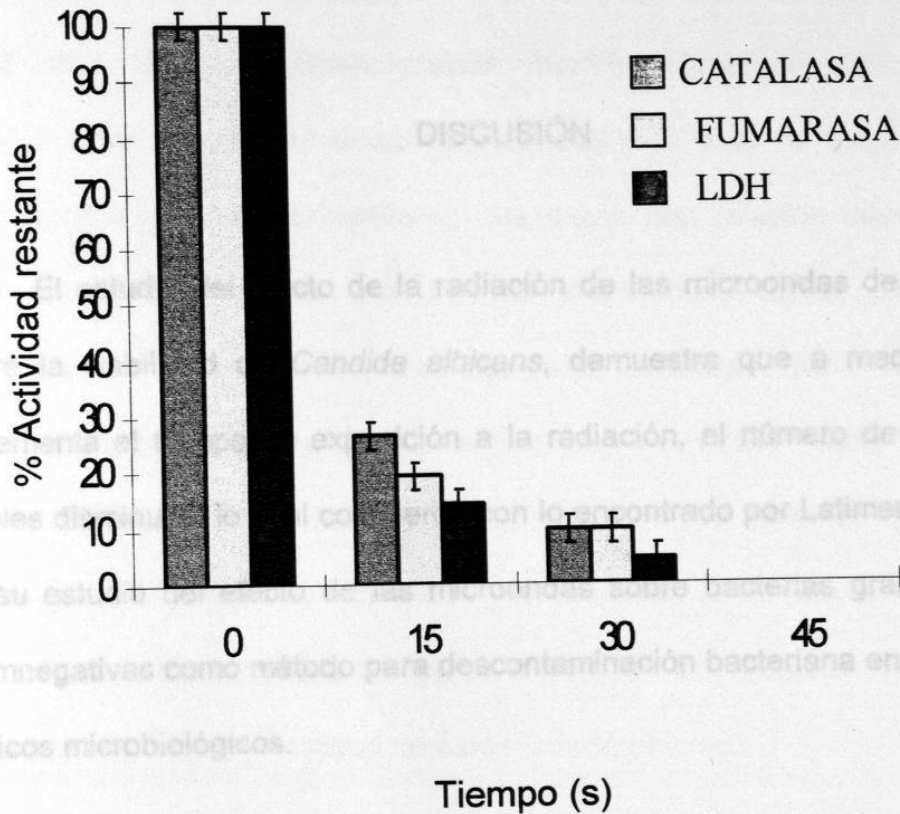


Fig 10 Actividad restante de enzimas con respecto al tiempo de exposición a la radiación

material dental, encontrando un tiempo de 8 min para lograr la descontaminación³¹. A su vez Gates, encontró, que se requieren 10 min, para lograr la destrucción de *Saccharomyces*, en este tipo de material³². Harris en su trabajo, al aplicar las microondas en lentes de contacto suaves contaminados con *Candida albicans*, logró la descontaminación después de 2 min de exposición a la radiación³³. Estos autores, utilizaron un número de células

CAPITULO CUATRO

DISCUSIÓN

El estudio del efecto de la radiación de las microondas de 2 450 MHz sobre la viabilidad de *Candida albicans*, demuestra que a medida que se incrementa el tiempo de exposición a la radiación, el número de organismos viables disminuye, lo cual concuerda con lo encontrado por Latimer y Matsen²⁰ en su estudio del efecto de las microondas sobre bacterias grampositivas y gramnegativas como método para descontaminación bacteriana en laboratorios clínicos microbiológicos.

Roher, reportó el efecto de las microondas sobre *Candida albicans*, en material dental, encontrando un tiempo de 8 min para lograr la descontaminación³¹. A su vez Gates, encontró, que se requieren 10 min, para lograr la destrucción de *Saccharomyces*, en este tipo de material³². Harris en su trabajo, al aplicar las microondas en lentes de contacto suaves contaminados con *Candida albicans*, logró la descontaminación después de 2 min de exposición a la radiación³³. Estos autores, utilizaron un número de células

aproximado de 1×10^4 hasta 1×10^5 UFC/mL. En el presente trabajo se encontró que 60 s, son suficientes para lograr el cien por ciento de letalidad de un inóculo de aproximadamente 1×10^7 UFC/mL de *C. albicans*.

Por otra parte Lechowich y col.¹⁹, evaluando el efecto de las microondas de 2 450 MHz en *Streptococcus faecalis* (*Enterococcus faecalis*) y *Saccharomyces cerevisiae* sobre la viabilidad y la tasa de respiración para estos microorganismos; encontraron que existe una relación directa entre el incremento de la exposición a la radiación y la disminución en ambas: la tasa de respiración y cuentas de células viables en levaduras. Con un tiempo de 5 min se lograron los efectos mencionados, con un inóculo desde 1×10^8 hasta 4×10^8 UFC/mL. En el presente trabajo se demostró también una relación directa, entre el tiempo de exposición y la viabilidad de *C. albicans*. Es decir a medida que se incrementó el tiempo de exposición a la radiación, disminuyó en forma proporcional la viabilidad de este microorganismo.

Goldblith y Wang¹⁷ reportaron el efecto de las microondas como método de esterilización en *Escherichia coli* y esporas de *Bacillus subtilis*. Al comparar el efecto total de esta radiación, demostraron que el grado de inactivación causado por las microondas, es idéntico al causado por los métodos convencionales. Por lo que este tipo de energía, representa una alternativa efectiva como método de esterilización.

Vela y Wu ²² en su investigación sobre el mecanismo de la acción letal de la radiación de 2 450 MHz sobre diferentes microorganismos: bacterias, actinomicetos, hongos y bacteriófagos, en presencia y ausencia de agua, demostraron que los microorganismos solo son inactivados en presencia de agua, lo que concuerda con las propiedades de las microondas de hacer rotar moléculas polares orientándolas en los campos eléctrico y magnético, lo cual produce una elevación térmica.

Rosaspina y col. ²⁴, al estudiar el efecto de las microondas, como un sistema de esterilización, lograron el mismo efecto esterilizante, en un tiempo menor, que el requerido por métodos convencionales.

Aunque el mecanismo de la actividad microbicida de las microondas no está bien dilucidado y existe poca información acerca de la morfología microbiana después de la exposición a la radiación de las microondas, los trabajos de Rosaspina y col. ²⁵, apoyan el hecho de que las microondas tienen efecto sobre las células microbianas, ocasionando cambios observables en la morfología celular con microscopía electrónica de barrido. En sus observaciones las bacterias presentan alteraciones progresivas, consistiendo inicialmente en la formación de perforaciones en la membrana celular de la bacteria y la completa desintegración de los microorganismos, a medida que se incrementa el tiempo de exposición a la radiación.

En este trabajo sobre la ultraestructura por microscopía electrónica de transmisión, se encontró que al incrementar el tiempo de exposición a la radiación de las microondas, el daño celular se hace más evidente, ya que las células de la levadura presentan cambios en su ultraestructura, que van inicialmente modificando el aspecto del citoplasma en los primeros tiempos de exposición, así como fragmentación de las membranas de los organelos, y *progresivamente formación de gránulos gruesos en el citoplasma*, discontinuidad en la pared celular y formación de cuerpos laminares en el citoplasma, formados por fosfolípidos extraídos de las membranas dañadas.

Las observaciones de Rosaspina²⁵ con microscopía electrónica de barrido, al igual que las obtenidas en el presente estudio con microscopía electrónica de transmisión revelan cambios progresivos al incrementar el tiempo de exposición a la radiación de las microondas en las membranas de los microorganismos.

En relación al efecto de las microondas sobre la actividad enzimática, Yeagers y col. mencionan que existen dos mecanismos por los cuales la energía de las microondas puede interactuar con las enzimas; uno de ellos la *absorción directa* a través del proceso de relajación o resonancia o indirectamente a través del calentamiento de las moléculas del solvente por *acción del campo de la microonda*⁴⁰.

En este trabajo, se encontró que la actividad de las enzimas: catalasa, fumarasa y LDH disminuye, a medida que se incrementa el tiempo de exposición a la radiación. Se puede observar como la enzima LDH que se encuentra en el citoplasma es la más afectada, en cuanto a la fumarasa y la catalasa también presentan una disminución pero no tan evidente como la LDH probablemente por ser enzimas presentes en estructuras subcelulares (mitocondria y peroxisoma respectivamente). De acuerdo con lo propuesto por Yeagers sobre los posibles mecanismos de acción de las microondas, los resultados de este trabajo sugieren que la disminución en la actividad de las enzimas puede deberse al calentamiento de las moléculas del solvente, en este caso el agua intracelular.

Con respecto a los resultados obtenidos en este trabajo sobre el efecto de las microondas en la viabilidad de la levadura, se encontró que la radiación de las microondas, destruye a los microorganismos a medida que se incrementa el tiempo de exposición, presentando un efecto esterilizador. Por lo que dicho efecto tiene aplicaciones en la descontaminación de materiales y dispositivos médicos, como sondas y catéteres. La aplicación de éstos conocimientos en el medio hospitalario, brindan un método alternativo de esterilización para dichos materiales y beneficios en cuanto a la reducción de tiempo en la descontaminación de este material, con respecto a los métodos convencionales de esterilización.

Asimismo las observaciones en la ultraestructura de *C. albicans* muestran cambios; primeramente en el citoplasma y van siendo progresivos, hasta llegar a la pérdida de la ultraestructura de las células.

Los resultados obtenidos de la ultraestructura, de la actividad enzimática, así como la viabilidad se correlacionan y muestran el efecto de la radiación de las microondas sobre *C. albicans*.

CAPITULO CINCO

CONCLUSIONES

- * Se cumplió el objetivo del trabajo propuesto, ya que los resultados obtenidos demuestran que la radiación de las microondas de 2 450 MHz sobre las células de *Candida albicans*, afecta la viabilidad, ultraestructura y actividad de enzimas marcadoras de compartimentos celulares.
- * A medida que se incrementa el tiempo de exposición a la radiación, la viabilidad de la levadura disminuye. A nivel morfológico el daño celular se hace más evidente y la actividad enzimática disminuye hasta no ser detectable.
- * De acuerdo con los resultados obtenidos, las proteínas parecen ser el blanco más inmediato de la radiación, ya que el daño sobre estas se traduce como la pérdida de la actividad enzimática y la coagulación citoplasmática.
- * Los hallazgos observados brindan apoyo para comprender los mecanismos de la muerte en células de levadura, y posiblemente para otros tipos de células eucarióticas, por medio de la radiación de baja energía.

APENDICES

APÉNDICES I y II

Tabla IV
Absorbancias de la cinética de crecimiento de
Candida albicans

Tiempo (hr)	Absorbancia (550 nm)*
0	0.041 ± 0.023
1	0.057 ± 0.013
2	0.130 ± 0.020
3	0.267 ± 0.011
4	0.370 ± 0.019
5	0.392 ± 0.020
6	0.436 ± 0.019
7	0.449 ± 0.025
8	0.495 ± 0.022
9	0.540 ± 0.017
10	0.568 ± 0.024
11	0.600 ± 0.030
12	0.660 ± 0.017
13	0.651 ± 0.023
14	0.652 ± 0.024
15	0.640 ± 0.021

*Ensayos realizados por triplicado

TABLA V
Determinación de la cinética de las enzimas

Tiempo (min)	Absorbancia a 240 nm
0	0.781 ± 0.004
1	0.701 ± 0.005
2	0.650 ± 0.014
3	0.613 ± 0.003
4	0.588 ± 0.002
5	0.574 ± 0.006
6	0.561 ± 0.008

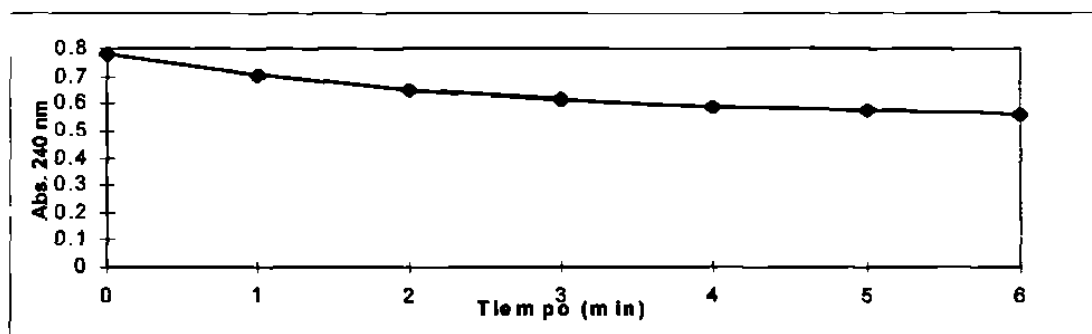
A) Catalasa

Tiempo (min)	Absorbancia a 240 nm
0	1.107 ± 0.010
1	1.135 ± 0.013
2	1.168 ± 0.014
3	1.199 ± 0.009
4	1.227 ± 0.009
5	1.247 ± 0.007
6	1.269 ± 0.011

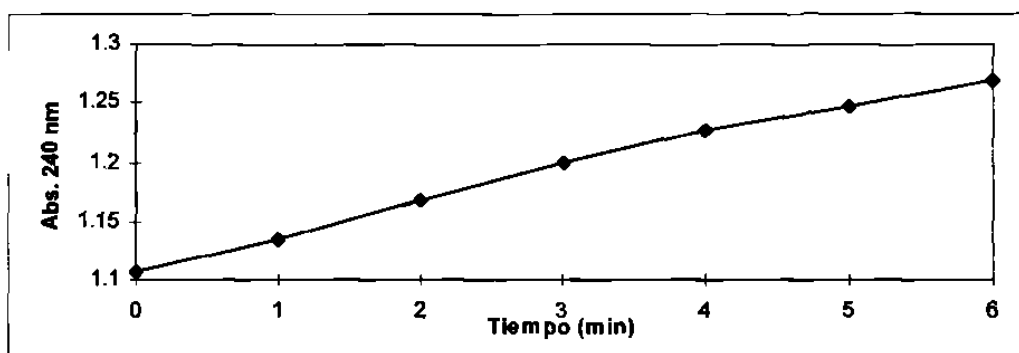
B) Fumarasa

Tiempo (min)	Absorbancia a 340 nm
0	2.678 ± 0.011
1	2.658 ± 0.003
2	2.628 ± 0.014
3	2.604 ± 0.006
4	2.577 ± 0.004
5	2.551 ± 0.005
6	2.528 ± 0.010

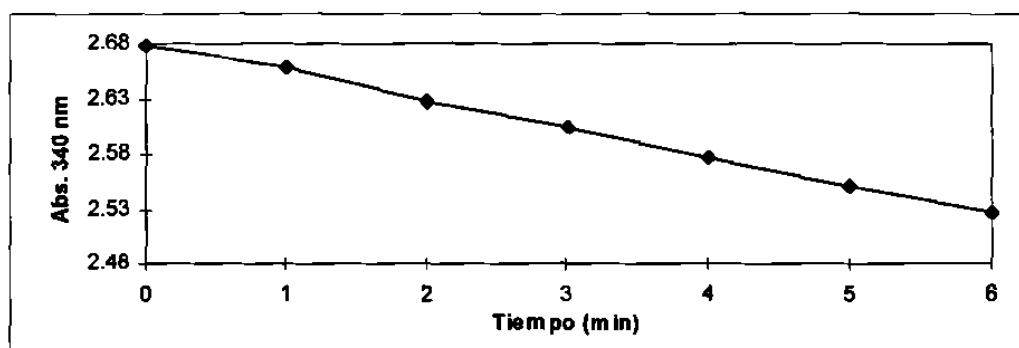
C) LDH



A)



B)



C)

Cinética de la enzimas catalasa (A), fumarasa (B) y LDH (C)

APÉNDICE III

1. Medios de cultivo

1.1 Agar Dextrosa Sabouraud

Composición:

Peptona especial	10.0 g
Dextrosa	40.0 g
Agar-Agar	15.0 g

Se disolvió en un litro de agua destilada, pH final 5.6 ± 0.2 .

Se esterilizó a 121°C a 15 libras de presión por 15 min.

1.2. Caldo Soya Trypticaseína

Composición:

Peptona de carne	17.0 g
Peptona de soya	3.0 g
NaCl	5.0 g
K_2HPO_4	2.5 g
Dextrosa	2.5 g

Se disolvió en un litro de agua destilada, pH final 7.3 ± 0.2 .

Posteriormente se esterilizó a 121°C a 15 libras de presión por 15 min.

1.3. Placas de Agar Soya Trypticaseína

Al medio de cultivo caldo soya tripticaseína se le agregó:

Agar bacteriológico 1.5 g por 100 mL de medio

Se esterilizó a 121°C por 15 min y se dejó enfriar aproximadamente a 45°C para vaciar en placas de Petri estériles.

2. Procedimiento para la determinación de actividad de catalasa

En una cubeta de cuarzo de 1 cm de trayecto óptico se colocó:

Amortiguador de fosfato de potasio 50 mM 950 μ L

Muestra 40 μ L

Se mezcló y se tomó la lectura de absorbancia a 240 nm, esta lectura corresponde al blanco de reactivos

Peróxido de hidrógeno al 30% (1:10) 10 μ L

Se mezcló e inició la cinética por 6 min. La actividad de la catalasa (U/mL) se obtuvo multiplicando el $\Delta A/\text{min}$ por el factor 692.5.

El origen de este factor se describe a continuación: la actividad enzimática se expresa en unidades internacionales (U), definiéndose una unidad como la transformación de 1 μ mol de sustrato o la formación de 1 μ mol de producto por minuto durante la reacción enzimática. Matemáticamente se expresa con la siguiente ecuación:

$$U = \Delta C/t \quad \text{ec'n (1)}$$

En general la actividad enzimática se expresa por unidades de volumen, esto es en U/mL. Donde al despejar ΔC se obtiene:

$$\Delta C = (U/\text{mL}) (t) \quad \text{ec'n (1a)}$$

Las determinaciones espectrofotométricas se basan en la ley de Lambert-Beer. Esta ley establece que el cambio de absorbancia es directamente proporcional tanto a la absortividad molar y al cambio de concentración del compuesto problema, como al trayecto óptico del haz. Matemáticamente se expresa por medio de la siguiente ecuación:

$$\Delta A = (\epsilon) (\Delta C) (d) \quad \text{ec'n (2)}$$

Al sustituir la ec'n(1a) en la ec'n(2) resultará:

$$\Delta A = (\epsilon) (U/mL) (t) (d) \quad \text{ec'n (3)}$$

Al despejar U/mL se obtendrá:

$$U/mL = \Delta A / \epsilon d t \quad \text{ec'n (3a)}$$

donde: U = Unidades de actividad ($\mu\text{mol}/\text{min}$)

ΔA = cambio de absorbancia del compuesto

ϵ = coeficiente de absortividad molar del H_2O_2 ($0.036 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$)

d = espesor de la cubeta (cm)

t = tiempo (min)

ΔC = cambio de concentración del compuesto (μmol)

Entonces:

$$U/mL = \Delta A / (0.036 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}) (1 \text{ cm}) (1 \text{ min})$$

$$U/mL = \Delta A / 0.036 \text{ cm}^3 \text{ min}/\mu\text{mol}$$

$$U/mL = \Delta A (27.7 \mu\text{mol}/\text{min mL})$$

$$U/mL = \Delta A (27.7 U/mL) \quad \text{ec'n (3b)}$$

Para el cálculo de la actividad de catalasa (U/mL), se toman además en cuenta otros parámetros como: el volumen total del ensayo en la cubeta y la dilución de la muestra y se tuvo un volumen de reacción de 1 mL, por lo que la dilución en la cubeta es 1:25.

Integrando estos nuevos parámetros en la ec'n (3b) quedaría de la siguiente forma:

$$U/mL = \Delta A (0.036 U/mL) (\text{dilución en la cubeta}) (\text{vol. en la cubeta})$$

$$U/mL = \Delta A (27.7 U/mL) (25) (1)$$

$$U/mL = (\Delta A) (692.5 U/mL)$$

Al multiplicarse el cambio de absorbancia del peróxido de hidrógeno/min por el factor 692.5 se obtuvo la actividad de la catalasa en la cubeta expresada en U/mL. La actividad de la catalasa en una muestra biológica se calcula considerando la dilución previa de ésta. Cuando se desea conocer la proporción de una enzima con respecto a la cantidad total de proteínas de la muestra se determina la actividad específica de la enzima (U/mg). La actividad específica se calculó dividiendo la actividad de la catalasa (U/mL) entre la concentración de proteínas (mg/mL).

3. Procedimiento para la determinación de actividad de fumarasa

En una cubeta de cuarzo de 1 cm de trayecto óptico se colocó:

Amortiguador de fosfato de potasio 50 M 950 μ L

Malato 0.2 M (dilución 1:50) 40 μ L

Se mezcló y se tomó el valor de la absorbancia a 240 nm, este valor correspondió al blanco de reactivos.

Muestra 10 μ L

Se mezcló e inició la cinética por 6 min. El volumen total del ensayo fue de 1 mL. La actividad de la fumarasa (U/mL) se obtuvo multiplicando el $\Delta A/\text{min}$ por factor 0.068

Este factor se obtuvo de la misma forma ya descrita para catalasa, tomando en cuenta que el coeficiente de absortividad molar del fumarato que es de $\varepsilon = 2.44 \text{ cm}^2 / \mu\text{mol}$.

4. Procedimiento para la determinación de la actividad de LDH

En una cubeta de cuarzo de 1 cm de trayecto óptico se colocó:

Amortiguador de fosfato de potasio 0.1 M	890 μL
Piruvato (16.5 mg/10 mL)	50 μL
NADH (33 mg/10mL)	50 μL

Se mezcló y se tomó el valor de la absorbancia a 340 nm, este valor correspondió al blanco de reactivos.

Muestra	10 μL
---------	------------------

Se mezcló e inició la cinética por 6 min. El volumen total de la reacción fue de 1 mL. La actividad de la fumarasa (U/mL) se obtuvo multiplicando el $\Delta A/\text{min}$ por el factor 0.027

El origen de este factor se obtuvo al igual que para catalasa, tomando en cuenta que el coeficiente de absortividad molar del NADH es de $\varepsilon = 6.22 \text{ cm}^2 / \mu\text{mol}$.

5. Preparación del amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.4

Solución A =	100 mL de KH_2PO_4 1M
Solución B =	100 mL de K_2HPO_4 1M
Solución madre =	Ajustar el pH de la solución B a 7.4 utilizando la solución A, almacenar 4°C. La concentración de fosfato de potasio de la solución madre es 1M
Solución de trabajo =	Realizar dilución 1:20 de la solución madre en agua destilada. La concentración final de esta solución de fosfato de potasio es de 50 mM

6. Preparación del amortiguador de fosfato de potasio 0.1 M, pH 7.0

A partir de la solución madre de fosfato de potasio se preparó el amortiguador de fosfato de potasio 0.1 M, realizando una dilución 1:10

7. Amortiguador para la preparación del extracto celular crudo de *Candida albicans*

Para la preparación del extracto celular crudo se utilizó como amortiguador una solución de fosfato de potasio 10 mM pH 7.4 conteniendo DTE 0.5 mM, PMSF 1 mM y EDTA 2 mM. Estos tres últimos compuestos se adicionaron inmediatamente antes de su uso. La cantidad necesaria de PMSF se tomó de una solución madre al 2% en etanol.

8. Curva de calibración de proteínas

Para cada determinación de proteínas se realizó una curva de calibración con estándares de albúmina sérica bovina conteniendo 2.5 a 20 μg de proteína. Cada uno de los estándares se preparó por triplicado a partir de una solución patrón de albúmina sérica bovina (1 mg/mL) como se describe en la Tabla VI. El volumen final de cada tubo fue de 200 μL . A cada uno de éstos se les agregó 1 mL del reactivo de Bradford (diluído 1:5 en agua destilada). Se agitaron los tubos en vortex y se dejaron reposar 30 min a temperatura ambiente. Se determinó el valor de absorbancia a 595 nm de cada uno de los estándares. Se utilizó el paquete estadístico de Excel para trazar la curva de calibración.

Determinación de la concentración de proteínas del extracto celular crudo de *Candida albicans*

Se prepararon diluciones de la muestra del extracto celular crudo en agua destilada. Alícuotas de 200 μL de cada una de estas diluciones se les agregó un mL del reactivo de Bradford (dilución 1:5 en agua destilada). Se agitaron en vortex, se dejaron reposar por 30 min a temperatura ambiente y posteriormente se les determinó su absorbancia a 595 nm. Los valores de absorbancia de cada dilución se interpolan en la curva de calibración para obtener la cantidad de proteínas (μg) en un volumen de 200 microlitros. Para calcular la concentración de proteínas del extracto celular crudo expresada en mg/mL se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{mg/mL} = \frac{(X) (D) (5)}{1000}$$

donde:

X = cantidad de proteína ($\mu\text{g}/200\mu\text{L}$)

D = dilución realizada

5 = factor para expresar el valor de 1 mL

1000 = factor para transformar de μg a mg/mL

Tabla VI

Estándares para la determinación de proteínas totales

Tubo No	Proteína (μg)	Solución patrón (μL)	Agua destilada (μL)
1	2.5	2.5	197.5
2	5.0	5.0	195.0
3	7.5	7.5	192.5
4	10.0	10.0	190.0
5	12.5	12.5	187.5
6	15.0	15.0	185.0
7	20.0	20.0	180.0
8	0.0	0.0	200.0

9. Técnica de inclusión en resina epóxica

Las muestras se lavaron tres veces con agua destilada, centrifugando 3 min a 3000 rpm. Se fijaron en permanganato de potasio al 1.5% en agua desionizada durante 20 min. Se centrifugaron y las pastillas se lavaron con agua destilada hasta que el sobrenadante fue transparente. Posteriormente se

contrastaron con acetato de uranilo 1% en agua electropura por 60 min y se deshidrataron de la siguiente manera:

15 min en etanol al 50%

15 min en etanol al 70%

15 min en etanol al 90%

15 min en etanol al 96%

15 min en etanol al 100%

60 min en etanol al 100% (2 tiempos)

Se aclararon con óxido de propileno, dos veces durante 15 min.

Se incluyeron en resina epóxica:

60 min en resina epóxica-óxido de propileno (1:1)

3 veces de 60 min en resina epóxica-óxido de propileno (3:1)

2 veces de 30 min en resina epóxica pura

60 min en resina epóxica pura

La polimerización se realizó en placas de plástico a 60°C por 12 horas. De los bloques resultantes se hicieron cortes finos utilizando el ultramicrotomo Ultratome LKB V. Estos cortes fueron contrastados de la siguiente forma: en una placa de petri se colocó un papel parafilm con gotas de acetato de uranilo al 0.5% en solución alcohólica al 50% por 2 min. Posteriormente se lavaron durante un minuto con agua electropura y se secaron. Por último se realizó la observación bajo el Microscopio Electrónico de Transmisión Carl-Zeiss EM 109 a un aumento de 12 000x

Resina Epóxica

En la preparación de la resina epóxica se utilizaron reactivos de la compañía Pelco, en las siguientes cantidades con el fin de lograr la consistencia requerida para procesar las muestras

Resina epóxica	29.0 g
DDSA	21.5 g
NMA	8.5 g
DMP ₃₀	1.0 g

Una vez pesados todos los componentes en un mismo recipiente se mezclaron hasta tener una solución homogénea.

Determinación de la cinética de las enzimas catalasa, fumarasa y LDH.

Previo a la determinación de la actividad específica de las enzimas en el extracto celular crudo, se determinó la cinética de éstas, a partir de enzimas purificadas de la marca Sigma.

Los resultados obtenidos de los ensayos enzimáticos, a lo largo de la prueba de 6 min., con las enzimas purificadas para encontrar la dilución necesaria de cada una de ellas, en donde el cambio de absorbancia fuera gradual a lo largo del tiempo que duró el ensayo, fueron los siguientes: para la enzima catalasa, en la que se midió la disminución del peróxido de hidrógeno a 240 nm, se encontró que fue necesario diluir 1:300 la enzima purificada para lograr el cambio de absorbancia gradual (Apéndice). Los resultados de los valores de densidad óptica, son el promedio de tres mediciones (tabla V-A).

Para la cinética de la enzima fumarasa, se midió la formación de fumarato a 240 nm, el cambio de absorbancia gradual a lo largo del ensayo, se obtuvo con una dilución de la enzima 1:100 (Apéndice, tabla V-B).

En la determinación de la cinética de la enzima LDH purificada, de ésta se hizo una dilución 1:700. En ésta prueba se midió la absorbancia de la disminución de la coenzima NADH, a 340 nm, la cual actúa en la transformación de piruvato a lactato (Apéndice, tabla V-C).

BIBLIOGRAFÍA

1. Thuery, J.. (1982). *Microwaves: industrial, scientific and medical applications*. Artech House, Boston London 3-82
2. Chaspoul, P.. (1982). Utilization of spectrum frequency. *Tech. Ing. Electron.* 1009:13
3. Boon, M.E. and Kok, L.P.. (1988). *Introduction of cookbook of pathology*. De. Coulomb Press Leyden, Leyden Neth. 15-45
4. Sing, R.P. and Hedman, D.R.. (1993). *Introduction of food engineering*. academic Press, 2nd Ed. 206-224
5. Atkins, P.W.. (1984). *Physical Chemistry* 2nd. Oxford University Press. 31-43
6. Agosto, W.. (1976). *Microwave power*, *IEEE Spectr.* 7:24-25
7. Bedrosian, K.. (1984). The necessary ingredients for successful microwave applications. *J. Microw. power* 8:173-178
8. Bryant, J.. (1984). Coaxial transmission lines, connectors and components *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.* 9:970-983
9. Assinder, Y. (1983). *Microwaves for food processing* *Trans. IMPI* 2:77-89
10. McRee, D. I.. (1974). Determination of the absorption of microwave radiation by a biological specimen in a 2 450 MHz microwave field *Health Physics* 26:385-390
11. Douglas, C., Burke, B., Kessler, D.L., Cicmanec, J.F. and Bracken, R.B.. (1990). Microwave: Practical cost-effective method for sterilizing urinary catheters in the home. *Urol.* 35:219-222
12. Hoffman, P. N. and Hanley, M. J.. (1994). Assessment of a microwave-based clinical waste decontamination unit. *J. Appl. Bacteriol.* 77:607-612

13. Culkin, K.A. and Fung, D.Y.C.. (1975). Destruction of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in microwave-cooked soups. *J. Milk Food Technol.* 38: 8-15
14. Wayland, J. R. , Brannen, J. P. and Morris, M. E.. (1977). On the interdependence of thermal and electromagnetic effects in the *Bacillus subtilis* spores to microwave exposure. *Rad. Res.* 71: 251-258
15. Welt, B. A., Brannen, J. L. and Lund, D. B.. (1984). Effect of microwave radiation on inactivation of *Clostridium sporogenes* (PA 3679) spores *Appl. and Environ. Microbiol.* 60: 482-488
16. Furia, L., Hill, D. W. and Gandhi, O. P..(1986). Effect of millimeter-wave irradiation on growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *IEEE Transac. on Bimed. Engineer.* 33:993-999
17. Goldblith, S. A. and Wang, D. I. C.. (1967). Effect of microwaves on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol.* 15:1371-1375
18. Murray, P. R., Kobayashi, G. S., Pfaller, M. A. Rosenthal, K. S.. (1997). *Microbiología Médica.* 2a. Ed. Harcourt Brace. 197-198
19. Lechowich, R. V., Beuchat, L. R., Fox, K. I. and Webster, F. H.. (1969). Procedure for evaluating the effect of 2 450 MHz microwaves upon *Streptococcus faecalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol.* 17:106-110
20. Latimer, J.M. and Matsen, J.M.. (1977). Microwave oven irradiation as a method for bacterial decontamination in a clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 6:340-342
21. Lohmann, S. and Manique, F.. (1986). Microwave sterilization of vials *Journal of Parenteral Science and Technology* 40:25-30
22. Vela, G. R. and Wu, J. F.. (1979). Mecahnism of lethal action of 2 450 MHz radiation on microorganisms. *App. and Environ. Microbiol.* 37:550-553

23. Najadovski, L., Dragas, Z. and Kotnik, V.. (1991). The killing activity of microwaves on some non-sporogenic and sporogenic medically importans strains. *J. Hosp. Infect.* 19:239-247
24. Rosaspina, S. , Salvatorelli, G . and Anzanel, D.. (1994). Prove sperimentali su di un sistema de sterilizzazione a micro-onde. *Minerva Stomatol.* 43:17-21
25. Rosaspina, S., Salvatorelli, G. and Anzanel, D.. (1994). The bactericidal effect of microwaves on *Mycobacterium bovis*. *J. Hosp. Infect.* 26:45-50
26. Abrara, A.. (1981). The effect of Moisture content and enzyme activity on vegetables *J. Microw. Power* 1:31-34
27. Arenas, R..(1993). *Micología Médica*. Interamericana McGraw-Hill 1a. Ed 223-226
28. Bonifaz, A.. (1990). *Micología médica básica*. Francisco Méndez Cervantes 277-280
29. López, R., Méndez, L. J., Hernández, F., Castañón, R.. (1995). *Micología médica*. Trillas,1a. Ed. 99-101
30. Rippon, J. W.. (1990). *Tratado de micología médica*. Interamericana McGraw.Hill. 3a Ed. 403-409
31. Roher, M. D.. (1985). Microwave sterilization. *JADA* 110:194-198
32. Gates, W. D.. (1994). Microbial contamination in four commercially available denture adhesives. *J. P. Dent.* 71:154-158
33. Harris, M.G., Kirby, J.E., Tornatore, C.W. and Wrightnour, J.A..(1989). Microwave disinfection of soft conctac lenes. *Op. and Vis. Sci.* 66:82-86
34. Burnie, J.P..(1985). Outbreak of systemic *Candida albicans* in intensive care unit caused by cross infection. *British Medical Journal* 209:746-748
35. Voss, A., Pfalle, M. A. and Doebbelig, B. N.. (1995). Investigation of *Candida albicans* transmission in a surgical intensive care unit cluster by using genomic DNA typing methods *J. Clin. Microbiol.* 33:576-580

36. Pfaller, M. and Wenzel, R..(1992). Impact of the changing epidemiology of fungal infections in the 1990s. *Eur. J. Clin: Microbiol. Infect. Dis.* 11:287-291
37. Pelczar, M. J. and Chang, E. C. S.. (1961). *Laboratory Exercises in Microbiology* Third ed. McGraw-Hill Book Co. 345
38. Aebi, H..(1974). in: H.U. Bermeier (ed) *Methoden der enzymatischen analyse*, 3rd ed Weinheim. 479-480
39. Bradford, M.. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72:249-255
40. Yeagers, E. K., Langley, J. B., Sheppard, A. P. and Huddleston, G. K. *Effects of microwaves on enzymes.* *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 301-304

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Concepción Melgoza Castillo

Candidato para el grado de
Maestro en Ciencias con Especialidad en Microbiología Médica

Tesis: EFECTO DE LA RADIACIÓN DE LAS MICROONDAS DE 2 450 MHz
SOBRE LA VIABILIDAD; ULTRAESTRUCTURA Y ACTIVIDAD
ENZIMATICA EN *Candida albicans*

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Biografía: Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León, el 23 de
Octubre de 1954, hija de José P. Melgoza Tamayo y Celestina Castillo
Ortiz.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado
obtenido Química Farmacobióloga en 1976

Experiencia Profesional: Maestra de Tiempo Completo en la Facultad de
Enfermería de la Universidad Autónoma de Nuevo León desde 1991.
Encargada del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Enfermería

