

<https://doi.org/10.24245/drm/bmu.v67i5.9132>

Prueba de pirógenos del extracto total proteico de *Candida albicans* mediante la técnica de LAL (lisado de amebocitos de *Limulus*)

Pyrogen test of the total protein extract of Candida albicans by the LAL technique (Limulus amebocytes lysate).

Alejandro Palma Ramos, Jorge Ismael Castañeda Sánchez, Laura Estela Castrillón Rivera

Resumen

OBJETIVO: Conocer si las proteínas que forman el extracto total proteico de *C. albicans* son pirogénicas o pueden administrarse en pacientes con seguridad y confianza.

MATERIALES Y MÉTODOS: Estudio prospectivo efectuado de febrero a noviembre de 2022, en el que se utilizaron cultivos de *Candida albicans*, los cuales fueron sometidos a sonicación para la posterior precipitación de proteínas por el método de *salting out* y su separación y purificación por SDS-PAGE y electroelución, para obtener las proteínas separadas y posteriormente someterlas a la prueba de pirógenos (LAL), tanto a las proteínas individuales como en su conjunto en el extracto total proteico.

RESULTADOS: La prueba de LAL para cada uno de los péptidos probados (85, 75, 65, 47, 40, 35 y 28 kDa) fue negativa y al no tener una respuesta positiva a una sensibilidad de 0.06 UE/mL, no se consideran endotóxicas; para el extracto total (candidina) la concentración de endotoxina es de 0.085 UE/mL y el máximo de 5 UE/mL.

CONCLUSIONES: El extracto total de *Candida albicans* (candidina) tiene mínima actividad de endotoxina, por lo que puede administrarse por vía parenteral.

PALABRAS CLAVE: *Candida albicans*; verrugas; candidina; endotoxina; inmunostimulación.

Abstract

OBJECTIVE: To know if the proteins that form the total protein extract (PET) of *C. albicans* are pyrogenic or can be used in patients safely and confidently.

MATERIALS AND METHODS: Prospective study carried out from February to November 2022, in which *Candida albicans* cultures were used, which were subjected to sonication for the subsequent precipitation of proteins by the salting out method and their separation and purification by SDS-PAGE and electroelution, to obtain the separated proteins and subsequently submit them to the pyrogen test (LAL) both to the individual proteins and as a whole in the total protein extract.

RESULTS: The LAL test for each of the peptides tested (85, 75, 65, 47, 40, 35 and 28 kDa) was negative and since there was no positive response to a sensitivity of 0.06 UE/mL, the endotoxin concentration is 0.085 UE/mL and the maximum is 5 UE/mL, so they are not considered endotoxic for the total extract (candidine).

CONCLUSIONS: The total extract of *Candida albicans* (candidine) has a minimal activity of endotoxin, so it can be administered parenterally.

KEYWORDS: *Candida albicans*; Warts; Candidin; Endotoxin; Immunostimulation.

Laboratorio de Inmunobiología, Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Ciudad de México.

Recibido: abril 2023

Aceptado: abril 2023

Correspondencia

Alejandro Palma Ramos
alpalm@correo.xoc.uam.mx

Este artículo debe citarse como:

Palma-Ramos A, Castañeda-Sánchez JI, Castrillón-Rivera LE. Prueba de pirógenos del extracto total proteico de *Candida albicans* mediante la técnica de LAL (lisado de amebocitos de *Limulus*). Dermatol Rev Mex 2023; 67 (5): 651-658.

ANTECEDENTES

Candida albicans es un hongo dimórfico, es decir, se desarrolla de forma distinta en función de la temperatura de crecimiento, como levadura, normalmente a 37°C en el huésped, y como hongo de aspecto filamentoso a 25°C en la naturaleza. Su reproducción es de forma asexual por gemación. En forma de levadura tiene aspecto de células redondas u ovaladas, de 3-8 x 2-7 micras de tamaño, formando pequeños grupos, mientras que en forma de hongo filamentoso las células se alargan y se diversifican tomando la apariencia de filamentos, pseudohifas o pseudomicelio. El dimorfismo le permite evadir los mecanismos de defensa relacionados con la inmunidad celular del huésped. En forma de levadura se comporta como saprofita, conviviendo en simbiosis con el huésped, mientras que en forma de hongo filamentoso se comporta como un parásito patógeno produciendo síntomas en el huésped. En términos macroscópicos, en agar Sabouraud crece formando colonias blancas, blandas, cremosas y lisas.¹

La candidina (extracto total proteico de *Candida albicans*) se ha utilizado en el tratamiento de verrugas planas,² en los casos en que éstas se consideren resistentes o recalcitrantes (cuando no responden a dos o más esquemas terapéuticos o cuando recidivan en poco tiempo), no hay tratamiento de elección, siendo los métodos destructivos los más utilizados, en estos casos se ha utilizado la candidina como un tratamiento prometedor por su efecto inmunoestimulante.^{3,4} Por otra parte, las verrugas víricas son frecuentes en niños y se ha administrado la candidina como inyección intralesional, ya que induce una respuesta localizada mediada por células.⁵

Como la candidina se ha utilizado en casos de pacientes con verrugas en general, es importante conocer la pirogenicidad de las proteínas que

componen este extracto, ya que uno de los mecanismos de la inmunidad innata frente a verrugas de origen viral está mediado por los interferones de tipo I y la muerte de las células infectadas está mediada por los linfocitos NK (*natural killer*), y la inmunidad adaptativa contra las infecciones virales está mediada por anticuerpos (cuando los virus se encuentran fuera de las células) que bloquean la unión y entrada de los virus a las células del hospedador, mientras que los linfocitos T citotóxicos (TCL) eliminan la infección, matando las células infectadas y estos linfocitos son estimulados por el interferón gamma para mejorar su función.⁶

La prueba de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) se usa para la detección de endotoxinas asociadas con las bacterias gramnegativas, el LAL proviene de la linfa de *Limulus polyphemus* que en inglés se llama *horseshoe crab* y se conoce como cacerola de mar. Sin embargo, este animal prehistórico, aunque parece un cangrejo no lo es, ya que pertenece a los arácnidos. Hace tiempo se observó que cuando el animal tenía una herida formaba un coágulo que la tapaba para impedir el ingreso de contaminantes a su cuerpo, y se trata de una cascada de reacciones en donde una proenzima activa la enzima y ésta actúa sobre la proteína de coagulación, lo que genera un coágulo muy débil que parece más bien un gel y por eso se le denominó a esta prueba *gel clot* en inglés. Este método es cualitativo y el resultado se refiere como menor que. Se especifica la sensibilidad del kit que puede ir desde 0.03 unidades de endotoxina hasta 0.250 unidades de endotoxina.⁷ La prueba de LAL se lleva a cabo como método de control de pirógenos en todas las etapas de producción de fármacos y productos biológicos.^{8,9,10}

El objetivo de este trabajo es conocer si las proteínas que forman el extracto total proteico de *C. albicans* son pirogénicas o pueden administrarse en los pacientes con seguridad y confianza.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo efectuado de febrero a noviembre de 2022, en el laboratorio de Inmunobiología de la Universidad Autónoma Metropolitana, plantel Xochimilco. Se realizó la obtención del extracto total proteico de *Candida albicans*, la identificación y purificación de proteínas del extracto total y se probaron cada una y en conjunto en la prueba de LAL para saber si en particular o en conjunto son pirogénicas.

Obtención del extracto total de *C. albicans*¹¹

Se utilizó la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231. Se cultivó en caldo Sabouraud dextrosa a 37°C durante 5 días, se centrifugó a 5900 x g durante una hora, una vez obtenida la biomasa se adicionaron 100 mL de solución salina fisiológica (0.85% de NaCl) y se sometió a lisis por ciclos de sonicación que constaron de 5 periodos diarios (un minuto de ultrasonido por un minuto de descanso hasta completar 15 minutos de sonicación al 80% de longitud de onda) durante 5 días en baño de hielo (Cole Parmer Ultrasonic processor, 750 watts, modelo CPX 750, Estados Unidos). Luego se centrifugó a 120 x g durante una hora. Al sobrenadante se le adicionó una solución de sulfato de amonio con pH de 7.8 hasta un 50% de saturación y el precipitado se dializó con solución salina de boratos 0.5 mM, pH 7.2 a 4°C durante 5 días. Una vez terminada la diálisis el extracto se centrifugó a 5900 x g durante 20 minutos, se separó el precipitado del sobrenadante y se suspendió en 50 mL de solución salina fisiológica.

El extracto de proteínas se esterilizó por filtración (membrana de 0.45 µm) y se dividió en alícuotas antes de almacenarlo a -70°C. El contenido de proteína total se cuantificó mediante el método estándar de Lowry.

Separación y purificación de las proteínas del extracto total proteico por SDS-PAGE¹²

El extracto total proteico se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%, con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), en condiciones reductoras.

Se separaron las bandas y se sometieron a la técnica de electroelución.

Electroelución

Se corrió un gel de electroforesis con peine ciego utilizando el marcador de pesos moleculares y la muestra, después que las proteínas se separaron por electroforesis fue necesario visualizar las bandas de interés, por lo cual se tiñó una pequeña porción del gel con muestra junto con los pesos moleculares, se empataron los geles, se cortaron las bandas de 28, 35, 40, 47, 65, 75 y 85 kDa y se colocaron en tubos Eppendorf con *buffer* de corrimiento. En el siguiente paso se colocaron los geles en tubos de electroelución con la membrana en la parte inferior y un adaptador de silicón, se corrió la electroelución con 8-10 mA durante 5 horas a 4°C (sistema de electroelución BioRad, BioModel 2010) y se obtuvieron las proteínas purificadas.

Prueba LAL¹³

Kit Limulus Amebocyte Lysate PYROGENT™ 0.25 mL.

Método de formación de gel

1) Preparaciones de *E. coli* (CSE)

- A. Se reconstituyó la endotoxina con 5.0 mL agua
- B. Se agitó el frasco de la endotoxina durante 15 minutos

- C. Se diluyó la endotoxina con agua despirogenizada a una concentración de 1.0 UE/mL.

Con la solución de endotoxina de 1.0 UE/mL se preparó una serie de diluciones que soportaban la sensibilidad del lisado (**Cuadro 1**). Cada dilución se agitó durante 60 segundos antes de proceder a la dilución siguiente.

Se prepararon las diluciones del extracto total proteico de *Candida albicans*. **Cuadro 2**

Al usar los tubos con el reactivo de LAL liofilizado se agregaron 0.25 mL de la solución de prueba. Se incubó la mezcla en las condiciones señaladas por el fabricante ($37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 60 ± 2 min).

Cuadro 1. Diluciones de endotoxina (CSE) como testigo en la prueba de LAL encontrándose un valor de 0.06 EU/mL de sensibilidad

Tubo núm.	Agua (mL)	Volumen de muestra	Concentración de endotoxina (UE/mL)
1	1.0	1.0 mL de 1.0 EU/mL	0.5
2	1.0	1.0 mL del tubo 1	0.25
3	1.0	1.0 mL del tubo 2	0.125
4	1.0	1.0 mL del tubo 3	0.06
5	1.0	1.0 mL del tubo 4	0.03
6	1.0	1.0 mL del tubo 5	0.01

Cuadro 2. Serie de diluciones del extracto total proteico de *Candida albicans*

Tubo núm.	Agua (mL)	Volumen de muestra	Concentración (mg/mL)
1	0	1.0 mL de extracto total proteico	4.318
2	1	1.0 mL del tubo 1	2.159
3	1	1.0 mL del tubo 2	1.080
4	1	1.0 mL del tubo 3	0.540
5	1	1.0 mL del tubo 4	0.270
6	1	1.0 mL del tubo 5	0.135

Al finalizar el periodo de incubación se tomó cada tubo y se invirtieron con un movimiento suave.

Se consideró una prueba positiva cuando el gel se mantenía íntegro al invertir el tubo y una prueba negativa cuando no había formación de un gel firme.

La prueba se consideró válida si:

- El agua libre de endotoxinas (control negativo) daba un resultado negativo.
- Si en la concentración más baja del CSE, el resultado era negativo en todas las réplicas.

El punto final se definió como el último resultado positivo en la serie de diluciones de endotoxina.

Límite de endotoxinas permitido

La Guía de la FDA establece la dosis máxima de producto que puede administrarse y el límite de endotoxinas para cada fármaco. Estos límites se calcularon considerando un peso promedio de 70 kg y la dosis máxima de producto a ser administrado (M). Los límites de endotoxinas por producto también están dados en las farmacopeas, para realizar los cálculos respectivos, se aplican a productos terminados y también a materias primas. **Cuadro 3**

Para determinar la concentración de endotoxina del extracto total proteico de *Candida albicans* se realizó la prueba por duplicado a cada dilución

Cuadro 3. Límites de endotoxinas

	Establecido	Calculado
Dosis máxima	1 mg/70 hg	0.0143 mg/kg
Límite endotoxinas	5 UE/kg	350 UE/mg
Límite endotoxinas/mL	350 UE/mg* 1 mg/mL	350 UE/mL

de la muestra hasta que se alcanzó un punto final; en el caso de las proteínas purificadas sólo se realizó con la concentración total.

Cálculos de las UE/mL

Se calculó la media geométrica de las concentraciones del punto final de la siguiente manera:

Media geométrica de la concentración del punto final = antilog ($\sum e/f$)

Donde:

$\sum e$ = suma de logaritmos de las concentraciones del punto final de la serie de diluciones empleadas.

f = número de réplicas.

Se calculó la dilución de la medida geométrica y se multiplicó por la sensibilidad para obtener la concentración de endotoxina de cada muestra con la siguiente fórmula:

Concentración de endotoxina = sensibilidad lisado x dilución de punto final.

Determinación de la máxima dilución válida (MDV)

La máxima dilución válida fue la dilución máxima permitida de una muestra en la que el límite de endotoxina puede determinarse.

La MDV se calculó mediante la siguiente fórmula:

MDV = límite de endotoxina/ λ

Donde:

El límite de endotoxina es la concentración máxima de toxina permitida en un producto,

que no produce una respuesta clínica pirogénica cuando se administra.

λ = sensibilidad del lisado calculada, expresada en UE/mL, o la concentración más baja de la curva estándar en los ensayos cuantitativos.

El límite de endotoxinas para seres humanos está determinado como 5 unidades de endotoxinas por kilogramo de peso por hora para productos parenterales ($K = 5$ UE/kg). Para la vía intratecal el límite es 0.2 UE/kg/h, el límite para volúmenes grandes de parenterales es de 0.5 UE/mL (Associates of CAPE COD incorporated 2023).

RESULTADOS

Se creció la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 caldo Sabouraud, durante 5 días de incubación a 37°C, se obtuvo el extracto total proteico y se cuantificó la concentración por el método de Lowry dando un valor de 4.318 mg/mL, el cual se corroboró con el método espectrofotométrico a 280 nm en nanodrop. Con esta concentración se trabajó.

Se corrió la electroforesis para observar los pesos moleculares de las proteínas que contiene el extracto total proteico. **Figura 1**

Se purificaron y extrajeron las proteínas del extracto total proteico de *Candida albicans*, por el método de electroelución, obteniéndose las concentraciones que se muestran en el **Cuadro 4**.

Se realizó la prueba LAL al extracto total proteico de *Candida albicans* (candidina) con diluciones al doble (**Cuadro 2**) para calcular las unidades de endotoxina por mililitro; esta prueba se realizó por duplicado y se observó la formación del gel a una concentración de 4.3 mg/mL, en concentraciones menores no se observó la formación del gel.

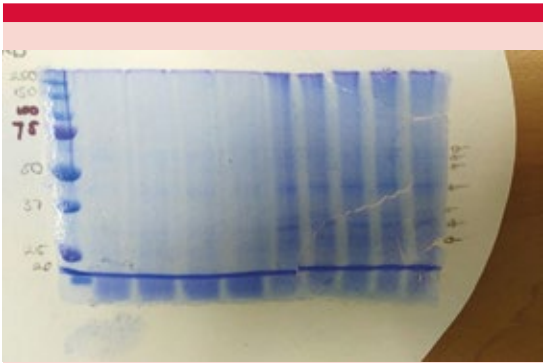


Figura 1. Electroforesis del extracto total proteico de *Candida albicans*, PAGE al 10% en condiciones reductoras.

Cuadro 4. Concentración obtenida de las proteínas purificadas por electroelución del extracto total proteico de *Candida albicans*. Por espectrofotometría a 280 nm (nanodrop)

Peso molecular de las proteínas del extracto total proteico de <i>Candida albicans</i> en kDa	Concentración en mg/mL
85	0.433
75	0.646
65	0.473
47	0.763
40	0.252
35	0.450
28	0.387

Determinación de UE/mL

El cálculo de UE/mL por la prueba de LAL para el extracto total proteico de *Candida albicans* se muestra en el **Cuadro 5**.

Una vez purificadas las proteínas por electroelución se cuantificó la concentración de cada una de las muestras por nanodrop (**Cuadro 4**) y se realizó la prueba LAL para cada una de ellas; los resultados se muestran en el **Cuadro 6**, en donde

se observa que la prueba fue negativa en todas las proteínas purificadas.

DISCUSIÓN

La candidina es un extracto total proteico antigénico obtenido de *Candida albicans*. Las primeras publicaciones de la administración de inmunoterapia con candidina datan de 1979, debido a que se considera que esta levadura prácticamente está presente en el 100% de la población, se utiliza para valorar la competencia inmunológica de tipo tardío.^{4,14,15}

La candidina se ha administrado en el tratamiento de verrugas,² en los casos en que éstas se consideren resistentes o recalcitrantes y al no tenerse un tratamiento de elección, los métodos destructivos son los más utilizados; en estos casos se ha utilizado como tratamiento prometedor por su efecto inmunoestimulante.³

Las verrugas son infecciones de la piel o las mucosas ocasionadas por virus de ADN llamados papilomavirus. Es una infección muy frecuente de alivio espontáneo en un alto porcentaje de casos, excepto en personas inmunodeprimidas. Existen múltiples terapéuticas disponibles (médicas, quirúrgicas e incluso psicoterapéuticas) y el médico de atención primaria debe conocer su existencia para aplicar aquéllas en las que tenga adiestramiento adecuado.¹⁶

Aunque pueden transcurrir uno o dos años, las verrugas más comunes desaparecen sin tratamiento y pueden desarrollarse otras nuevas en áreas cercanas. Algunas personas deciden acudir al médico para tratar sus verrugas porque el tratamiento casero no funciona y las verrugas son molestas, se diseminan o son un problema estético.

Los objetivos del tratamiento son destruir la verruga, estimular una respuesta del sistema inmunitario para luchar contra el virus o ambos.

Cuadro 5. Resultados de la prueba de LAL para el extracto total proteico de *Candida albicans*

	Réplica	Diluciones			
		1	1/2	Punto final	Log ₁₀
Extracto total proteico (candidina)	1	+	-	1	0
	2	-	-	0.5	-0.301
				Promedio	-0.151
				Antilog ₁₀	0.707 = 1/1.415
				Concentración de endotoxina	0.085 UE/mL
				Máxima dilución válida	21 UE/mL

Cuadro 6. Resultado de la prueba de LAL con las proteínas purificadas por electroelución de *Candida albicans*

Peso de proteínas del extracto total proteico de <i>Candida albicans</i> (kDa)	Concentración en mg/mL	Prueba LAL
85	0.433	-
75	0.646	-
65	0.473	-
47	0.763	-
40	0.252	-
35	0.450	-
28	0.387	-

El tratamiento puede demorar semanas o meses. Incluso con tratamiento, las verrugas tienden a reaparecer o a diseminarse.

Por este motivo en este trabajo se estudió la pirogenicidad del extracto total proteico de *Candida albicans*, ya que se ha administrado como tratamiento de verrugas con resultados alentadores;^{2,4} en el cálculo de las unidades de endotoxinas por mililitro (UE/mL), la dilución máxima válida para el extracto total proteico de *Candida albicans* y las proteínas específicas de 28, 35, 40, 47, 65, 75 y 85 kDa por el método de LAL no dieron formación del gel y se consideraron negativas.

Con los resultados obtenidos de las pruebas de LAL se concluye que la concentración de endo-

toxina es de 0.085 UE/mL para el extracto total proteico de *Candida albicans*, cifra baja porque la concentración máxima permitida es de 5 UE/kg por vía parenteral.

En el caso de las proteínas purificadas, al no tener una respuesta positiva a una sensibilidad de 0.06 UE/mL, no se consideran endotóxicas.

CONCLUSIONES

El extracto total proteico de *Candida albicans* tiene mínima actividad de endotoxina, por lo que puede ser administrada por vía parenteral.

REFERENCIAS

1. Mesa LM, Arcaya N, Cañas O, Machado Y Calvo B. Evaluación de los caracteres fenotípicos para diferenciar *Candida albicans* de *Candida dubliniensis*. Rev Iberoam Micol 2004; 21: 135-38.
2. Bonilla L, Vera A, Benuto R. Candidina intralesional en el tratamiento de las verrugas planas en la cara. Piel 2005; 20 (3): 112-114. doi:10.1016/S0213-9251(05)72241-3.
3. Vásquez Chirinos M, Panniello M. Uso intralesional del antígeno de *Candida* como inmunoterapia en el tratamiento de verrugas múltiples y recalcitrantes y su eficacia al año del tratamiento. Dermatol Venez 2018; 56 (2): 29-36.
4. Cruz PD, Padilla DM, Alonzo RP, Palma RA, Peralta PM. Tratamiento con candidina de pacientes con verrugas vulgares resistentes. Dermatol Rev Mex 2011; 55 (1): 9-16.
5. Gerlero P, Hernández MA. Actualización sobre el tratamiento de las verrugas vulgares en los niños. Actas Dermosifiliogr 2016; 107 (7): 551-558. doi: 10.1016/j.ad.2016.04.010.
6. Sánchez RR, Sánchez RE, Rodríguez HN. La respuesta inmune antiviral. Rev Cubana Med Gen Integr 2023; 14 (1): 93-98.

7. Medina BR, Cuesta GE, Cisneros XR, Arzola RJ. Determinación de endotoxinas bacterianas por el método cromogénico cinético en el inyectable Cefepima. Aporte Santiaguino 2019; 12 (2): 174-185. doi:10.32911/as2019.v12.n2.640.
8. Perdomo MR. Ensayo del lisado de amebocitos del Limulus (LAL). Rev Cubana Farm 2004; 38 (1): 1.
9. Cruz Alvarenga A. Los antagonistas fisiológicos de los pirógenos endógenos y su papel en la fiebre. Rev Cient Cienc Med 2019; 22 (2): 36-46.
10. Lebeque PY, Fong LO, Rodríguez LE, Llauredó M, Serrat DM. Evaluación *in vivo* de la pirogenicidad de bioproductos fúngicos con potencial prebiótico. Rev Inf Cient 2022; 101 (3): 1-12.
11. Palma RA, Espinosa AV, Castrillón RL, Nájera MO, Vega MM, Arenas GR, Drago SM, Sainz-ET. Stimulation of the protective response to Actinomycetoma by *Nocardia brasiliensis* in mice treated with *Candida albicans* antigens. Adv Microbiol 2014; 4: 297-305. doi.org/10.4236/aim.2014.4603.
12. Cela E, Beléndez C, Galarón P. Interpretación de la electroforesis de hemoglobina. An Pediatr Contin 2009; 7 (3): 152-155. doi: 10.1016/S1696-2818(09)71119-9.
13. Lisado de amebocitos de Limulus (LAL) Kinetic-QCL™. https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/US/en/document/29927.
14. Hogan DA, Vik, Kolter RA. Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. Mol Microbiol 2004; 54 (5): 1212-1223. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04349.x.
15. Carlisle PL, Banerjee M, Lazzell A, Monteagudo C, y col. Expression levels of a filament-specific transcriptional regulator are sufficient to determine *Candida albicans* morphology and virulence. PNAS 2009; 106 (2):599-604. doi/10.1073/pnas.080406110
16. Revenga AF, Paricio RJ. Las verrugas. Med Integr 2001; 37 (9): 395-403.

Dermatología Comunitaria México AC

Comunica con mucho agrado a todos los interesados, la apertura de su página web que pone a su disposición en la dirección: dermatologiacomunitaria.org.mx

Nuestro objetivo es dar a conocer: quiénes somos, nuestra historia desde los inicios, las etapas por las que hemos atravesado, quiénes han participado en nuestras actividades, las instituciones que nos han apoyado.Cuál es nuestra visión y razón de ser, entre lo que destaca la atención dermatológica a los grupos marginados, la enseñanza constante de la dermatología básica al personal de salud del primer nivel de atención en las áreas remotas y la investigación. Aunque los problemas dermatológicos no son prioritarios por su letalidad, sí lo son por su enorme frecuencia y la severa afectación en la calidad de vida de los que los padecen.

Les mostramos la estructura de nuestros cursos y cómo los llevamos a cabo.

La sección de noticias comparte con los interesados nuestro quehacer mes con mes y el programa anual tiene como objetivo invitarlos a participar en nuestras actividades.

Desde enero de este año está funcionando el Centro Dermatológico Ramón Ruiz Maldonado para personas de escasos recursos y para recibir a los pacientes afectados por las así llamadas enfermedades descuidadas *neglectas*, que nos envía el personal de salud que trabaja en las áreas remotas. Se encuentra ubicado temporalmente en el Fraccionamiento Costa Azul del puerto de Acapulco.

Con un profundo sentido de amistad y reconocimiento le hemos dado este nombre para honrar la memoria de quien fuera uno de los dermatólogos más brillantes de nuestro país, que alcanzó reconocimiento nacional e internacional. Además de haber alentado nuestras actividades participó, acompañado de su familia, en muchas de nuestras jornadas en las comunidades.

Contacto con las doctoras Guadalupe Chávez López y Guadalupe Estrada Chávez.