

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el SECIHTI (Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Maestría en Ciencias  
en Ciencias de la Vida**

---

**Biosíntesis de nanopartículas de plata y óxido de cobre:  
caracterización y efecto antifúngico sobre *Malassezia  
pachydermatis***

Tesis  
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

**Jorge Antonio Villa Nevarez**

Ensenada, Baja California, México  
2025

Tesis defendida por  
**Jorge Antonio Villa Nevarez**

y aprobada por el siguiente Comité

**Dra. Ernestina Castro Longoria**  
Directora de tesis

**Dr. Domingo Martínez Soto**

**Dr. Roberto Cruz Flores**



**Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo**  
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

**Dra. Ana Denise Re Araujo**  
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Jorge Antonio Villa Nevarez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida.

***Biosíntesis de nanopartículas de plata y óxido de cobre: caracterización y efecto antifúngico sobre Malassezia pachydermatis***

Resumen aprobado por:

Dra. Ernestina Castro Longoria  
**Directora de tesis**

La levadura *Malassezia pachydermatis* es un patógeno oportunista de la piel en caninos domésticos; cuando las condiciones se lo permiten, este hongo se reproduce en exceso generando infecciones. En veterinaria, los tratamientos para las micosis son largos y requieren la aplicación de antifúngicos derivados de los azoles. Se ha reportado que el uso prolongado de estos medicamentos puede promover el desarrollo de resistencia a estos antimicóticos. Las nanopartículas metálicas son estructuras con un tamaño menor a los 100 nanómetros y están formadas por átomos de metal. La síntesis biológica de nanopartículas metálicas utiliza una sal precursora del metal y utiliza biomoléculas producidas por organismos como los hongos para catalizar las reacciones de reducción y de estabilización. Las nanopartículas de plata y las nanopartículas de óxido de cobre tienen uso en la medicina como agentes antimicrobianos por su capacidad de eliminar una amplia gama de patógenos, desde bacterias como *E. coli* hasta hongos como *Candida albicans*. Los sobrenadantes producidos con hongos del género *Trichoderma* han sido utilizados para la biosíntesis de nanopartículas metálicas con éxito y presentan efectos fungicidas contra hongos fitopatógenos. En el presente trabajo se aislaron cepas de *Malassezia pachydermatis* de pacientes caninos sanos y con otitis; se confirmó su identidad mediante técnicas moleculares y realizamos análisis filogenéticos con fragmentos de ADN obtenidos de las cepas aisladas. Las cepas se registraron en el cepario del laboratorio como CDM1-Mp1, CDM2-Mp2, CDM3-Mp3 y CDM4-Mp4. Con la finalidad de encontrar sustancias nuevas para el tratamiento de las Dermatitis por *Malassezia* probamos las nanopartículas de óxido de cobre y de plata para determinar su efectividad como antifúngicos contra *M. pachydermatis*. Las CuONPs no presentaron resultados consistentes en las concentraciones evaluadas en este trabajo y las AgNPs demostraron ser efectivas en concentraciones de 1.5 mg/mL contra CDM1-Mp1 y de 0.76 mg/mL contra CDM2-Mp2.

**Palabras clave:** *Malassezia pachydermatis*, *Trichoderma ghanense*, nanopartículas de plata, nanopartículas de óxido de cobre, antifúngico

Abstract of the thesis presented by **Jorge Antonio Villa Nevarez** as a partial requirement to obtain the Master of science degree in Life Sciences.

***Biosynthesis of silver and copper oxide nanoparticles: characterization and antifungal effects on Malassezia pachydermatis***

Abstract approved by:

PhD Ernestina Castro Longoria  
**Thesis Director**

The yeast *Malassezia pachydermatis* is an opportunistic pathogen of the skin of domestic canines; when the conditions allow it, this fungus overgrows, causing infections. In veterinary medicine, the treatment for mycoses is long and requires the application of azole derivatives fungicides. It has been reported that the prolonged use of these drugs can promote the development of resistance to antimycotic medication. Metallic nanoparticles are structures with sizes under 100 nanometers and are formed by metal atoms. Biological synthesis of metallic nanoparticles uses a precursor salt of the metal and utilizes biomolecules produced by organisms like fungi to catalyze the reduction and stabilization reactions. Silver nanoparticles and copper oxide nanoparticles are used in medicine as antimicrobial agents due to their ability to eliminate a wide range of pathogens such as bacteria like *E. coli* and fungi like *Candida albicans*. The supernatants produced with fungi of the genus *Trichoderma* have been used for the biosynthesis of metallic nanoparticles successfully and have fungicidal effects against phytopathogenic fungi. In this study, *Malassezia pachydermatis* strains were isolated from healthy canine patients and patients with otitis; we confirmed their identity using molecular techniques, and the phylogenetic analyses that we performed using DNA fragments obtained from the isolated strains. We recorded the strains in the laboratory strain library as CDM1-Mp1, CDM2-Mp2, CDM3-Mp3 and CDM4-Mp4. To discover new substances for the treatment of *Malassezia* dermatitis, we evaluated copper oxide and silver nanoparticles to determine their effectiveness as fungicides against *M. pachydermatis*. CuONPs did not show consistent results at the concentrations evaluated in this study, and AgNPs were proven to be effective at concentrations of 1.5 mg/mL against CDM1-Mp1 and 0.76 mg/mL against CDM2-Mp2.

**Keywords:** *Malassezia pachydermatis*, *Trichoderma ghanense*, silver nanoparticles, copper oxide nanoparticles, antifungal

## **Dedicatoria**

A mis padres Antonio Villa y Alma Rosa Nevarez; a mis hermanas Alejandra Villa y Karla Villa; a mi sobrina Allison Chávez; quienes me han apoyado desde siempre para poder realizar mis sueños.

A mi tía Ma. Guadalupe Villa, quien con su ejemplo y determinación nos inspiró a muchos a realizar estudios superiores.

## Agradecimientos

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación por financiar este proyecto.

Al Centro de Investigación Científica y de Estudios Superiores de Ensenada, Baja California por permitirme desarrollar esta parte de mi formación académica en sus instalaciones, con su equipo y con el apoyo de su plantel académico y de sus técnicos.

A la Dra. Ernestina Castro Longoria por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto y en su laboratorio, por guiarme e instruirme con su conocimiento y experiencia para poder crecer profesionalmente. Gracias por confiar en mí y apoyarme durante todo el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Domingo Martínez y a los integrantes de su laboratorio por sus aportaciones que ayudaron a mejorar y a enriquecer más este trabajo.

Al Dr. Roberto Flores por sus comentarios y observaciones que aportaron para el desarrollo exitoso y al enriquecimiento de este proyecto.

Al Dr. Antonio Peña Jasso por abrirme las puertas de su hospital y permitirme obtener muestras sus pacientes para poder realizar este trabajo. A su equipo de trabajo incluyendo a la Dra. Herrera por apoyarme con la toma de muestras.

A mis compañeros del laboratorio, la Dra. Sophia González, el Dr. Daniel Rivera, la M.C. Erisneida Campos, el M.C. Elias Trujillo por sus comentarios, sus aportaciones y todo su apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

A mi familia, mis padres, mis hermanas y mi sobrina por el apoyo incondicional que me han brindado toda mi vida. Gracias por sus palabras de aliento y sabiduría, por su afecto y gracias por creer en mí.

A Lenis, Estefania, Grecia y Emil por su apoyo y amistad sincera.

A Dios, por darme el valor, la fuerza y la tenacidad para poder concretar este proyecto.

## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria .....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas .....	xi
<b>Capítulo 1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1 Antecedentes .....	2
1.1.1 Las levaduras <i>Malassezia pachydermatis</i> .....	2
1.1.2 Dermatitis por <i>Malassezia</i> en caninos y en felinos domésticos .....	3
1.1.3 Tratamientos contra <i>Malassezia pachydermatis</i> y la resistencia a antifúngicos.....	5
1.1.4 Las nanopartículas metálicas .....	6
1.1.4.1 Biosíntesis de nanopartículas metálicas .....	8
1.1.5 Los hongos del género <i>Trichoderma</i> .....	9
1.2 Justificación .....	10
1.3 Hipótesis.....	11
1.4 Objetivos .....	11
1.4.1 Objetivo general .....	11
1.4.2 Objetivos específicos.....	11
<b>Capítulo 2. Metodología .....</b>	<b>12</b>
2.1 Aislamiento de cepas de <i>Malassezia pachydermatis</i> .....	12
2.2 Identificación de las cepas de <i>Malassezia pachydermatis</i> .....	13
2.2.1 Identificación morfológica.....	13
2.2.2 Identificación molecular .....	13

2.3	Síntesis de nanopartículas metálicas con sobrenadantes de <i>Trichoderma</i> .....	15
2.3.1	Obtención de los sobrenadantes de <i>Trichoderma</i> spp. ....	15
2.3.2	Pruebas de la actividad antifúngica de los sobrenadantes de <i>Trichoderma</i> spp. ....	16
2.3.3	Síntesis de nanopartículas de óxido de cobre y de nanopartículas de plata .....	16
2.4	Caracterización de las nanopartículas metálicas .....	18
2.5	Pruebas de actividad antifúngica de las nanopartículas metálicas.....	18
2.5.1	Ensayos de actividad antifúngica .....	18
2.5.2	Determinación de la concentración mínima inhibitoria de las nanopartículas de plata ..	19
2.6	Análisis estadístico .....	19
<b>Capítulo 3.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>20</b>
3.1	Aislamiento de cepas de <i>Malassezia pachydermatis</i> .....	20
3.2	Identificación de <i>Malassezia pachydermatis</i> .....	20
3.2.1	Identificación morfológica.....	20
3.2.2	Identificación molecular .....	23
3.3	Biosíntesis de las nanopartículas metálicas con los sobrenadantes de <i>Trichoderma ghanense</i> .....	27
3.3.1	Obtención de los sobrenadantes de <i>Trichoderma</i> spp. ....	27
3.3.2	Pruebas de actividad antifúngica de los sobrenadantes de <i>Trichoderma</i> spp.....	28
3.3.3	Síntesis de las nanopartículas de plata y de óxido de cobre.....	29
3.4	Caracterización de las nanopartículas metálicas .....	30
3.5	Pruebas de actividad antifúngica de las nanopartículas metálicas.....	31
3.5.1	Ensayos de actividad antifúngica .....	31
3.5.2	Determinación de la concentración mínima inhibitoria de las nanopartículas de plata ..	32
<b>Capítulo 4.</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>34</b>
<b>Capítulo 5.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>39</b>
	<b>Literatura citada</b>	<b>40</b>
	<b>Anexos</b>	<b>47</b>

## Lista de figuras

Figura	Página
1. Principales zonas de la piel afectadas por <i>Malassezia</i> en perros y gatos. Obtenido de Hobi et al., (2022). .....	3
2. Anatomía del oído canino. Ilustración hecha por Kip Carter, 2023. ....	4
3. Razas de carnívoros domésticos según su prevalencia de dermatitis por <i>Malassezia</i> . Caninos con mayor prevalencia (A), caninos con menor prevalencia (B) y felinos con mayor prevalencia (C). Imágenes tomadas de <a href="https://www.purina.es/encuentra-mascota">https://www.purina.es/encuentra-mascota</a> .....	5
4. Métodos de síntesis de nanopartículas de plata. Tomado de Fripiat et al., 2025.....	7
5. Mecanismos antifúngicos planteados para las nanopartículas de plata. Ilustración hecha con BioRender.....	9
6. Tubos con medio Stuart de transporte e hisopos con exudado muestreado de pacientes caninos del Hospital Veterinario Peña Jasso.....	12
7. Esquema que representa los marcadores utilizados para la amplificación de diferentes regiones del ADN ribosomal. En verde se marcan los cebadores para la región 18S, en amarillo los cebadores para la región ITS, en azul los cebadores para la región 28S y en rojo los cebadores reportados por Hernández-Escareño (2012) y por Puig (2017). ....	14
8. Cultivos en medio PDA de (A) <i>Trichoderma atroviride</i> , (B) <i>T. ghanense</i> , (C) <i>T. harzianum</i> y (D) <i>Trichoderma</i> spp. (TH-25). Cultivados a 25 °C por 8 días.....	16
9. Diagrama representativo del protocolo seguido para la síntesis de las nanopartículas de plata que se utilizó en este trabajo. Ilustración hecha con BioRender.....	17
10. Diagrama representativo del protocolo seguido para la síntesis de las nanopartículas de plata que se utilizó en este trabajo. Ilustración hecha con BioRender.....	17
11. Morfología macroscópica de las cepas (A) CDM1-Mp1, (B) CDM2-Mp2, (C) CDM3-Mp3 y (D) CDM4-Mp4 morfología colonial de los aislados y (E) una cepa de <i>Malassezia pachydermatis</i> vista con el microscopio confocal de barrido laser Olympus FV1000 teñida con Calcofluor White.....	21
12. Morfología de las colonias de las cepas (A) CDM1-Mp1 y (D) CDM4-Mp4 aisladas de pacientes sanos, y (B) CDM2-Mp2, (C) CDM3-Mp3 aisladas de pacientes con signos de Otitis Externa. 22	
13. Amplificación vista en geles de Agarosa al 1%. Región ITS (700 a 750 bp), ARNr de LSU (550-600 bp) y ARNr de SSU (1200 bp).....	23

14. Secuencias de la región ITS de las cepas aisladas comparadas con dos cepas de <i>M. pachydermatis</i> reportadas en NCBI. En rojo se marcan las similitudes y en negro las diferencias. ....	24
15. Árbol de inferencia filogenética hecho con la región ITS.....	24
16. Alineación de las secuencias de la región LSU de las cepas aisladas comparadas con dos cepas de <i>M. pachydermatis</i> reportadas en NCBI. En rojo se marcan las similitudes y en negro las diferencias.....	25
17. Árbol de inferencia filogenética hecho con la región LSU. ....	25
18. Alineación de las secuencias de la región SSU de las cepas aisladas y comparadas con dos cepas de <i>M. pachydermatis</i> reportadas en NCBI. En rojo se muestran las similitudes y en negro las diferencias.....	26
19. Árbol de inferencia filogenética hecho con la región SSU. ....	26
20. Cultivos de (A) <i>Trichoderma atroviride</i> , (B) <i>T. ghanense</i> , (C) <i>T. harzianum</i> y (C) <i>Trichoderma</i> spp. en medio Caldo Papa Dextrosa a 25 °C después de 5 días. ....	27
21. Sobrenadantes de las diferentes especies de <i>Trichoderma</i> . Sobrenadante 1 (A1) y 2 (A2) de <i>T. asperellum</i> , sobrenadante 1 (B1) y 2 (B2) de <i>T. atroviride</i> , sobrenadante 1 (C1) y 2 (C2) de <i>T. ghanense</i> , sobrenadante 1 (D1) y 2 (D2) de <i>T. harzianum</i> y sobrenadantes 1 (E1) y 2 (E2) de <i>Trichoderma</i> sp.....	27
22. Ensayos de la actividad antifúngica de los sobrenadantes de <i>Trichoderma</i> spp. Caja Petri con el ensayo de difusión en disco de los (A) sobrenadantes 1 y (B) el ensayo con los sobrenadantes 2.....	28
23. Nanopartículas de plata sintetizadas con sobrenadantes de <i>Trichoderma</i> . (A) AgNPs sintetizadas con el sobrenadante 2 de <i>T. atroviride</i> , (B) el sobrenadante 1 y (C) el sobrenadante 2 de <i>T. ghanense</i> y (D) con el sobrenadante 1 de <i>T. harzianum</i> .....	29
24. Nanopartículas de óxido de cobre sintetizadas con los sobrenadantes de <i>Trichoderma</i> . (A) CuONP biosintetizadas con el SN2 de <i>T. atroviride</i> , (B) el SN1 de <i>T. ghanense</i> y (C) el SN2 de <i>T. ghanense</i> y (D) con el sobrenadante 1 de <i>T. harzianum</i> .....	30
25. Caracterización de las nanopartículas de plata. (A) Distribución del potencial Zeta de las AgNP. (B) Medición del radio hidrodinámico de las AgNP. (C) Gráfica de la espectroscopia UV-Visible de las AgNP sintetizadas con el SN2 de <i>Trichoderma ghanense</i> .....	31
26. Morfología y distribución de tamaños de las AgNP. (A) Micrografía de TEM magnificación de 80 kV, barra de escala de 100 nm. (B) Histograma de los tamaños de las AgNP.....	31
27. Resultados de los ensayos de microdilución en placas de SDA. Nanopartículas de óxido de cobre probadas con CDM1-Mp1 (A) y CDM2-Mp2 (B). ....	32

28. Placas representativas de los ensayos para determinar la actividad antifúngica y la CMI de las AgNPs contra la cepa CDM1-Mp1 posterior a 4 días de incubación. Se realizaron tres ensayos con cada concentración de nanopartículas. .... 33
29. Placas representativas de los ensayos para determinar la actividad antifungica y la CMI de las AgNPs contra la cepa CDM2-Mp2 posterior a 2 días de incubación. Se realizaron tres ensayos con cada concentración de nanopartículas. .... 33
30. Pruebas de medición de tamaño de colonias de las cepas de *M. pachydermatis*. (A) Colonias al día 0 en SDA, (B) colonias al día 5 en SDA, (C) colonias al día 7 en SDA, (D) colonias al día 0 en YPDA, (E) colonias al día 5 en YPDA, (F) colonias al día 7 en YPDA. .... 47
31. Gráfica de barras representativa de los ensayos de inhibición con los sobrenadantes. Barras de error con la desviación estándar. \* $p < 0.05$  (ANOVA de una vía). .... 49
32. Resultados de pruebas preliminares para selección de AgNP efectivas contra *M. pachydermatis*. (A) Placa con los resultados de las AgNP contra CDM1-Mp1, (B) resultados de las AgNP contra CDM2-Mp2 después de 24 horas del tratamiento. .... 50

## Lista de tablas

Tabla	Página
1. Lista de especies del género <i>Malassezia</i> reportadas a Julio del 2025. ....	2
2. Información de los pacientes caninos muestreados de Julio a Septiembre del 2024. En gris claro se marcan los pacientes sanos y en gris oscuro los pacientes con signos de otitis. ....	20
3. Relación de información utilizada para el registro y el control de las cepas de <i>Malassezia</i> aisladas. ....	22
4. Datos de los ensayos de inhibición con los sobrenadantes de <i>Trichoderma</i> .....	48

## Capítulo 1. Introducción

---

En la clínica veterinaria, las dermatitis por *Malassezia* (DM) son enfermedades de la piel secundarias a otras afecciones como inmunosupresión, reacciones alérgicas y asociadas a neoplasias (Hobi et al., 2024). Los tratamientos para estas micosis se basan, además del tratamiento de la enfermedad primaria, en la aplicación de antifúngicos derivados de los azoles (DA) por periodos largos (Bajwa, 2023; Bond et al., 2020).

El uso prolongado de antimicóticos puede permitir el desarrollo de resistencia en cepas de *Malassezia pachydermatis* lo que impide la resolución de la patología en los pacientes (Angileri et al., 2018). Los reportes sobre resistencia a fungicidas destacan la necesidad de que la comunidad científica desarrolle nuevas estrategias de control, incluyendo la identificación de compuestos antimicrobianos innovadores y la implementación de tratamientos alternativos que limiten la selección y propagación de cepas resistentes.

Las nanopartículas metálicas (NPM) tienen un uso extenso en la medicina debido a que por su tamaño nanométrico poseen características fisicoquímicas deseables como agentes antimicrobianos, como acarreadores de medicamentos, como adyuvantes en la sanación de heridas, etc. (Wahab et al., 2023). Las metodologías para la fabricación de NPM son la síntesis física, la síntesis química y la síntesis biológica; esta última se caracteriza por utilizar biomoléculas producidas por organismos para realizar la reacción de reducción y estabilización del metal para la formación de las nanopartículas (Fripiat et al., 2025).

Los hongos son una excelente opción para la síntesis de nanopartículas debido a que producen una amplia gama de metabolitos, mismos que se aprovechan para la reacción de síntesis biológica de NPM. Dentro de los hongos mayormente usados se encuentran los del género *Trichoderma*, estos son conocidos por sus propiedades como agentes de control biológico de fitopatógenos y uno de los varios mecanismos de combate de estos organismos es la producción de enzimas hidrolíticas. Al cultivar en este hongo en condiciones de estrés secreta enzimas que son utilizadas para la síntesis de nanopartículas (González et al., 2024).

En el presente trabajo exploramos los efectos antifúngicos de las nanopartículas de óxido de cobre y de las nanopartículas de plata contra *Malassezia pachydermatis*, con el fin de determinar si estas nanopartículas biosintetizadas con sobrenadantes de *Trichoderma ghanense* podrán ser efectivas para el tratamiento de la otitis y/o de las dermatitis por *Malassezia* en caninos domésticos.

## 1.1 Antecedentes

### 1.1.1 Las levaduras *Malassezia pachydermatis*

Los hongos del género *Malassezia* son organismos comensales de la piel de diversos animales, son organismos unicelulares ovoides (de 3 a 8  $\mu\text{m}$ ) que se reproducen por gemación, al observarlas bajo el microscopio se apreciará su morfología característica en forma de cacahuete o huella de zapato. Estos hongos son patógenos oportunistas y causan infecciones de la piel cuando las condiciones en su hospedero son óptimas para ello. Hasta el momento, se conocen 18 especies del género *Malassezia* (Bond et al., 2020; Hobi et al., 2022) y se reportan dos posibles nuevas especies: *Malassezia gallinae* (Zhao et al., 2024) y *Malassezia polysorbatinonusus* (Hiruma et al., 2025). En la Tabla 1 se presentan las especies de *Malassezia* descritas y algunos de sus hospederos.

**Tabla 1.** Lista de especies del género *Malassezia* reportadas a Julio del 2025.

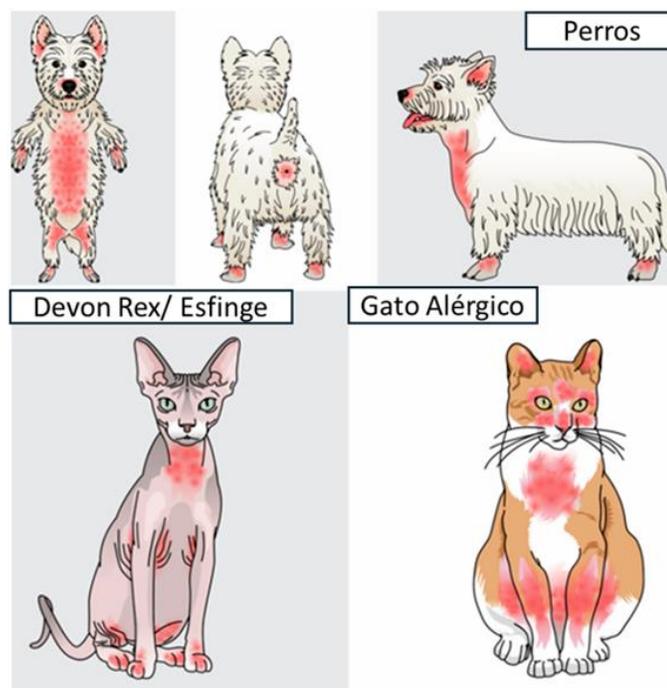
Especie	Hospedero	Referencia
<i>Malassezia furfur</i>	Humanos, perros, gatos, cerdos, etc.	(Robin) Baillon, 1889
<i>Malassezia pachydermatis</i>	Perros, gatos, cerdos, cabras, etc.	(Weidman) Dodge, 1925
<i>Malassezia sympodialis</i>	Humanos, perros, gatos, gallinas, etc.	Simmons & Guého, 1990
<i>Malassezia globosa</i>	Humanos, perros, gatos, etc.	Midgley et al., 1996
<i>Malassezia obtusa</i>	Humanos, perros, gatos, ganado, etc.	Midgley et al., 1996
<i>Malassezia slooffiae</i>	Humanos, gatos, ganado, ovejas, etc.	Guillot et al., 1996
<i>Malassezia restricta</i>	Humanos, perros, gatos, etc.	Guého et al., 1996
<i>Malassezia dermatis</i>	Humanos y gatos	Sugita et al., 2002
<i>Malassezia japonica</i>	Humanos y gatos	Sugita et al., 2003
<i>Malassezia nana</i>	Perros, gatos, gando y caballos	Hirai et al., 2004
<i>Malassezia yamatoensis</i>	Humanos y gatos	Sugita et al., 2004
<i>Malassezia caprae</i>	Cabras, caballos y humanos	Cabañes & Boekhout, 2007
<i>Malassezia equina</i>	Caballos y ganado	Cabañes & Boekhout, 2007
<i>Malassezia cuniculi</i>	Conejos	Cabañes & Castella, 2011
<i>Malassezia arunalokei</i>	Humanos y perros	Honnaivar et al., 2016
<i>Malassezia brasiliensis</i>	Pericos	Cabañes et al., 2016
<i>Malassezia psittaci</i>	Pericos	Cabañes et al., 2016
<i>Malassezia vespertilionis</i>	Murciélagos	Lorch et al., 2016
<i>Malassezia gallinae</i>	Gallinas	Zhao et al., 2024
<i>Malassezia polysorbatinonusus</i>	Humanos	Hiruma et al., 2025

Tabla modificada de Bond et al., (2020).

*M. pachydermatis* se encuentra en la piel y mucosas de carnívoros domésticos, donde generará infecciones de la piel cuando la homeostasis del hospedero se ve interrumpida por otras afecciones (Bond et al., 2020). Poseen una pared celular de 0.2-0.3  $\mu\text{m}$  (200-300 nm) de grosor con un patrón en espiral de su cara interior (David et al., 2007; David M et al., 2003). Esta especie se caracteriza por ser capaz de obtener ácidos grasos de las peptonas presentes en el medio Agar Sabouraud Dextrosa (SDA), lo que permite diferenciarla de las otras especies de *Malassezia* (Guého-Kellermann et al., 2010; Guillot et al., 1996).

### 1.1.2 Dermatitis por *Malassezia* en caninos y en felinos domésticos

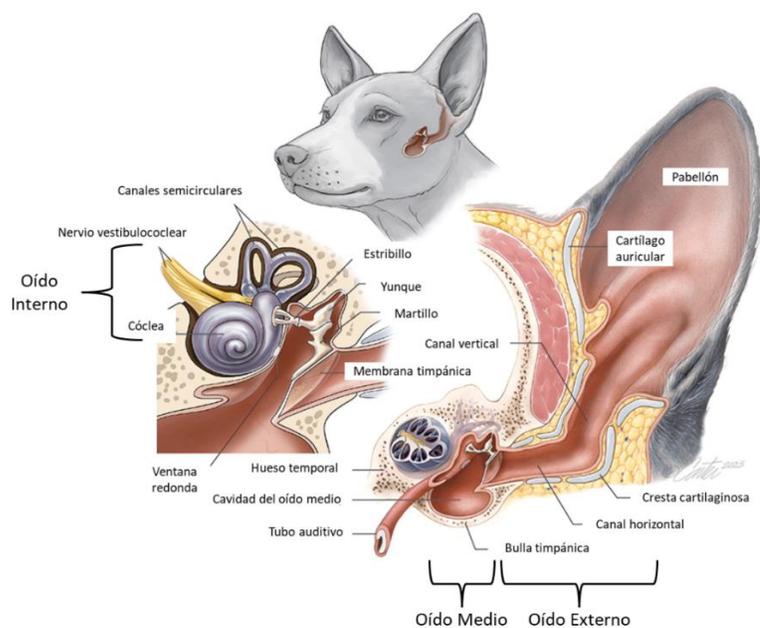
En caninos (*Canis lupus familiaris*) y felinos domésticos (*Felis silvestris catus*), *M. pachydermatis* causa infecciones de la piel o dermatitis (Figura 1) cuando el hospedero tiene defectos en su función inmunológica o endocrina y por enfermedades subyacentes de la piel como la dermatitis atópica. Las patologías que causan irritación excesiva provocan una respuesta de rascado y lamido que daña la capa externa de la piel (Machado et al., 2011), así se pierde la homeostasis hídrica cutánea y adicionalmente se permite la degradación de proteínas y de lípidos de la piel que son consumidos por microorganismos como *M. pachydermatis* que causaran una infección oportunista (Bond et al., 2020).



**Figura 1.** Principales zonas de la piel afectadas por *Malassezia* en perros y gatos. Obtenido de Hobi et al., (2022).

Dentro de las DM la Otitis Externa (OE) es común en la práctica veterinaria, con una prevalencia de alrededor del 10% reportada en Inglaterra (O'Neill et al., 2021). Esta enfermedad se caracteriza por la inflamación del canal auditivo externo (Figura 2) del oído canino (Bajwa, 2019) donde se puede encontrar una gran variedad de microorganismos exacerbando la enfermedad, principalmente bacterias como *Staphylococcus* spp. y levaduras como *M. pachydermatis* (Dinkiva & Rusenova, 2024).

En condiciones favorables, como exceso de humedad y calor en el oído, *M. pachydermatis* se reproducirá en exceso, generando daño a las células de su hospedero por medio de la producción de enzimas líticas como las lipasas (Ro & Dawson, 2005). Al generar daño, se activarán diversas vías de señalización en el cánido que culminarán en la generación de una reacción inflamatoria (Sparber & LeibundGut-Landmann, 2017) que en casos severos puede reducir el diámetro (estenosis) del canal auditivo externo del canino hasta obstruirlo (Eger & Lindsay, 1997).



**Figura 2.** Anatomía del oído canino. Ilustración hecha por Kip Carter, 2023.

Existen factores predisponentes para el desarrollo de estas micosis como las orejas caídas, el pelaje largo, la presencia de pliegues en la piel que permiten la acumulación de humedad y suciedad en diferentes regiones del cuerpo, sin ventilación adecuada permitirá el sobrecrecimiento de *M. pachydermatis*. Las razas con mayor predisposición de desarrollar DM, debido que poseen uno o más factores predisponentes, son los West Highland Terrier, Bóxer, Cocker Spaniel, Shih Tzu, Beagle, Golden Retriever, Basset Hound y Bulldog Inglés (Figura 3A). Las razas con menor probabilidad de desarrollar estas afecciones son los

Chihuahueños, Border Collie, Jack Russel Terrier y Yorkshire Terrier (Figura 3B) (Hobi et al., 2022; O'Neill et al., 2021).

En los felinos es común que la raza Devon Rex y el gato Esfinge (Figura 3C) presenten poblaciones de *Malassezia* elevadas de forma normal (Åhman & Bergström, 2009), por lo que las hace más susceptibles a desarrollar DM. Las patologías relacionadas con *Malassezia* en gatos son secundarias a alergias, neoplasias (Mauldin et al., 2002) en el timo o en el páncreas (Forster-Van Hijfte et al., 1997; Godfrey, 1998), diabetes mellitus (Hobi et al., 2024) o infecciones por virus de inmunodeficiencia felina (Sierra et al., 2000).



**Figura 3.** Razas de carnívoros domésticos según su prevalencia de dermatitis por *Malassezia*. Caninos con mayor prevalencia (A), caninos con menor prevalencia (B) y felinos con mayor prevalencia (C). Imágenes tomadas de <https://www.purina.es/encuentra-mascota>.

### 1.1.3 Tratamientos contra *Malassezia pachydermatis* y la resistencia a antifúngicos

El tratamiento más común para la DM, dependiendo de su presentación (afectando una o más regiones de la piel) es el uso tópico o sistémico de fármacos antifúngicos; dentro de estos medicamentos encontramos a los DA (Bajwa, 2023; Bond et al., 2020), los cuales son fungistáticos en concentraciones bajas y algunos pueden ser fungicidas en concentraciones altas (Manavathu et al., 1998). Estos tienen como mecanismo de acción la inhibición de la enzima lanosterol 14 alfa-desmetilasa que es necesaria para la síntesis del ergosterol, el esteroles que constituye las membranas celulares fúngicas (Campoy, 2017).

Debido a que ambas patologías, DM y OE, se generan de forma secundaria, a otras afecciones, el tratamiento correctivo de la enfermedad primaria debe de realizarse para evitar relapsos (Bajwa, 2019, 2023).

Cada vez son más comunes los reportes de nuevas cepas de microorganismos resistentes a los antimicrobianos y las levaduras *Malassezia* no son la excepción. Los tratamientos para las micosis son largos y costosos, siendo los DA los antifúngicos de uso habitual debido a su amplio espectro de eficacia y por sus bajos costos (Vishkautsan et al., 2023).

En varios manuscritos se reportan cepas de *Malassezia pachydermatis* resistentes a los antifúngicos derivados de los azoles como itraconazol y ketoconazol, entre otros (Watanabe et al., 2017; Murayama & Kano, 2023). El uso prolongado de antifúngicos en concentraciones subóptimas permite el desarrollo de resistencia a estos medicamentos, que en enfermedades causadas por *M. pachydermatis* se traduce en la falla terapéutica en el paciente (Angileri et al., 2018).

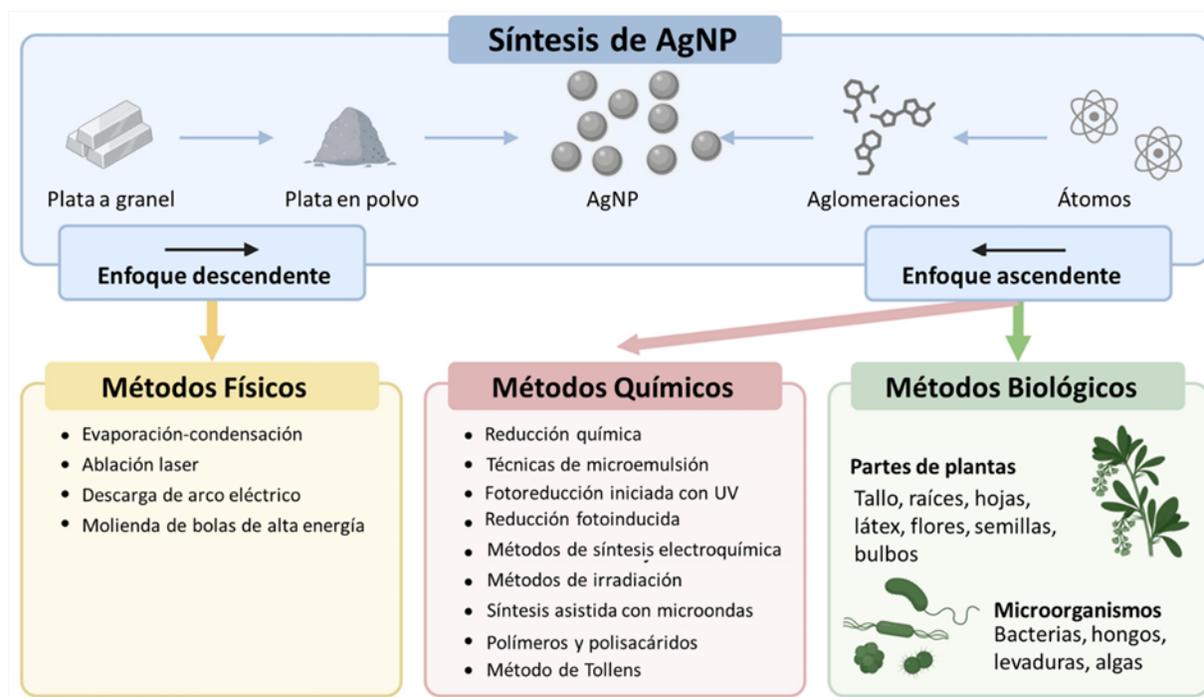
En el caso de *M. pachydermatis* se plantea que mutaciones en el gen ERG11, que codifica para la enzima lanosterol 14 alfa-desmetilasa, inducen una posible sobreproducción de esta enzima o modificaciones en su estructura para reducir la afinidad de los azoles por esta enzima (Kano et al., 2020). Además, se propone que la función de las bombas de eflujo juega un papel importante para eliminar los azoles del espacio intracelular impidiendo que actúen en su sitio diana (Iatta et al., 2017).

#### 1.1.4 Las nanopartículas metálicas

Las nanopartículas metálicas (NPM) son un material derivado de la nanotecnología, una rama de la tecnología que trabaja con estructuras cuyas dimensiones no superan los 100 nm. Además de las nanopartículas, existen otras nanoestructuras como los nano-platos, los nano-cables y las nano-varillas, cada una de estas estructuras con diferentes propiedades conferidas por su conformación (Thepbandit et al., 2024). Dentro de las nanopartículas metálicas encontramos las nanopartículas de oro (AuNPs), las nanopartículas de plata (AgNPs), las nanopartículas de óxido de cobre (CuONPs), las nanopartículas de óxido de zinc (ZnONPs), entre otras.

Existen tres métodos principales para la obtención de nanopartículas: 1) la síntesis física, utiliza energía mecánica, térmica, etc., para reducir el metal de su tamaño a granel a tamaño nanométrico; 2) la síntesis

química, que a partir de una sal precursora del metal se formarán las nanopartículas con la adición de un agente reductor y uno estabilizador; y 3) la síntesis biológica o biosíntesis, esta sigue el mismo método de la química, pero en lugar de agentes químicos utiliza sustancias producidas por organismos como plantas, hongos y bacterias (Bruna et al., 2021).



**Figura 4.** Métodos de síntesis de nanopartículas de plata. Tomado de Frippiat et al., 2025.

Las NPM son utilizadas en diferentes industrias por sus propiedades fisicoquímicas que les confieren efectos tanto antibióticos como antifúngicos, como acarreadores de medicamentos, o como aditivos en el alimento para el ganado (Frippiat et al., 2025). En la Figura 4 se puede observar la variedad de técnicas de los diferentes métodos de síntesis de NPM.

Los mecanismos de acción antifúngicos de las NPM se deben a su tamaño nanométrico, con un tamaño menor a 100 nm tiene afinidad para penetrar la membrana y pared celulares. Las nanopartículas metálicas también tienen la propiedad de tener un radio volumen-superficie de contacto muy alto, es decir, con una cantidad mínima de NPM se puede cubrir un área extensa (Frippiat et al., 2025).

Al estar en contacto con el patógeno, las nanopartículas primero actúan en el exterior adhiriéndose a la pared donde al liberar iones metálicos podrán perforarla y por su tamaño podrán internalizarse. Al acumularse en la membrana impedirán sus funciones y las de sus proteínas de transporte o de eflujo,

también podrían perforar y romper la membrana permitiendo la salida del contenido intracelular (Vázquez-Muñoz et al., 2014).

En el espacio intracelular, las NPM interactúan con los organelos donde causan daño mecánico y participan en la producción de especies reactivas de oxígeno, que a su vez generan estrés oxidativo; al entrar en contacto con el núcleo, generan daño al ADN fúngico (Mussin & Giusiano, 2022). En la Figura 5 se ilustran los mecanismos de acción antifúngica de las AgNP.

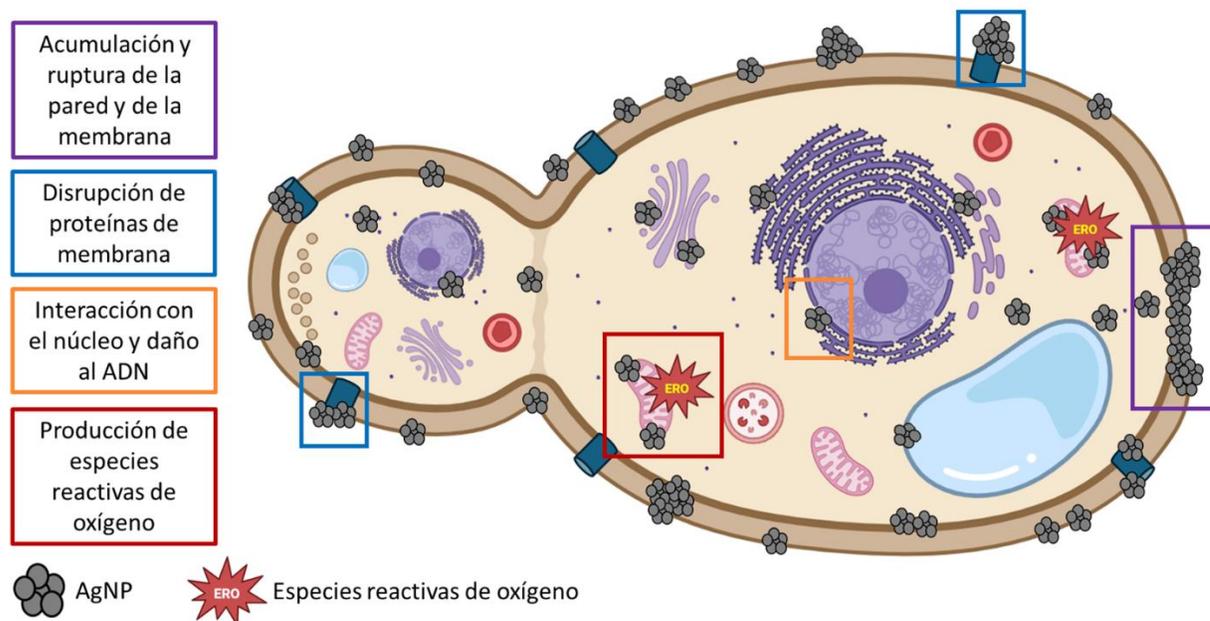
#### 1.1.4.1 Biosíntesis de nanopartículas metálicas

En la síntesis verde se encuentran dos técnicas para la obtención de nanopartículas: la síntesis intracelular y la síntesis extracelular. La síntesis intracelular se agrega la sal precursora metálica al medio de cultivo donde crece el microorganismo para que al internalizarla y por medio de sus enzimas intracelulares se lleve a cabo la reacción de reducción y aglomeración de los iones metálicos, formándose así las NPM. En la síntesis extracelular, se obtienen extractos o sobrenadantes del organismo de interés; con las moléculas orgánicas presentes en el extracto/sobrenadante se realiza la reacción de reducción y estabilización de las nanopartículas (Khandel & Shahi, 2018).

La biosíntesis de nanopartículas metálicas con hongos es una práctica extensa debido a que los hongos son conocidos por su copiosa producción de metabolitos secundarios (Goyal et al., 2017), los cuales fungen como agentes reductores y estabilizadores en la reacción de síntesis (Murillo-Rábago et al., 2022). Los hongos también son una opción económica para la síntesis de NPM, crecen en condiciones de laboratorio sencillas, en medios de cultivo económicos y producen biomasa con mayor velocidad que las bacterias (Siddiqi & Husen, 2016).

Las AgNPs biosintetizadas tienen uso extendido para el combate de patógenos debido a las propiedades antimicrobianas ya conocidas de la plata. Se han publicado trabajos donde las AgNPs han sido efectivas contra diferentes especies de los hongos como *Aspergillus* spp., *Cladosporium pini-ponderosae*, *Bionectria ochroleuca*, *Epicoecum nigrum*, *Exserohilum rostratum*, *Fusarium proliferatum*, *Candida* spp. (Ribeiro et al., 2023) y *Malassezia furfur* (Mussin et al., 2019). Los efectos antifúngicos tanto de las CuONPs como de las AgNPs dependen directamente de la concentración a la que se exponen los patógenos. Por ello, es fundamental determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), definida como la menor concentración del compuesto capaz de inhibir visiblemente el crecimiento del microorganismo (Andrews, 2001).

En el caso de las CuONPs biosintetizadas con hongos han probado sus propiedades antimicrobianas contra diferentes patógenos. En estudios recientes, las CuONPs biosintetizadas probaron ser efectivas contra las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (Flores-Rábago et al., 2023), *Campylobacter jejuni* (Rivera-Mendoza et al., 2024) y levaduras como *Candida albicans* (Garcia-Marin et al., 2022).



**Figura 5.** Mecanismos antifúngicos planteados para las nanopartículas de plata. Ilustración hecha con BioRender.

### 1.1.5 Los hongos del género *Trichoderma*

El género *Trichoderma* presenta hongos filamentosos de distribución cosmopolita, se encuentran en el suelo, en la madera, y como organismos asociados a plantas (Harman et al., 2012; Schmoll & Schuster, 2010). Tienen aplicación en varias industrias, como agentes de control biológico contra fitopatógenos (Thepbandit et al., 2024), promotores del crecimiento y activadores del sistema inmune de las plantas (Alghuthaymi et al., 2022).

El sobrenadante de estos hongos ha sido utilizado con éxito para la síntesis de NPM en varios estudios que demostraron tener propiedades antibacterianas, antifúngicas y en algunos casos presentaron biocompatibilidad en líneas celulares. Garcia-Marin, en el 2022, sintetizó nanopartículas de óxido de cobre con diferentes especies de *Trichoderma*, obteniendo inhibición contra *C. albicans*. También determinó una viabilidad celular del 80% en líneas celulares de mamíferos tratadas con la CMI de *C. albicans* y niveles de

hemólisis abajo del 5%, indicando que las CuONPs sintetizadas con *Trichoderma* son biocompatibles y hemocompatibles (Garcia-Marin et al., 2022).

En el 2023, Shobha y colaboradores sintetizaron nanopartículas de óxido de zinc, con extracto de *Trichoderma asperellum*. En ese estudio demostraron que las ZnONPs biosintetizadas con *Trichoderma* poseen efectos bactericidas logrando inhibir a los patógenos *E. coli* y *S. aureus*. Además, las ZnONPs inhibieron el desarrollo de biopelículas por parte de *S. aureus*. En el 2024, el equipo de Thepbandit utilizó *Trichoderma harzianum* para sintetizar AgNPs. En ese trabajo, las AgNPs tuvieron efectos fungicidas contra los fitopatógenos de la planta yuca (*Manihot esculenta*).

En el 2024 se analizaron los componentes de los sobrenadantes de *Trichoderma* cultivada con *Neurospora crassa*, en ese trabajo encontraron que las moléculas presentes en el sobrenadante son la N-acetilhexosaminidasa, la celulasa y la quinasa (González et al., 2024). Se hipotetiza que la quitinasa ayuda en la actividad antifúngica de las NPM, siendo esta enzima encargada de degradar la quitina de la pared celular de los hongos (Anwar et al., 2023).

En estudios recientes, se analizó la actividad de la enzima quitinasa en nanopartículas fabricadas con sobrenadantes de *Trichoderma*. Se determinó que las nanopartículas sintetizadas con el sobrenadante de *T. ghanense* cultivado en agua desionizada mantuvo una actividad de quitinasa alta en comparaciones con las NPM hechas con otras especies de *Trichoderma* (Campos-Jiménez et al., datos no publicados).

## 1.2 Justificación

Existen reportes de fallas en el tratamiento de dermatitis por *Malassezia* en diversos pacientes caninos. La causa más común es el nulo o errado seguimiento del tratamiento por parte de los dueños del paciente, debido a que los tratamientos son prolongados y complicados de seguir. Además, se ha reportado el descubrimiento de cepas de *M. pachydermatis* resistentes a antifúngicos. Las nanopartículas metálicas han demostrado efectos antifúngicos y antibacteriano contra diversos organismos patógenos y fitopatógenos. En el presente trabajo se analizaron los efectos de nanopartículas metálicas sintetizadas con *T. ghanense* sobre la levadura *M. pachydermatis* con el fin de determinar si las nanopartículas tienen efecto antifúngico sobre este hongo.

### 1.3 Hipótesis

Las nanopartículas de plata y de óxido de cobre sintetizadas con sobrenadante de *Trichoderma ghanense* tienen efectos antifúngicos contra la levadura *Malassezia pachydermatis* in vitro.

### 1.4 Objetivos

#### 1.4.1 Objetivo general

Analizar la actividad antifúngica de las nanopartículas de plata y de óxido de cobre sintetizadas con sobrenadante de *Trichoderma* sobre la levadura *Malassezia pachydermatis*.

#### 1.4.2 Objetivos específicos

1. Identificar *Malassezia pachydermatis* de muestras de pacientes caninos sanos por medio de microscopía y técnicas moleculares.
2. Analizar la actividad antifúngica de sobrenadantes de *Trichoderma* spp. contra *Malassezia pachydermatis*.
3. Sintetizar nanopartículas de plata y de óxido de cobre utilizando sobrenadantes de *Trichoderma* spp.
4. Determinar las características fisicoquímicas de las nanopartículas de plata y de las nanopartículas de óxido de cobre.
5. Evaluar la susceptibilidad de *M. pachydermatis* a las nanopartículas de plata y a las nanopartículas óxido de cobre.

## Capítulo 2. Metodología

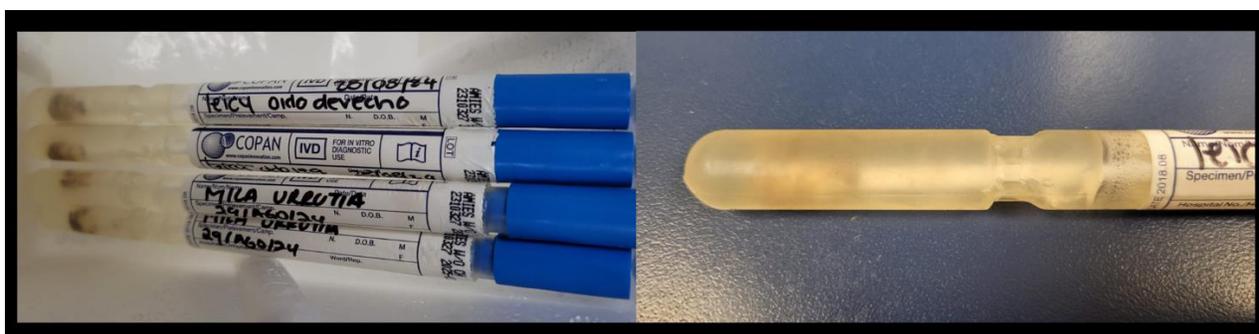
---

### 2.1 Aislamiento de cepas de *Malassezia pachydermatis*

La toma de muestras se llevó a cabo en el Hospital Veterinario Peña Jasso de Ensenada, B.C., el día 7 de julio del 2024 se muestrearon al azar diez pacientes caninos sanos (*Canis lupus familiaris*). Los días 28 y 29 de agosto y el día 4 de septiembre del mismo año se tomó muestra de cuatro pacientes con signos sugestivos a otitis (inclinación de la cabeza, producción de exudado oscuro con olor fétido, etc.) que acudieron a revisión o consulta rutinaria.

Para la toma de muestras de exudados óticos se utilizaron hisopos estériles que se introdujeron de 1 a 1.5 cm dentro del oído externo de los individuos y se frotó en forma circular durante 10 segundos para coleccionar material biológico de la cavidad. Los hisopos con exudado se colocaron en tubos individuales con medio Stuart (Figura 6) etiquetados para transportar al laboratorio en condiciones de refrigeración a 4 °C (Núñez et al., 2022; Omodo-Eluk et al., 2003).

Las muestras se sembraron en cajas Petri con Agar Sabouraud Dextrosa (SDA) de MCD LAB, S.A. de C.V. (Guillot et al., 1996) adicionado con el antibiótico ampicilina (AMP). Se utilizó la técnica de estría cruzada para la inoculación con los hisopos del muestreo. Como control se repitió el proceso con un hisopo estéril sin utilizar almacenado y transportado bajo las mismas condiciones que los hisopos con muestras. Se incubaron a 37 °C por 7 días y fueron observadas cada 24 - 48 horas.



**Figura 6.** Tubos con medio Stuart de transporte e hisopos con exudado muestreado de pacientes caninos del Hospital Veterinario Peña Jasso.

Las colonias producidas por el género *Malassezia* son de color café claro al amarillo, de textura lisa y

cremosa con bordes lisos o ligeramente arrugados (Guého-Kellermann et al., 2010). Una vez que se observó crecimiento de colonias en las placas se tomó muestra de aquellas que tuvieran las características de una colonia de *M. pachydermatis* y se inocularon por medio de piquete en otra placa con medio SDA cuadrículada para aislar las cepas. Se incubaron a 37 °C y cada colonia que creció se analizó bajo el microscopio, las colonias con morfología de levaduras *Malassezia* se cultivaron nuevamente en placas con medio SDA individuales para obtener cultivos puros de cada cepa.

## 2.2 Identificación de las cepas de *Malassezia pachydermatis*

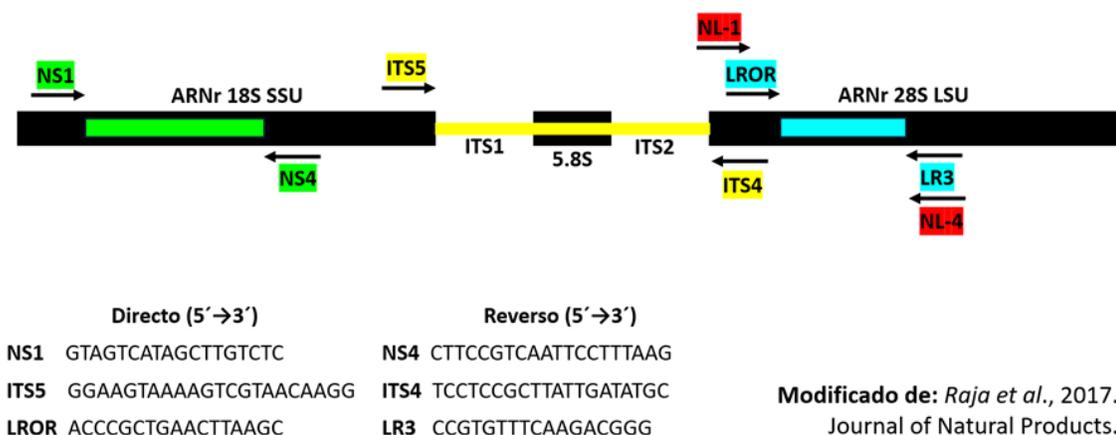
### 2.2.1 Identificación morfológica

El medio SDA es medio selectivo para diferenciar entre especies del género *Malassezia*. La especie *M. pachydermatis* es la única levadura de este género que crece en el medio Sabouraud Dextrosa Agar (Guillot et al., 1996). Para diferenciar la levadura *M. pachydermatis* de otros dermatofitos se realizó un análisis de la morfología macroscópica. Se buscaron colonias con coloración de color crema al amarillo claro, con textura suave y cremosa como mantequilla. Para el análisis de la morfología microscópica se tomó una muestra de una colonia, se colocó en un portaobjetos y se le agregaron tres gotas de azul de algodón lactofenol, se colocó el cubreobjetos y se analizaron bajo el microscopio. Se buscaron células ovoides y con la forma característica de huella de zapato o de cacahuate con tamaños que van desde los 3 a los 8  $\mu\text{m}$  (Bond et al., 2020).

### 2.2.2 Identificación molecular

Para determinar por medio de métodos moleculares el género y la especie de las levaduras aisladas se realizó la extracción de ADN con el equipo DNeasy® Plant Pro-Kit (50), y se utilizaron tres marcadores moleculares. Se amplificó la región ITS con los cebadores ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC), para la amplificación de la región ARNr de LSU se usaron los marcadores LROR (ACCCGCTGAACTTAAGC) con LR3 (CCGTGTTTCAAGACGGG) y los cebadores NS1 (GTAGTCATAGCTTGCTC) con NS4 (CTTCCGTCAATTCCTTAAG) funcionaron para amplificar una porción de la región ARNr SSU (Raja et al., 2017).

### Cebadores para ADN Nuclear Ribosomal



**Figura 7.** Esquema que representa los marcadores utilizados para la amplificación de diferentes regiones del ADN ribosomal. En verde se marcan los cebadores para la región 18S, en amarillo los cebadores para la región ITS, en azul los cebadores para la región 28S y en rojo los cebadores reportados por Hernández-Escareño (2012) y por Puig (2017).

Se realizó PCR para la amplificación de la región ITS siguiendo el siguiente protocolo: 98°C por 1 minuto, 35 ciclos de 98°C por 10 segundos, 56°C por 10 segundos, 72°C por 45 segundos, 72°C por 5 minutos y se mantuvieron a 4°C. Para la amplificación de la región ARNr 18S SSU y de la región ARNr 28S LSU se siguió el protocolo: 98°C por 1 minuto, 35 ciclos de 98°C por 10 segundos, 62°C por 10 segundos, 72°C por 45 segundos, 72°C por 5 minutos y se mantuvieron a 4°C, todos las PCR se realizaron en el termociclador BIO-RAD T100™ Thermal Cycler. Los resultados de la amplificación se sometieron a electroforesis en gel de Agarosa al 1% a 90 V por 45 minutos en el equipo BIO-RAD PowerPac™ Basic y observados en el transiluminador BIO-RAD ChemiDoc XRS+.

Los productos de la amplificación de las tres regiones se mandaron a secuenciar a Eton Bioscience, Inc. Se realizó una limpieza de las secuencias obtenidas con el programa AliView (Larsson, 2014) con el cual se alinearon y se cortaron las regiones de los extremos para obtener la misma longitud en todas las secuencias. Una vez refinadas las secuencias directas y reversas se alinearon mediante AliView para obtener una secuencia consenso para realizar un análisis de porcentaje de identidad en la plataforma BLASTn (Altschul et al., 1990) de la página de NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Para presentar las secuencias obtenidas con cada marcador molecular se realizó una alineación múltiple con el programa de alineación MUSCLE (Edgar, 2004) y se les dio un formato con Boxshade (<https://junli.netlify.app/apps/boxshade/>) que marca con rojo las similitudes y con negro las diferencias,

utilizando secuencias de dos cepas de *M. pachydermatis* reportadas en NCBI que presentaron mayor similitud con las secuencias de nuestras cepas.

Para realizar los árboles filogenéticos seleccionamos secuencias de *M. pachydermatis* compartían mayor similitud con los aislados. También, se utilizaron secuencias de otras especies de *Malassezia* y del organismo *Tilletiopsis minor* como grupos externos para realizar el alineamiento múltiple de las secuencias.

Para el análisis filogenético utilizamos la página NGphylogeny.fr (Lemoine et al., 2019). Se empleó el software MUSCLE para realizar las alineaciones múltiples, el recorte de las secuencias se llevó a cabo con el programa BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy) (Criscuolo et al., 2012). Se realizó un análisis de máxima verosimilitud con PhyML (Guidon et al., 2010) siguiendo un modelo de selección inteligente (SMS) (Lefort et al., 2017) donde se corrieron 500 réplicas de Bootstrap (Lemoine et al., 2018). Los árboles filogenéticos fueron editados con el programa FigTree (Rambaut, 2018).

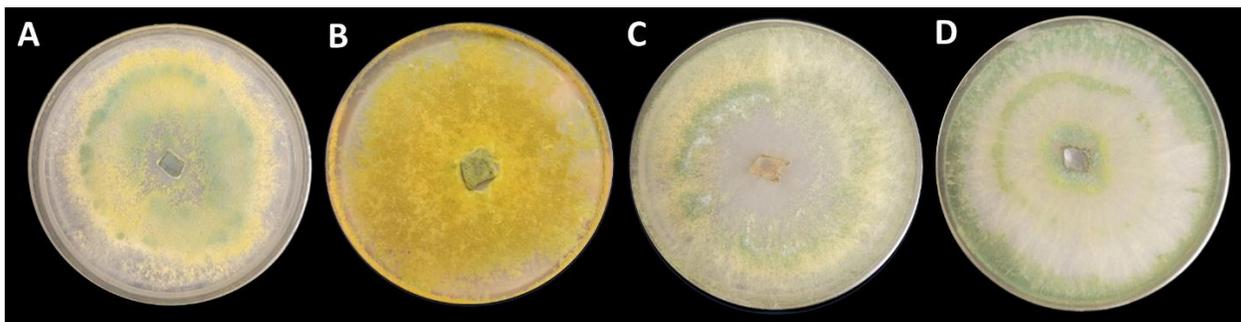
## **2.3 Síntesis de nanopartículas metálicas con sobrenadantes de *Trichoderma***

### **2.3.1 Obtención de los sobrenadantes de *Trichoderma* spp.**

Para la síntesis de nanopartículas primeramente se evaluó el potencial antifúngico de los sobrenadantes de las cepas de *Trichoderma atroviride*, *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. ghanense* y *Trichoderma* sp. proveídas por el Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Las cepas fueron incubadas en Agar Papa Dextrosa (PDA) a 25 °C y almacenadas a 4 °C (Figura 8).

Para la obtención de biomasa fúngica las diferentes especies de *Trichoderma* se cultivaron en Caldo Papa Dextrosa (PDB) y se incubaron a 25 y 33 °C en agitación a 125 rpm durante 8 días. Posteriormente se separó el primer sobrenadante (SN1) de la biomasa fúngica por medio de filtración con tela de fibras sintéticas. El SN1 se centrifugó y se filtró al vacío con una membrana de nitrocelulosa con un diámetro de poros de 0.45 µm, posteriormente se filtró con una jeringa y una membrana de nitrocelulosa con poros de 0.2 µm de diámetro (Flores-Rábago et al., 2023; Murillo-Rábago et al., 2022).

La biomasa de cada hongo se lavó con agua destilada estéril para ser cultivada en agua desionizada estéril en proporción 1:9 (biomasa fúngica: agua desionizada) en un matraz Erlenmeyer a 125 rpm a 25 y 33 °C por 5 días. Posterior a la incubación la biomasa se eliminó por medio de filtración, el sobrenadante (SN2) se centrifugó, y fue filtrado al vacío con una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  y se filtró con una jeringa y una membrana de nitrocelulosa de 0.2  $\mu\text{m}$  (Flores-Rábago et al., 2023; Murillo-Rábago et al., 2022).



**Figura 8.** Cultivos en medio PDA de (A) *Trichoderma atroviride*, (B) *T. ghanense*, (C) *T. harzianum* y (D) *Trichoderma* spp. (TH-25). Cultivados a 25 °C por 8 días.

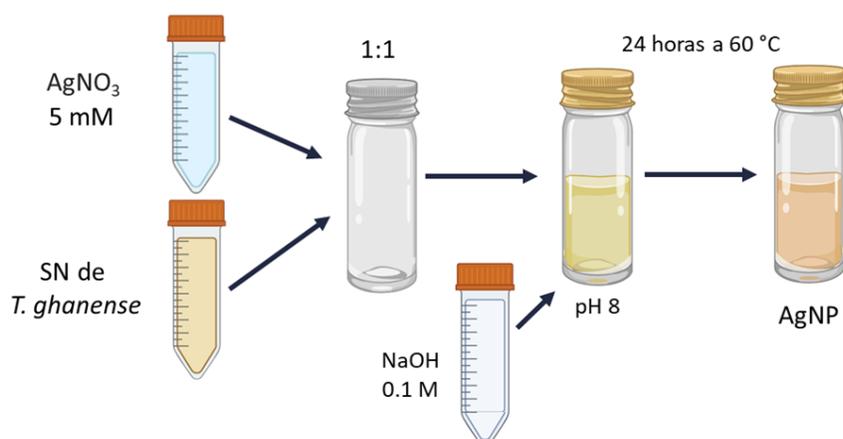
### 2.3.2 Pruebas de la actividad antifúngica de los sobrenadantes de *Trichoderma* spp.

Los sobrenadantes obtenidos fueron sometidos a una prueba de actividad antifúngica para seleccionar el más efectivo contra *M. pachydermatis*. Se realizó una suspensión de las levaduras *M. pachydermatis* (SL) en agua destilada. En una placa Petri con medio SDA se sembraron 300  $\mu\text{L}$  de SL en distribución en tapete. En discos de papel filtro se colocaron 30  $\mu\text{L}$  de SN1 de las cinco cepas de *Trichoderma*, como control positivo se colocó un disco con Ketoconazol (KTZ) en una concentración de 20 mg/mL y otro con KTZ de 40 mg/mL, para control negativo se colocó un disco con 30  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril (Rojas et al., 2017). Se repitió el mismo procedimiento para probar el SN2.

### 2.3.3 Síntesis de nanopartículas de óxido de cobre y de nanopartículas de plata

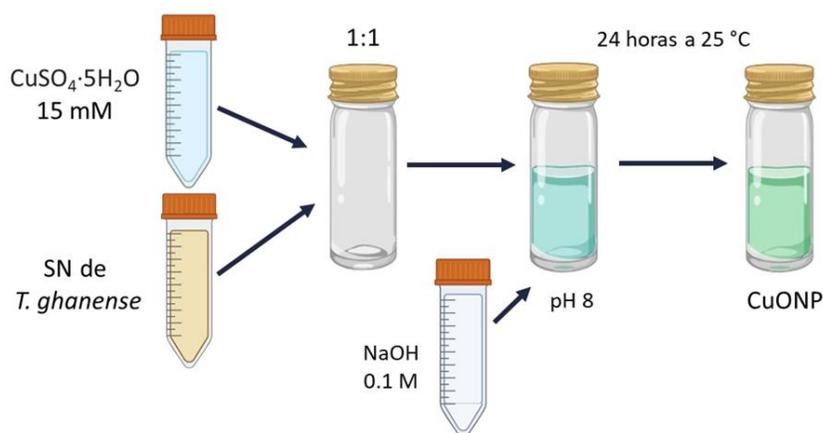
En la síntesis de nanopartículas de plata se realizó una solución de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) de Matheson Coleman & Bell® en una concentración de 5 mM. Se realizaron reacciones de síntesis en una proporción 1:1 ( $\text{AgNO}_3$ :SN), en frascos estériles se mezclaron 5 mL de la solución de  $\text{AgNO}_3$  con 5 mL de sus respectivos sobrenadantes. En el caso del SN2 de *T. atroviride* se ajustó el pH a 7 con NaOH y el potenciómetro Edge™ de HANNA® Instruments. Se dejaron reposar a 60 °C por 24 horas (Murillo-Rábago et al., 2022). Las AgNPs

más efectivas, hechas con el SN2 de *T. ghanense* presentaron un pH de 8. En la Figura 10 se aprecian los pasos seguidos para la biosíntesis de las nanopartículas.



**Figura 9.** Diagrama representativo del protocolo seguido para la síntesis de las nanopartículas de plata que se utilizó en este trabajo. Ilustración hecha con BioRender.

Para sintetizar las nanopartículas de óxido de cobre se preparó una solución con sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) de Sigma-Aldrich® a una concentración de 15 mM. Los sobrenadantes seleccionados fueron el SN2 de *T. atroviride*, los sobrenadantes 1 y 2 de *T. ghanense* y el SN1 de *T. harzianum*. Las nanopartículas fueron sintetizadas en una proporción 1:1 ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ :SN) de volúmenes. En frascos estériles se hizo la mezcla de 3 mL de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  con los 3 mL de su respectivo sobrenadante (Flores-Rábago et al., 2023). Se ajustó el pH a 8 con hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) en una concentración 0.1 M y con el apoyo del potenciómetro Edge™ de HANNA® Instruments. Se dejaron reposar a temperatura ambiente ( $25\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ ) por 24 horas. En la Figura 9 se representa la metodología utilizada para la síntesis.



**Figura 10.** Diagrama representativo del protocolo seguido para la síntesis de las nanopartículas de plata que se utilizó en este trabajo. Ilustración hecha con BioRender.

## 2.4 Caracterización de las nanopartículas metálicas

Para caracterizar las AgNP biosintetizadas se midió el potencial Zeta y el radio hidrodinámico por medio de la dispersión dinámica de luz con el equipo Zetasizer Nano zs90 de Malvern. La espectroscopía de UV-visible se midió con el equipo Perkin Elmer precisely UV-VIS lambda/25 en un rango de longitud de onda de 200 a 800 nm. La morfología de las AgNP se analizó con el Microscopio Electrónico de Transmisión Hitachi H7500 a 80 kV, para realizar este análisis se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de AgNPs en rejillas de cobre de 75 de malla secadas a temperatura ambiente por 1 hora (Flores-Rábago et al., 2023; Murillo-Rábago et al., 2022).

## 2.5 Pruebas de actividad antifúngica de las nanopartículas metálicas

### 2.5.1 Ensayos de actividad antifúngica

Para la determinación de la actividad antifúngica de las NPs se hicieron ensayos de microdilución en caldo (BMD) del CLSI M27-3A con modificaciones. El medio RPMI 1640 se substituyó por Caldo Sabouraud Dextrosa (SDB) debido a que este medio provee un crecimiento óptimo de *M. pachydermatis* (Rincón et al., 2006). Se cultivaron las cepas CDM1-Mp1 y CDM2-Mp2 en SDB a 37 °C por 3 días. Para obtener la suspensión de levaduras (SL), de los cultivos líquidos se realizaron diluciones a las que se les midió su densidad óptica a 530 nm (Rincón et al., 2006) con el espectrofotómetro Multiskan Sky de Thermo Scientific™ y se hicieron diluciones de la suspensión hasta llevarlas a 0.1 en la escala de McFarland, equivalente a  $3 \times 10^8$  levaduras por mililitro (Deegan et al., 2019).

Se prepararon suspensiones con concentraciones de 7.94, 15.88, 23.82, 31.77 y 39.71 mg/mL de CuONPs sintetizadas con las tres especies de *Trichoderma*. En placas con 96 pocillos se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de SDB en cada pocillo, 100  $\mu\text{L}$  de inóculo, 100  $\mu\text{L}$  de diferentes concentraciones de CuONPs (Deegan et al., 2019). Como control negativo se preparó un pocillo con 100  $\mu\text{L}$  de SDB y 100  $\mu\text{L}$  de agua desionizada estéril que se inoculó con 100  $\mu\text{L}$  de la SL. Para el control positivo se colocó un pocillo con 100  $\mu\text{L}$  de SDB, 100  $\mu\text{L}$  de KTZ en concentración de 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de la SL (Deegan et al., 2019) sin CuONPs. Se incubaron a 37 °C por 24 horas y se verificaron los resultados inoculando 10  $\mu\text{L}$  de cada pocillo en placas con SDA e incubándolas por 5 días a 37 °C. Los ensayos se realizaron en triplicado.

### 2.5.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de las nanopartículas de plata

Se prepararon suspensiones con concentraciones de 2.24, 4.49, 6.74, 8.89, 11.23, 13.48, 15.73 y 17.97 mg/mL de AgNPs. En placas con 96 pocillos se colocaron 100  $\mu$ L de SDB en cada pocillo, 100  $\mu$ L de inóculo, 100  $\mu$ L de diferentes concentraciones de las AgNP (Deegan et al., 2019). El control positivo fue un pocillo con 100  $\mu$ L de SDB, 100  $\mu$ L de SL y 100  $\mu$ L de KTZ en concentración de 8  $\mu$ g/mL. Para el control negativo un pocillo con 100  $\mu$ L de SDB y 100  $\mu$ L de agua desionizada que fue inoculado con 100  $\mu$ L de SL (Deegan et al., 2019) sin AgNPs. Se incubaron a 37 °C por 24 horas y posterior a la incubación se confirmaron los resultados cultivando 10  $\mu$ L de cada pocillo en placas con SDA e incubándolas por 5 días a 37 °C. Los ensayos se realizaron en triplicado.

## 2.6 Análisis estadístico

Para determinar si existían diferencias significativas entre las medias de los grupos de los ensayos con los sobrenadantes de *Trichoderma*, se utilizó la prueba ANOVA de una vía en Microsoft Excel. Para determinar el tamaño promedio de las AgNPs se utilizó la función de cálculos del software Image J (Ruende et al., 2017). Debido a que el objetivo de este trabajo es de carácter exploratorio se consideró que no era necesario aplicar pruebas estadísticas inferenciales.

## Capítulo 3. Resultados

### 3.1 Aislamiento de cepas de *Malassezia pachydermatis*

Se obtuvo crecimiento de microorganismos de dos muestras de los pacientes sanos y de dos muestras de los pacientes caninos con signos de Otitis. En la Tabla 2 se puede consultar la información de los pacientes muestreados. Se analizaron las colonias que presentaron rasgos fenotípicos característicos de las levaduras del género *Malassezia* (Figura 11A). Al tener diversas colonias en cada placa, se tomó una muestra de cinco colonias de cada placa y se inocularon con la técnica de picadura en placas cuadrículas con medio SDA (Figura 11B). Las placas con cuadrícula se incubaron a 37 °C por 7 días.

**Tabla 2.** Información de los pacientes caninos muestreados de Julio a Septiembre del 2024. En gris claro se marcan los pacientes sanos y en gris oscuro los pacientes con signos de otitis.

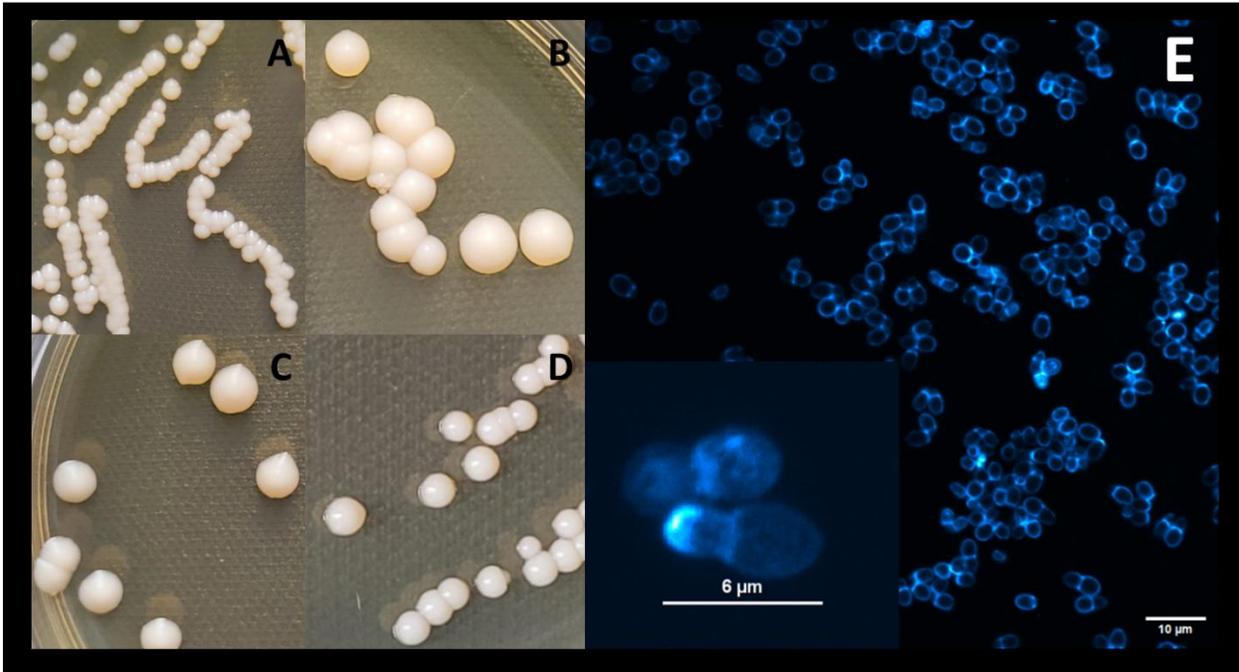
Paciente	Sexo	Raza	Edad	Peso	Sx Otitis	Exudado	Aislamiento
Jackson	Macho	Mix Labrador	13 años	35.5 Kg	No	+++	Negativo
Arya	Hembra	Maltés	5 años	3 Kg	No	-	Negativo
Tomas	Macho	Mestizo	4 años	8.6 Kg	No	-	Negativo
Loki	Macho	Corgi	6 años	12 Kg	No	-	Positivo
Dulce	Hembra	Mestizo	12 años	8.4 Kg	No	-	Negativo
Libertad	Hembra	Mestizo	0.5 años	10.9 Kg	No	-	Positivo
Petaca	Hembra	Mestizo	1 año	20 Kg	No	-	Negativo
Charlot	Hembra	Chihuahueño	4 años	1.8 Kg	No	-	Negativo
Maia	Hembra	Mix Pug	7 años	6.6 Kg	No	-	Negativo
Prieta	Hembra	Mestizo	13 años	40 Kg	No	-	Negativo
Leicy	Hembra	Mestizo	8 años	22 Kg	Si	+++	Positivo
Mila	Hembra	Weimaraner	12 años	25 Kg	Si	+++	Negativo
Lua	Hembra	Golden Retriever	7.5 años	29 Kg	Si	+++	Positivo

### 3.2 Identificación de *Malassezia pachydermatis*

#### 3.2.1 Identificación morfológica

Se analizaron muestras de las colonias aisladas con el microscopio confocal de barrido laser Olympus FV1000 teñidas con Calcofluor White. De las veinte colonias analizadas, diecinueve mostraron células

ovoides y con la forma de huella de zapato. En la Ilustración 11E se puede observar la morfología de una cepa aislada en este trabajo. El aislado presentó una conformación característica de las células del género *Malassezia* en forma de huella de zapato o de cacahuete y una longitud promedio de 6  $\mu\text{m}$ .

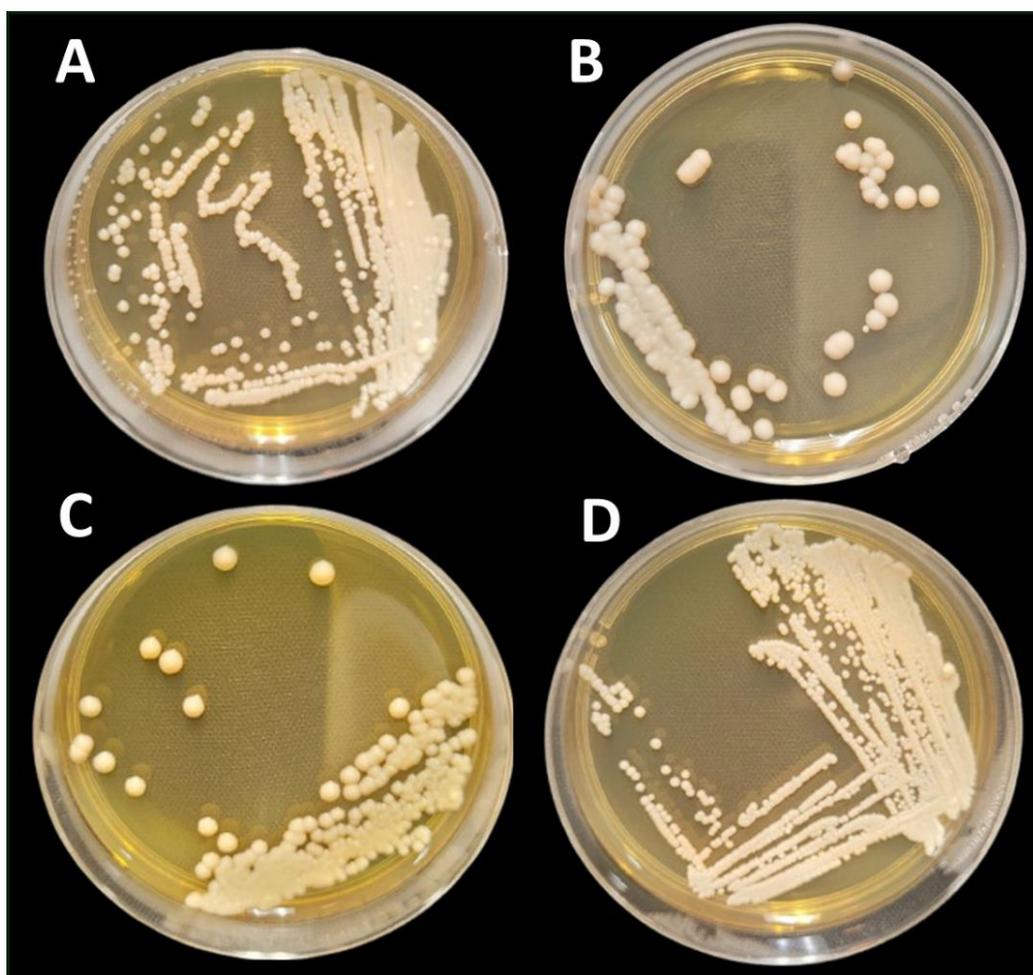


**Figura 11.** Morfología macroscópica de las cepas (A) CDM1-Mp1, (B) CDM2-Mp2, (C) CDM3-Mp3 y (D) CDM4-Mp4 morfología colonial de los aislados y (E) una cepa de *Malassezia pachydermatis* vista con el microscopio confocal de barrido laser Olympus FV1000 teñida con Calcofluor White.

Una vez aisladas las cuatro cepas de *Malassezia* se realizaron pruebas para caracterizarlas. Las cepas CDM1-Mp1 (Figura 11A) y CDM4-Mp4 (Figura 11D) fueron obtenidas de pacientes sanos y los aislados CDM2-Mp2 (Figura 11B) y CDM3-Mp3 (Figura 11C) se obtuvieron de pacientes con otitis.

Los aislados CDM1-Mp1 (Figura 12A) y CDM4-Mp4 (Figura 12C) se caracterizaron por tener un crecimiento promedio de 3-5 días y generar colonias de tamaño de 4-5 mm después de 7 días de incubación. Mientras que CDM2-Mp2 (Figura 12B) y CDM3-Mp3 (Figura 12C) los aislados de pacientes enfermos, presentaron colonias de crecimiento promedio de 1-2 días y de tamaño de 6-7 mm a los 7 días de incubación.

En medio SDA y YPDA se observó un patrón similar en cuanto a su crecimiento y su tamaño de colonias; en medio SDA todas las cepas presentaron una coloración crema con bordes lisos (Anexo A). En la Tabla 3 se puede leer la información que se determinó al analizar la morfología de las colonias producidas por estas cepas de *Malassezia*.



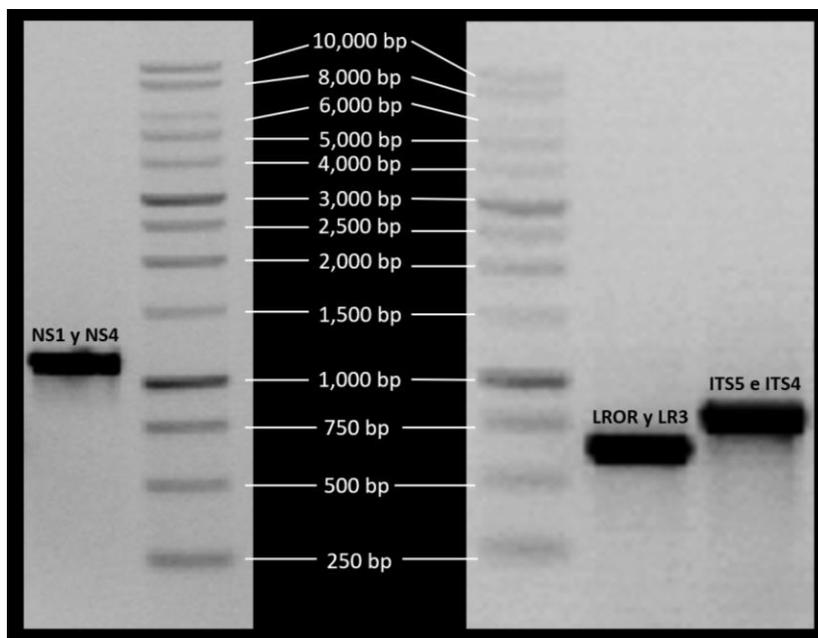
**Figura 12.** Morfología de las colonias de las cepas (A) CDM1-Mp1 y (D) CDM4-Mp4 aisladas de pacientes sanos, y (B) CDM2-Mp2, (C) CDM3-Mp3 aisladas de pacientes con signos de Otitis Externa.

**Tabla 3.** Relación de información utilizada para el registro y el control de las cepas de *Malassezia* aisladas.

Control de Cepas				Morfología					
No. Muestra	Paciente	Cepas	Códigos	Agar Sabouraud Dextrosa			YPDA		
				Color	Tamaño	Borde	Color	Tamaño	Borde
4	Loki	CDM4-Mp4	M0/LK	Crema	4 mm	Liso	Crema	4 mm	Arrugado
6	Libertad	CDM1-Mp1	M1/LT	Crema	5 mm	Liso	Crema	5 mm	Arrugado
11	Leicy	CDM2-Mp2	M2/LE	Crema	6 mm	Liso	Crema	6 mm	Liso/Arrugado
13	Lua	CDM3-Mp3	M3/LU	Crema	7 mm	Liso	Crema	6 mm	Liso
Cepas	Microscopía			Identificación Molecular				Identidad	
	M. Óptico	Fotos	LSCM	Ext. ADN	PCR	Secuenciación	Filogenia	Género	Especie
CDM4-Mp4	Sí	Sí	No	No	No	No	No	<i>Malassezia</i>	<i>sp.</i>
CDM1-Mp1	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	<i>Malassezia</i>	<i>pachydermatis</i>
CDM2-Mp2	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	<i>Malassezia</i>	<i>pachydermatis</i>
CDM3-Mp3	Sí	Sí	No	Sí	Sí	Sí	Sí	<i>Malassezia</i>	<i>pachydermatis</i>

### 3.2.2 Identificación molecular

La amplificación de la región ITS con los cebadores ITS5 e ITS4 resultó con un producto de 700 a 750 bp, la región de ARNr de SSU amplificada con los cebadores NS1 y NS4 produjo una banda de aproximadamente 1200 bp y la región ARN de LSU analizada con los marcadores LROR y LR3 presentó un producto de 550-620 bp (Figura 13).



**Figura 13.** Amplificación vista en gels de Agarosa al 1%. Región ITS (700 a 750 bp), ARNr de LSU (550-600 bp) y ARNr de SSU (1200 bp).

En las alineaciones múltiples con las secuencias de la región ITS de las tres cepas y de dos cepas de *M. pachydermatis* se observó que los aislados CDM2-Mp2 y CDM3-Mp3 compartían mayor similitud entre ambas y con el aislado de *M. pachydermatis* CBS:6541 (KY104159.1). El aislado CBS:6541 presentó una similitud del 99.87% con CDM2-Mp2 y del 100% con CDM3-Mp3. Por otro lado, el aislado CDM1-Mp1 y la cepa *M. pachydermatis* MA366 (KY655274.1) presentaron un porcentaje de similitud del 99.67%. La alineación múltiple de esta región se presenta en la Figura 14.

En la Figura 15 se muestra el árbol filogenético hecho con la alineación múltiple de la región ITS de las levaduras aisladas en este trabajo, de las cepas de *M. pachydermatis*, de las otras especies de *Malassezia* y de *Tilletiopsis minor* tomadas de NCBI. En este árbol podemos ver que las ramas que separan a los

subclados están bien soportadas y que dentro del subclado de *M. pachydermatis* se posicionan las levaduras obtenidas en este trabajo.

```

1 .....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....100.....110.....120.....130.....140.....150
CDM2-Mp2 1 CCTGTATGGCC--GAGCGCACGCACTTACAACAACTCGTATGTTGTATGTACGTTGTAAAGCTTGGACCTCACTGGCCAAACAAC--TTTATACAACCTTGCACAACGGATCTCTTGGTCTCCCATCGATGAAGAACGCGAGCAAAAG
CDM3-Mp3 1 CCTGTATGGCC--GAGCGCACGCACTTACAACAACTCGTATGTTGTATGTACGTTGTAAAGCTTGGACCTCACTGGCCAAACAAC--TTTATACAACCTTGCACAACGGATCTCTTGGTCTCCCATCGATGAAGAACGCGAGCAAAAG
Mp-CBS-6541 1 CCTGTATGGCC--GAGCGCACGCACTTACAACAACTCGTATGTTGTATGTACGTTGTAAAGCTTGGACCTCACTGGCCAAACAAC--TTTATACAACCTTGCACAACGGATCTCTTGGTCTCCCATCGATGAAGAACGCGAGCAAAAG
CDM1-Mp1 1 TGTATATGGCCGAGAGCGCACGCACTTACAACAACTCGTATGTTGTATGTACGTTGTAAAGCTTGGACCTCACTGGCCAAACAAC--TTTATACAACCTTGCACAACGGATCTCTTGGTCTCCCATCGATGAAGAACGCGAGCAAAAG
Mp-MA366 1 TGTATATGGCCGAGAGCGCACGCACTTACAACAACTCGTATGTTGTATGTACGTTGTAAAGCTTGGACCTCACTGGCCAAACAAC--TTTATACAACCTTGCACAACGGATCTCTTGGTCTCCCATCGATGAAGAACGCGAGCAAAAG

151 .....160.....170.....180.....190.....200.....210.....220.....230.....240.....250.....260.....270.....280.....290.....300
CDM2-Mp2 148 CGATAGGTAATGTAATGGAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTGAACGCACCTTGGCCTCATGGTATCCGTGGAGCATGCTGTTTGGTGGCCGGAATCTCCCAACCCCAACGGTTGCCGAAAGGACTGTGGCGGAGAGGG
CDM3-Mp3 148 CGATAGGTAATGTAATGGAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTGAACGCACCTTGGCCTCATGGTATCCGTGGAGCATGCTGTTTGGTGGCCGGAATCTCCCAACCCCAACGGTTGCCGAAAGGACTGTGGCGGAGAGGG
Mp-CBS-6541 148 CGATAGGTAATGTAATGGAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTGAACGCACCTTGGCCTCATGGTATCCGTGGAGCATGCTGTTTGGTGGCCGGAATCTCCCAACCCCAACGGTTGCCGAAAGGACTGTGGCGGAGAGGG
CDM1-Mp1 151 CGATAGGTAATGTAATGGAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTGAACGCACCTTGGCCTCATGGTATCCGTGGAGCATGCTGTTTGGTGGCCGGAATCTCCCAACCCCAACGGTTGCCGAAAGGACTGTGGCGGAGAGGG
Mp-MA366 151 CGATAGGTAATGTAATGGAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTGAACGCACCTTGGCCTCATGGTATCCGTGGAGCATGCTGTTTGGTGGCCGGAATCTCCCAACCCCAACGGTTGCCGAAAGGACTGTGGCGGAGAGGG

301 .....310.....320.....330.....340.....350.....360.....370.....380.....390.....400.....410.....420.....430.....440.....450
CDM2-Mp2 298 TTGGATGGGTGCTACTGCTGTGGTGGGAACTACAACAGGCTGGCCGAAATGCAATAGCGCTCAGGAC--ACATTGCTACTGCTCTACAAAAGGAAGCAGCAGGAGGTATGGGGGGAAACACCCACCGTATTCCCAACT
CDM3-Mp3 298 TTGGATGGGTGCTACTGCTGTGGTGGGAACTACAACAGGCTGGCCGAAATGCAATAGCGCTCAGGAC--ACATTGCTACTGCTCTACAAAAGGAAGCAGCAGGAGGTATGGGGGGAAACACCCACCGTATTCCCAACT
Mp-CBS-6541 298 TTGGATGGGTGCTACTGCTGTGGTGGGAACTACAACAGGCTGGCCGAAATGCAATAGCGCTCAGGAC--ACATTGCTACTGCTCTACAAAAGGAAGCAGCAGGAGGTATGGGGGGAAACACCCACCGTATTCCCAACT
CDM1-Mp1 301 TTGGATGGGTGCTACTGCTGTAGC---AAACT---ACAGGCTGGCCGAAATGCAATAGCGCTCAGGACAACTTCCCTACTGCTCTACAAAAGGAAGCAGCAGGAGGTAT--GGAGGAAACACCCACCGTATTCCCAACT
Mp-MA366 301 TTGGATGGGTGCTACTGCTGTAGC---AAACT---ACAGGCTGGCCGAAATGCAATAGCGCTCAGGACAACTTCCCTACTGCTCTACAAAAGGAAGCAGCAGGAGGTAT--GGAGGAAACACCCACCGTATTCCCAACT

451 .....460.....470.....480.....490.....500.....510.....520.....530.....540.....550.....560.....570.....580.....590.....600
CDM2-Mp2 447 CGCCTGACTGTTTTTGGCGCATGSCATGATAGCTCATTGCTGTGTGGG--TAGGTTGGTGGTGGGACTGTGTAGTGCCTTAGAGCTTTGAGAAGTGTGTTCTGTGTCTAGCACTGAAAAGTACATTCTTTTTCAATTCT
CDM3-Mp3 447 CGCCTGACTGTTTTTGGCGCATGSCATGATAGCTCATTGCTGTGTGGG--TAGGTTGGTGGTGGGACTGTGTAGTGCCTTAGAGCTTTGAGAAGTGTGTTCTGTGTCTAGCACTGAAAAGTACATTCTTTTTCAATTCT
Mp-CBS-6541 447 CGCCTGACTGTTTTTGGCGCATGSCATGATAGCTCATTGCTGTGTGGG--TAGGTTGGTGGTGGGACTGTGTAGTGCCTTAGAGCTTTGAGAAGTGTGTTCTGTGTCTAGCACTGAAAAGTACATTCTTTTTCAATTCT
CDM1-Mp1 443 CGCCTGACTGTTTT---GCGCATGSCATGATAGCTCATTGCTGTGTGGG--TAGGTTGGTGGTGGGACTGTGTAGTGCCTTAGAGCTTTGAGAAGT--TGTTCTGTGTCTAGCACTG--AAAAGTCAATTC--CTTTTCAATTCT
Mp-MA366 443 CGCCTGACTGTTTT---GCGCATGSCATGATAGCTCATTGCTGTGTGGG--TAGGTTGGTGGTGGGACTGTGTAGTGCCTTAGAGCTTTGAGAAGT--TGTTCTGTGTCTAGCACTG--AAAAGTCAATTC--CTTTTCAATTCT

601 .....610...
CDM2-Mp2 596 GGTCTCAATCAC
CDM3-Mp3 596 GGTCTCAATCAC
Mp-CBS-6541 596 GGTCTCAATCAC
CDM1-Mp1 586 GGTCTCAATCAA
Mp-MA366 585 GGTCTCAATCAC
    
```

Figura 14. Secuencias de la región ITS de las cepas aisladas comparadas con dos cepas de *M. pachydermatis* reportadas en NCBI. En rojo se marcan las similitudes y en negro las diferencias.

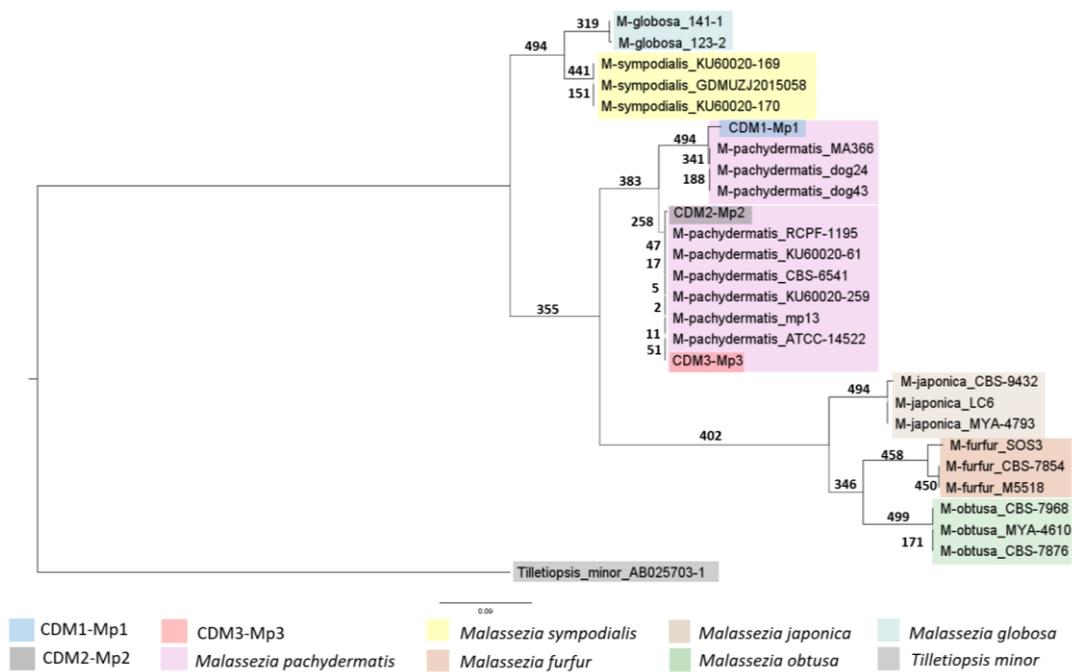


Figura 15. Árbol de inferencia filogenética hecho con la región ITS.

Los resultados obtenidos al realizar la alineación múltiple con la región LSU (Figura 16) demostraron que los aislados CDM1-Mp1 y *M. pachydermatis* ML-134 (MF158337.1) presentan un porcentaje de identidad del 100% en BLASTn. Además, que las secuencias de los aislados CDM2-Mp2 y *M. pachydermatis* ML-135 (MF158338.1) eran idénticas, con 100% de porcentaje de identidad de BLASTn y que CDM3-Mp3 mostró un porcentaje de identidad del 99.87% con ML-135.



98.34% con CDM1-Mp1, del 99.78% con CMD2-Mp2 y del 99.77% con CDM3-Mp3; el aislado ATCC 14522 (EU192366.1) presentó un 99.65% de similitud con CDM2-Mp2. En la Figura 18 se puede apreciar la alineación de las secuencias de esta región. En el árbol filogenético de la Figura 19, se aprecia cómo el subclado de *M. pachydermatis* tiene poco soporte debido a que se utilizaron pocas secuencias para llevar a cabo este análisis.

```

1 .....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....100.....110.....120.....130.....140.....150
CDM1-Mp1 1 TTGGGCTTGGTGAATCAATAAATCTTCGGATCGCATGGCCCTTGGCCGGGATGCTTCATTCAAATATCGCCATCAACTGTCGATGATGGATAGAGGCTCATATGGTTCGAAAGGGTACGGGGATAGGGTTCGATTC
CDM2-Mp2 1 TTGGGCTTGGTGAATCAATAAATCTTCGGATCGCATGGCCCTTGGCCGGGATGCTTCATTCAAATATCGCCATCAACTGTCGATGATGGATAGAGGCTCAACATGGTTCGAAAGGGTACGGGGATAGGGTTCGATTC
M-pachydermatis_CBS_1879 1 TTGGGCTTGGTGAATCAATAAATCTTCGGATCGCATGGCCCTTGGCCGGGATGCTTCATTCAAATATCGCCATCAACTGTCGATGATGGATAGAGGCTCAACATGGTTCGAAAGGGTACGGGGATAGGGTTCGATTC
CDM3-Mp3 1 TTGGGCTTGGTGAATCAATAAATCTTCGGATCGCATGGCCCTTGGCCGGGATGCTTCATTCAAATATCGCCATCAACTGTCGATGATGGATAGAGGCTCAACATGGTTCGAAAGGGTACGGGGATAGGGTTCGATTC
M-pachydermatis_ATCC_14522 1 TTGGGCTTGGTGAAT-ATAATAACTCTTCGGATCGCATGGCCCTTGGCCGGGATGCTTCATTCAAATATCGCCATCAACTGTCGATGATGGATAGAGGCTCAACATGGTTCGAAAGGGTACGGGGATAGGGTTCGATTC

151 .....160.....170.....180.....190.....200.....210.....220.....230.....240.....250.....260.....270.....280.....290.....300
CDM1-Mp1 151 GGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCAATCCAGGAGGCGAGCGAGGCGCAATACCCAAATCCCGACAGGGGAGGTAGTACAAATATGAAATATACGGCTTATCGTGTATATTTGGAATGATACAAATTAATCCCTTA
CDM2-Mp2 151 GGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCAATCCAGGAGGCGAGCGAGGCGCAATACCCAAATCCCGACAGGGGAGGTAGTACAAATATGAAATATACGGCTTATCGTGTATATTTGGAATGATACAAATTAATCCCTTA
M-pachydermatis_CBS_1879 151 GGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCAATCCAGGAGGCGAGCGAGGCGCAATACCCAAATCCCGACAGGGGAGGTAGTACAAATATGAAATATACGGCTTATCGTGTATATTTGGAATGATACAAATTAATCCCTTA
CDM3-Mp3 151 GGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCAATCCAGGAGGCGAGCGAGGCGCAATACCCAAATCCCGACAGGGGAGGTAGTACAAATATGAAATATACGGCTTATCGTGTATATTTGGAATGATACAAATTAATCCCTTA
M-pachydermatis_ATCC_14522 150 GGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCAATCCAGGAGGCGAGCGAGGCGCAATACCCAAATCCCGACAGGGGAGGTAGTACAAATATGAAATATACGGCTTATCGTGTATATTTGGAATGATACAAATTAATCCCTTA

301 .....310.....320.....330.....340.....350.....360.....370.....380.....390.....400.....410.....420.....430.....440.....450
CDM1-Mp1 301 ACGAGGAACAATGGAGGCAAGTCTGGTGCACAGCAGCGGGTAATCCAGCTCAATAGCCTATATTAAGTTGTTCAGTTAAAGAGCTGTAGTTGGACTTTGGCCCGGACAGGGCGCTCCGCTCAAGGGGTACTGTTTCGCT
CDM2-Mp2 301 ACGAGGAACAATGGAGGCAAGTCTGGTGCACAGCAGCGGGTAATCCAGCTCAATAGCCTATATTAAGTTGTTCAGTTAAAGAGCTGTAGTTGGACTTTGGCCCGGACAGGGCGCTCCGCTCAAGGGGTACTGTTTCGCT
M-pachydermatis_CBS_1879 301 ACGAGGAACAATGGAGGCAAGTCTGGTGCACAGCAGCGGGTAATCCAGCTCAATAGCCTATATTAAGTTGTTCAGTTAAAGAGCTGTAGTTGGACTTTGGCCCGGACAGGGCGCTCCGCTCAAGGGGTACTGTTTCGCT
CDM3-Mp3 301 ACGAGGAACAATGGAGGCAAGTCTGGTGCACAGCAGCGGGTAATCCAGCTCAATAGCCTATATTAAGTTGTTCAGTTAAAGAGCTGTAGTTGGACTTTGGCCCGGACAGGGCGCTCCGCTCAAGGGGTACTGTTTCGCT
M-pachydermatis_ATCC_14522 300 ACGAGGAACAATGGAGGCAAGTCTGGTGCACAGCAGCGGGTAATCCAGCTCAATAGCCTATATTAAGTTGTTCAGTTAAAGAGCTGTAGTTGGACTTTGGCCCGGACAGGGCGCTCCGCTCAAGGGGTACTGTTTCGCT

451 .....460.....470.....480.....490.....500.....510.....520.....530.....540.....550.....560.....570.....580.....590.....600
CDM1-Mp1 451 GGGCTTTCCTCTGGTGTACTGCTGTTTCGGAGTAGGAAACAGGACTTTTACTTTGAAAAAATAGAGTGTTCAGAGCAGGCTTCACCCAGAGATATAGCATGAAATAAATAGAGAGCGGGTCTATTTTGTGTGT
CDM2-Mp2 451 GGGCTTTCCTCTGGTGTACTGCTGTTTCGGAGTAGGAAACAGGACTTTTACTTTGAAAAAATAGAGTGTTCAGAGCAGGCTTCACCCAGAGATATAGCATGAAATAAATAGAGAGCGGGTCTATTTTGTGTGT
M-pachydermatis_CBS_1879 451 GGGCTTTCCTCTGGTGTACTGCTGTTTCGGAGTAGGAAACAGGACTTTTACTTTGAAAAAATAGAGTGTTCAGAGCAGGCTTCACCCAGAGATATAGCATGAAATAAATAGAGAGCGGGTCTATTTTGTGTGT
CDM3-Mp3 451 GGGCTTTCCTCTGGTGTACTGCTGTTTCGGAGTAGGAAACAGGACTTTTACTTTGAAAAAATAGAGTGTTCAGAGCAGGCTTCACCCAGAGATATAGCATGAAATAAATAGAGAGCGGGTCTATTTTGTGTGT
M-pachydermatis_ATCC_14522 450 GGGCTTTCCTCTGGTGTACTGCTGTTTCGGAGTAGGAAACAGGACTTTTACTTTGAAAAAATAGAGTGTTCAGAGCAGGCTTCACCCAGAGATATAGCATGAAATAAATAGAGAGCGGGTCTATTTTGTGTGT

```

Figura 18. Alineación de las secuencias de la región SSU de las cepas aisladas y comparadas con dos cepas de *M. pachydermatis* reportadas en NCBI. En rojo se muestran las similitudes y en negro las diferencias.

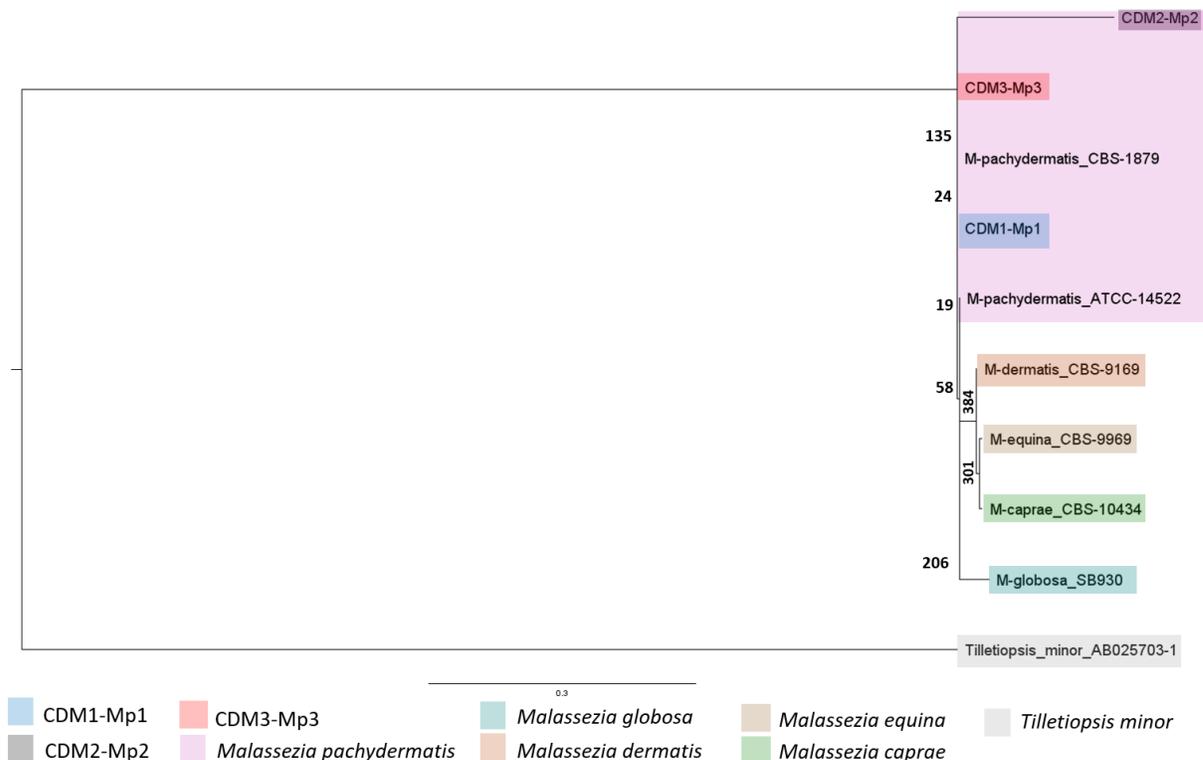
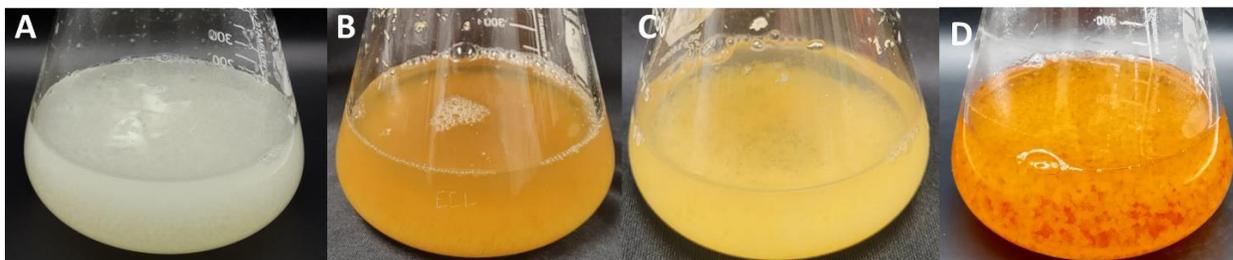


Figura 19. Árbol de inferencia filogenética hecho con la región SSU.

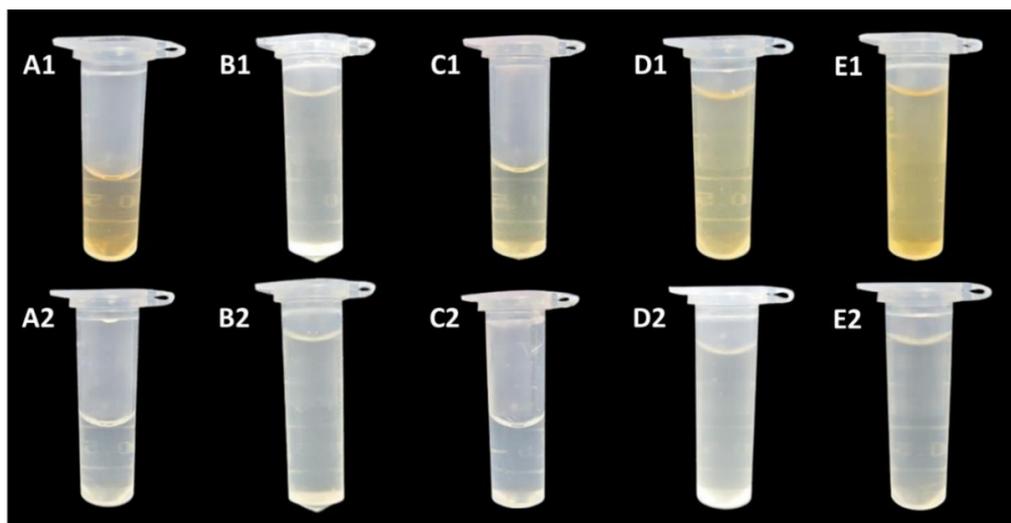
### 3.3 Biosíntesis de las nanopartículas metálicas con los sobrenadantes de *Trichoderma ghanense*

#### 3.3.1 Obtención de los sobrenadantes de *Trichoderma* spp.

Se observaron diferencias en el patrón de crecimiento entre las distintas especies de *Trichoderma* cultivadas en medio PDB. En general, el crecimiento de todas las especies se caracterizó por la formación de micelio en agregados esféricos o “pellets”. El micelio presentaba coloraciones del blanco al amarillo claro, se observó que el medio cambió de turbidez dependiendo de la especie. La especie *T. atroviride* le dio un color blanco con turbidez; *T. ghanense* presentó un medio de color ámbar turbio; *T. harzianum* produjo un medio amarillo claro con poca turbidez; la especie identificada como *Trichoderma* sp. mantuvo un medio PDB con poca turbidez y de color amarillo ámbar (Figura 20).



**Figura 20.** Cultivos de (A) *Trichoderma atroviride*, (B) *T. ghanense*, (C) *T. harzianum* y (D) *Trichoderma* spp. en medio Caldo Papa Dextrosa a 25 °C después de 5 días.

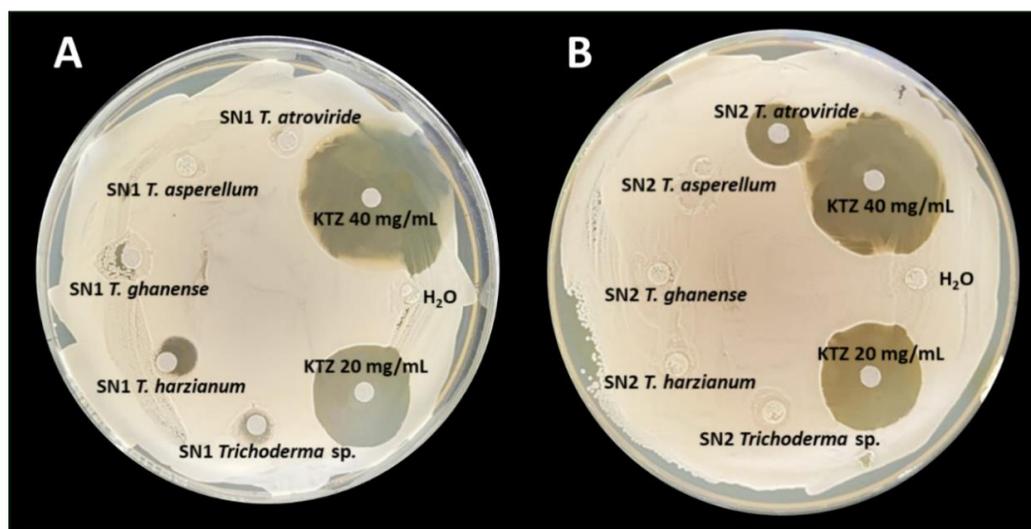


**Figura 21.** Sobrenadantes de las diferentes especies de *Trichoderma*. Sobrenadante 1 (A1) y 2 (A2) de *T. asperellum*, sobrenadante 1 (B1) y 2 (B2) de *T. atroviride*, sobrenadante 1 (C1) y 2 (C2) de *T. ghanense*, sobrenadante 1 (D1) y 2 (D2) de *T. harzianum* y sobrenadantes 1 (E1) y 2 (E2) de *Trichoderma* sp.

Después de filtrar los sobrenadantes 1 de las cinco especies de *Trichoderma* mantuvieron un color similar al observado antes de ser filtrados (Figura 21). Posterior al cultivo de la biomasa fúngica en agua desionizada, los sobrenadantes 2 fueron filtrados; estos se observaron con una claridad no observada en los SN1. Se hipotetiza que en estos sobrenadantes se encontrará una mayor cantidad de metabolitos secretados por los hongos debido al estrés de estar en un ambiente sin nutrientes como lo es el agua desionizada.

### 3.3.2 Pruebas de actividad antifúngica de los sobrenadantes de *Trichoderma* spp.

En la determinación de la actividad antifúngica de los sobrenadantes se obtuvieron cuatro sobrenadantes efectivos. El SN1 de *Trichoderma* sp. y de *T. harzianum*, el SN2 de *T. atroviride* mostraron efectos inhibitorios sobre *M. pachydermatis*. En ambas pruebas con los controles el KTZ en concentración de 40 mg/mL se observó un halo de inhibición promedio de  $31.66 \pm 27.54$  mm de diámetro, KTZ con una concentración de 20 mg/mL el halo fue de  $29.67 \pm 0.5$  mm, el halo generado por el agua destilada fue de 0 mm. El SN1 de *T. harzianum* presentó un halo de inhibición de  $4 \pm 6.93$  mm, el de *Trichoderma* sp. de 6.66 mm, *T. atroviride*, *T. asperellum*, *T. ghanense* no mostraron inhibición. El SN2 de *T. atroviride* obtuvo un halo de inhibición de  $12 \pm 10.39$  mm, las demás especies no generaron halo de inhibición. En la Figura 22 se muestran placas representativas de las pruebas de difusión en disco. En los Anexos B y C se presentan los datos y la gráfica de estos ensayos.

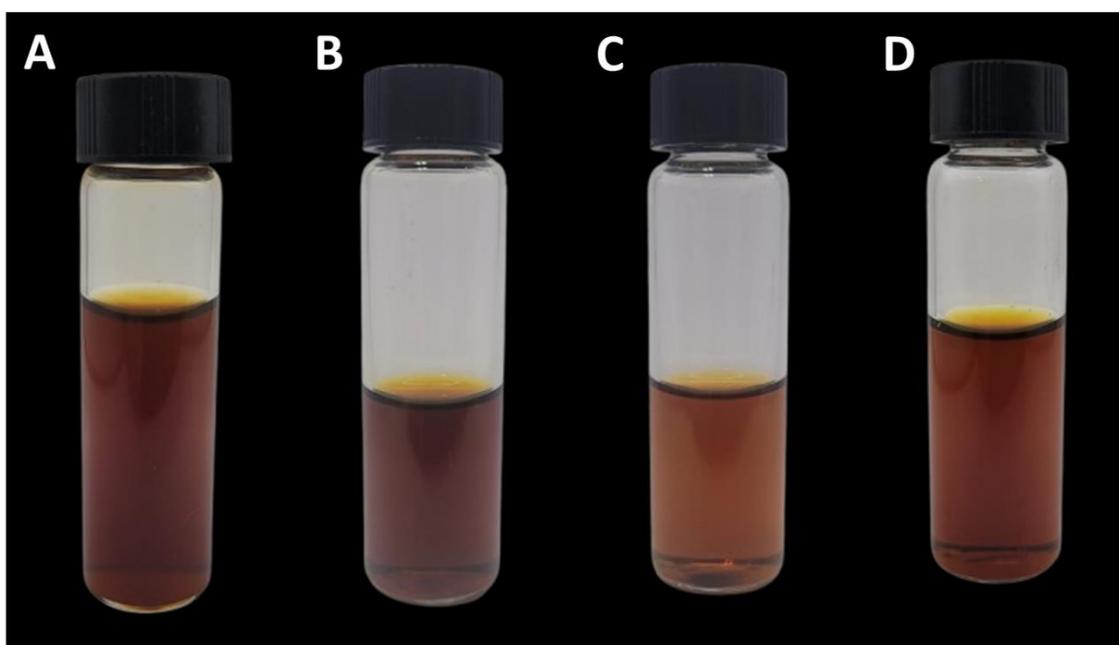


**Figura 22.** Ensayos de la actividad antifúngica de los sobrenadantes de *Trichoderma* spp. Caja Petri con el ensayo de difusión en disco de los (A) sobrenadantes 1 y (B) el ensayo con los sobrenadantes 2.

### 3.3.3 Síntesis de las nanopartículas de plata y de óxido de cobre

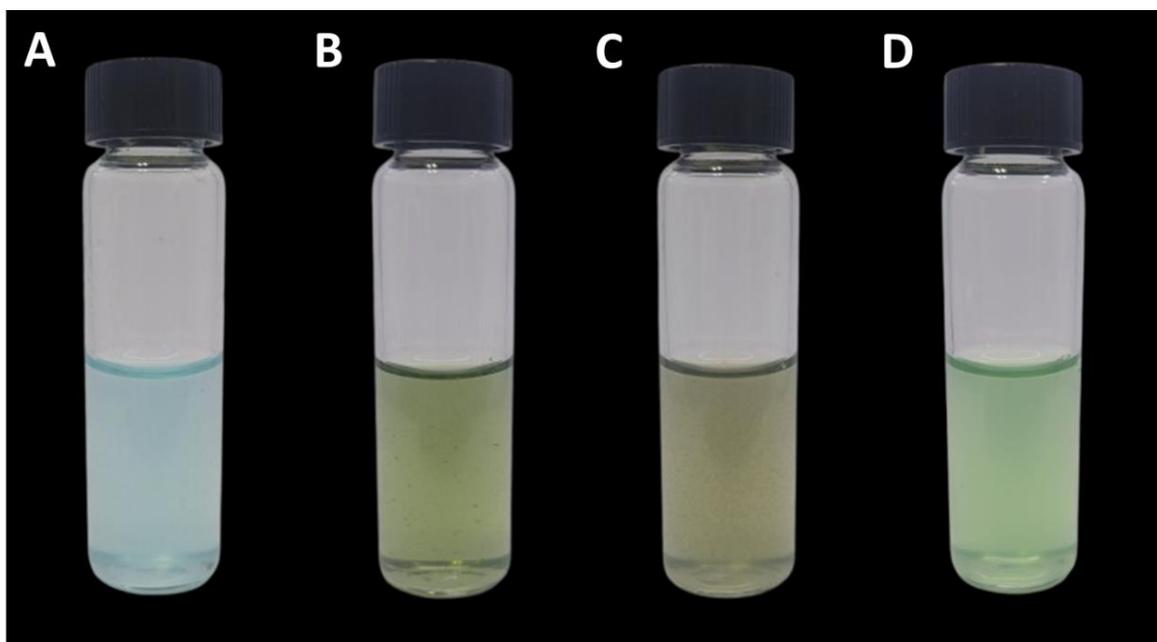
En la biosíntesis de nanopartículas tanto de las AgNPs como de las CuONPs se observó una variación en los colores de la solución resultante dependiente del sobrenadante de *Trichoderma* utilizado.

Se sintetizaron nanopartículas de plata con el SN2 de *T. atroviride*, los sobrenadantes 1 y 2 de *T. ghanense* y el SN1 de *T. harzianum* (Figura 23). Las AgNPs obtenidas con los sobrenadantes de *Trichoderma* resultaron con colores de tonalidad ámbar oscuro, las AgNPs del SN2 de *T. ghanense* presentando una tonalidad más clara (Figura 23C).



**Figura 23.** Nanopartículas de plata sintetizadas con sobrenadantes de *Trichoderma*. (A) AgNPs sintetizadas con el sobrenadante 2 de *T. atroviride*, (B) el sobrenadante 1 y (C) el sobrenadante 2 de *T. ghanense* y (D) con el sobrenadante 1 de *T. harzianum*.

También se sintetizaron nanopartículas de óxido de cobre con los sobrenadantes de tres especies de *Trichoderma* (Figura 24). Las CuONPs hechas con el SN2 de *T. atroviride* resultaron de un color azul celeste (Figura 24A), las sintetizadas con los sobrenadantes de *T. ghanense* presentaron tonos verdes oscuros (Figura 24B y 24C) y las fabricadas con el SN1 de *T. harzianum* presentaron un color verde claro (Figura 23D).

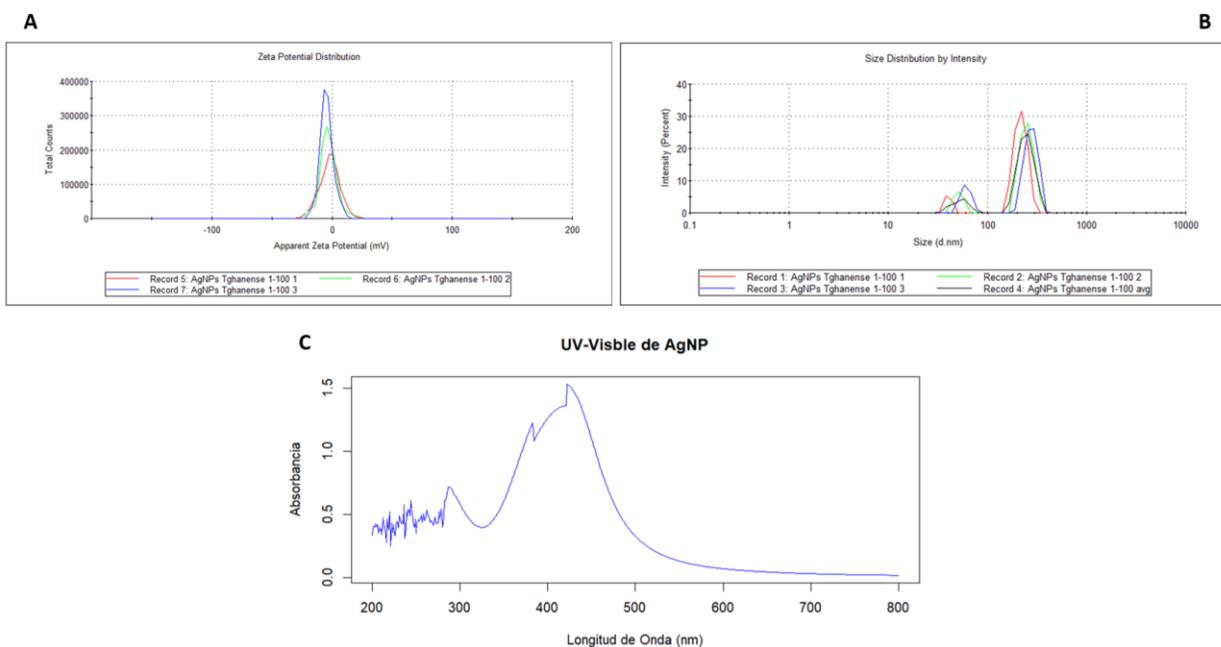


**Figura 24.** Nanopartículas de óxido de cobre sintetizadas con los sobrenadantes de *Trichoderma*. (A) CuONP biosintetizadas con el SN2 de *T. atroviride*, (B) el SN1 de *T. ghanense* y (C) el SN2 de *T. ghanense* y (D) con el sobrenadante 1 de *T. harzianum*.

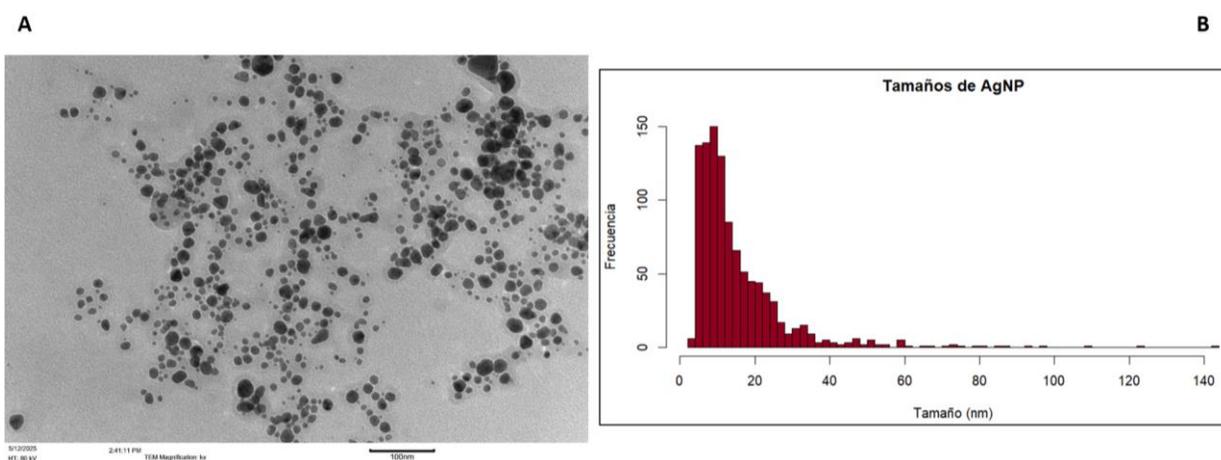
### 3.4 Caracterización de las nanopartículas metálicas

Se presenta la caracterización de las nanopartículas que mostraron potencial inhibitorio contra *M. pachydermatis*. Se determinó el potencial Z de las AgNPs y se obtuvo un valor de  $-25.1$  mV (Figura 25A) y un radio hidrodinámico promedio de  $204.6$  d.nm (Figura 25B). En la medición de espectrofotometría UV-visible, las AgNPs sintetizadas con el SN2 de *T. ghanense* mostraron un pico de absorción de aproximadamente  $420$  nm (Figura 25C).

Al analizar la morfología de las AgNPs en el TEM (Figura 26A), se observan nanopartículas semiesféricas polidispersas con un tamaño promedio de  $15.3 \pm 77.77$  y nanoplatos de forma triangular (Figura 26B). Se apreció una matriz rodeando las AgNPs que se hipotetiza, es formada por biomoléculas del sobrenadante 2 de *Trichoderma ghanense* fungiendo como agente estabilizador.



**Figura 25.** Caracterización de las nanopartículas de plata. (A) Distribución del potencial Zeta de las AgNP. (B) Medición del radio hidrodinámico de las AgNP. (C) Gráfica de la espectroscopia UV-Visible de las AgNP sintetizadas con el SN2 de *Trichoderma ghanense*.



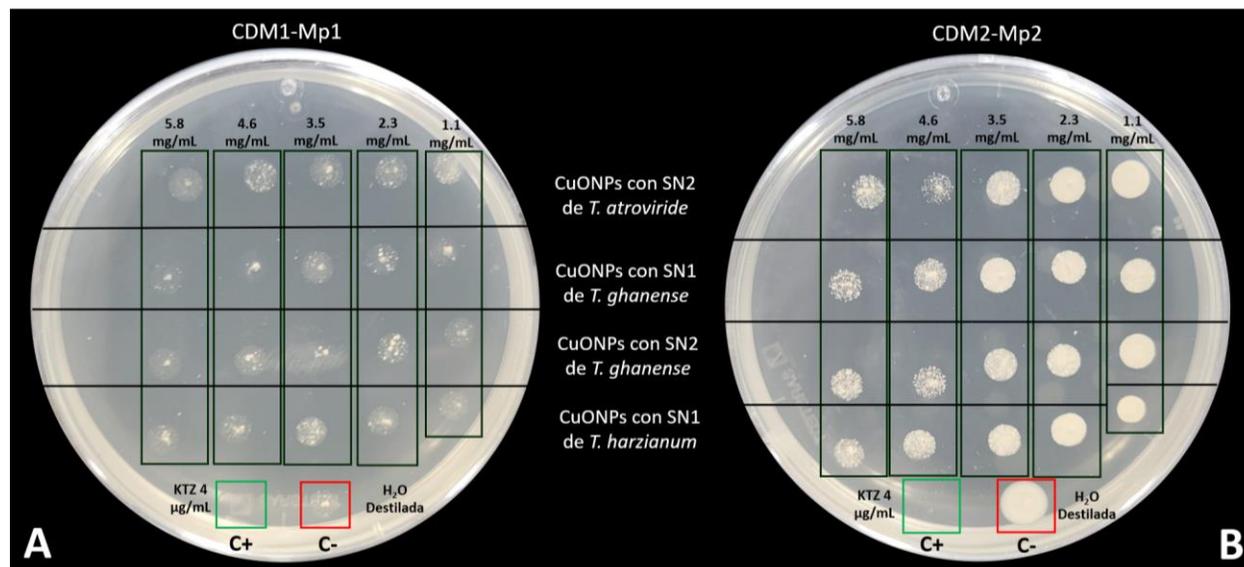
**Figura 26.** Morfología y distribución de tamaños de las AgNP. (A) Micrografía de TEM magnificación de 80 kV, barra de escala de 100 nm. (B) Histograma de los tamaños de las AgNP.

### 3.5 Pruebas de actividad antifúngica de las nanopartículas metálicas

#### 3.5.1 Ensayos de actividad antifúngica

Las CuONPs sintetizadas con los sobrenadantes de tres especies de *Trichoderma* en concentraciones bajas no presentaron un efecto antifúngico repetible contra la levadura *M. pachydermatis*; los ensayos se

realizaron en triplicado y no se observaron resultados consistentes. En la Figura 27 se observa un ejemplo de los resultados obtenidos con los ensayos de microdilución de las CuONPs.

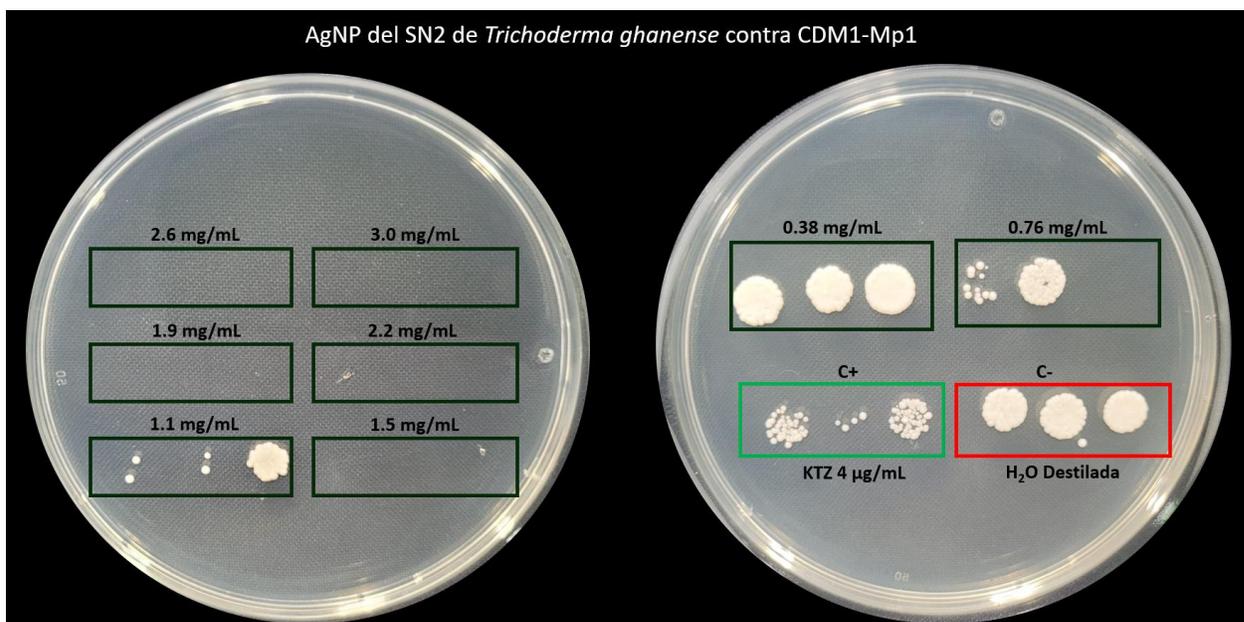


**Figura 27.** Resultados de los ensayos de microdilución en placas de SDA. Nanopartículas de óxido de cobre probadas con CDM1-Mp1 (A) y CDM2-Mp2 (B).

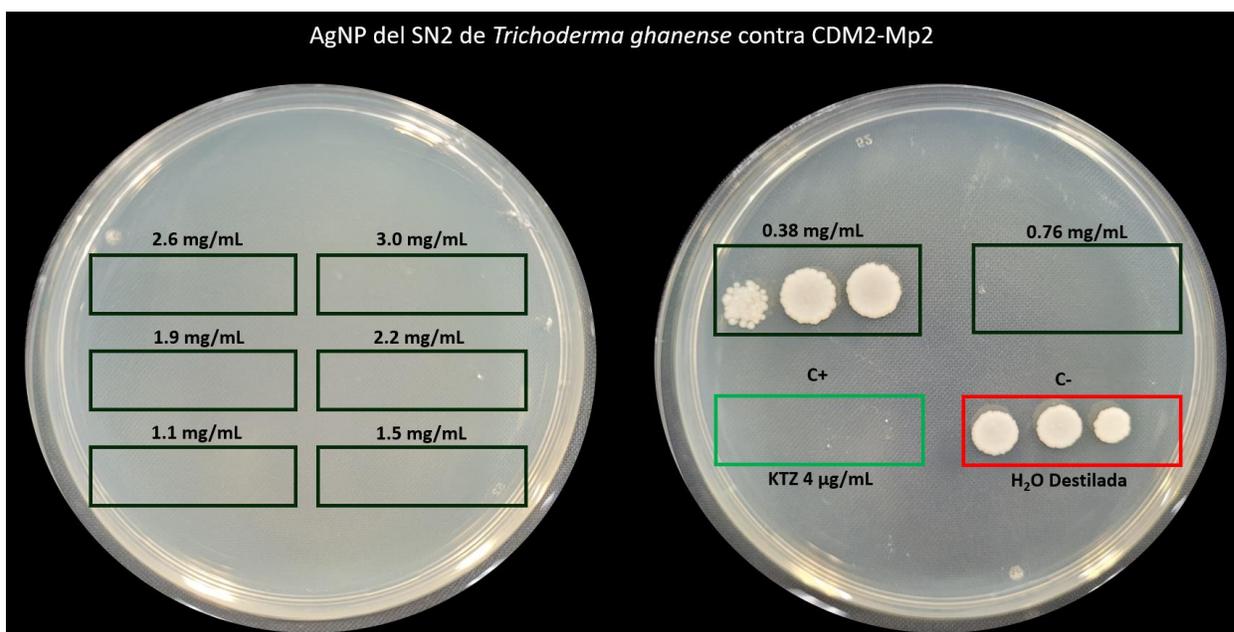
Para las AgNPs se realizó un ensayo inicial de microdilución donde se probaron concentraciones de 0.38, 0.76, 1.1, 1.5 y 1.9 mg/mL de AgNP. Debido a que los resultados observados a las 24 horas de realizar el experimento se registró un efecto inhibitorio, se realizar pruebas con las AgNPs del sobrenadante 2 de *T. ghanense* y probar concentraciones más altas para determinar una concentración mínima inhibitoria contra ambos aislados. En el Anexo B se observan los resultados de esta prueba.

### 3.5.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de las nanopartículas de plata

En los ensayos de la concentración mínima inhibitoria de las AgNP se realizaron ensayos con diferentes concentraciones de AgNPs y se logró inhibición en concentraciones debajo de 1.5 mg/mL (Figuras 28 y 29). Se probaron las concentraciones de 0.38, 0.76, 1.1, 1.5, 1.9, 2.2, 2.6 y 3.0 mg/mL. En este ensayo se determinó que la concentración mínima inhibitoria de las AgNPs contra CMD1-Mp1 fue de 1.5 mg/mL y de 0.76 mg/mL para CDM2-Mp2.



**Figura 28.** Placas representativas de los ensayos para determinar la actividad antifúngica y la CMI de las AgNPs contra la cepa CDM1-Mp1 posterior a 4 días de incubación. Se realizaron tres ensayos con cada concentración de nanopartículas.



**Figura 29.** Placas representativas de los ensayos para determinar la actividad antifúngica y la CMI de las AgNPs contra la cepa CDM2-Mp2 posterior a 2 días de incubación. Se realizaron tres ensayos con cada concentración de nanopartículas.

## Capítulo 4. Discusión

---

Se obtuvieron tres aislamientos confirmados y un aislamiento tentativo de *M. pachydermatis*, a partir de muestras provenientes de caninos clínicamente sanos y de individuos diagnosticados con OE. El primer muestreo, realizado de julio a septiembre del 2024, contó con un total de 20 muestras de pacientes caninos sin signología de OE, de estos se obtuvieron dos resultados positivos de los pacientes Loki (cepa CDM4-Mp4) y Libertad (CDM1-Mp1). Loki era un canino de raza Corgi de 6 años y 12 kg de peso, los hisopos usados con él no presentaban exudados; la cepa CDM4-Mp4 se aisló del oído izquierdo de este canino. La paciente de raza mestiza Libertad tenía 6 meses de edad al momento de la toma de la muestra, pesaba 10.9 kg y no presentó exudados en sus muestras; la cepa CDM1-Mp1 se aisló de ambos oídos de la paciente. En el segundo muestreo, se obtuvieron dos resultados positivos de un total de 3 pacientes con signos de otitis muestreados. La cepa CDM2-Mp2 se aisló de Leicy, una canina mestiza de 8 años que pesaba 22 kg y presentaba abundante exudado en sus muestras. De Lua, una paciente Golden Retriever de 7.5 años, se aisló la cepa CDM3-Mp3; al momento de la toma de las muestras, la canina pesaba 29 kg y presentó copioso exudado en sus muestras.

Los resultados de este aislamiento son concordantes con los reportes de Núñez y colaboradores del 2022, quienes aislaron cepas de *M. pachydermatis* de 8 pacientes sanos en Chile; el aislamiento de *M. pachydermatis* de pacientes sanos reportado en ese trabajo y en este proyecto concuerdan con la naturaleza comensal de esta levadura. Al ser parte de la microbiota cutánea canina, es de esperarse que se pueda aislar sin problemas de cualquier tipo de paciente. Cuando *M. pachydermatis* actúa como patógeno oportunista, esta levadura se reproduce en exceso y es más probable obtener aislados de este hongo al tomar muestras de las zonas afectadas por esta levadura (Bond et al., 2020).

El aislamiento de *M. pachydermatis* no está libre de retos; los hongos *Malassezia* son conocidos por ser lipofílicos, por lo cual para su crecimiento en condiciones de laboratorio se requieren medios de cultivo adicionados con lípidos para permitir su desarrollo. *Malassezia pachydermatis* es la única especie de este género que tiene la capacidad de obtener lípidos de medios como el Sabouraud Dextros y el medio Extracto de Levadura (Guillot et al., 1996). Además, se sabe que la temperatura de cultivo puede afectar el total de microorganismos encontrados en las placas posterior al muestreo. Medina Ibarra (2025) analizó las características fisiológicas de las cuatro cepas que obtuvimos en este trabajo. Se observó que los aislados CDM1-Mp1 y CDM4-Mp4 presentaban un crecimiento similar en velocidad y tamaño al de los aislados CDM2-Mp2 y CDM3-Mp3 cuando fueron cultivados en medio suplementado con aceite de oliva,

en comparación con su crecimiento en medios SDA o YPDA sin lípidos adicionados. Además, los aislados CDM1-Mp1 y CDM4-Mp4 no crecían a una temperatura superior a los 37 °C, a diferencia de las cepas CDM2-Mp2 y CDM3-Mp3 que llegaron a crecer a 40 °C. Esto también se reporta en la literatura, diferentes cepas de *M. pachydermatis* presentan diferentes niveles de tolerancia temperaturas, se reporta que pueden crecer de los 35 a los 40 °C; y que existen cepas de esta especie con una mayor necesidad de lípidos en el medio de cultivo para crecer.

En cuanto a la identificación molecular, la amplificación de la región ITS con el cebador directo ITS5 y con el cebador reverso ITS 4 resultaron con un producto de 700 a 750 pb. Al amplificar esta misma región, Sugita reportó productos de 698 a 712 pb (Sugita et al., 2005) y el equipo de Puig de 730 pb (Puig et al., 2017). Las diferencias en los resultados se deben a los diferentes cebadores directos utilizados, mientras que Sugita y colaboradores utilizaron pITS-F (GTCGTAACAAGGTTAACCTGCGG) en este trabajo se utilizó el ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAAGG), los cebadores reversos utilizados en ambos trabajos son idénticos: pITS-R (TCCTCCGCTTATTGATATGC) reportado por Sugita y el ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) utilizado en este proyecto. El uso de cebadores directos diferentes resultará en productos de la amplificación con diferentes longitudes. Los resultados de la amplificación de la región LSU son similares a los obtenidos por Hernández-Escareño en el 2012, donde aislaron varias cepas de *M. pachydermatis* de distintos caninos de la ciudad de Monterrey, Nuevo León. En su amplificación de esta región con los marcadores NL-1 y NL-4 encontraron productos de 600 pb (Hernández-Escareño, 2012) y 580 pb (Puig et al., 2017). En este trabajo se amplificó la región LSU con los cebadores LROR y LR3 con los que obtuvimos un producto de 550 a 600 pb. Esto se debe a que los marcadores utilizados por los equipos de Hernández-Escareño y Puig cubren una región más extensa de la LSU (Figura 7). La amplificación de la región SSU con un producto de 1200 pb, pero debido a que no hay muchas secuencias de esta región reportadas en NCBI no se pudo corroborar el resultado.

Con respecto a los resultados de los sobrenadantes de *Trichoderma*, se analizaron 10 sobrenadantes de 5 especies de este hongo. Los sobrenadantes 1 de *T. harzianum*, *Trichoderma* sp., y *T. ghanense*; y el sobrenadante 2 de *T. atroviride* se consideraron para ser utilizados en pruebas posteriores. En el 2024 Campos Jiménez (2024) midió la actividad de la enzima quitinasa de diferentes formulaciones de AgNPs biosintetizadas con sobrenadantes de *Trichoderma*. Sus resultados indicaron que en las AgNPs sintetizadas con el sobrenadante 2 de *Trichoderma ghanense*, obtenido de cultivar la biomasa del hongo en agua desionizada, la enzima quitinasa presente en la suspensión de nanopartículas seguía activa y realizando su actividad de hidrolisis de quitina. Por lo mencionado anteriormente, el sobrenadante 2 de *T. ghanense* se agregó a mi lista de sobrenadantes para sintetizar las CuONPs y AgNPs.

Las AgNPs biosintetizadas con el SN2 de *T. ghanense* presentaron un potencial Z de -25.1 mV, este dato es consistente con un potencial Z adecuado. En general los resultados de entre - 30 mV a 30 mV hacen referencia a que las nanopartículas formadas son estables y se repellen entre ellas, evitado su aglomeración (Bhattacharjee, 2016; Planchon et al., 2013). Estas AgNP presentaron un radio hidrodinámico promedio de 204.6 d.nm, este dato determina el tamaño de las nanopartículas dispersas en un medio líquido. El tamaño promedio de las AgNPs fue de  $15.3 \pm 77.77$  nm, el valor de desviación estándar se debe a que en la formulación de AgNPs sintetizadas se obtuvieron además de nanopartículas también nanoplatos que se aprecian con forma triangular en la 26A.

Una vez sintetizadas, las CuONPs se probaron en ensayos de microdilución en placas de 96 pozos, en concentraciones de 1.1, 2.3, 3.5, 4.6 y 5.8 mg/mL. Estas nanopartículas no demostraron un efecto antifúngico consistente contra *M. pachydermatis*. En el trabajo de Garcia-Marin las CuONPs sintetizadas con sobrenadantes de *Trichoderma* demostraron efectos antifúngicos contra la levadura *Candida albicans* en concentraciones a partir de los 39.9 µg/mL. Los resultados de este trabajo probablemente se deben al grosor de la pared celular de *M. pachydermatis*, este dermatofito posee una pared celular de 200 nm de grosor (David et al., 2007; David M et al., 2003) y la pared celular de *C. albicans* mide de entre 120 a 150 nm (Leonardo et al., 2020). En el mismo trabajo, Garcia-Marin analizó levaduras de *C. albicans* tratadas con CuONPs y observó que las nanopartículas se encontraban acumuladas en la membrana, en la pared y dentro de la pared, así como en el espacio intracelular. Por lo cual las CuONP no podrían haber perforado dicha pared, como se observa en los análisis realizados por Garcia-Marin en su trabajo con *C. albicans* del 2022 y llegado a la membrana o al citoplasma, donde tendrían una mayor probabilidad de causar detrimentos a la célula fúngica.

Referente a los resultados observados en los ensayos de microdilución con las AgNPs en concentraciones de 0.38, 0.76, 1.1, 1.5, 1.9, 2.2, 2.6, 3.0 mg/mL en donde algunas formulaciones de nanopartículas, como las sintetizadas con el sobrenadante de *T. atroviride*, no presentaron efectos antifúngicos contra *M. pachydermatis*. Estas variaciones se deben a las diferencias encontradas en los sobrenadantes de cada especie de *Trichoderma*. Entre las cinco especies analizadas en este trabajo se determinó que las AgNPs fabricadas con sobrenadantes de *T. ghanense* mantuvieron un efecto antifúngico sobre *M. pachydermatis*. Hipotetizamos que se debe a la presencia de metabolitos secundarios producidos por *T. ghanense* como quitinasa, manosa-deshidrogenasa, glucanasa, etc. Esto se reportó en el trabajo de (González et al., 2024) donde determinó que el extracto de *T. asperellum* T8a al ser co-cultivado con *N. crassa* presentaba actividad fungistática contra *B. cinerea* y *F. solani*; un análisis de este extracto demostró la presencia de celulasa, quitinasa y N-acetil hexosaminidasa, enzimas líticas de diferentes componentes de células

vegetales y fúngicas. Similarmente, el trabajo de Campos Jiménez (2024) dilucidó que las CuONPs sintetizadas con el SN2 de *T. ghanense* mantuvieron la actividad de la enzima quitinasa; esta enzima degrada la quitina de la pared celular de los hongos.

En un estudio del 2019, el equipo de Mussin probó AgNPs de origen químico con un tamaño de 15 nm; en ese trabajo reportan CMI contra inóculos de  $0.5 - 2.5 \times 10^5$  UFC/mL de *Malassezia furfur* de 0.06 hasta 2.0 mg/mL (Mussin et al., 2019). El equipo de Anwar también analizó los efectos de AgNPs químicas contra un inóculo de  $10^5$  UFC/mL de *M. furfur*, donde obtuvieron CMI de 0.2 mg/mL con nanopartículas de 20 y 50 nm. Por otro lado, las AgNPs biosintetizadas con el filtrado libre de células de la actinobacteria *Pilimelia columellifera* subsp. *pallida* presentaron una CMI de 16 µg/mL contra *M. furfur* y de 64 µg/mL contra *C. albicans* (Wypij et al., 2017). En otro trabajo probaron AgNPs sintetizadas con extractos de la planta *Azadirachta indica* contra *M. pachydermatis* y *M. globosa*; sintetizaron nanopartículas con concentraciones de 25 hasta 200 mM de  $\text{AgNO}_3$ , obtuvieron AgNPs de 40 a 50 nm de tamaño. Las AgNPs presentaron halos de inhibición en ensayos de difusión en pozos con concentraciones de 2, 3 y 4 mg/mL (Saranya et al., 2016). Las diferencias de los resultados de esos estudios con los de este trabajo varían por el origen y tamaño de las AgNPs, así como la especie y la concentración de inóculo de *Malassezia* utilizado. El filtrado de la actinobacteria posee biomoléculas desconocidas que pudieron generar un efecto antifúngico mayor que el de los sobrenadantes de *Trichoderma*. Además de su tamaño y forma, la composición química de las NPM de origen químico les confiere propiedades antimicrobianas y citotóxicas (Zhang et al., 2022), por lo que en el presente estudio se optó por la biosíntesis de AgNPs reduciendo los posibles efectos citotóxicos de la AgNPs. En el trabajo de Saranya y colaboradores obtuvieron su máximo potencial de inhibición con 4 mg/mL de AgNPs en concentraciones de  $\text{AgNO}_3$  de 50 a 200 mM; mientras que en este proyecto encontramos inhibición total de dos cepas de *M. pachydermatis* con concentraciones de 0.76 mg/mL y 1.5 mg/mL con concentración de  $\text{AgNO}_3$  de 5 mM. Obtuvimos resultados en concentraciones más bajas que el equipo de Saranya debido al tamaño de las AgNPs, las de Saranya median de 40 a 50 nm y las sintetizadas en este trabajo median 15.3 nm lo cual les permite penetrar con facilidad la membrana y pared celulares de *M. pachydermatis*. Además, de las concentraciones de  $\text{AgNO}_3$  su metodología también difiere con la nuestra en que para su síntesis no modifican el pH y dejan que la reacción ocurra a temperatura ambiente; ambos factores afectarán el tamaño y estabilidad de las AgNPs resultantes (Armendariz et al., 2004; Rai et al., 2006).

La síntesis biológica permite explorar nuevas aplicaciones de las nanopartículas metálicas, especialmente en las áreas médicas. Al utilizar sustancias provenientes de microorganismos no patógenos, se asegura que sean biocompatibles con organismos vivos, característica que se necesita para generar efectos

terapéuticos o antimicrobianos sin perjudicar al paciente. La biosíntesis de NPM no requiere equipos de laboratorio costosos o sofisticados, utiliza reactivos económicos y sencillos de obtener. Además, no requiere agregar un agente reductor y uno estabilizante, debido a que las biomoléculas presentes en el sobrenadante realizan esas reacciones (Dinkshit et al., 2021). Todo esto permite realizar estudios científicos con nanopartículas con costos relativamente bajos.

## Capítulo 5. Conclusiones

---

El aislado de tres cepas de *Malassezia pachydermatis* del canal auditivo externo de pacientes caninos sanos y con otitis confirmó los datos ya reportados que indicaban que es posible obtener a estos organismos al tomar muestras de la piel de caninos con o sin patologías relacionadas con *Malassezia*.

Los sobrenadantes de las especies de *Trichoderma* obtenidos en este trabajo presentaron una baja actividad antifúngica sobre las cepas *Malassezia pachydermatis*.

Las CuONPs obtenidas con los sobrenadantes de *Trichoderma* presentaron efectos no consistentes sobre *Malassezia pachydermatis*, por lo cual es posible que se requieran concentraciones más altas contra esta levadura.

Las AgNPs sintetizadas con el sobrenadante 2 de *Trichoderma ghanense* presentaron un tamaño promedio de 15.3 nm, poseen un potencial Z de -25.1, un diámetro hidrodinámico de 204.6 nm y un pico de absorbancia de 420 nm, las cuales efectos antifúngicos en concentraciones muy bajas, de 1.5 mg/mL contra CDM1-Mp1 y de 0.76 mg/mL contra CDM2-Mp2.

## Literatura citada

- Ahman, S. E., & Bergström, K. E. (2009). Cutaneous carriage of *Malassezia* species in healthy and seborrhoeic Sphynx cats and a comparison to carriage in Devon Rex cats. *Journal of feline medicine and surgery*, 11(12), 970–976. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2009.04.011>
- Alghuthaymi, M. A., Abd-Elsalam, K. A., Abodalarn, H. M., Ahmed, F. K., Ravichandran, M., Kalia, A., & Rai, M. (2022). *Trichoderma*: An Eco-Friendly Source of Nanomaterials for Sustainable Agroecosystems. *Journal of Fungi*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/jof8040367>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Andrews J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 48(1), 5–16. [https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl\\_1.5](https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5)
- Angileri, M., Pasquetti, M., De Lucia, M., & Peano, A. (2018). Azole resistance of *Malassezia pachydermatis* causing treatment failure in a dog. *Medical mycology case reports*, 23, 58–61. <https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2018.12.004>
- Anwar, M. F., Yadav, D., Jain, S., Kapoor, S., Rastogi, S., Arora, I., & Samim, M. (2016). Size- and shape-dependent clinical and mycological efficacy of silver nanoparticles on dandruff. *International journal of nanomedicine*, 11, 147–161. <https://doi.org/10.2147/IJN.S86828>
- Anwar, W., Amin, H., Khan, H. A. A., Akhter, A., Bashir, U., Anjum, T., Kalsoom, R., Javed, M. A., & Zohaib, K. A. (2023). Chitinase of *Trichoderma longibrachiatum* for control of *Aphis gossypii* in cotton plants. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-39965-y>
- Armendariz, V., Herrera, I., Peralta-Videa, J. R., Jose-Yacamán, M., Troiani, H. E., Santiago, P., & Gardea-Torresdey, J. L. (2004). Size controlled gold nanoparticle formation by *Avena sativa* biomass: Use of plants in nanobiotechnology. *Journal of Nanoparticle Research*, 6(4), 377–382. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11051-004-0741-4>
- Bajwa J. (2019). Canine otitis externa - Treatment and complications. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne*, 60(1), 97–99. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30651659/>
- Bajwa J. (2023). *Malassezia* species and its significance in canine skin disease. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne*, 64(1), 87–90. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36593939/>
- Bhattacharjee S. (2016). DLS and zeta potential - What they are and what they are not?. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 235, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Bond, R., Morris, D. O., Guillot, J., Bensignor, E. J., Robson, D., Mason, K. V., Kano, R., & Hill, P. B. (2020). Biology, diagnosis and treatment of *Malassezia* dermatitis in dogs and cats. Clinical Consensus Guidelines of the World Association for Veterinary Dermatology. *Veterinary dermatology*, 31(1), 28–74. <https://doi.org/10.1111/vde.12809>

- Bruna, T., Maldonado-Bravo, F., Jara, P., & Caro, N. (2021). Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Applications. *International journal of molecular sciences*, 22(13), 7202. <https://doi.org/10.3390/ijms22137202>
- Campoy, S., & Adrio, J. L. (2017). Antifungals. *Biochemical pharmacology*, 133, 86 – 96. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.019>
- Criscuolo, A., & Gribaldo, S. (2010). BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): a new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments. *BMC evolutionary biology*, 10, 210. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-210>
- David, M., Gabriel M., & Kopecká M. (2003). Unusual ultrastructural characteristics of the yeast *Malassezia pachydermatis*. *SCRIPTA MEDICA (BRNO)*, 76(3), 173–186. [https://www.researchgate.net/publication/286050285\\_Unusual\\_ultrastructural\\_characteristics\\_of\\_the\\_yeast\\_Malassezia\\_pachydermatis](https://www.researchgate.net/publication/286050285_Unusual_ultrastructural_characteristics_of_the_yeast_Malassezia_pachydermatis)
- David, M., Gabriel, M., & Kopecká, M. (2007). Microtubular and actin cytoskeletons and ultrastructural characteristics of the potentially pathogenic basidiomycetous yeast *Malassezia pachydermatis*. *Cell biology international*, 31(1), 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2006.09.001>
- Deegan, K. R., Fonseca, M. S., Oliveira, D. C. P., Santos, L. M., Fernandez, C. C., Hanna, S. A., Machado, B. A. S., Umsza-Guez, M. A., Meyer, R., & Portela, R. W. (2019). Susceptibility of *Malassezia pachydermatis* Clinical Isolates to Allopathic Antifungals and Brazilian Red, Green, and Brown Propolis Extracts. *Frontiers in Veterinary Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00460>
- Dikshit, P. K., Kumar, J., Das, A. K., Sadhu, S., Sharma, S., Singh, S., Gupta, P. K., & Kim, B. S. (2021). Green Synthesis of Metallic Nanoparticles: Applications and Limitations. *Catalysts*, 11(8), 902. <https://doi.org/10.3390/catal11080902>
- Dinkova, V., & Rusenova, N. (2024). A Retrospective Study (2019-2023) on the Prevalence and Antimicrobial Resistance of Isolates from Canine Clinical Samples Submitted to the University Veterinary Hospital in Stara Zagora, Bulgaria. *Microorganisms*, 12(8), 1670. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12081670>
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, 5. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113>
- Eger, C. E., & Lindsay, P. (1997). Effects of otitis on hearing in dogs characterized by brainstem auditory evoked response testing. *The Journal of small animal practice*, 38(9), 380–386. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1997.tb03490.x>
- Flores-Rábago, K. M., Rivera-Mendoza, D., Vilchis-Nestor, A. R., Juarez-Moreno, K., & Castro-Longoria, E. (2023). Antibacterial Activity of Biosynthesized Copper Oxide Nanoparticles (CuONPs) Using *Ganoderma sessile*. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 12(8), 1251. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12081251>
- Forster-Van Hijfte, M. A., Curtis, C. F., & White, R. N. (1997). Resolution of exfoliative dermatitis and *Malassezia pachydermatis* overgrowth in a cat after surgical thymoma resection. *The Journal of small animal practice*, 38(10), 451–454. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1997.tb03439.x>

- Frippiat, T., Art, T., & Delguste, C. (2025). Silver Nanoparticles as Antimicrobial Agents in Veterinary Medicine: Current Applications and Future Perspectives. *Nanomaterials*, 15(3), 202. <https://doi.org/10.3390/nano15030202>
- Garcia-Marin, L. E., Juárez-Moreno, K., Vilchis-Nestor, A. R., & Castro-Longoria, E. (2022). Highly Antifungal Activity of Biosynthesized Copper Oxide Nanoparticles against *Candida albicans*. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 12(21), 3856. <https://doi.org/10.3390/nano12213856>
- Godfrey D. R. (1998). A case of feline paraneoplastic alopecia with secondary *Malassezia*-associated dermatitis. *The Journal of small animal practice*, 39(8), 394–396. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1998.tb03739.x>
- González, Y., Martínez-Soto, D., de Los Santos-Villalobos, S., Garcia-Marin, L. E., Juárez-Moreno, K., & Castro-Longoria, E. (2024). Potential application of a fungal co-culture crude extract for the conservation of post-harvest fruits. *Brazilian journal of microbiology*, 55(2), 1679–1691. <https://doi.org/10.1007/s42770-024-01274-5>
- Goyal, S., Ramawat, K. G., & Mérillon, J. (2017). Different Shades of Fungal Metabolites: An Overview. In J. Mérillon, K. G. Ramawat (Eds.), *Fungal Metabolites* (p. 1–29). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-25001-4\\_34](https://doi.org/10.1007/978-3-319-25001-4_34)
- Guého-Kellermann, E., Boekhout, T. & Begerow, D. (2010). Biodiversity, Phylogeny and Ultrastructure. In *Malassezia and the Skin: Science and Clinical Practice* (pp. 17-63). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-03616-3>
- Guillot, J., Gueho, E., Lesourd, M., Midgley, G., Chevrier, G., & Dupont, B. (1996). Identification of *Malassezia* species. A practical approach. *Journal of Medical Mycology*, 6(3), 103–110. [https://www.researchgate.net/publication/279895481\\_Identification\\_of\\_Malassezia\\_species\\_A\\_practical\\_approach](https://www.researchgate.net/publication/279895481_Identification_of_Malassezia_species_A_practical_approach)
- Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3), 307–321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>
- Harman, G. E., Herrera-Estrella, A. H., Horwitz, B. A., & Lorito, M. (2012). Special issue: Trichoderma—from Basic Biology to biotechnology. *Microbiology*, 158(1), 1–2. <https://doi.org/10.1099/mic.0.056424-0>
- Hernández-Escareño, J. J., Sandoval-Coronado, C. F., Salinas-Meléndez, J. A., Riojas-Valdez, V. M., Picón-Rubio, F., Dávalos-Aranda, G., & Sánchez-Yañez, J. M. (2012). *Malassezia pachydermatis* in dogs with external otitis from Monterrey, Nuevo León, México. *African Journal of Microbiology Research*. <https://academicjournals.org/journal/AJMR/article-abstract/67B1DBF23998>
- Hiruma, J., Nojo, H., Hiruma, M., Sugita, T., Makimura, K., Harada, K., & Kano, R. (2025). *Malassezia polysorbatinonus* sp. nov., a Novel Isolate from a Japanese Patient with Seborrheic Dermatitis. *Mycopathologia*, 190(1), 15. <https://doi.org/10.1007/s11046-024-00926-2>
- Hobi, S., Bęczkowski, P. M., Mueller, R., Tse, M., & Barrs, V. R. (2024). *Malassezia* dermatitis in dogs and cats. *Veterinary journal (London, England: 1997)*, 304, 106084. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2024.106084>

- Hobi, S., Cafarchia, C., Romano, V., & Barrs, V. R. (2022). *Malassezia*: Zoonotic Implications, Parallels and Differences in Colonization and Disease in Humans and Animals. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 8(7), 708. <https://doi.org/10.3390/jof8070708>
- Iatta, R., Puttilli, M. R., Immediato, D., Otranto, D., & Cafarchia, C. (2017). The role of drug efflux pumps in *Malassezia pachydermatis* and *Malassezia furfur* defence against azoles. *Mycoses*, 60(3), 178–182. <https://doi.org/10.1111/myc.12577>
- Kano, R., Aramaki, C., Murayama, N., Mori, Y., Yamagishi, K., Yokoi, S., & Kamata, H. (2020). High multi-azole-resistant *Malassezia pachydermatis* clinical isolates from canine *Malassezia* dermatitis. *Medical mycology*, 58(2), 197–200. <https://doi.org/10.1093/mmy/myz037>
- Khandel, P., & Shahi, S. K. (2018). Mycogenic nanoparticles and their bio-prospective applications: current status and future challenges. In *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 8(4), 69–391. Springer Medizin. <https://doi.org/10.1007/s40097-018-0285-2>
- Larsson A. (2014). AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(22), 3276–3278. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531>
- Lefort, V., Longueville, J. E., & Gascuel, O. (2017). SMS: Smart Model Selection in PhyML. *Molecular biology and evolution*, 34(9), 2422–2424. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx149>
- Lemoine, F., Correia, D., Lefort, V., Doppelt-Azeroual, O., Mareuil, F., Cohen-Boulakia, S., & Gascuel, O. (2019). NGPhylogeny.fr: new generation phylogenetic services for non-specialists. *Nucleic acids research*, 47(W1), W260–W265. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz303>
- Lemoine, F., Domelevo Entfellner, J. B., Wilkinson, E., Correia, D., Dávila Felipe, M., De Oliveira, T., & Gascuel, O. (2018). Renewing Felsenstein's phylogenetic bootstrap in the era of big data. *Nature*, 556(7702), 452–456. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0043-0>
- Lenardon, M. D., Sood, P., Dorfmueller, H. C., Brown, A. J. P., & Gow, N. A. R. (2020). Scalar nanostructure of the *Candida albicans* cell wall; a molecular, cellular and ultrastructural analysis and interpretation. *Cell surface (Amsterdam, Netherlands)*, 6, 100047. <https://doi.org/10.1016/j.tcsw.2020.100047>
- Machado, M. L. S., Ferreira, L., Ferreira, R. R., Corbellini, L. G., Deville, M., Berthelemy, M., & Guillot, J. (2011). *Malassezia* dermatitis in dogs in Brazil: Diagnosis, evaluation of clinical signs and molecular identification. *Veterinary Dermatology*, 22(1), 46–52. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2010.00909.x>
- Manavathu, E. K., Cutright, J. L., & Chandrasekar, P. H. (1998). Organism-dependent fungicidal activities of azoles. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 42(11), 3018–3021. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.11.3018>
- Mauldin, E. A., Morris, D. O., / Goldschmidt, M. H. (2002). Retrospective study the presence of *Malassezia* in feline skin biopsies. A clinicopathological study. *Veterinary dermatology*, 13(1), 7-13. <https://doi.org/10.1046/j.0959-4493.2001.00279.x>

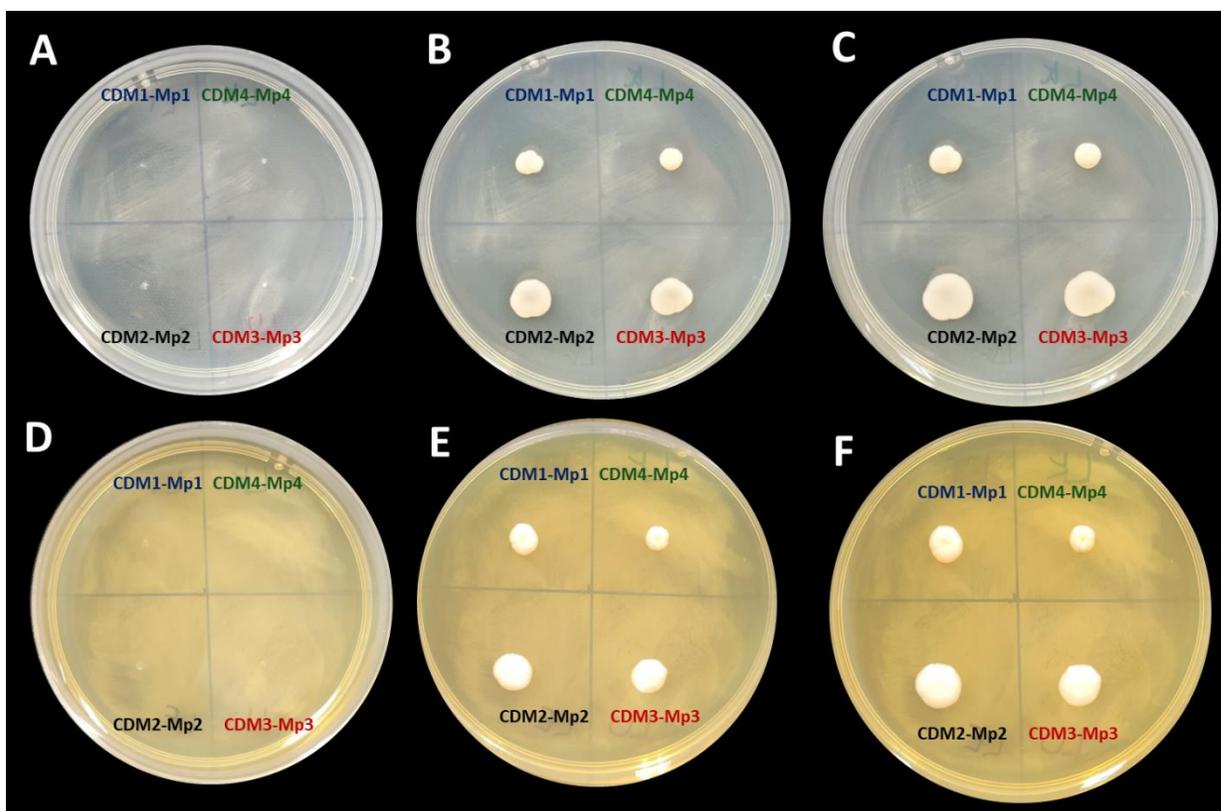
- Medina Ibarra, Y. R. (2025). *Biosíntesis y Caracterización de Nanopartículas de Plata (AgNPs) con Trichoderma spp. y su Efecto Antifúngico en Cepas de Malassezia pachydermatis*. [Tesis de Licenciatura en Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Occidente]. [Archivo PDF]
- Murayama, N., & Kano, R. (2023). Azole and terbinafine susceptibility testing of *Malassezia pachydermatis* in Japan. *The Journal of veterinary medical science*, 85(3), 383–385. <https://doi.org/10.1292/jvms.22-0358>
- Murillo-Rábago, E. I., Vilchis-Nestor, A. R., Juárez-Moreno, K., García-Marin, L. E., Quester, K., & Castro-Longoria, E. (2022). Optimized Synthesis of Small and Stable Silver Nanoparticles Using Intracellular and Extracellular Components of Fungi: An Alternative for Bacterial Inhibition. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(6), 800. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11060800>
- Mussin, J. E., Roldán, M. V., Rojas, F., Sosa, M. de los Á., Pellegrini, N., & Giusiano, G. (2019). Antifungal activity of silver nanoparticles in combination with ketoconazole against *Malassezia furfur*. *AMB Express*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0857-7>
- Mussin, J., & Giusiano, G. (2022). Biogenic silver nanoparticles as antifungal agents. *Frontiers in chemistry*, 10, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.1023542>
- Núñez, A. H., Hidalgo, F. G., Morales, P. C., Silva, V. E., Thomson, P. E., & Castro, R. A. (2022). Antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* isolated from the external auditive conduct from dogs, in central Chile. *Open Veterinary Journal*, 12(1), 99–104. <https://doi.org/10.5455/OVJ.2022.v12.i1.12>
- Omodo-Eluk, J. A., Baker, K. P., & Fuller, H. (2003). Comparison of two sampling techniques for the detection of *Malassezia pachydermatis* on the skin of dogs with chronic dermatitis. *The Veterinary Journal*, 165(2), 119–124. [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(02\)00128-4](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(02)00128-4)
- O'Neill, D. G., Volk, A. V., Soares, T., Church, D. B., Brodbelt, D. C., & Pegram, C. (2021). Frequency and predisposing factors for canine otitis externa in the UK - a primary veterinary care epidemiological view. *Canine medicine and genetics*, 8(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s40575-021-00106-1>
- Planchon, M., Ferrari, R., Guyot, F., Gélabert, A., Menguy, N., Chanéac, C., Thill, A., Benedetti, M. F., & Spalla, O. (2013). Interaction between *Escherichia coli* and TiO<sub>2</sub> nanoparticles in natural and artificial waters. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 102, 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.08.034>
- Puig, L., Bragulat, M. R., Castellá, G., & Cabañes, F. J. (2017). Characterization of the species *Malassezia pachydermatis* and re-evaluation of its lipid dependence using a synthetic agar medium. *PloS one*, 12(6), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179148>
- Rai, A., Singh, A., Ahmad, A., & Sastry, M. (2006). Role of halide ions and temperature on the morphology of biologically synthesized gold nanotriangles. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*, 22(2), 736–741. <https://doi.org/10.1021/la052055q>
- Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2017). Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products*, 80(3), 756–770. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>
- Rambaut, A. (2018) Figtree ver 1.4.4. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh.

- Ribeiro, L. G., Roque, G. S. C., Conrado, R., & De Souza, A. O. (2023). Antifungal Activity of Mycogenic Silver Nanoparticles on Clinical Yeasts and Phytopathogens. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 12(1), 91. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12010091>
- Rincón, S., Cepero De García, M. C., & Espinel-Ingroff, A. (2006). A modified Christensen's urea and CLSI broth microdilution method for testing susceptibilities of six *Malassezia* species to voriconazole, itraconazole, and ketoconazole. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(9), 3429–3431. <https://doi.org/10.1128/JCM.00989-06>
- Rivera-Mendoza, D., Quiñones, B., Huerta-Saquero, A., & Castro-Longoria, E. (2024). Antimicrobial Activity of Green Synthesized Silver and Copper Oxide Nanoparticles against the Foodborne Pathogen *Campylobacter jejuni*. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 13(7), 650. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13070650>
- Ro, B. I., & Dawson, T. L. (2005). The role of sebaceous gland activity and scalp microfloral metabolism in the etiology of seborrheic dermatitis and dandruff. *The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings*, 10(3), 194–197. <https://doi.org/10.1111/j.1087-0024.2005.10104.x>
- Rojas, F. D., Córdoba, S. B., de los Ángeles Sosa, M., Zalazar, L. C., Fernández, M. S., Cattana, M. E., Alegre, L. R., Carrillo-Muñoz, A. J., & Giusiano, G. E. (2017). Antifungal susceptibility testing of *Malassezia* yeast: comparison of two different methodologies. *Mycoses*, 60(2), 104–111. <https://doi.org/10.1111/myc.12556>
- Rueden, C. T., Schindelin, J., Hiner, M. C., DeZonia, B. E., Walter, A. E., Arena, E. T., Eliceiri, K. W. (2017). ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*, 18, 529. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1934-z>
- Saranya, S., Vijayarani, K., Ramya, K., Revathi, K., & Kumanan, K. (2016). Synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Azadirachta indica* leaf extract and their anti-fungal activity against *Malassezia* species. *Journal of Nano Research*, 43, 1-10. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/JNanoR.43.1>
- Schmoll, M., & Schuster, A. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(3), 787–799. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2632-1>
- Shobha, B., Ashwini, B. S., Ghazwani, M., Hani, U., Atwah, B., Alhumaidi, M. S., Basavaraju, S., Chowdappa, S., Ravikiran, T., Wahab, S., Ahmad, W., Lakshmeesha, T. R., & Ansari, M. A. (2023). *Trichoderma*-Mediated ZnO Nanoparticles and Their Antibiofilm and Antibacterial Activities. *Journal of Fungi*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/jof9020133>
- Siddiqi, K. S., & Husen, A. (2016). Fabrication of Metal Nanoparticles from Fungi and Metal Salts: Scope and Application. *Nanoscale research letters*, 11(1), 98. <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1311-2>
- Sierra, P., Guillot, J., Jacob, H., Bussi eras, S., & Chermette, R. (2000). Fungal flora on cutaneous and mucosal surfaces of cats infected with feline immunodeficiency virus or feline leukemia virus. *American journal of veterinary research*, 61(2), 158–161. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2000.61.158>
- Sparber, F., & LeibundGut-Landmann, S. (2017). Host Responses to *Malassezia* spp. in the Mammalian Skin. *Frontiers in immunology*, 8, 1614. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01614>

- Sugita, T., Takeo, K., Hama, K., Virtudazo, E., Takashima, M., Nishikawa, A., Kucsera, J., Dorogi, J., Komori, S., Nakagaki, K., Vollekova, A., Slavikova, E., & Farkas, V. (2005). DNA sequence diversity of intergenic spacer I region in the non-lipid-dependent species *Malassezia pachydermatis* isolated from animals. *Medical mycology*, 43(1), 21–26. <https://doi.org/10.1080/1369378042000193185>
- Thepbandit, W., Papathoti, N. K., Hoang, N. H., Siriwong, S., Sangpueak, R., Saengchan, C., Laemchiab, K., Kiddeejing, D., Tonpho, K., & Buensanteai, K. (2024). Bio-synthesis and characterization of silver nanoparticles from *Trichoderma* species against cassava root rot disease. *Scientific Reports*, 14(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-60903-z>
- Vazquez-Muñoz, R., Avalos-Borja, M., & Castro-Longoria, E. (2014). Ultrastructural analysis of *Candida albicans* when exposed to silver nanoparticles. *PloS one*, 9(10), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108876>
- Vishkautsan, P., Sykes, J., & Papich, M. (2023). Antifungal Drugs. In J. Sykes, S. Rankin, M. Papich, S. Weese, & S. Little (Eds.), *Greene's Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 5, 127–139. ELSEVIER. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-50934-3.00011-2>
- Wahab, S., Salman, A., Khan, Z., Khan, S., Krishnaraj, C., & Yun, S. I. (2023). Metallic Nanoparticles: A Promising Arsenal against Antimicrobial Resistance-Unraveling Mechanisms and Enhancing Medication Efficacy. *International journal of molecular sciences*, 24(19), 14897. <https://doi.org/10.3390/ijms241914897>
- Watanabe, S., Koike, A., Kano, R., Nagata, M., Chen, C., Hwang, C. Y., Hasegawa, A., & Kamata, H. (2014). In vitro susceptibility of *Malassezia pachydermatis* isolates from canine skin with atopic dermatitis to ketoconazole and itraconazole in East Asia. *The Journal of veterinary medical science*, 76(4), 579–581. <https://doi.org/10.1292/jvms.13-0433>
- Wypij, M., Czarnecka, J., Dahm, H., Rai, M., & Golinska, P. (2017). Silver nanoparticles from *Pilimelia columellifera* subsp. *pallida* SL19 strain demonstrated antifungal activity against fungi causing superficial mycoses. *Journal of basic microbiology*, 57(9), 793–800. <https://doi.org/10.1002/jobm.201700121>
- Zhang, N., Xiong, G., & Liu, Z. (2022). Toxicity of metal-based nanoparticles: Challenges in the nano era. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 10, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1001572>
- Zhao, Y. J., Ma, Q., Liu, M. M., & Wang, Q. M. (2024). *Malassezia gallinae* sp. nov., a new basidiomycetous yeast species isolated from skins of chickens. *Medical mycology*, 62(11). <https://doi.org/10.1093/mmy/myae109>

## Anexos

### Anexo A



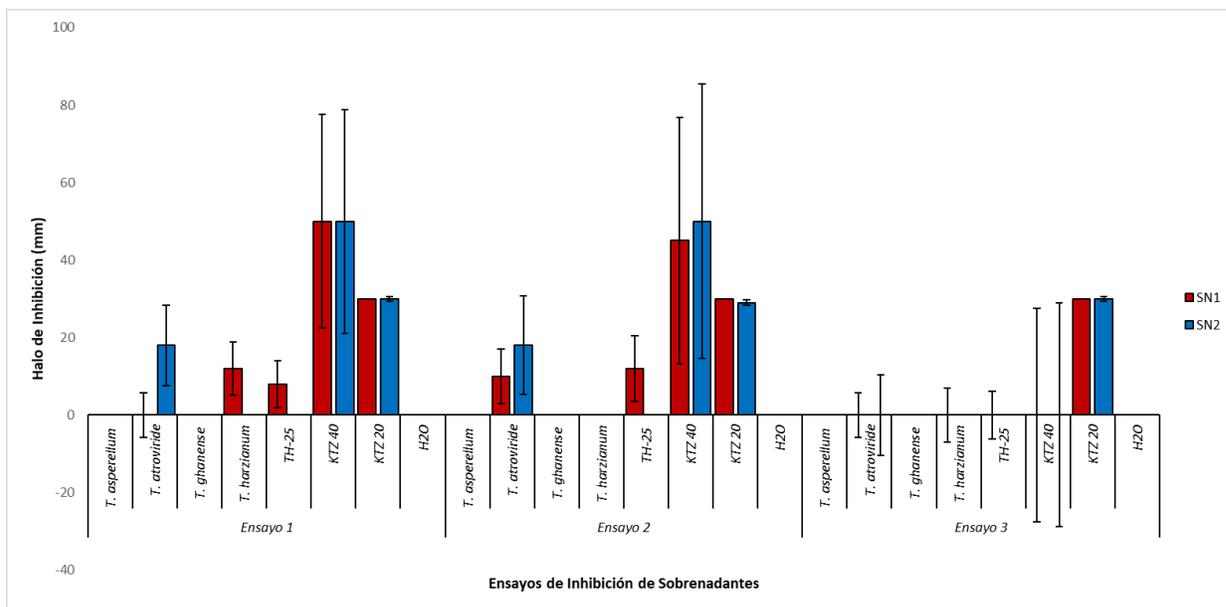
**Figura 30.** Pruebas de medición de tamaño de colonias de las cepas de *M. pachydermatis*. (A) Colonias al día 0 en SDA, (B) colonias al día 5 en SDA, (C) colonias al día 7 en SDA, (D) colonias al día 0 en YPDA, (E) colonias al día 5 en YPDA, (F) colonias al día 7 en YPDA.

## Anexo B

Tabla 4. Datos de los ensayos de inhibición con los sobrenadantes de *Trichoderma*.

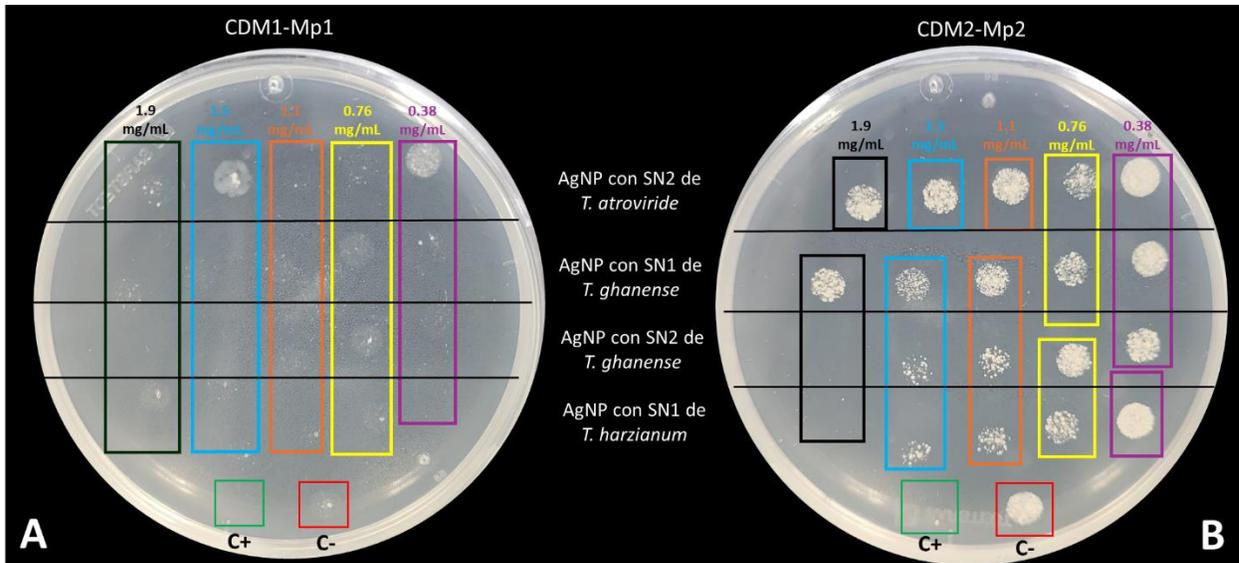
Halos de Inhibición (mm)		
Tratamiento	SN1	SN2
<i>T. asperellum</i>	0	0
<i>T. atroviride</i>	3.33 ± 5.77	12 ± 10.39
<i>T. ghanense</i>	0	0
<i>T. harzianum</i>	4 ± 6.93	0.00
TH-25	6.67 ± 6.11	0.00
KTZ 40 mg/mL	31.67 ± 27.54	33.33 ± 28.86
KTZ 20 mg/mL	30 ± 0	29.67 ± 0.5
H <sub>2</sub> O	0	0

## Anexo C



**Figura 31.** Gráfica de barras representativa de los ensayos de inhibición con los sobrenadantes. Barras de error con la desviación estándar. \* $p < 0.05$  (ANOVA de una vía).

## Anexo D



**Figura 32.** Resultados de pruebas preliminares para selección de AgNP efectivas contra *M. pachydermatis*. (A) Placa con los resultados de las AgNP contra CDM1-Mp1, (B) resultados de las AgNP contra CDM2-Mp2 después de 24 horas del tratamiento.