

Tesis defendida por
Roberto Vazquez Muñoz
y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Ernestina Castro Longoria
Director del Comité

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez
Miembro del Comité

Dra. Nina Bogdanchikova
Miembro del Comité

Dr. Fernando Díaz Herrera
Coordinador
Programa de Posgrado en Ciencias
de la Vida

Dr. Jesús Favela Vara
Encargado del Despacho de la
Dirección de Estudios de Posgrado

Septiembre del 2013

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



Programa de posgrado en ciencias en ciencias de la vida

Efectos de las nanopartículas de plata en el hongo patógeno *Candida albicans*

Tesis

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

Presenta:

Roberto Vazquez Muñoz

Ensenada, Baja California, México
2013

Resumen de la tesis de Roberto Vazquez Muñoz, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida, con orientación en Microbiología.

Efectos de las nanopartículas de plata en el hongo patógeno *Candida albicans*

Resumen aprobado por:

Dra. Ernestina Castro Longoria
Director de Tesis

Las enfermedades infecciosas son la principal causa de muerte en el mundo. Los hongos patógenos se han convertido, desde principios de 1980, en una de las principales causas de las infecciones humanas. El género *Candida* representa la principal causa mundial de infecciones fúngicas. Hasta el momento, el tratamiento convencional es por medio de sustancias antifúngicas. La diversidad de estas sustancias es muy limitada y presentan algunas desventajas importantes. Por otro lado, el desarrollo de nuevos antibióticos es un proceso largo y costoso, por lo que no hay seguridad de que se puedan seguir generando nuevos antibióticos al ritmo que se requiere. La plata ha sido reconocida por su capacidad antimicrobiana y recientemente las nanopartículas de plata (AgNPs), han sido reportadas como agentes antimicrobianos, así mismo al ser utilizadas en combinación con antibióticos, estas elevan la efectividad de los mismos. Por lo tanto, los materiales nanoestructurados podrían ser una buena alternativa para combatir a los microorganismos patógenos. Es por ello que el objetivo general de éste trabajo fue determinar los efectos y la interacción de nanopartículas de plata quasi-esféricas, funcionalizadas con polivinilpirrolidona (PVP), en el hongo patógeno *Candida albicans*. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración inhibitoria del 50 % (IC_{50}) de las AgNPs en *C. albicans* ATCC SC5314. El efecto de las AgNPs se comparó con cultivos expuestos al fluconazol (FLZ), el antifúngico más utilizado en la clínica y también con nitrato de plata ($AgNO_3$), en donde las AgNPs nanopartículas mostraron mayor potencia que el $AgNO_3$ y el FLZ. Se observó que las AgNPs tienen un efecto fungicida y que al parecer no presentan el efecto paradoja. También se demostró que las AgNPs tienen un efecto sinérgico con el FLZ, potenciando la actividad antifúngica de éste. Se evaluó también el efecto de las AgNPs en otras especies de *Candida* y en aislados clínicos, encontrando que hay algunas cepas de *C. albicans* que resisten concentraciones de AgNPs, superiores a la CMI establecida para la cepa de referencia. Por otro lado, ninguna de las cepas de *C. glabrata*, *C. parapsilosis* o *C. tropicalis* resistió a la concentración de AgNPs equivalente a la CMI de la cepa de referencia. Mediante el análisis ultraestructural se determinó que las AgNPs se acumulan de manera no específica en el exterior e interior de las células de *C. albicans*, así como en la pared celular. Nuestros resultados sugieren que muy probablemente las AgNPs actúan como reservorio de iones de Ag^+ ; los cuales son liberados gradualmente hacia el interior de la célula, pudiendo incluso inducir fragmentación nuclear. También se encontró que en bajas concentraciones ($\leq IC_{50}$) las AgNPs no inhiben la capacidad dimórfica de *C. albicans*. Como estudio preliminar, se evaluó la capacidad de *C. albicans* para generar resistencia contra las AgNPs, siendo negativa la generación de resistencia durante el tiempo de observación. Por lo tanto las AgNPs pueden ser una alternativa viable para el tratamiento de enfermedades infecciosas, particularmente por su capacidad de actuar de manera no específica.

Palabras clave: **Nanopartículas de plata, *Candida*, bionanotecnología, bionanomedicina.**

Abstract of the thesis presented by Roberto Vazquez Muñoz as a partial requirement to obtain the Master in Science degree in Life Sciences, with orientation in Microbiology

Effects of silver nanoparticles in the pathogenic fungus *Candida albicans*

Abstract approved by:

Dr. Ernestina Castro Longoria
Thesis advisor

Infectious diseases are the leading cause of death worldwide. Fungal pathogens have become a major cause of human infections since the early 1980s. The genus *Candida* is the world's leading cause of fungal infections. So far, antifungal substances are used as conventional treatment. The diversity of these substances is very limited and has several significant drawbacks. On the other hand, the development of new antibiotics is a long and expensive process, so there is no assurance that new antibiotics can be generated as they are required. Silver has long been recognized as an antimicrobial agent and recently, silver nanoparticles (AgNPs) were reported to have antimicrobial activity as well as to raise the effectiveness of antibiotics. Therefore, nanostructured materials could be a good alternative to combat pathogens. For that reason, the overall objective of this work was to determine the effects and interaction of quasi-spherical silver nanoparticles, functionalized with polyvinylpyrrolidone (PVP), in the pathogenic fungus *Candida albicans*. The minimal inhibitory concentration (MIC) and the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of AgNPs were determined for *C. albicans* ATCC SC5314. The effect of AgNPs was also compared with cultures exposed to fluconazole (FLZ), the most common antifungal agent used in the clinic, and with silver nitrate (AgNO₃). AgNPs showed higher potency than the AgNO₃ and FLZ. We observed that AgNPs showed antifungal effect and apparently do not exhibit the paradox effect. It was found that AgNPs have a synergistic effect with FLZ, enhancing its antifungal activity. The antifungal effect of AgNPs was also evaluated against other *Candida* species and clinical isolates, finding that some *C. albicans* strains were resistant to AgNPs concentrations, higher than the MIC established for the reference strain. However, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* were inhibited by AgNPs concentration equivalent to the MIC determined for the reference strain. Ultrastructural analysis revealed that AgNPs accumulated non-specifically in the exterior and interior of *C. albicans* cells, and were also found in the cell wall. Our results suggest that most probably AgNPs act as a reservoir of Ag + ions; releasing them gradually and that once inside the cell they can induce nuclear fragmentation. Also it was determined that at low concentrations (\leq IC₅₀), AgNPs did not inhibit the dimorphic ability of *C. albicans*. As a preliminary study, we evaluated if *C. albicans* is able to generate resistance against AgNPs. Our results show that over the observed period, *C. albicans* did not generate resistance to AgNPs. Therefore AgNPs might be a viable alternative for the treatment of infectious diseases, particularly due to its ability to act in a nonspecific manner.

Keywords: **silver nanoparticles, *Candida*, bionanotechnology, bionanomedicine.**

Dedicatoria

A mi Amor Daniela Silem Chávez Ramírez...

A mi hermana Annet Patricia Vazquez...

A mis sobrinos, especialmente a Ángel Alexis...

A mi familia...

A la Dra. Nina B. y la red de Nanoplata...

Al Dr. Noboru Takeuchi y familia...

Agradecimientos

Este trabajo surgió gracias al apoyo de muchas personas, particularmente por el respaldo de mi Comité de Tesis. Antes que nada le agradezco a la Dra. Ernestina Castro Longoria, por haber creído en el proyecto y por apoyarme desde el principio y con todo lo necesario para que la tesis se realizara con éxito, en tiempo y forma. Le agradezco también por transmitirme el interés por la microscopía, particularmente la microscopía electrónica, que amplió mi forma de ver las cosas. Le agradezco con especial cariño a la Dra. Nina Bogdanchikova, por introducirme y guiarme en el campo de la nanotecnología y, eventualmente, por generar las condiciones para que yo ingresara en el área bionanotecnológica. Le agradezco también su amistad y apoyo durante estos años y por impulsarme siempre a seguir dando mi mayor esfuerzo y ser cada día una mejor persona. Le doy las gracias también a la Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez y a su grupo, en especial a la M.C. Naidy Pinoncely y la M. C Isadora Clarck, por su apoyo con las cepas de su laboratorio, los consejos y las recomendaciones. Sin su apoyo este trabajo no sería el mismo.

Agradezco al Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, por aceptarme en el programa de posgrado de Ciencias de la Vida y por brindar siempre todas las facilidades, desde la parte administrativa hasta las instalaciones, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada para realizar la Maestría y a SEP-CONACyT CB2011/169154 por financiar parcialmente este trabajo.

También quiero agradecer al Dr. Vasily Burmistrov (Vector Vita, Rusia) y al Dr. Alexey Pestryakov, quienes hicieron observaciones importantes sobre el manejo de las nanopartículas de plata y compartieron su conocimiento sobre los estudios de las AgNPs en los sistemas biológicos, realizados en Rusia.

Al Dr. Miguel Ávalos Borja, y al Dr. Nicolás Cayetano Castro, del Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. (LINAN-IPICyT), por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por todas las facilidades durante mi estancia.

Al Dr. Alejandro Huerta Saquero, por sus invaluable observaciones en diferentes aspectos metodológicos del trabajo, por los consejos y por las provechosas discusiones sobre los distintos resultados.

A la Dra. Oksana Martinyuk, del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, por las instrucciones y consejos para el mejor manejo de la AgNPs, y por facilitarme siempre las soluciones de nanomateriales cada vez que se requerían.

Al M. C. Miguel Humberto Carrillo Mendivil por el apoyo en la fase preliminar al trabajo y por darme las bases necesarias para desarrollar un proyecto en el área microbiológica.

Al Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Universidad Autónoma de Baja California, por las facilidades y apoyo.

A los técnicos y compañeros del laboratorio del Departamento de Microbiología Experimental y Aplicada, de la DBEA-CICESE

Al Amor de mi Vida, Daniela Silem Chaves Ramírez, por su Amor, apoyo y comprensión. Agradezco también sus consejos y recomendaciones en algunos aspectos técnicos en la parte experimental, y por escucharme siempre que yo quería discutir conceptos y datos técnicos del trabajo. ¡Te AMO Daniela!

Le doy gracias infinitas a mi familia de sangre y la que uno tiene el honor de escoger: los amigos. Gracias a mi hermanita Annet Patricia Vazquez Muñoz por todo su apoyo en el aspecto personal. Le doy las gracias a mis amigos, por todo: Alberto Manuel Mora Cortes y familia, Rosario Andrade, Nayeli Girón, Marina Jiménez, Karina Alvarez Alvarez, Catalina Avalos, Ana Victoria Flores, Itzel Ortega, Carlos Apodaca y familia, Ana Marichal... quienes sin duda alguna, siempre han estado ahí, de una forma u otra.

También quiero dedicarles este trabajo a todos los investigadores y académicos que, desde sus respectivas áreas, me han apoyado con muy buenos consejos, y sobre todo, con una buena amistad que se ha construido con muchos de ellos: Dra. Nina Bogdanchikova, Dr. Noboru Takeuchi y familia, Dr. Alejandro Martínez, Dr. Ernesto Campos, Dra. Nahara Ayala, Dr. Ismael Plascencia, Dr. Cesar Almonaci, Dr. Horacio de la Cueva, Biól. Isabel Pérez Monfort y a la Dra. Karla Oyuki Juárez.

A la Dra. Rufina Hernández, que más allá de su papel como coordinadora del posgrado en su momento, me dio apoyo moral, consejos y por escucharme, así como por un par de reprimendas que necesitaba.

A mi generación del posgrado, la cohorte 2011-2013, por su amistad y todos los momentos divertidos que pasamos juntos. Sin duda alguna, hay amistades que llegaron para quedarse, sin importar a donde no lleven nuestros diferentes caminos.

A la Dra. Nallely Cano, por sus consejos, recomendaciones, preguntas y el apoyo técnico relativo a mi trabajo de tesis.

A Anaid Meza y Yasmin Lozano, estudiantes de Biología y Bioingeniería, respectivamente, por el apoyo técnico durante el tiempo que trabajaron conmigo en el laboratorio. Gracias, sobre todo, por su trabajo en el laboratorio, su amistad y los buenos momentos.

Sin duda alguna, las personas e instituciones con las que he colaborado en diferentes actividades han sido un gran apoyo, así que también le agradezco a todos ellos: a la Lic. Antonia Martínez y su equipo, de Caracol Museo de Ciencias y Acuario; a los integrantes de la Asociación de Biólogos de Ensenada; a la MC Norma Herrera, a la MC. Adriana Blancarte y al resto del equipo del Departamento de Comunicación del CICESE; a los directivos y colegas divulgadores científicos del Museo del Trompo, al Club Toastmasters de profesionistas 6767 y a la Red de Nanoplata Argovit.

Contenido

	Página
Resumen español.....	i
Resumen ingles.....	ii
Dedicatorias.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tablas.....	x
Capítulo I. Introducción.....	1
Capítulo II. Antecedentes.....	2
II.1 El panorama actual de las enfermedades infecciosas y las micosis.....	2
II.2 Descripción y uso de las sustancias fungicidas.....	3
II.3 Desventajas de los antibióticos: efectividad y resistencia.....	8
II.4 Resistencia de <i>Candida</i> spp. a los antifúngicos.....	11
II.5 El género <i>Candida</i> y <i>Candida albicans</i> como modelo de estudio.....	11
II.5.1 <i>Candida albicans</i>	12
II.5.2 Candidiasis.....	14
II.6 Nanotecnología y Bionanotecnología.....	16
II.7 Trabajos previos.....	26
Capítulo III. Justificación.....	29
Capítulo IV. Hipótesis.....	30
Capítulo V. Objetivos.....	31
Capítulo VI. Materiales y Método.....	33
VI.1 Materiales y Equipo.....	33
VI.1.1 Material Biológico.....	33
VI.1.2 Medios de Cultivo.....	33
VI.1.3 Nanopartículas de plata.....	33
VI.1.4 Antibiótico: Fluconazol.....	34
VI.1.5 Nitrato de Plata.....	34
VI.1.6 Polivinilpirrolidona.....	34
VI.2 Efecto de las AgNPs en <i>Candida albicans</i>	34
VI.2.1 Preparación de los cultivos.....	34
VI.2.2 Curva estándar de <i>Candida albicans</i> : densidad celular vs densidad óptica.....	35
VI.2.3 Determinación de la CMI de las AgNPs.....	35
VI.2.4 Determinación de la CI_{50} de las AgNPs vs la CI_{50} del FLZ en <i>C. albicans</i>	38
VI.2.5 Evaluación del efecto fungicida / fungistático de las AgNPs.....	39
VI.2.6 Evaluación para determinar si se presenta el “efecto paradoja” en las AgNPs.....	40
VI.2.7 Evaluación de la interacción AgNPs - FLZ.....	41
VI.3 Contrastar la CMI de <i>Candida albicans</i> con otras especies y con los aislados clínicos.....	42
VI.4 Análisis Microscópico.....	44
VI.4.1 Microscopía óptica.....	44
VI.4.2 Microscopía Electrónica de Transmisión.....	44
VI.5 Ensayos para evaluar la capacidad de generar resistencia a los tratamientos.....	46

Capítulo VII. Resultados.....	50
VII.1 Efecto de las AgNPs en <i>Candida albicans</i>	50
VII.1.1 Determinación de la CMI de las AgNPs.....	50
VII.1.2 Determinación de la CI_{50} de las AgNPs vs la CI_{50} del FLZ en <i>C. albicans</i>	53
VII.1.3 Evaluación del efecto fungicida / fungistático de las AgNPs.....	55
VII.1.4 Evaluación para determinar si se presenta el “efecto paradoja” en las AgNPs.....	57
VII.1.5 Evaluación de la interacción AgNPs - FLZ.....	59
VII.2 Comparación del efecto de la CMI en otras especies del género <i>Candida</i> y en aislados clínicos de las especies representativas.....	62
VII.3 Análisis Microscópico.....	66
VII.3.1 Microscopía óptica.....	67
VII.3.2 Microscopía Electrónica de Transmisión.....	71
VI.4 Análisis de resistencia.....	83
Capítulo VIII. Discusión.....	86
Conclusiones.....	101
Referencias bibliográficas.....	103

Lista de figuras

Figura		Página
1	Estructura química de algunos antifúngicos representativos	5
2	Aprobación de nuevos antibióticos por parte de la FDA	9
3	Distintas morfologías de <i>Candida albicans</i>	13
4	Comparación entre nanopartículas de diferentes tamaños	17
5	Tamaño comparativo entre NPs de 10 nm y los sistemas biológicos	18
6	Diferentes tipos de nanomateriales y nanopartículas.	19
7	Diferentes mecanismos de las NPs metálicas sobre la célula.	24
8	Efecto de las AgNPs en la transición dimórfica de <i>C. albicans</i>	26
9	Imagen en TEM de células de <i>C. albicans</i> con AgNPs	27
10	Fragmentación del DNA en <i>C. albicans</i>	28
11	Esquema representativo de los cultivos en YPD, ajustados a 2 ml	36
12	Esquema de inoculación en placa YPDA.	37
13	Esquema de re-inoculación en placa YPDA	40
14	Siembra en placa de los tratamientos combinados de AgNPs+FLZ en <i>C. albicans</i> .	42
15	Esquema de inoculación para probar la CMI de <i>C. albicans</i> en diferentes especies y aislados clínicos del género <i>Candida</i>	43
16	Representación de los cultivos iniciales y de los sub-cultivos sucesivos	47
17	Diagrama de trabajo para la prueba de resistencia.	48
18	Imágenes representativas de los cultivos en placa de las cepas de <i>C. albicans</i> expuestas a AgNPs, AgNO ₃ y FLZ.	51
19	Efecto de la PVP en el crecimiento de <i>C. albicans</i>	52
20	Crecimiento comparativo en cultivos de <i>C. albicans</i> tratados con PVP.	53
21	Método de cuenta en placa para determinar la CI ₅₀ .	55
22	Esquema de re-inoculación para determinar el efecto fungicida.	57
23	Curva de crecimiento de <i>C. albicans</i> expuesta al FLZ.	58
24	Gráfica de crecimiento para contrastar la respuesta a los tratamientos combinados	61
25	Efecto de la interacción entre AgNPs y FLZ	62
26	Imágenes representativas para evaluar el efecto de la CMI de las AgNPs en los aislados clínicos del género <i>Candida</i> .	65
27	Gráfica de la respuesta general de los aislados clínicos del género <i>Candida</i> , a la CMI de AgNPs	66
28	Interacción entre células de <i>C. albicans</i> y AgNPs	67
29	Microscopía de fluorescencia, de <i>C. albicans</i> sin tratamiento, teñidas con DAPI.	68
30	Microscopía de fluorescencia, de <i>C. albicans</i> con tratamiento, teñidas con DAPI	69

31	Microscopía de fluorescencia, de <i>C. albicans</i> con tratamiento, teñidas con DAPI y excitadas con luz UV y azul.	70
32	Presencia de hifas en cultivos de <i>C. albicans</i> expuesta a la CI ₅₀ de las AgNPs.	71
33	Análisis ultraestructural <i>C. albicans</i>	72
34	Acumulación de las AgNPs en el exterior de las células.	75
35	Distribución de las AgNPs en el interior de las células.	77
36	Presencia de las AgNPs en la pared celular.	79
37	Análisis de EDS/EDX de las células de <i>C. albicans</i> , sin tratamiento.	80
38	Análisis de EDS/EDX en las células de <i>C. albicans</i> , con AgNPs.	81
39	Análisis cristalográfico de las AgNPs.	82
40	Inóculos de los cultivos expuestos a las AgNPs sembrados en YPDA	84
41	Análisis cristalográfico de las AgNPs.	85

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Espectro de acción de algunos antifúngicos contra las principales especies patógenas de <i>Candida</i> spp.	6
2	Historia de las terapias antifúngicas.*	7
3	Historia del desarrollo antibióticos vs la aparición de la resistencia	10
4	Distribución de las principales especies de <i>Candida</i> que provocan candidiasis	15
5	Variación geográfica de la distribución de especies de <i>Candida</i> que causan fungemias	16
6	Nanomateriales antimicrobianos.	21
7	Densidad celular vs concentración de los tratamientos ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) para determinar la CMI.	36
8	Densidad celular vs dosis de AgNPs y FLZ para determinar la CI_{50}	38
9	Concentraciones utilizadas de los tratamientos para determinar su efecto fungicida / fungistático.	39
10	Evaluación del efecto paradoja.	41
11	Tratamientos combinados de AgNPs-FLZ	41
12	Concentraciones de los tratamientos para evaluar la capacidad de <i>C. albicans</i> para generar resistencia.	46
13	Concentraciones usadas después del periodo experimental.	49
14	CMI de las AgNPs y el AgNO_3	50
15	Efecto de la PVP en el crecimiento del <i>C. albicans</i>	53
16	Determinación de la CI_{50} para los diferentes tratamientos	54
17	Determinación del efecto fungicida/fungistático de los tratamientos con plata y el FLZ.	56
18	Crecimiento de <i>C. albicans</i> tratada con FLZ.	59
19	Determinación de la presencia del efecto paradoja en los tratamientos con AgNPs y AgNO_3 .	59
20	Respuesta del crecimiento vs los diferentes tratamientos AgNPs-FLZ	60
21	Efecto del CMI en aislados clínicos de <i>C. albicans</i> .	63
22	Efecto del CMI en aislados clínicos de <i>Candida</i> no- <i>albicans</i> .	64
23	Respuesta de los cultivos post-tratamiento.	84
24	Concentraciones de AgNPs utilizadas en algunos trabajos con <i>C. albicans</i>	89
25	Diferencias entre las AgNPs utilizadas en algunos trabajos con <i>C. albicans</i> .	90
26	Concentraciones de AgNPs utilizadas en diferentes especies de <i>C. albicans</i> .	95

Capítulo I

INTRODUCCIÓN

Actualmente, las enfermedades infecciosas representan uno de los problemas de salud más importantes a nivel mundial. Existen diversas dificultades asociadas al tratamiento de estas enfermedades, entre las que destacan: los efectos secundarios no deseados asociados a los antibióticos, el lento desarrollo de nuevas sustancias y tratamientos, la evolución de cepas resistentes, etc. El paradigma actual, para el desarrollo de nuevos antibióticos, no es suficiente para garantizar el tratamiento adecuado en el mediano y en el largo plazo. Por lo tanto, es necesario buscar nuevas formas de combatir las enfermedades infecciosas, mediante la aplicación de tecnologías más recientes.

Las nanociencias y la nanotecnología ofrecen nuevas alternativas para abordar diversos problemas actuales. En este sentido, el desarrollo de disciplinas como la bionanotecnología y la bionanomedicina, presentan una plataforma novedosa para resolver muchos problemas asociados a la salud. Los nanomateriales, aplicados a la investigación biomédica, han demostrado ser una ruta viable para tratar diferentes padecimientos, incluyendo a las enfermedades infecciosas.

El presente trabajo muestra los efectos que tienen las nanopartículas de plata (AgNPs) sobre el hongo patógeno *Candida albicans*. Se presenta una aproximación de la interacción que existe entre los nanomateriales con éste hongo. Se estudian características de relevancia clínica, tales como: la concentración mínima inhibitoria (CMI), la concentración mínima fungicida (CMF), concentración mínima inhibitoria media CI_{50} , el efecto de las AgNPs en diferentes especies del género *Candida*, tanto en cepas de referencia como en aislados clínicos y su efecto en aplicaciones prolongadas *in vitro*, entre otros.

Capítulo II

ANTECEDENTES

II.1 El panorama actual de las enfermedades infecciosas y las micosis.

Las enfermedades infecciosas son causadas por diversos agentes patógenos, tales como virus, bacterias, protozoarios y hongos. Según el *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID) y la World Health Organization, las enfermedades infecciosas son la principal causa de muerte en el mundo (NLM, 2013; WHO, 1997). Éstas enfermedades han incrementado su incidencia en los últimos años, por lo que son motivo de preocupación a nivel internacional (Huh & Kwon, 2011).

El impacto de las enfermedades infecciosas trasciende a diferentes áreas, desde el desarrollo científico hasta el aspecto socio-económico. Las enfermedades infecciosas representan un porcentaje notable de los recursos públicos y privados del sector salud, comparable a otros problemas de salud importantes (Scott, 2009). En los Estados Unidos, se estima que el costo para combatirlas es de 120 mil millones de dólares al año (NIAID, 2009). El tema de las enfermedades infecciosas es de tal relevancia, que uno de los “Objetivos del Desarrollo del Milenio”, de las Naciones Unidas, involucra el combate de estas enfermedades (WHO, 2000).

Entre los agentes que provocan las enfermedades infecciosas, además de los virus, destacan las bacterias y los hongos patógenos. Aunque las infecciones virales y bacterianas presentan los primeros lugares de incidencia, las micosis han contribuido en la morbilidad y mortalidad de estas enfermedades (Pfaller & Diekema, 2004 y Pfaller & Diekema, 2007).

Los hongos patógenos se han convertido, desde principios de 1980, en una de las principales causas de las infecciones humanas. Estas afectan especialmente a personas

inmunocomprometidas; y se presentan también como infecciones nosocomiales (McNeil *et al.*, 2001; Fridkin, 2005; Nucci & Marr, 2005). Como ejemplo de su incremento, en los Estados Unidos aumento el número de sepsis fúngicas en un 207%, desde 1979 hasta el 2000 (Martin *et al.*, 2003). Las infecciones fúngicas se han convertido en un problema de salud pública importante (McNeil *et al.*, 2001; Pfaller, 1998; Wilson *et al.*, 2002). El género *Candida* es el más representativo de las micosis (Eggimann *et al.*, 2003).

Son muchos los factores han contribuido al incremento de las infecciones fúngicas. Entre los más importante destacan: el incremento de la población inmunocomprometida; el incremento en el uso de antibióticos de amplio espectro, las quimioterapias citotóxicas, la emergencia de cepas patógenas no comunes, y hasta la globalización, entre otros (WHO, 2008; Nucci *et al.*, 2005; Pfaller *et al.*, 2004; Walsh *et al.*, 2004). Otro factor importante es la migración, que permite la diseminación de cepas patógenas exóticas (Chu *et al.*, 2006).

El uso de sustancias antibióticas en el tratamiento de enfermedades infecciosas, permite lograr un efecto positivo en muchos casos. Aun así, hay muchos problemas relacionados con su uso, tales como su limitada variedad, la automedicación, la interacción negativa que pueden presentar entre los diferentes tipos (Fothergill *et al.*, 2006) y la resistencia que presentan los microorganismos.

El desarrollo de nuevos antibióticos es un proceso largo y costoso. Hasta la aparición de la oxazolidona en el 2001, no se habían desarrollado nuevos antibióticos por cerca de 25 años (Cassell & Mekalanos, 2001). La familia de antifúngicos más recientes son las equinocandinas, que se aparecieron también en el 2001. En años posteriores han aparecido algunos antibióticos, resultado de la modificación de los ya existentes.

II.2 Descripción y uso de las sustancias fungicidas.

Las infecciones microbianas se tratan por medio de antibióticos y, en el caso específico de los hongos, se utilizan sustancias antifúngicas. Éstas se clasifican en tres familias: polienos, triazoles y equinocandinas.

Polienos

Los polienos son sustancias naturales, obtenidas del actinomiceto *Streptomyces nodosus*. El más común es la Anfotericina B, cuyo mecanismo de acción consiste en unirse al ergosterol de la membrana celular, alterando su estabilidad y generando poros. Estos poros propician la salida no controlada del material intracelular, provocando la muerte celular, por lo que es fungicida. Entre los antifúngicos, la Anfotericina B tiene el más amplio espectro de actividad, con bajas tasas de resistencia (Gallis *et al.*, 1990).

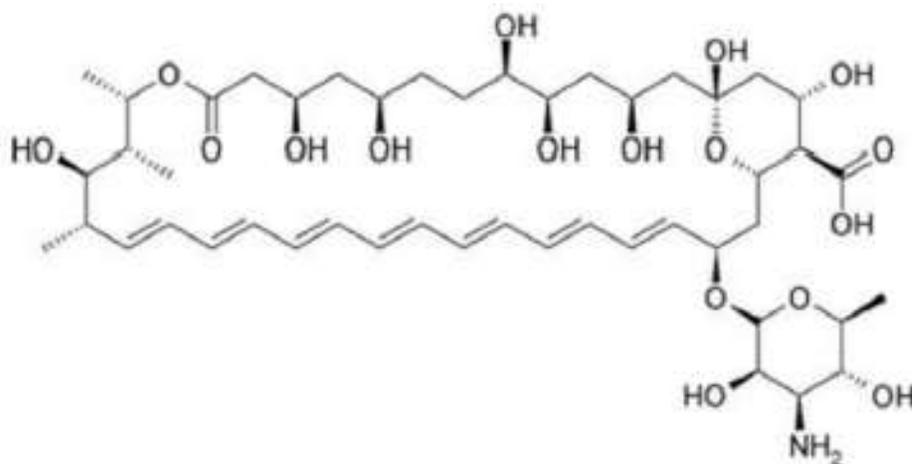
Azoles

Los azoles se clasifican en imidazoles (ketoconazol, miconazol, etc.) o triazoles (fluconazol, voriconazol, etc.), según el número de nitrógenos que tengan (dos o tres, respectivamente) en el anillo azólico. Se usan regularmente para combatir las micosis cutáneas y vaginales (Saag & Dismukes, 1998). El principal mecanismo de acción de los azoles, consiste en la inhibición de la C14- α esterol demetilasa dependiente del CYP450 fúngico. Esto genera una interrupción en la síntesis del ergosterol, provocando que éste se consuma mientras que sus precursores se acumulan. Como consecuencia directa, se detiene el crecimiento celular, aunque no mata a la célula, por lo que su efecto es fungistático (Nett & Andes, 2012).

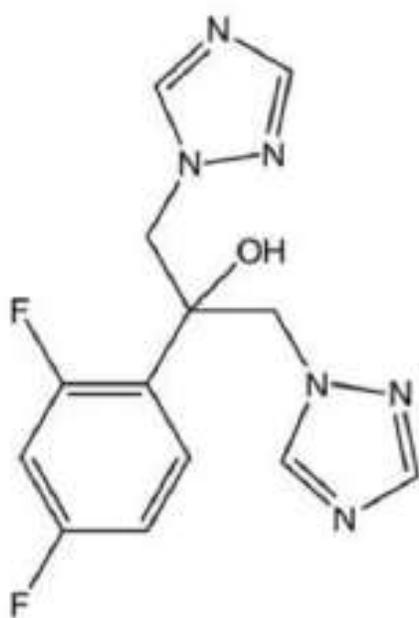
El Fluconazol es el azol más comúnmente usado. Tiene actividad contra *Candida* spp y es más activo contra *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitinae* y *C. dubliniensis*. (Pfaller *et al.*, 2004). En la clínica es un antifúngico de primera línea. El espectro de actividad de los diferentes azoles es muy similar.

Equinocandinas

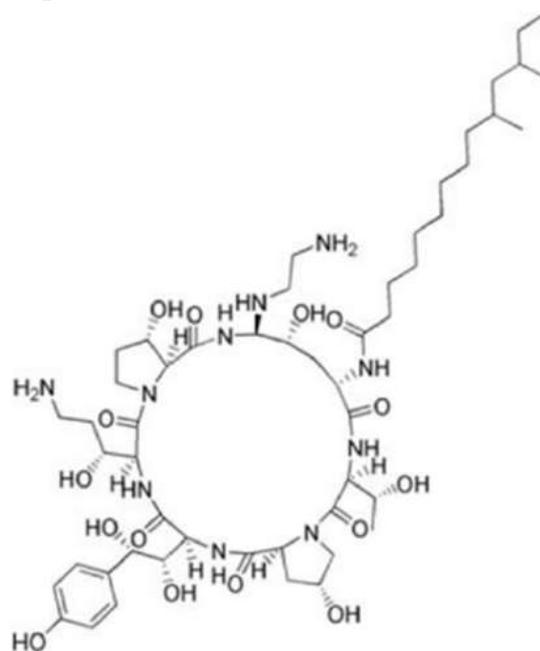
Las equinocandinas son polipéptidos semisintéticos, formados por N-hexapéptidos ligados a una cadena de ácido graso. Las equinocandinas que se utilizan actualmente son: caspofunginas, micafunginas y anidulafunginas. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis de β -1,3 glucanos, polisacáridos esenciales en muchos hongos patógenos (Douglas *et al.*, 1997). Son fungicidas contra *Candida* spp y fungistáticos contra hongos filamentosos (Bowman *et al.*, 2002). En la figura 1 se muestran las estructuras químicas de algunos antifúngicos, correspondientes a las tres clases descritas anteriormente.



Anfotericina B (polieno)



Fluconazol (triazol)



Caspofungina (equinocandina)

Figura 1. Estructura química de algunos antifúngicos representativos. Antifúngicos de diferentes familias, para resaltar las diferencias entre ellos. Adaptado de "Antifungals: Drug Class, Mechanisms of action, pharmacokinetics/pharmacodynamics, drug-drug interactions, toxicity, and clinical use" de Nett & Andes, en: Calderone R.A. & Clancy C.J. (ed.) *Candida & Candidiasis*, 2012, p.348.

Muchos de los agentes antifúngicos ofrecen una fuerte actividad contra *Candida spp.* Aun así, es importante desarrollar compuestos que sean efectivos contra las *Candida* no-albicans y los hongos filamentosos. La tabla 1 muestra el espectro de acción de diferentes antifúngicos contra las principales especies de *Candida spp.* Debido a sus características químicas, cada sustancia antifúngica tiene diferentes tipos de interacción y presentan, por tal motivo, ventajas y desventajas que se muestran en la tabla 2.

Tabla 1. Espectro de acción de algunos antifúngicos contra las principales especies patógenas de *Candida spp.* Adaptado de “Antifungals: Drug Class, Mechanisms of action, pharmacokinetics/pharmacodynamics, drug-drug interactions, toxicity, and clinical use” de Nett & Andes, en: Calderone R.A. & Clancy C.J. (Ed.) *Candida & Candidiasis*, 2012, P.346.

ESPECIE	AMB	5FC	FLU	ITR	VOR	POS	CAS	MIC	ANI
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. glabrata</i>	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Nota: AMB=Anfotericina B; 5FC=Flucitosina; FLU=Fluconazol; ITR=Itraconazol; VOR=Voriconazol; POS=Posoconazol; CAS=Caspogunfinas; MIC=Miconazol; ANI=Anidulafungina

Tabla 2. Historia de las terapias antifúngicas. Adaptado de “Antifungals: Drug Class, Mechanisms of action, pharmacokinetics/pharmacodynamics, drug-drug interactions, toxicity, and clinical use” de Nett & Andes, en: Calderone R.A. & Clancy C.J. (ed.) *Candida & Candidiasis*, 2012, p.348.

Antifúngico	Año	Mayor ventajas	Principal desventaja
Desoxicolato de Anfotericina B	1958	Fuerte, de amplio espectro	Toxicidad renal
Flucitosina	1973	Actividad contra <i>Candida</i> y <i>Cryptococcus</i>	Aparición de resistencia como monoterapia
Fluconazol	1990	Buena biodisponibilidad oral y tolerancia; penetra el sistema nervioso; actividad contra levaduras.	Actividad limitada contra hongos. Interacción con el CYP450
Itraconazol	1992	Actividad contra hongos filamentosos y endémicos.	Biodisponibilidad oral variable. Interacción con el CYP450
Anfotericina B (lipídica)	1995	Menos tóxica que en desoxicolato	Se requieren dosis altas Costosa.
Voriconazol	2002	Muy efectivo contra <i>Candida</i> ; disponible como oral y parenteral.	Biodisponibilidad oral y metabolismo variables.
Posoconazol	2006	Actividad contra zigomicetos	Sólo está en presentación oral. Dificultad para llegar a niveles terapéuticos debido a su absorción.
Caspofungina Micafungina Anidulafungina	2001	Buena tolerancia; pocas interacciones entre fármacos; Buena actividad contra <i>C. glabrata</i> .	Actividad variable contra <i>C. parapsilosis</i> ; Sólo en formulación parenteral.

El uso de antifúngicos ha ayudado a mitigar los efectos nocivos de las infecciones causadas por los hongos. Por otro lado, es importante señalar que su uso viene acompañado de efectos secundarios no deseados; tales como citotoxicidad, biodisponibilidad, etc. (tabla 2). Además, el uso de los antifúngicos presenta un gran problema: el desarrollo de mecanismos de resistencia por parte de los microorganismos patógenos (Perea *et al.*, 2001; White *et al.*, 2002).

II.3 Desventajas de los antibióticos: efectividad y resistencia.

Los microorganismos constantemente se adaptan y evolucionan para sobrevivir en condiciones nuevas o adversas. La resistencia a antimicrobianos se entiende como la capacidad que tienen para crecer en presencia de una sustancia que normalmente los inhibe, ya sea que los mate (microbicidas) o que limite su crecimiento (microbiostáticos). La resistencia incrementa la dificultad para tratar o curar infecciones microbianas.

En años recientes, se ha observado un rápido incremento en la resistencia de los hongos contra los antifúngicos (Goffeau, 2008), lo que genera un gran problema en la clínica. Se ha sugerido que la resistencia contra los antifúngicos se debe, principalmente, a la limitada variedad de fármacos disponibles (Kim *et al.*, 2009); aunque también se consideran factores como la automedicación y la variabilidad genética propia de los hongos. Por lo tanto, es necesario que se desarrollen nuevas sustancias y/o materiales, que permitan combatir a las infecciones fúngicas de una manera más efectiva.

A pesar de toda la investigación científica relacionada con el desarrollo, o modificación química de los actuales antibióticos, no hay seguridad de que se puedan seguir generando nuevos antibióticos al ritmo que se requiere (Taylor *et al.*, 2002). En la figura 2 se muestra la cantidad de antibióticos aprobados por la FDA (Food and Drugs Administration) por periodos de 5 años, desde 1983 hasta el 2007.

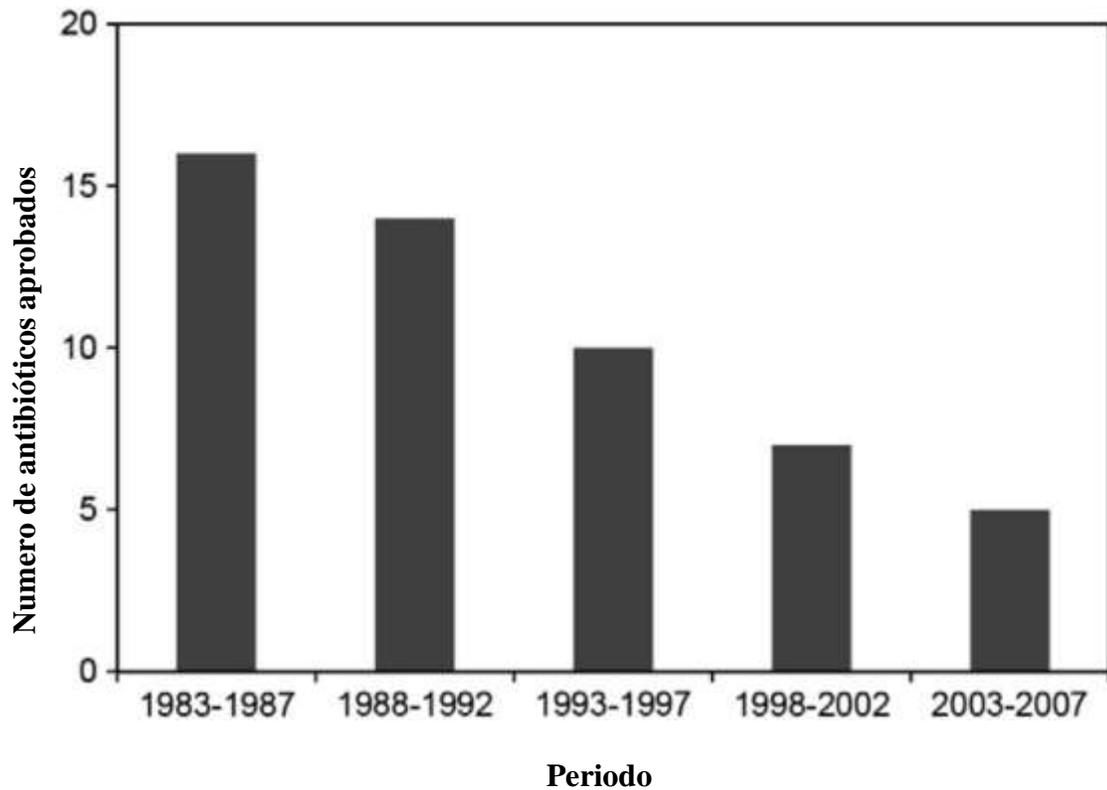


Fig. 2. Aprobación de nuevos antibióticos por parte de la FDA. Se observa que la cantidad de antibióticos aprobados disminuye con el tiempo. Adaptado de “The bacteria fight back” de Taubes, 2008, Science 321, p.361.

Ante éste panorama, algunos investigadores sugieren que el desarrollo de nuevos antibióticos no puede alcanzar al ritmo con el que aparecen microorganismos resistentes (Huh *et al.*, 2011; Taubes, 2008). En la Tabla 3 se muestra una breve historia del desarrollo de algunos antibióticos, contra la aparición de cepas microbianas resistentes a los mismos.

Tabla 3. Historia del desarrollo antibióticos vs la aparición de la resistencia. Historia del desarrollo de antibióticos contra la adquisición subsecuente de resistencia por parte de los microorganismos. Adaptado de “Nanoantibiotics: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era”, de Huh *et al.*, 2011, J Control Release. 156(2), p. 130

Desarrollo de antibióticos	Aparición de la resistencia
Penicilina (1942)	Dispersión de la penicilina (1945)
	Penicilinas transferible en <i>Gonococcus</i> (1976)
	<i>Enterococcus</i> resistente a la penicilina (1983)
Estreptomicina (1947)	Resistencia a la estreptomicina (1947)
Tetraciclina (1952)	Resistencia a la tetraciclina (1956)
Vancomicina (1958)	Raramente usada hasta mediados de la década de 1980
	<i>Enterococcus</i> resistente a la vancomicina (VRE) (1987)
	<i>S. aureus</i> resistente intermedio a la vancomicina (VISA) (1996)
	<i>S. aureus</i> resistente a la vancomicina (VRSA) (2002)
Metilicina (1959)	<i>S. aureus</i> resistente a la metilicina (MRSA) (1961)
	MRSA dispersa en la comunidad (1999)
Cefatolina (1964)	Resistencia a la cefatolina: primera cefalosporina (1966)
Gentamicina (1967)	Resistencia a la gentamicina (1970)
Cefotaxima (aprobado por la FDA: 1981)	Resistencia a la cefotaxima (1983)
	Primer brote de la tercera <i>K. pneumoniae</i> resistente a la cefalosporina (1987)
Imipenem, (1984) 1er. carbapenem	<i>Acinetobacter baumannii</i> resistente a la carbapenem (1998)
Linezolid, Oxazolidinona Aprobado por la FDA: 2000	<i>S. aureus</i> resistente a la linezolid y VRE (2001)

Para el desarrollo de nuevas sustancias, es importante considerar la cercanía evolutiva entre hongos y mamíferos; dado que pudiesen ser susceptibles a moléculas similares. También es primordial considerar la efectividad *in vitro* vs *in vivo*, pues ésta puede variar. Otros problemas se relacionan con el diseño, la especificidad y los blancos particulares que interaccionen con las

sustancias antifúngicas. Asimismo, un factor relevante es la relación costo-beneficio de la sustancia a desarrollar, pues el factor económico es determinante.

II.4 Resistencia de *Candida* spp. a los antifúngicos

La resistencia de *Candida* spp a los azoles es poco frecuente en pacientes con infecciones orales, no inmunocomprometidos. Un ejemplo es el posaconazol, que presenta muchas ventajas contra la candidiasis oral refractaria. Por otro lado, las equinocandinas parenterales son muy útiles contra las candidiasis esofágicas resistentes a los azoles. En los últimos años, se ha incrementado el número de mujeres con cepas resistentes a azoles. En algunos casos de candidiasis vulvovaginal, los antifúngicos no son efectivos, dejando al ácido bórico como el único tratamiento alternativo (Sobel, 2007).

La resistencia contra antifungicos es uno de los factores que contribuyen a que los tratamientos clínicos fallen. Aunque posiblemente no sea un problema tan grande como se ha pensado, podría convertirse en un gran reto en los próximos años (Lewis & Kontoyiannis, 2012). Por tal motivo, las nuevas sustancias antifúngicas deben considerar la posibilidad de que se generen cepas resistentes, y realizar los estudios correspondientes.

II.5 El género *Candida* y *Candida albicans* como modelo de estudio.

Las levaduras representan una de las principales causas mundiales de infecciones fúngicas ungueales, donde las especies de *Candida* son las más frecuentes (Manzano-Gayosso *et al.*, 2011). El género de *Candida* incluye a cerca de 150 especies, las cuales crecen principalmente como levaduras unicelulares, aunque algunas pueden cambiar a formas de hifa y pseudohifa. Uno de los clados filogenéticos más importantes en la clínica es el CTG (Fitzpatrick *et al.*, 2006). Entre los miembros de éste grupo destacan *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*. Otras especies de importancia clínica, como *C. glabrata* y *C. krusei*, son más distantes a nivel filogenético.

Las especies de *Candida* son un componente potencial en la biota microbiana del tracto digestivo en humanos. Bajo ciertas condiciones, *Candida* puede volverse patógena e infectar al hospedero. A las infecciones causadas por las especies de éste género se les llama candidiasis, y son un problema clínico grave (Moran *et al.*, 2012).

Los organismos del género *Candida* son muy versátiles, y tienen la capacidad de crecer bajo condiciones variables de su entorno. Como resultado, las candidiasis se presentan con muchas variantes, que van desde superficiales hasta sistémicas. *Candida* spp puede infectar a diferentes órganos y tejidos, e incluso a los ojos y al cerebro (Clancy & Nguyen, 2012). Sin embargo, las formas más comunes son las candidiasis vulvovaginal y orofaríngea (Revankar & Sobel, 2012). Cerca del 75% de las mujeres padecen candidiasis vulvovaginal al menos una vez en su vida, y de éstas, el 8% tiene infecciones recurrentes (Sobel, 2007)

II.5.1 *Candida albicans*

El organismo de estudio en éste trabajo es el hongo patógeno *Candida albicans*, debido a su importancia en el sector salud. Además, *C. albicans* es el modelo más importante de levaduras patógenas para los humanos (Molero *et al.*, 1998) y es el hongo patógeno más común en el ser humano.

C. albicans es un ascomiceto y pertenece a la familia Saccharomycetaceae. Es un organismo diploide, dimorfo, que puede formar pseudohifas, hifas y blastoconidios ovalados (3-8 x 2-7 μm), como se observa en la figura 3. Presenta clamidosporas unicelulares (8-16 μm), ovaladas, con gruesa pared refringente, situadas al final de las hifas, pseudohifas o laterales sobre blastoconidios ovalados (Ponton *et al.*, 2002). Vive como comensal de animales de sangre caliente, incluyendo a los humanos y coloniza la superficie de las cavidades mucosas (Matthews, 1994).

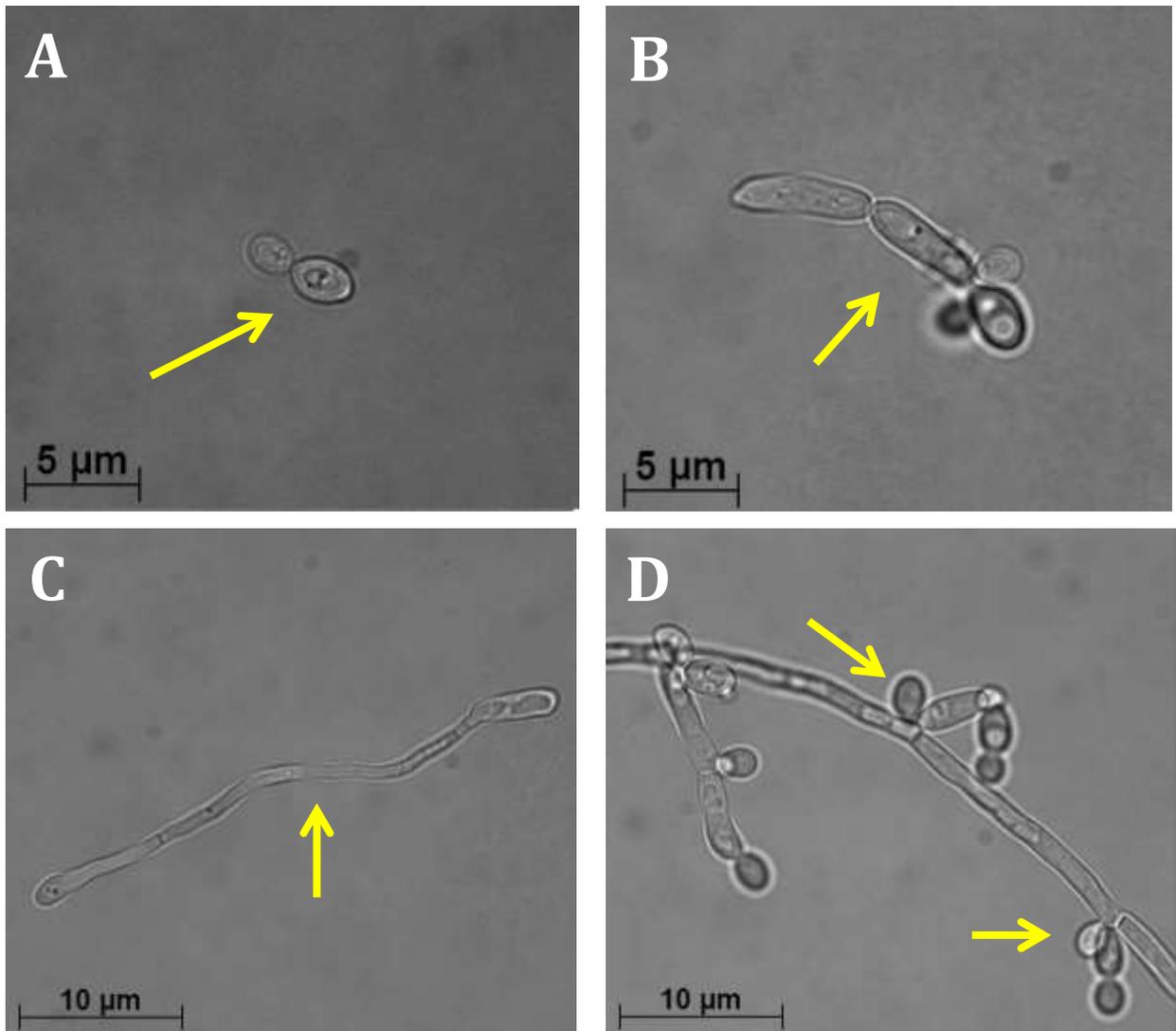


Figura 3. Distintas morfologías de *Candida albicans*. (A) Levadura; (B) pseudohifa; (C) hifa y (D) clamidospora. Las flechas señalan un ejemplo en cada tipo de estructura. Imágenes obtenidas por microscopía de contraste de fases.

C. albicans es la especie más común de hongos en los aislados clínicos humanos. Se encuentra en hasta el 60% de las personas sanas, y el porcentaje incrementa con la edad y con otros factores, como el uso de prótesis dentales (Clayton & Noble, 1966; Davies *et al.*, 2002). Aunque regularmente se le considera como patógeno oportunista, las infecciones no se limitan a pacientes inmunocomprometidos. *C. albicans* también puede afectar a pacientes sanos, sobre todo cuando se presentan factores que perturben la microbiota, tales como el uso de antibióticos o por cambios hormonales (Moran *et al.*, 2012)

II.5.2 Candidiasis

La patogenicidad de *C. albicans* se atribuye a diferentes características, entre las que destacan su dimorfismo. Sus diferentes formas le permiten una mejor diseminación (levadura), pero la forma hifal es crucial para la invasión del tejido (Saville *et al.*, 2003). *C. albicans* presenta una mayor capacidad adherente que las otras especies del género, con excepción de *C. dubliniensis* (King *et al.*, 1980). Además, *C. albicans* tiene la capacidad de tolerar un amplio rango de pH, estrés oxidativo y estrés osmótico.

La candidiasis se clasifica en diferentes tipos, que dependen de la región corporal que afecten. Los principales son la candidiasis superficial y la sistémica (invasiva). Entre las primeras, la candidiasis mucosa es muy común y sus índices de prevalencia e incidencia son mucho mayores que en la candidiasis sistémica. La candidiasis mucosa tiene una considerable morbilidad tanto en pacientes hospitalizados, regularmente inmunocomprometidos, como en pacientes sanos. Entre las candidiasis mucosas destaca la candidiasis vulvovaginal, que es la segunda causa de infecciones vaginales a nivel mundial. Durante la edad fértil, el 75% de las mujeres padece al menos una infección de candidiasis vulvovaginal; y el 40-50% de estos casos incurre en un segundo ataque (Revankar & Sobel, 2012).

Más del 90% de los casos de candidiasis invasiva (CI) se deben a cinco especies del género *Candida*: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei*. *C. albicans* es responsable, por sí sola, de hasta el 60% de los casos de CI (Moran *et al.*, 2012). En la tabla 4 se presenta un caso de distribución de candidiasis, causadas por diferentes especies del género *Candida*. En la tabla 5 se presenta la variación geográfica de la distribución de las principales especies de *Candida* que causan fungemias.

Tabla 4: Distribución de las principales especies de *Candida* que provocan candidiasis. Casos de Candidiasis Invasiva, obtenidos por el programa global antifúngico ARTEMIS DISK, entre 1997 y el 2003. Adaptado de “Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem”, de Pfaller & Diekema, 2007, *Clinical Microbiology Reviews*, 20, p. 138.

Especie	Porcentaje (%) total de casos					
	1997/1998	1999	2000	2001	2002	2003
<i>C. albicans</i>	73.3	69.8	68.1	65.4	61.4	62.3
<i>C. glabrata</i>	11.0	9.7	9.5	11.1	10.7	12.0
<i>C. tropicalis</i>	4.6	5.3	7.2	7.5	7.4	7.5
<i>C. parapsilosis</i>	4.2	4.9	5.6	6.9	6.6	7.3
<i>C. krusei</i>	1.7	2.2	3.2	2.5	2.6	
<i>Otras especies</i>	5.2	8.1	6.4	6.6	11.3	8.2
<i>Número total de casos</i>	22,533	20,998	11,698	21,804	24,680	33,002

La candidemia es la cuarta causa de infecciones sanguíneas en los Estados Unidos. Esta infección invasiva tiene una alta mortalidad, que excede el 40% de los casos clínicos (Gudlaugsson *et al.*, 2003). Otros problemas se asocian a la capacidad de *Candida* para infectar prácticamente cualquier órgano, problema independiente de la candidemia. Asimismo, los pacientes con candidemia son 20 veces más propensos a morir en el hospital que los pacientes que padecen infecciones sistémicas causadas por otras especies.

Tabla 5: Variación geográfica de la distribución de las principales especies de *Candida* que causan fungemias. Se muestra la distribución más reciente de los datos de Pfaller & Diekema (2007). En el apartado de “otras” se refiere a especies poco comunes cuyo porcentaje por especie individual es menor al 1% en la mayoría de los casos. Adaptado de “Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem”, de Pfaller & Diekema, 2007, *Clinical Microbiology Reviews*, 20, p. 139.

Región	Periodo	Aislados	Porcentaje (%) del total de especies					
			<i>C. alb</i>	<i>C. glab.</i>	<i>C. par.</i>	<i>C. trop.</i>	<i>C. krs</i>	Otras
Norteamérica	2001 - 2004	2,773	51	22	14	7	2	4
Europa	1997 - 1999	2,089	56	14	13	7	2	8
Asia	2001 - 2004	1,314	56	10	16	14	2	2
Latinoamérica	2001 - 2004	1,565	50	7	16	20	2	5

Nota: *C. alb* = *C. albicans*), *C. glab.*= *C. glabrata*), *C. par.*= *C. parapsilosis*, *C. trop.* =*C. tropicalis* y *C. krs* = *C. krusei*.

II.6 Nanotecnología y Bionanotecnología

La nanotecnología es un área inherentemente inter- y multidisciplinaria. Según el National Nanotechnology Institute (NNI), es el entendimiento y control de la materia a escala nanométrica. Asimismo, para Nature Nanotechnology (NN), la nanotecnología tiene entre sus enfoques a las tecnologías del ADN, grafenos, nanoporos y a la nanotoxicología. Esta última es relevante debido a que considera las interacciones entre los materiales y los sistemas biológicos; también considera la interacción con el entorno e incluso, a la regulación de los nanomateriales. La interacción de nanomateriales con sistemas biológicos nos lleva a la bionanotecnología.

La bionanotecnología consiste en la integración de las ciencias biológicas y las nanociencias y nanotecnologías. Hay muchas ramas de investigación y aplicaciones importantes de la bionanotecnología, entre estas destacan la producción de alimentos, el tratamiento de agua (You

et al., 2011), etc. Para algunos centros de investigación, como el Institute of Bionanotechnology in Medicine (IBNAM), su eje central es la bionanomedicina.

Se define como nanomateriales o nanoestructuras a aquellos que se encuentran en la escala nanométrica, de 1 a 100 nm (Re *et al.*, 2012) o incluso 1000 nm (Buzea *et al.*, 2007, Mohanraj & Chen, 2006). Un nanómetro es la milmillonésima parte de un metro (1×10^{-9} m). En estos tamaños cambian algunas propiedades de la materia. Así, las nanoestructuras poseen propiedades fisicoquímicas únicas (Kim *et al.*, 2007). Una característica distintiva, es que en la escala nanométrica, los materiales poseen un gran área superficial y puede haber muchas nanoestructuras por unidad de masa, según se observa en la figura 4.

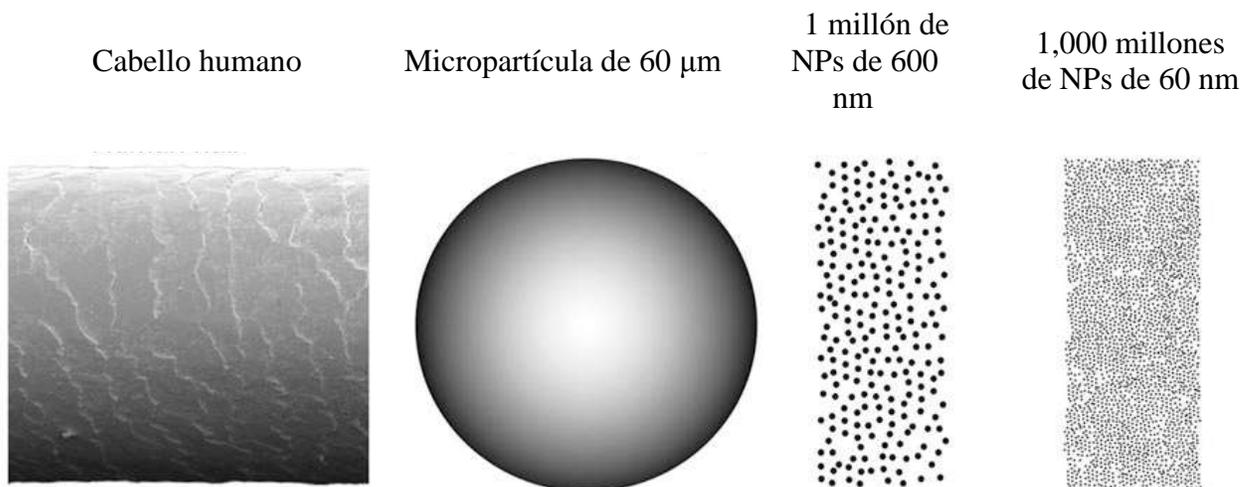


Fig. 4: Comparación entre nanopartículas de diferentes tamaños. Se contrasta una micropartícula de 60 μm de diámetro (grosor promedio del cabello humano), con nanopartículas (NPs) de 600 y 60 nm. Las NPs de 60 nm tienen un área superficial 1000 veces mayor que la de 60 μm . Adaptado de “Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity” de Buzea *et al.*, 2007, MR33.

Las nanoestructuras se pueden sintetizar a partir de una gran gama de materiales, desde elementos puros, como carbón, silicio, titanio, hierro, oro, plata (Winberg *et al.*, 2011), hasta sustancias biológicas complejas, como lípidos y ácidos nucleicos. Las propiedades de los nanomateriales dependen de diferentes parámetros, entre los que destacan el tamaño, los

elementos constituyentes y la forma (Mohanraj & Chen, 2006). Otros factores que modifican sus propiedades son: su entorno de interacción, moléculas funcionalizadoras, etc.

Además de las nanopartículas sintetizadas por el hombre, existen muchas nanopartículas no-antropogénicas (cenizas, polvo, etc.) que interactúan con nosotros (Suh *et al.*, 2009). Por lo tanto, el tamaño es un parámetro de interés, debido su impacto a nivel biológico. En la figura 5 se observa una comparación entre las NP y los sistemas biológicos.

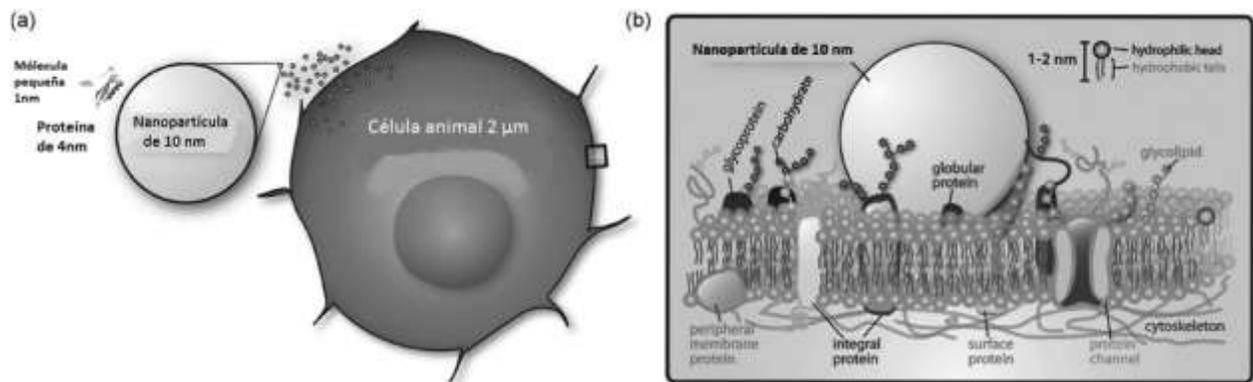


Fig. 5: Tamaño comparativo entre NPs de 10 nm y los sistemas biológicos. En (a) se muestra una comparación entre las NPs y una célula animal de 2 μm. En (b) se contrasta el tamaño de una NP con la membrana (y sus componentes) de una célula. Modificado de "Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience", de Suh *et al.*, 2009, *Progress in Neurobiology* 87, p. 138.

Según la aplicación deseada, se pueden emplear diferentes nanomateriales, tales como nanotubos, liposomas, nanoalambres, grafenos, nanoláminas, etc. (Ghosh *et al.*, 2008). Los nanomateriales pueden tener estructuras muy diversas y con diferentes niveles de organización. En la figura 6 se muestran diferentes tipos de nanomateriales.

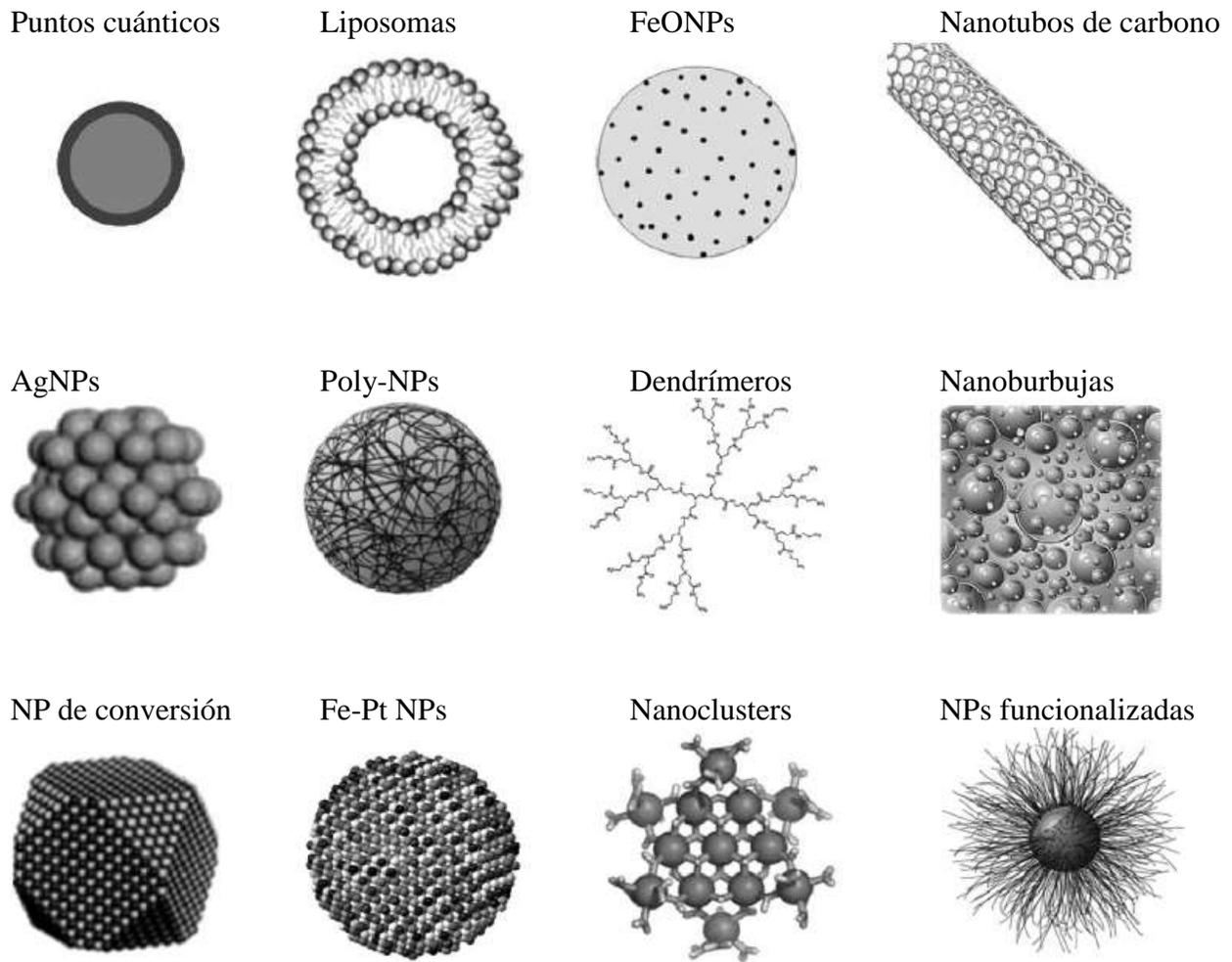


Fig. 6: Diferentes tipos de nanomateriales y nanopartículas.
 La mayoría de éstos poseen aplicaciones clínicas potenciales. Adaptado de “Nanoparticles for neuroimaging”,
 de Re *et al.*, 2012, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 45, p.3.

La bionanotecnología puede ayudar a mitigar el impacto de las enfermedades infecciosas. Dentro de este extenso campo, un área importante es el tratamiento de enfermedades infecciosas. Actualmente, la diversidad de clases de antifúngicos es muy limitada (polienos, azoles y equinocandinas). Debido a las desventajas asociadas a los antifúngicos, es necesario desarrollar nuevas sustancias para combatir a las enfermedades infecciosas de manera adecuada.

Los materiales nanoestructurados son una alternativa para combatir a los microorganismos patógenos. Así, nace la posibilidad de utilizar materiales novedosos que exhiben propiedades antibióticas, que además podrían sobrepasar la resistencia de los microorganismos patógenos

(Huh *et al.*, 2011; Rai *et al.*, 2009). Esto es relevante, debido a que el incremento en dicha resistencia resulta en una elevada mortandad y aumenta los costos hospitalarios (Siegel, 2008).

Los “nanoantibióticos”, concepto propuesto por Huh *et al.*,(2011), se definen como nanomateriales que muestran una actividad antimicrobiana y/o que elevan la efectividad y seguridad de los antibióticos. Las nanopartículas de plata (AgNPs) son un buen ejemplo de nanobióticos y hay muchos estudios relativos a su síntesis química, síntesis biológica, efecto en bacterias, etc. Por otro lado, los estudios en eucariontes son relativamente escasos, tanto para hongos (Panáček *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010) como en protozoarios (Kvitek *et al.*, 2009). El concepto de “nanoantibiótico” no se ha generalizado todavía, y no ha sido utilizado por otros autores.

Hay diferentes nanoestructuras que pueden utilizarse en diversas aplicaciones biomédicas. Es importante señalar que todavía falta mucha investigación en ésta área, debido a que se desconoce, de manera general, la interacción entre los sistemas biológicos y los nanomateriales. En la tabla 7 se muestran diferentes nanomateriales con propiedades antimicrobianas y sus posibles mecanismos; sin embargo, es importante destacar que faltan muchos estudios todavía, como en el caso de las nanopartículas de plata.

Tabla 6: Nanomateriales antimicrobianos. Se presentan ejemplos de diferentes nanomateriales que han sido estudiados y que presentan aplicaciones potenciales relevantes. Se proponen mecanismos de acción en procariontes (bacterias). Adaptado de “Nanoantibiotics: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era”, de Huh *et al.*, 2011 J Control Release. 156(2), p. 132

Nano-material	Mecanismo antimicrobiano (bacterias)	Aplicaciones potenciales: clínicas e industriales
AgNPs	Liberación de iones de plata; daño a la membrana celular, al ADN y a la cadena respiratoria	Revestimiento de material quirúrgico, usos clínicos y tratamiento de agua.
ZnNPs	Acumulación intracelular; daño a la membrana celular	Artículos antibacteriales (cremas, etc.); revestimiento de material quirúrgico.
TiO ₂ NPs	Producción de ROS; daño a la membrana y a la pared celular.	Agente antibacterial; purificador de agua y aire.
AuNPs	Interacción con la membrana celular, atracción electrostática.	Terapia foto-térmica y uso antifúngico.
Quitosan	Ruptura y permeabilidad de la membrana celular. quelación de metales traza e inactivación de enzimas.	Desinfectante de agua, bacteriostático, bactericida.
Fullerenos	Destrucción de la membrana, incremento de la actividad de los neutrófilos.	Desinfectante
NTC	Daño a la membrana celular por ROS; oxidación de proteínas de la membrana y lípidos	Agente antibacterial, purificador de agua, revestimiento
NONPs	Liberación de NO y producción de ROS	Heridas infectadas y pie diabético.
Nano-emulsiones	Daño a la membrana, destrucción de la cubierta de las esporas	Inhalador antimicrobiano, nano-transportador de vacunas.
Nota: AgNPs= nanopartículas de plata; ZnNPs= nanopartículas de zinc; TiO ₂ NPs= nanopartículas de dióxido de titanio; AuNPs= nanopartículas de oro; NTC= nanotubos de carbono; NONPs= nanopartículas de óxido nítrico.		

En la tabla 6 se observa que la mayoría de los nanomateriales con actividad antimicrobiana son metales u óxidos metálicos, además de algunas estructuras basadas en carbono. Los materiales más comunes, con fines biomédicos, son las nanopartículas metálicas. Las nanopartículas inorgánicas tienen un gran potencial para las aplicaciones biológicas, biomédicas y farmacéuticas (Sondi *et al.*, 2004). Entre sus ventajas se cita una baja citotoxicidad, la posibilidad de sobrepasar los mecanismos de resistencia y un costo más bajo de producción (Allaker *et al.*, 2000; Baker *et al.*, 2005).

Las nanopartículas de plata (AgNPs) se encuentran entre las estructuras con mayor potencial en la clínica. Desde la antigüedad se conoce la capacidad antimicrobiana de la plata, así como algunas de sus propiedades y aplicaciones, sobre todo antibacteriales (Baker *et al.*, 2005; Silver, 2003; Klansen, 2000 (a); Klansen, 2000 (b) Atiyeh *et al.*, 2007; Zhao & Stevens; 1998).

El uso histórico de plata ha sido en forma de plata coloidal o iones de plata. Se sabe que la plata coloidal desnatura a las proteínas y las precipita y reaccionan con los grupos amino, carboxilo, fosfatos, imidazoles, etc. También afectan a las enzimas, al atacar a los grupos sulfhidrilos; ya sea inactivando o disminuyendo su capacidad, tal es el caso de la lactato-deshidrogenasa y de la glutatión-peroxidasa (Fung & Bowen, 1996). Estas características la convierten en un potente agente antibiótico.

Es importante destacar que existen problemas asociados al uso de la plata iónica o coloidal. En estas especies químicas, la plata tiene baja estabilidad y puede ser fácilmente desactivada por precipitación o por formación de complejos (Herrera *et al.*, 2001), lo que limita su uso. La plata se sigue usando a nivel comercial, como desinfectante (AgNO_3) y suplemento alimenticio.

Además de los efectos deseados, la plata iónica tiene otros efectos nocivos en el hombre. La Ag^+ puede causar efectos no deseados como la argiria y la argiriosis, por lo que representa un riesgo latente (White *et al.*, 2003; Kwon *et al.*, 2009). Se ha reportado que la plata iónica, como la contenida en el AgNO_3 , tiene efectos nocivos en células humanas, inhibiendo la síntesis de DNA y de proteínas (Hidalgo & Domínguez, 1998). Por otro lado, aunque en general las AgNPs no se consideran como tóxicas para el hombre, hay algunos estudios que sugieren lo contrario (Asharani *et al.*, 2009).

La principal aplicación potencial de las AgNPs es como antimicrobiano (Huh *et al.*, 2011, Melaiye *et al.*, 2005; Sondi *et al.*, 2004; Morones *et al.*, 2005). Sin embargo es importante señalar que tienen otras propiedades, como las siguientes: no están electrocargadas; tienen actividad antiinflamatoria (Nadworny *et al.*, 2008, Jaya *et al.*, 2009), son antivirales (Rogers *et al.*, 2008), se aplica en tratamientos post-quemaduras (Klansen, 2000), etc. Así, podrían tener aplicaciones relevantes en otras áreas de interés clínico.

La mayoría de los estudios de las AgNPs se orientan en las aplicaciones biomédicas, especialmente contra bacterias. Se ha demostrado que pueden impedir la formación de biopelículas (Martínez-Gutiérrez *et al.*, 2013), inclusive cuando éstas se generan en ambientes marinos (Fabrega *et al.*, 2009). Por otro lado, los estudios contra otros organismos, como hongos patógenos y protozoarios, son muy limitados (Kvitek *et al.*, 2009), lo mismo pasa en el caso de los virus (You *et al.*, 2011). Faltan muchos estudios sobre el impacto de los nanomateriales en los sistemas biológicos, particularmente en aquellos que exhiben propiedades antimicrobianas bajo diferentes condiciones, como las AgNPs (Weinberg *et al.*, 2011).

Se han propuesto diferentes mecanismos de acción para los nanomateriales y estos tienden a ser muy generalizados, por lo que necesitan mejorarse y actualizarse (figura 6). En trabajos con células de mamíferos, Park *et al.*,(2010), citan la liberación de ROS, además de que detiene el ciclo celular en la fase S, lo que también lleva a la apoptosis.

Por otro lado, además de lo propuesto por Kim *et al.*,(2007; 2009) para *Candida* spp, otros autores (Feng *et al.*, 2000; Guzman *et al.*, 2012; Yamanaka *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2009) han propuesto mecanismos que necesitan ser evaluados en *Candida* spp. Estos mecanismos son (Huh *et al.*, 2011):

- 1) Daño a la membrana celular, lo que lleva a la plasmólisis.
- 2) Interacción con los compuestos azufrados, lo puede interferir en los puentes disulfuro y en otros enlaces.
- 3) Liberación de iones de plata.

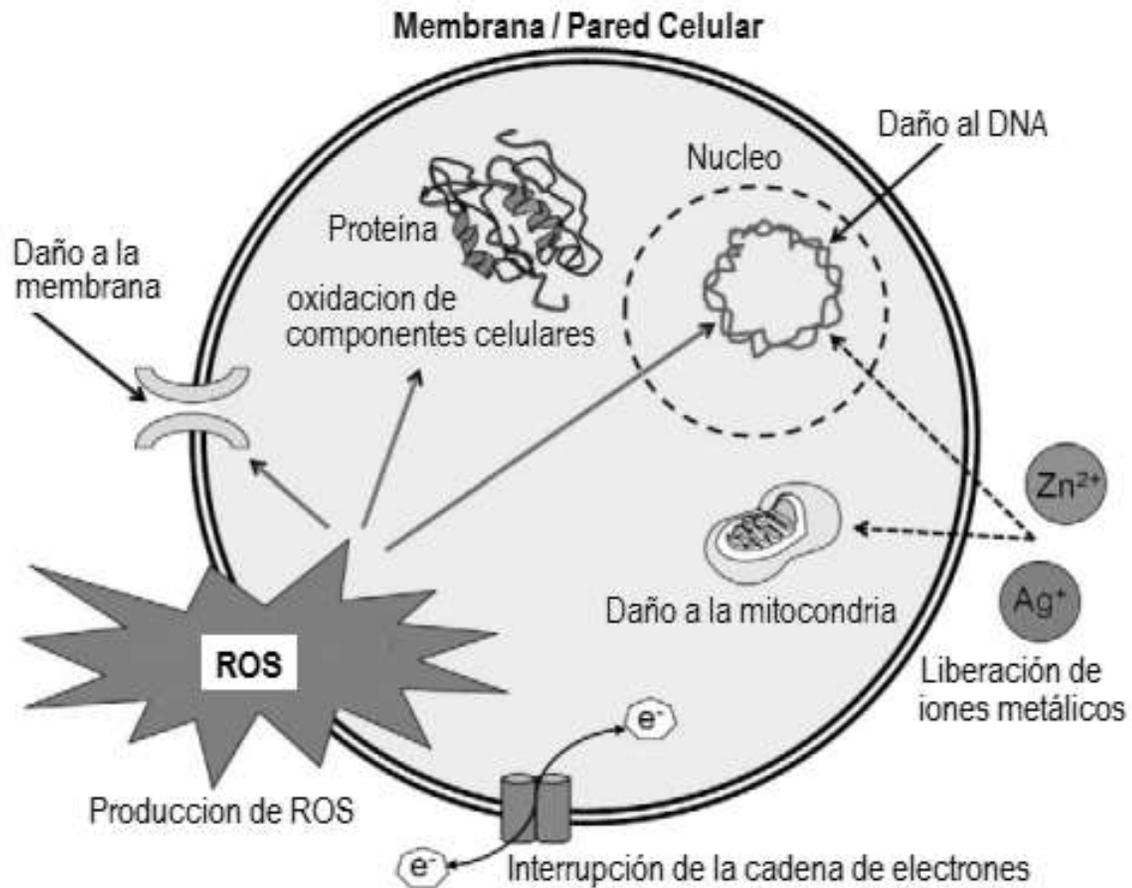


Fig. 7. Diferentes mecanismos de las NPs metálicas sobre la célula. Se muestran los diferentes mecanismos para las nanopartículas más comunes: nanopartículas de plata (AgNPs), nanopartículas de óxido de zinc (ZnONPs) y nanopartículas de dióxido de titanio (TiO_2 NPs). Adaptado de "Nanoantibiotics: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era", de Huh *et al.*, (2011) *J Control Release*. 156(2), p. 132

La mayoría de los estudios relativos a AgNPs-sistemas biológicos, se orientan sólo al efecto que tienen los nanomateriales en los microorganismos. Son pocos trabajos los que buscan explicar las interacciones y los posibles mecanismos de acción. En este sentido, el trabajo más reciente entre AgNPs y *Candida* spp, es el de Huang *et al.*,(2012), que muestra la posible producción de ROS en la mitocondria, que aparentemente lleva a la apoptosis. Esto ya se había considerado en trabajos anteriores (Park *et al.*, 2009; Benaroudj *et al.*, 2001; Pozniakovsky *et al.*,

2005; Kohanski *et al.*, 2007; Carlson *et al.*, 2008), en donde el punto central es la apoptosis, pero en general no se consideran otros aspectos de la célula. En otros estudios, se ha observado que las AgNPs interfieren en el ciclo celular, arrojando a las células en las fases G2/M (Kim *et al.*, 2009), por lo que también podría intervenir en la apoptosis (Phillips *et al.*, 2003).

Entender los mecanismos que influyen en la muerte celular en hongos, podría ayudar a desarrollar nuevas técnicas clínicas para la aplicación de las AgNPs. Es importante destacar que en estos estudios no se toma en cuenta la capacidad que tienen los microorganismos para generar resistencia contra los nanomateriales. Éste punto es importante, debido a que el número de bacterias y hongos patógenos multirresistente se incrementa rápidamente. Así, considerando el tema de los antibióticos y la resistencia a los mismos, las AgNPs son uno de los nanomateriales más prometedores y mejor estudiados.

Es vital señalar que, aunque se conocen los efectos antibacterianos y antifúngicos de diferentes tipos de AgNPs, se ignora mucho sobre sus mecanismos de acción. Esto es más notorio en el caso de los hongos pues, aunque hay algunos trabajos que reportan algunas interacciones relevantes (Kim *et al.*, 2007, Kim *et al.*, 2009, Huang *et al.*, 2012), todavía falta conocer más acerca de los efectos y de los mecanismos asociados.

Debido a su importancia, la síntesis y aplicación de nanopartículas uniformes, con características definidas de tamaño y forma, son prioritarias para combatir infecciones microbianas. Bajo estas condiciones, es importante a definir otros parámetros de relevancia clínica, como la concentración mínima inhibitoria, la concentración mínima fungicida, el tiempo de exposición requerido para que actúen los nanomateriales, su estabilidad, excipientes, biocompatibilidad, etc.

Un punto crucial es determinar el efecto de estas NPs tanto *in vitro* como *in vivo*. Es necesario evaluar, su efecto e interacción en sistemas biológicos más complejos, como el hombre y otros organismos de interés humanos, como ganado y plantas.

II.7 Trabajos previos

Hay algunos trabajos que han abordado el efecto y los mecanismos de acción de las AgNPs de plata en *C. albicans* y otras especies del género *Candida*. Son de especial interés aquellos que muestran la interacción entre *Candida albicans* y las AgNPs obtenidas por síntesis química y que tienen un efecto por sí mismas. Si bien hay estudios que incluyen híbridos de NPs con otras sustancias, como AgNPs-péptidos (Liu *et al.*, 2013), las AgNPs, pueden ejercer por sí mismas un efecto microbicida importante, según su forma y tamaño. Por otro lado, las nanopartículas generadas por biosíntesis, según su método de síntesis, pudieran representar un riesgo adicional en las aplicaciones biomédicas.

Kim *et al.* (2008), estudiaron el efecto de las AgNPs en los dermatofitos, entre los que destaca *Candida* spp. Se reportó que las AgNPs (esféricas, 3 nm) mostraron una fuerte actividad en contra del hongo y que hay una actividad sobre el micelio, inhibiendo la transición de levadura a hifa de *C. albicans* (figura 7). Este tipo de estudios es relativamente reciente, y los autores consideran que posiblemente este es el primer estudio que se haya realizado en dermatofitos



Fig. 8 Efecto de las AgNPs en la transición dimórfica de *C. albicans*. Control (A), Levaduras con Suero Fetal Bovino (SFB) y sin AgNPs (B), y levaduras con SFB y 2 $\mu\text{g/ml}$ of AgNPs (C). Adaptado de “Antifungal Effect of Silver Nanoparticles on Dermatophytes” de Kim, 2008, J. Microbiol. Biotechnol. 18(8), p. 1483

Kim *et al* (2009), en otro trabajo, sugieren que las AgNPs (esféricas, 3 nm) podrían estar presentando un efecto antifúngico al romper la estructura de la membrana celular, lo que también inhibe el proceso de gemación. Los análisis por TEM, muestran la aparente formación de “pozos” en la superficie de la membrana de *C. albicans* (figura 9). En pruebas adicionales, se observó que las nanopartículas de plata tienen un bajo efecto hemolítico. Los autores sugieren una mayor investigación sobre los efectos y mecanismos, para la aplicación clínica de las AgNPs. En otros estudios con levaduras, como *Saccharomyces cerevisiae* (Endo *et al.*, 1997) sugieren también daños a la membrana celular y la inhibición del proceso de gemación.

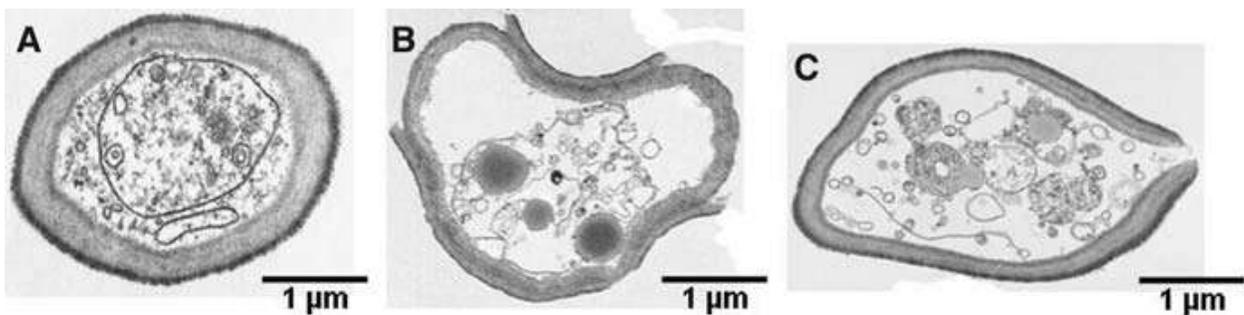


Fig. 9. Imagen en TEM de células de *C. albicans* con AgNPs. (A) Sin tratamiento, (B) con $170 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AgNPs y (C) con $400 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AgNPs. Las células con AgNPs fueron expuestas por 24 horas a 28°C . Adaptado de “Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*”, de Kim, *et al*, 2009, *BioMetals* 22(2), p. 240.

En estudios posteriores, Panáček *et al.*, (2010), observaron el efecto inhibitorio de las AgNPs en cuatro especies de *Candida*: *C. albicans* I y II, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*. Las AgNPs utilizadas (esféricas, 25 nm), presentaron diferentes valores de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Sin embargo, no se proponen mecanismos de acción, sólo se muestran los efectos de inhibición. También se compararon los resultados con plata coloidal. Reportan que las AgNPs en las concentraciones antifúngicas no son tóxicas para las células humanas (fibroblastos), mientras que la concentración antifúngica de la plata coloidal si es citotóxica.

Estudios más recientes proponen diferentes mecanismos o efectos a nivel estructural. Hwang *et al.*, (2012), estudiaron los efectos y los posibles mecanismos de las AgNPs (esféricas, 3 nm).

Encontraron que éstas se relacionan con la producción de ROS y que podrían provocar la apoptosis de *C. albicans*, mediante la generación de radicales hidroxilo, además de que encontraron fragmentación del ADN (Figura 10).

Por otro lado, Iu *et al.*,(2013), mediante microscopía confocal, encontraron que las AgNPs (10 nm, PVP-SDS), pueden dañar la membrana de la célula. Otros trabajos, como el de Monteiro *et al.*,(2013), señalan que las NPs de plata coloidal afectan la composición y la estructura de las biopelículas de *C. albicans* y *C. glabrata*, y que además tienen un efecto fungicida.

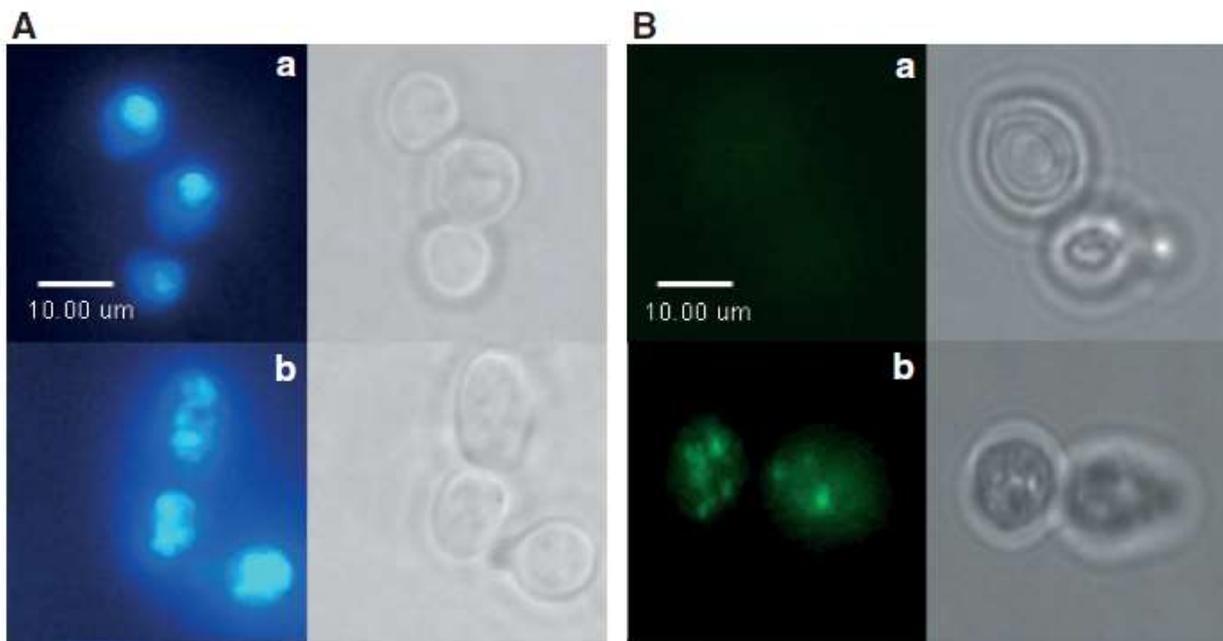


Fig. 10. Fragmentación del DNA en *C. albicans*. (A) DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole), (B) TUNEL (desoxinucleotidil transferasa terminal mediada por dUTP-biotina nick de etiquetado terminal). (a) Es el control negativo y (b) el tratamiento con AgNPs. Adaptado de "Silver nanoparticles induce apoptotic cell death in *Candida albicans* through the increase of hydroxyl radicals", de Hwang *et al.* 2012, FEBS Journal 279, p. 1333.

Es importante estudiar más sobre los efectos y las interacciones de los nanomateriales con los sistemas biológicos. En éste sentido, el estudio de los efectos entre *Candida albicans* y las AgNPs presentan una relevancia debido a su posible aplicación en la clínica.

El presente trabajo utilizó nanopartículas de plata, esféricas, de un rango de 3-10 nm. Las AgNPs están funcionalizadas con el polímero polivinilpirrolidona, lo que les proporciona estabilidad e incrementa su biocompatibilidad (Bühler, 2006).

Capítulo III

JUSTIFICACIÓN

La bionanotecnología es un área emergente que promete mejorar procesos y productos en diferentes áreas. En el caso de las áreas biomédicas, uno de los problemas que se pueden atender es el de las enfermedades infecciosas; particularmente en lo relativo al creciente número de microorganismos resistentes a las sustancias antimicrobianas. En el caso del género *Candida*, los tratamientos para combatirla son escasos, especialmente en la candidiasis refractarias, por lo que ésta es un gran reto terapéutico. La poca efectividad de los antifúngicos, ofrecen una oportunidad para el desarrollo de tratamientos alternos (Sanjay *et al.*, 2012).

Además del Posoconazol oral y de la forma adhesiva del Micafungina, no se han desarrollado nuevos antifúngicos para tratar las candidiasis orales y lo mismo pasa con las candidiasis vulvovaginales. Se necesitan tratamientos novedosos con sustancias fungicidas, económicas y de amplio espectro. Los agentes tópicos podrían ser más fáciles de desarrollar debido a que hay menos efectos secundarios y complicaciones que con los tratamientos sistémicos. Así, los nanomateriales prometen ser una buena alternativa para tratar estos problemas de manera efectiva.

El presente trabajo busca ampliar el conocimiento actual sobre la interacción de las AgNPs en distintos niveles estructurales de los sistemas biológicos, tomando como modelo a *Candida albicans*. Destaca la relevancia de estudiar el efecto de las AgNPs en la célula eucarionte, lo que permite entender mejor las interacciones y compararlas con los modelos procariontes.

Es fundamental entender el efecto de las AgNPs en la morfología y fisiología de *Candida spp.*, cuando es expuesta a diferentes tratamientos con las AgNPs. Otro punto importante es la observación de la relación entre éstas las nanopartículas y la resistencia contra los antibióticos que presentan los hongos, con la finalidad de evaluar su viabilidad en la clínica.

Capítulo IV

HIPÓTESIS

El presente trabajo puso a prueba cuatro hipótesis, todas relacionadas con los efectos y la interacción de las AgNPs en el hongo patógeno *C. albicans*.

- 1) Las AgNPs esféricas, de un diámetro de 3-10 nm, inhiben el crecimiento del hongo patógeno *C. albicans* a una concentración determinada.
- 2) Las AgNPs sobrepasan los mecanismos de resistencia que tiene *C. albicans* contra los antibióticos.
- 3) Las AgNPs presentan mecanismos de acción no específicos, por lo que pueden encontrarse en diferentes partes de la célula de *C. albicans*.
- 4) *C. albicans* no puede generar resistencia contra las AgNPs.

Capítulo V

OBJETIVOS

V.1 Objetivo General

Determinar los efectos y la interacción de las nanopartículas de plata, esféricas, de un rango de 3-10 nm, en el hongo patógeno *Candida albicans*.

V.2 Objetivos particulares:

- 1) Determinar la CMI y la CMF de las AgNPs para inhibir el crecimiento de *C. albicans* y contrastarla con la CMI del AgNO₃.
- 2) Determinar la CI₅₀ de las AgNPs en *C. albicans* y compararla contra la del FLZ.
- 3) Evaluar si el efecto de las AgNPs es fungicida o fungistático
- 4) Evaluar si se presenta el “efecto paradoja” en las AgNPs
- 5) Determinar si tiene una interacción antagónica o sinérgica con el FLZ.
- 6) Contrastar la CMF de *Candida albicans* con otras especies del género.
- 7) Contrastar la CMF de *Candida albicans* con aislados clínicos de diferentes especies del género.

- 8) Observar si las AgNPs se depositan en las células de *C. albicans* y en qué regiones se presentan.
- 9) Observar si hay cambios estructurales en las AgNPs y en las células de *C. albicans*, post-tratamiento.
- 10) Evaluar si la CI_{50} y la CMF a las AgNPs se mantiene constante después de exponer a *C. albicans* al tratamiento en sub-cultivos continuos.
- 11) Determinar, en caso de que se observe tolerancia a la CI_{50} de las AgNPs, si es adaptación o generación de resistencia.

Capítulo VI

MATERIALES Y MÉTODO

VI.1 MATERIALES Y EQUIPO

VI.1.1 Material Biológico:

Se trabajó con cepas de referencia y con aislados clínicos de cuatro especies del género *Candida*, obtenidas del cepario de *Candida* del Laboratorio de la Dra. Rosa Mouriño del Departamento de microbiología del CICESE. Las cepas de referencia fueron: *C. albicans* ATCC SC5314, *C. glabrata* ATCC 2001, *C. parapsilosis* ATCC 46143 y *C. tropicalis* MYA 5964. Los diferentes aislados clínicos probados corresponden a cepas de estas cuatro especies.

VI.1.2 Medios de cultivo:

Todos los cultivos en medio líquido se inocularon en caldo de cultivo YPD (1 g. de extracto de levadura, 2 g. de peptona y 2 g. de dextrosa, por cada 100 ml de H₂O), mientras que los cultivos en placa se realizaron en cajas de Petri con medio YPDA (YPD adicionado con 2 g. de agar por cada 100 ml).

Los reactivos utilizados fueron los siguientes: Extracto de levadura (Becton & Dickinson Company), Peptona (Becton & Dickinson Company), Dextrosa (genérica) y Agar (Agarmex). Los medios de cultivo se prepararon con agua destilada y se esterilizaron por los métodos convencionales.

VI.1.3 Nanopartículas de plata (AgNPs):

Las nanopartículas de plata fueron proporcionadas por el Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en colaboración con la empresa Vector-Vita Ltd (Rusia). Las AgNPs son esferoides de 3 a 10 nm de diámetro,

suspendidas en agua destilada y des-ionizada y están funcionalizadas con el polímero polivinilpirrolidona, lo que incrementa su estabilidad y biocompatibilidad (Bühler, 2006). La concentración de la solución original de las AgNPs, fue de $12,000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de plata.

VI.1.4 Antibiótico: Fluconazol (FLZ):

Se adquirió la formula concentrada inyectable Diflucan (Pfizer). La solución de Fluconazol tenía una concentración original de $2000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

VI.1.5 Nitrato de Plata AgNO_3 :

Se utilizó Nitrato de Plata (AgNO_3) S181-100 de la marca Fisher Chemicals. Se preparó una solución 0.11 M de AgNO_3 en agua destilada y se esterilizó por los medios convencionales. La solución preparada tenía una concentración de plata de $11,880 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Se preparó en ésta concentración para tener una concentración de plata similar a las AgNPs.

VI.1.6 polivinilpirrolidona (PVP):

Se utilizó polivinilpirrolidona preparada en una dilución concentrada (en agua destilada, esterilizada). La solución fue proporcionada por la Dra. Nina Bogdanchikova, del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM, y tenía una concentración de PVP de $187,500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

VI.2 Efecto de las AgNPs en *Candida albicans*

VI.2.1 Preparación de los cultivos.

Para realizar los diferentes experimentos, se cultivaron a las células de *Candida* en YPDA por 24 horas a 37°C . Para los cultivos en medio líquido, se tomó una muestra del cultivo en YPDA y se inoculó en YPD. El medio con las células se agitó por 60 segundos a velocidad media-alta, en un vortex marca Genia Vortex 2 de Scientific Industries. Para determinar la Densidad Óptica, se colocaron $450 \mu\text{L}$ en una celda de cuarzo y se midieron por espectrofotometría.

Después de aplicarles los respectivos tratamientos, que se describen en las siguientes secciones, los cultivos en medio YPD se dejaron incubar por 24 horas a 37°C, en agitación constante a 250 rpm. En todos los experimentos se incluyó un control (*C. albicans* sin tratamiento), un blanco (medio YPD) y un control positivo con YPD + tratamiento (AgNPs, FLZ o AgNO₃), sin células de *Candida*.

VI.2.2) Curva estándar de *Candida albicans*: densidad celular vs densidad óptica.

Se elaboró una curva estándar para determinar la concentración de células por mililitro, en medio YPD. Se realizaron varias diluciones de un cultivo de *C. albicans*. Por cada dilución, se contaron las células en una cámara de Neubauer, por cuadruplicado y se determinó su absorbancia, por triplicado, a 520 nm, en un espectrofotómetro Jenway 6505 UV-Vis.

Los conteos se correlacionaron con la absorbancia (densidad óptica). Con esta relación se generó una curva estándar. En el presente trabajo, todas las mediciones de la densidad óptica (D.O.), para determinar la cantidad de cel.*ml⁻¹ de *Candida* spp, se realizaron a una longitud de onda de 520 nm.

Los inóculos experimentales para *C. albicans* ATCC SC5314 fueron los siguientes: 4.3x10⁷ cel.*ml⁻¹ (D.O.=0.706), 2.5x10⁶ cel.*ml⁻¹ (D.O.= 0.082) y 1x10⁴ cel.*ml⁻¹ (D.O.= 0.040).

VI.2.3) Determinación de la CMI de las AgNPs.

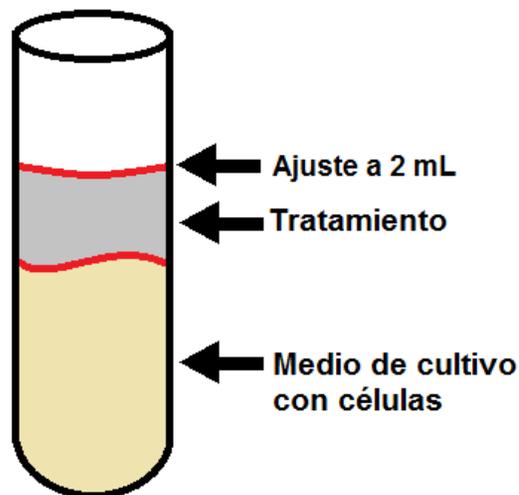
Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las AgNPs, se realizaron pruebas en base al método de microdiluciones M27-A2 del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2002), con algunas modificaciones. La CMI se determinó para la cepa de referencia *C. albicans* ATCC SC5314. Se realizaron pruebas con tres diferentes concentraciones de células por mililitro.

Para las pruebas, se siguió el procedimiento indicado en el punto VI.2.0 y se ajustó la D.O. de los cultivos hasta llegar a la concentración de células deseada. Posteriormente se prepararon dos series de alícuotas y se agregaron diferentes cantidades de AgNPs o de AgNO₃, según el

tratamiento, hasta ajustar un volumen de 2 ml por réplica (fig. 11). En la tabla 7 se describen las concentraciones de células y de los tratamientos (AgNPs y AgNO₃) utilizados. Los cultivos se dejaron en incubación como se señala en VI.2.0, junto con los controles respectivos

Tabla 7. Densidad celular vs concentración de los tratamientos ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) para determinar la CMI. Se probaron diferentes concentraciones de los tratamientos (AgNPs, AgNO₃ y FLZ) en cultivos de *C. albicans* ATCC SC 5314 con diferente densidad celular inicial.

Tratamiento	(D.O.)	Concentración de plata ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)
AgNPs	0.706	3000, 2700, 2400, 2100, 1800, 1200 y 600
	0.082	3000, 1500, 600, 150, 90 y 42
	0.040	1500, 600, 150, 90, 42 y 18
AgNO ₃	0.082	3000, 1500, 600, 150, 90 y 42
	0.040	1500, 600, 150, 90, 42 y 18
FLZ	0.082	500, 250, 125, 63, 31
	0.040	250, 125, 63, 31, 15



Cultivo experimental ajustado a 2 mL
(Cultivo + Tratamiento)

Fig. 11. Esquema representativo de los cultivos en YPD, ajustados a 2 ml

Después de 24 horas de exposición en YPD, se revisaron los cultivos. Asimismo, se tomaron 10 μl de cada muestra y se inocularon en una placa con YPDA, por triplicado, como se muestra en la figura 11a. En otra caja se colocaron 20 μL de cada cultivo, junto con los controles (figura 11b). Se dejaron en incubación por 24 horas, a 37 °C.

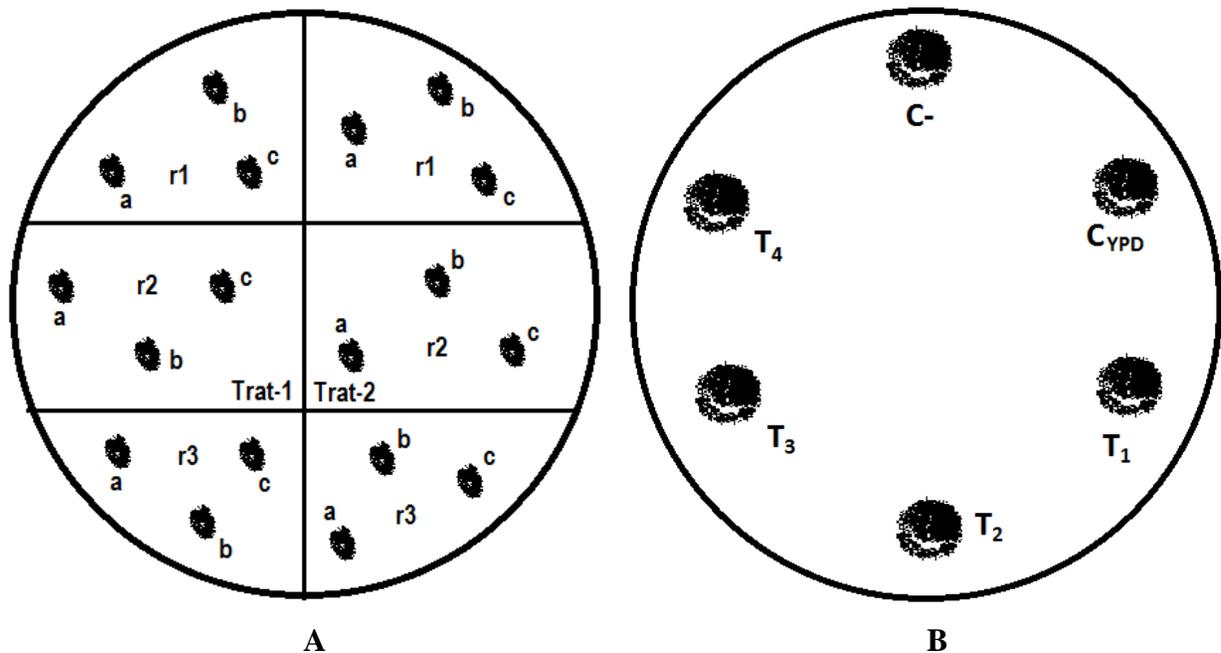


Fig. 12. Esquemas de inoculación en placa YPDA. En (A) se muestran los inóculos (10 μl), por triplicado (a, b y c), de cada réplica (r1, r2 y r3), por triplicado también, de los diferentes tratamientos (Trat-1 y Trat.2, por ejemplo). En (B) se inocularon 20 μl , de cada réplica de cada tratamiento (T₁, T₂, T₃ y T₄), incluyendo los respectivos controles: el control (sin tratamiento, C-) y el blanco (medio YPD, C_{YPD}), para indicar la esterilidad del medio.

También se realizó una prueba para determinar si la molécula funcionalizante (polivinilpirrolidona) posee actividad antifúngica. Se evaluó el efecto de la PVP en el crecimiento de *C. albicans* ATCC SC5314. Se siguió el procedimiento de preparación del inóculo señalado en el punto VI.2.0 y se expuso a una concentración de 50,000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de PVP. A las 24 horas se midió el crecimiento mediante espectrofotometría, a $\lambda=520$ nm. Asimismo, en placas YPDA se inocularon 30 μl de cada tratamiento y los controles, con la finalidad de evaluar y contrastar el crecimiento en los diferentes cultivos.

VI.2.4) Determinación de la CI_{50} de las AgNPs vs la CI_{50} del FLZ en *C. albicans*.

Se determinó la concentración mínima inhibitoria media (CI_{50}) de las AgNPs y del FLZ (como antifúngico de referencia). Se realizó una prueba en base al método de microdiluciones M27-A2 del CLSI (2002), con algunas modificaciones. Se definió la CI_{50} para dos concentraciones iniciales de células por mililitro (D.O.= 0.082 y 0.040).

Para las pruebas, se siguió el procedimiento indicado en el punto VI.2.0 y se ajustó la D.O. de un cultivo para llegar a la concentración de células deseada. Posteriormente se prepararon dos series de alícuotas, una para las AgNPs y el otro para el FLZ. En la tabla 8 se muestran los inóculos iniciales de *C. albicans*, y las concentraciones utilizadas para cada tratamiento. Se agregaron diferentes volúmenes ya sea de las AgNPs o del FLZ, para lograr las concentraciones deseadas, ajustadas a cultivos de 2 ml (fig. 10). Los cultivos se dejaron en incubación, como se especifica en VI.2.0, con sus respectivos controles.

Tabla 8. Densidad celular vs dosis de AgNPs y FLZ para determinar la CI_{50} . La CI_{50} de las AgNPs y del FLZ se determinó para dos cultivos con diferente densidad celular inicial.

Inóculo <i>C. albicans</i> (D.O.)	Tratamiento	Concentraciones ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
0.082	AgNPs	150, 120, 90, 60, 42 y 18
	FLZ	300, 125, 63, 31, 15
0.040	AgNPs	90, 60, 42, 18, 6
	FLZ	125, 63, 31, 15, 7

Los cultivos se revisaron a las 24 horas de exposición. Para los cultivos con una D.O.= 0.082, tratados con las AgNPs y del control negativo, se realizaron diluciones de 1×10^{-4} y de 1×10^{-5} . Posteriormente se tomaron 50 μl de cada muestra y se inocularon en una placa con YPDA. Se distribuyeron de manera uniforme con un asa microbiológica y se dejaron en incubación por 24 horas, a 37 °C. A las 24 horas se contaron las colonias por el método de cuenta en placa. Para los cultivos tratados con FLZ, del inóculo D.O.=0.082, se determinó mediante espectrofotometría. Para el inóculo de D.O.=0.040 se determinó la CI_{50} del FLZ y de las AgNPs por espectrofotometría, con una $\lambda= 520$ nm.

VI.2.5) Evaluación del efecto fungicida / fungistático de las AgNPs.

Se preparó un cultivo según lo señalado en el punto VI.2.0 y se ajustó la D.O. a 0.082. Se prepararon alícuotas con concentraciones de plata (AgNPs y AgNO₃) equivalentes a la CMI, CMIx2 y CMIx5 (tabla 9). Las concentraciones del FLZ equivalen a la CI₅₀, CI₅₀x2 y CI₅₀x4. Los cultivos se dejaron en incubación. Además de los tratamientos, se incluyó un control negativo (*C. albicans* sin tratamiento). Se siguió el método para determinar el efecto fungicida / fungistático citado por Quintero-Mora *et al.*, (2008) y Quezada *et al.*, (2006), con algunas modificaciones.

Tabla 9. Concentraciones utilizadas de los tratamientos para determinar su efecto fungicida / fungistático. Se contrastan con el FLZ como antifúngico de referencia (fungistático).

Tratamientos	CMI / CI ₅₀ ^a (µg*mL ⁻¹)		
	x1	x2	x5
AgNPs	42	84	210
AgNO ₃	42	84	210
^a FLZ	31	63	125
^a Para el FLZ se utilizó la IC ₅₀ , debido a que no se determinó una CMI.			

A las 24 horas se tomaron 100 µl de cada uno de los tratamientos y se re-inocularon en 2 ml de medio YPD sin tratamiento. Se dejaron incubar por 24 horas, bajo las condiciones especificadas en VI.2.0; el proceso se repitió dos veces más. Cada 24 horas se revisó su turbidez de manera visual. Al tercer sub-cultivo se observaron con microscopía óptica de campo claro y, además, se revisó su densidad óptica por espectrofotometría. También se tomaron 10 µl de cada uno de los tratamientos y se inocularon en placas con YPDA. Los cultivos en placa se incubaron por 24 horas a 37 °C. En la figura 13 se muestra la distribución de los cultivos, en placa YPDA.

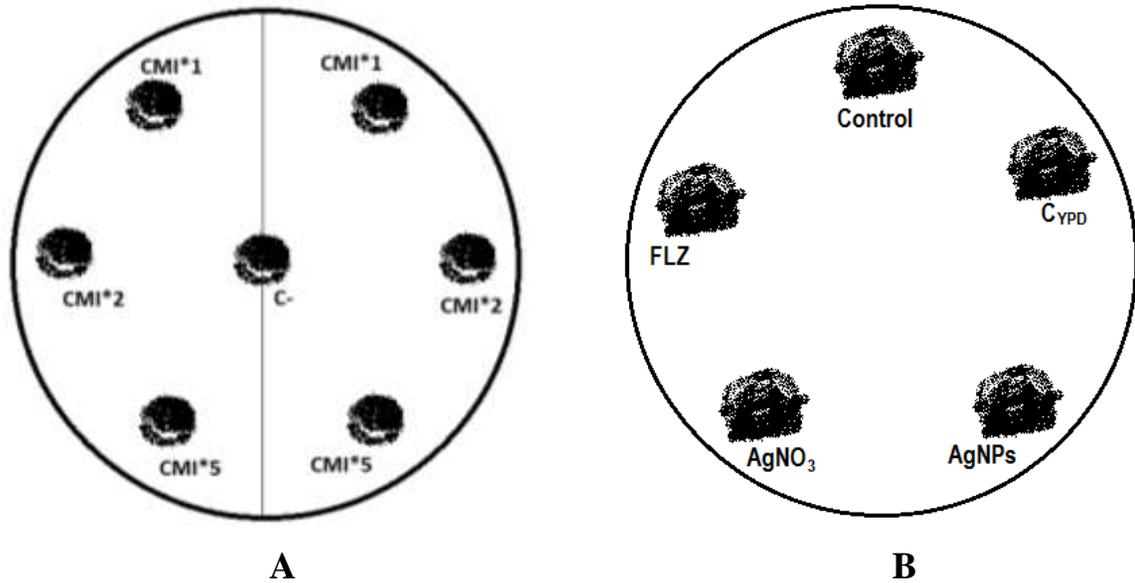


Fig. 13. Esquema de re-inoculación en placa YPDA. (A) Re-inoculación de los tratamientos a las 24 horas de exposición. Se expusieron las CMI señaladas y sólo se inocularon los tratamientos con AgNPs/AgNO₃. (B) Al tercer sub-cultivo en YPD, libre de tratamiento, se inocularon 20 µl de cada tratamiento en placa YPDA, para verificar su respuesta. El Control sirvió para señalar el crecimiento normal de *C. albicans* sin tratamiento.

VI.2.6) Evaluación para determinar si se presenta el “efecto paradoja” en las AgNPs

El efecto paradoja se determinó mediante una prueba de exposición de *C. albicans* a diferentes concentraciones de los tratamientos. Se realizó una prueba en base al ya citado método de microdiluciones M27-A2 del CLSI (2002), con algunas modificaciones, para evaluar si se presenta éste efecto con las AgNPs. Para las pruebas se preparó un cultivo conforme el punto VI.2.0 y se ajustó a una D.O.=0.040. En el caso de las AgNPs y del AgNO₃ se probaron concentraciones sub-CMI y superiores a la CMI, mientras que con el FLZ se utilizaron concentraciones superiores a la DL₅₀. En la tabla 10 se indican las concentraciones probadas.

Tabla 10. Evaluación del efecto paradoja. Se evaluó en *C. albicans* ATCC SC5314, en un cultivo con una D.O.= 0.040. En negritas se señalan la CMI (Ag) y la CI₅₀ (FLZ)

Tratamiento	Concentraciones ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
AgNPs	1800, 900, 150, 90, 42 y 18
AgNO ₃	1800, 900, 150, 90, 42 y 18
FLZ	500, 300, 150, 125, 63 y 31

Los cultivos se dejaron en incubación y se analizaron a las 24 horas. Los cultivos con FLZ se observaron por métodos visuales y por espectrofotometría. Por otro lado, de los cultivos con AgNPs, se tomaron 10 μl de cada tratamiento y se inocularon en placa YPDA, siguiendo el esquema de la figura 11b y se dejaron incubar por 24 horas.

VI.2.7) Evaluación de la interacción AgNPs - FLZ

Para determinar qué tipo de interacción existe entre el FLZ y las AgNPs, se siguió el procedimiento indicado en el punto VI.2.0 y se generó un inóculo con una D.O.= 0.040. Se prepararon alícuotas a las que se les aplicó diferentes concentraciones de AgNPs-FLZ (tabla 11) y se dejaron incubar.

Tabla 11. Tratamientos combinados de AgNPs-FLZ. Se realizaron cuatro combinaciones diferentes, mediante dos concentraciones de AgNPs y dos concentraciones de FLZ.

Concentraciones $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$		FLZ	
		300	31
AgNPs	42	42/300	42/31
	18	18/300	18/31

Los cultivos se observaron por microscopía óptica de campo claro. Además se inocularon 10 μ l, por triplicado, de cada tratamiento en placa YPDA (figura 14) y se dejaron incubar por 24 horas a 37°C.

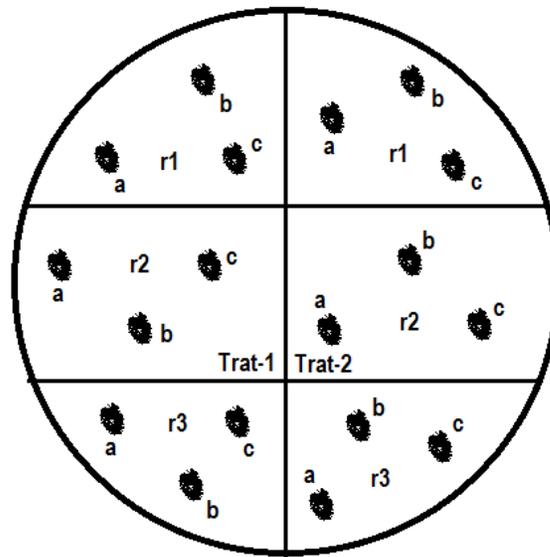


Fig. 14. Siembra en placa de los tratamientos combinados de AgNPs+FLZ en *C. albicans*. Se muestran los inóculos (10 μ l), por triplicado (a, b y c), de cada réplica (r1, r2 y r3), por triplicado también, de los diferentes tratamientos (Trat-1 y Trat.2, por ejemplo).

VI.3 Comparación del efecto de la CMI en otras especies del género *Candida* y en aislados clínicos de las especies representativas

Se determinó la respuesta de las diferentes especies del género *Candida*, al tratamiento con AgNPs. Además de *C. albicans*, las especies de *Candida* estudiadas fueron: *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*. Se realizaron pruebas en las cepas de referencia y en aislados clínicos de las especies citadas.

Las AgNPs se probaron en 21 aislados clínicos de *C. albicans*, en 14 de *C. glabrata* y en 4 de *C. parapsilosis*. En todas las especies se incluyó la cepa de referencia, En el caso de *C. tropicalis* sólo se probó en la cepa de referencia. En total, se determinó el efecto de la CMI de las AgNPs en 42 cepas, además de la cepa de referencia *C. albicans* ATCC SC5314.

Para las pruebas, se siguió el procedimiento señalado en el punto VI.2.0. Los cultivos en YPD se ajustaron a una concentración de la 2.5×10^6 cel. \cdot ml $^{-1}$. A cada cepa se le aplicó un tratamiento de AgNPs igual a la CMI ($150 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) y a la CMIx2 ($300 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) obtenida de *C. albicans* ATCC SC5314 (punto VI.2.2) y se dejaron en incubación. A las 24 horas, se tomaron 10 μl de cada muestra y se inocularon en placa YPDA, como se observa en el esquema de inoculación de la figura 15.

Las cepas y los aislados clínicos se clasificaron, según su respuesta, en susceptible, resistente a CMI y resistente a CMIx2.

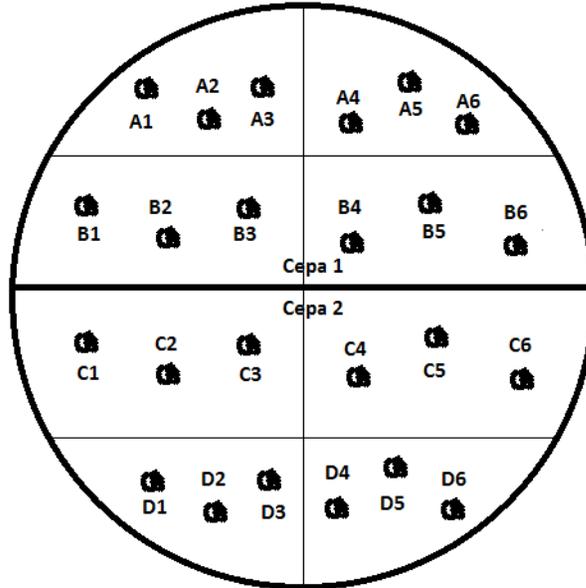


Fig. 15. Esquema de inoculación para probar la CMI de *C. albicans* en diferentes especies y aislados clínicos del género *Candida*. Se agregaron 5 μl de cada tratamiento por cepa, según la CMI y su CMIx2 de *C. albicans* ATCC SC5314. Las réplicas, por triplicado, de los inóculos de la CMIx1 corresponden a las letras “A” y “C”, mientras que la CMIx2 se inoculó en “B” y en “D”.

VI.4 Análisis Microscópico.

Se prepararon cultivos de *C. albicans* SC5314, según el punto VI.2.0 y se les dio un tratamiento con la CMI y la DL₅₀ de las AgNPs, en medio líquido, por 24 horas.

VI.4.1) Microscopía óptica:

Se observó la estructura de la célula de manera general, pre- y post-tratamiento. Se utilizó microscopía óptica de contraste de fases y de fluorescencia. Se utilizó un cultivo con una D.O.=0.040 y se le aplicó la DL₅₀ de las AgNPs (18 µg*mL⁻¹).

Por otro lado, para evaluar algunos de los efectos intracelulares de las AgNPs, se utilizó microscopía de fluorescencia. Las células control y las células con tratamiento se tiñeron con DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol). El DAPI se utilizó para determinar si había fragmentación nuclear o del ADN (Huang *et al.*, 2012). Además, se utilizó la excitación en verde para determinar si era posible observar a las AgNPs por fluorescencia (Castro-Longoria *et al.*, 2011). Las muestras con DAPI se excitaron con una $\lambda = 358$ nm (UV) y emitieron a $\lambda = 461$ nm (azul), mientras que las AgNPs se excitaron a $\lambda = 488$ nm (azul) y emitieron a $\lambda = 509$ nm (verde).

Se utilizó un equipo de Microscopía Confocal Olympus IXF1/Fluoview FV1000 y un equipo Zeiss Axiovert 200M. La microscopía de contraste de fases se utilizó para mejorar la observación y comparación de la morfología de las células control y las células con AgNPs, post-tratamiento.

VI.4.2) Microscopía Electrónica de Transmisión:

Se preparó un cultivo con una D.O.=0.082 y se dividió en dos sub-cultivos: el cultivo control y el cultivo con tratamiento (150 µg*mL⁻¹ de AgNPs). A las 24 horas de crecimiento, los cultivos se procesaron para la microscopía electrónica. La preparación de las muestras consistió en fijar y deshidratar a las células, para después embeberlas en la resina de soporte. La preparación consistió en los siguientes pasos:

- a) Fijación de las células, con glutaraldehído al 2% por 2 horas
- b) Post-fijación con OsO₄ al 1% por 30 minutos.
- c) Deshidratación, por medio de series de etanol/agua (30, 60, 90 y 100% de etanol).
- d) Infiltración de las muestras en una serie de resina/etanol (30, 60, 90 y 100% de etanol).
- e) Las muestras se embebieron en una resina de incrustación al 100%
- f) Montaje, en portaobjetos.
- g) Polimerización a 60°C por 24 horas.

Para obtener las muestras para el análisis en el TEM, se realizaron cortes con un ultramicrotomo Leica Ultracut R. Se realizaron cortes de 70 nm de grosor y se montaron en rejillas de cobre de 75 mesh y en rejillas de Lacey-Carbon de 300 mesh (Ted Pella).

Las muestras se analizaron en un TEM Hitachi H7500, del Laboratorio del Departamento de Microbiología Experimental y Aplicada, de la DBEA-CICESE. También se realizaron análisis de microscopía electrónica de alta resolución, se realizaron en el HR-TEM Tecnai F300, del Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. (LINAN-IPICyT).

Las observaciones y análisis realizados se describen a continuación:

1. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), para observar la ultraestructura celular y la distribución de las nanopartículas en la célula. Con esta técnica se observaron las células a diferentes escalas, iniciando de una panorámica de un conjunto de células (aumentos de 10,000x), hasta el análisis de estructuras internas de una sola célula (aumentos de 100,000x).
2. Se utilizó también la Microscopía Electrónica de Transmisión y Barrido (STEM), para analizar regiones particulares en la célula, y realizar otros análisis, como el DF-TEM, EDX y Cristalografía. Ésta técnica se fundamenta enfocar el haz de electrones en un punto estrecho que es escaneado sobre la muestra.
3. Microscopía Electrónica de Transmisión de Campo Oscuro (DF-TEM), para iluminar regiones específicas de la célula, y generar mayor contraste entre éstas y las AgNPs. Ésta técnica se fundamenta en la exclusión del haz de electrones no dispersos, lo que genera un campo oscuro. Además, la DF-TEM permitió analizar si la muestra tenía una estructura cristalina.

4. El análisis de Espectroscopía de Energía Dispersiva (EDS/EDX) se utilizó para determinar los perfiles químicos de las regiones intercelulares observadas (en cultivos con y sin AgNPs). Ésta técnica analítica permitió la identificación química de los elementos de la muestra, debido a su interacción con los rayos X.
5. Por último, el análisis de cristalografía se realizó para determinar la estructura interna de las AgNPs, post tratamiento.

VI.5 Ensayos para evaluar la capacidad de generar resistencia a los tratamientos.

Se preparó un cultivo de *C. albicans* ATCC SC5314, según el punto VI.2.0 y se ajustó a D.O. a 0.040. A partir del cultivo, se prepararon dos series de sub-cultivos, por triplicado, ajustados, con los tratamientos, a 2 ml. Para ajustar los sub-cultivos, se agregó la CI_{50} de las AgNPs y del FLZ (18 y 31 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente) y se dejó incubar (figura 16a). Como controles se incluyeron el control sin tratamiento, blanco (medio YPD) y medio YPD + FLZ (CI_{50}). En la tabla 12 se muestran los tratamientos de los cultivos utilizados.

Tabla 12. Concentraciones de los tratamientos para evaluar la capacidad de *C. albicans* para generar resistencia. Tratamientos para los sub-cultivos sucesivos, para evaluar la respuesta de *C. albicans* ante una exposición constante a las AgNPs y al FLZ.

Tratamiento	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Concentración equivalente
Control negativo	N/A	N/A
AgNPs	42	CMI
FLZ	31	DL_{50}

A las por 24 horas se midió la densidad óptica de cada réplica, por espectrofotometría. Posteriormente, de cada cultivo con tratamiento, se tomó el volumen necesario para hacer un nuevo sub-cultivo, ajustado nuevamente a la D.O. a 0.040. El ajuste se realizó agregando un volumen del cultivo anterior, y agregando el volumen de los tratamientos y llevando cada réplica a un volumen de 2 ml con medio YPD (figura 16b).

Ésta operación se repitió por 10 días consecutivos, con la finalidad de determinar si *C. albicans* pudiese generar resistencia bajo una serie de cultivos sucesivos, expuesta constantemente a los tratamientos. En la figura 17 se muestra el diagrama de flujo del proceso.

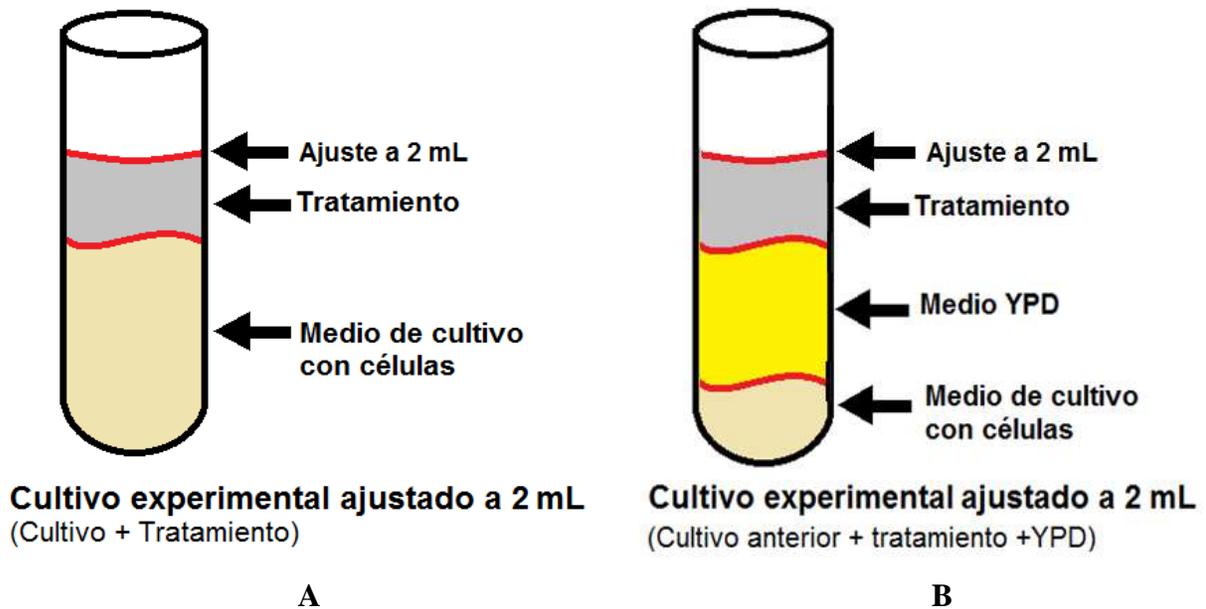


Figura 16. Representación de (A) los cultivos iniciales y (B) de los sub-cultivos sucesivos. Los cultivos se ajustan a 2 ml, con una exposición constante a los tratamientos.

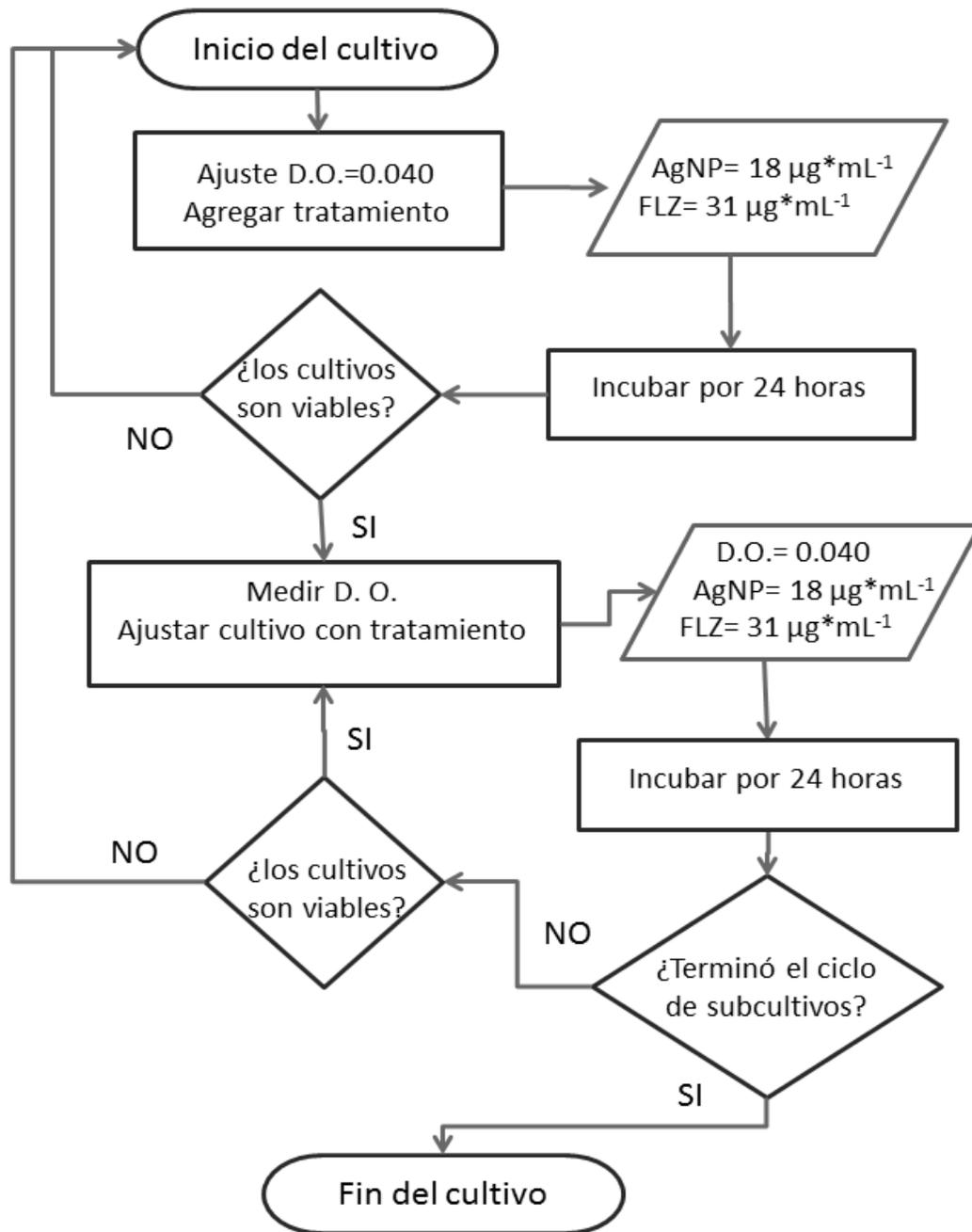


Figura 17. Diagrama de trabajo para la prueba de resistencia.
Se muestra el diagrama general del experimento, en donde el ciclo de sub-cultivos se repito 10 veces.

Al finalizar de todo el proceso, se tomó una muestra de cada serie de tratamientos (AgNPs y FLZ) con un asa microbiológica y se inoculó en una placa YPDA. El inóculo se sembró por el método de estriado francés y se dejó crecer a 37°C. A las 24 horas, se preparó un cultivo por el

método descrito en el punto VI.2.0, en YPD y se aplicaron los tratamientos y concentraciones señalados en la tabla 13.

Tabla 13. Tratamientos aplicados en las cepas, después del periodo experimental.

Tratamiento original	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	Concentración equivalente
Control negativo	N/A	N/A
	42 (AgNPs)	CMI
	31 (FLZ)	DL ₅₀
AgNPs	42	CMIx1
	126	CMIx3
FLZ	31	DL ₅₀ x1
	150	DL ₅₀ x5

Capítulo VII

RESULTADOS

VII.1.- Efecto de las AgNPs en *Candida albicans*

VII.1.1 Determinación de la CMI de las AgNPs.

La concentración mínima inhibitoria se define como la concentración más baja que inhibe el crecimiento visible de los hongos. Por otro lado, la concentración mínima fungicida, se define como la CMI en la que puede haber crecimiento (fungistática) o no (fungicida) de los hongos, post-tratamiento, después de re-inocularlos en placas libre de tratamiento (Scorzoni *et al.*, 2007). La determinación de dichas concentraciones es relevante para la clínica.

Se determinó la concentración mínima inhibitoria para los tratamientos con AgNPs y AgNO₃. No se estableció una CMI para el FLZ. Las CMI para las AgNPs y el AgNO₃ se presentan en la tabla 14. Se observa que la CMI de las AgNPs pueden ser iguales o menores que las CMI del AgNO₃. En la figura 18 se muestran imágenes de los cultivos expuestos a los tratamientos con AgNPs, AgNO₃ y FLZ. Se determinó que la CMI en los compuestos con plata es equivalente a la concentración mínima fungicida (CMF).

Tabla 14. CMI de las AgNPs y el AgNO₃. Determinación de la CMI en *C. albicans* ATCC SC5314, a diferentes concentraciones celulares.

D.O. del cultivo inicial ($\lambda=520$)	Concentración de plata ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	
	AgNPs	AgNO ₃
0.706	600	-
0.082	150	150
0.040	42	90

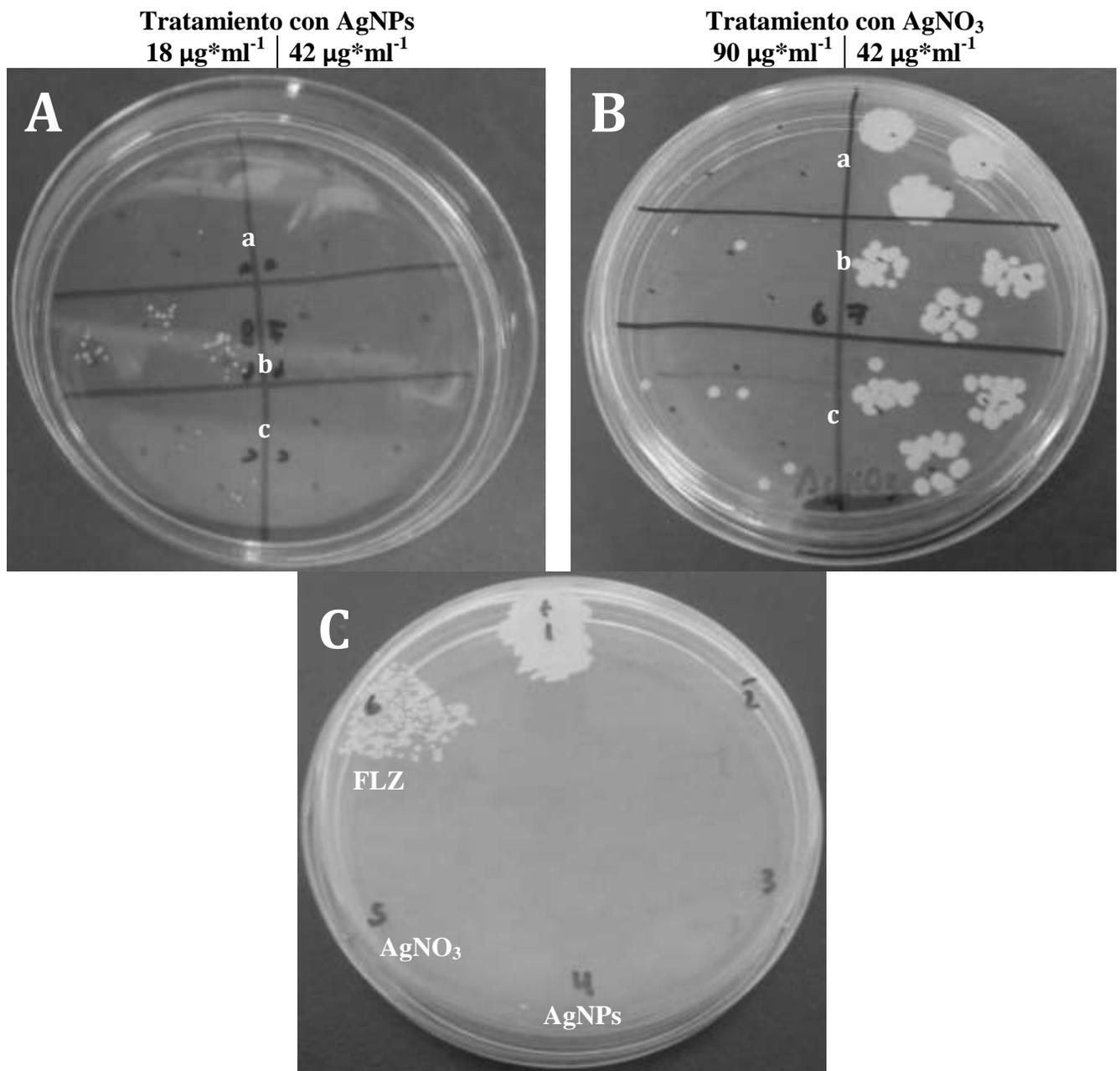


Fig. 18. Imágenes representativas de los cultivos en placa de las cepas de *C. albicans* expuestas a AgNPs, AgNO₃ y FLZ. Cultivos con tratamientos (A) AgNPs y (B) AgNO₃. Se inocularon las réplicas (a, b y c), por triplicado, de cada tratamiento, en placas YPDA. En (A) se observa el crecimiento y la inhibición de las células, conforme disminuye la concentración de las AgNPs (7 y 8). En (B) se observa el crecimiento gradual de los cultivos conforme disminuye la concentración del tratamiento (6 y 7), AgNO₃ en este caso. En (C) se presenta las placas YPDA por cada tratamiento, que incluyen los controles de *C. albicans* sin tratamiento (1), al blanco (2) y al control FLZ (3). Los tratamientos inoculados fueron los equivalentes a la CMI (4 y 5) o a la IC₅₀ (6).

En la prueba de *C. albicans* tratada sólo con polivinilpirrolidona, se observó crecimiento post-tratamiento. Los cultivos de la cepa de referencia de *C. albicans* fueron tratados con de $50,000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de PVP. En la tabla 15 se muestran los resultados y en la figura 18 las gráficas comparativas entre el Control sin tratamiento (C-) y la PVP. Los resultados por espectrofotometría muestran un crecimiento muy similar entre los cultivos sin tratamiento y los cultivos tratados con PVP. Por otro lado, en la figura 19 se muestra el crecimiento comparativo entre los tratamientos y los controles, inoculados en placa con medio YPDA. En el medio en placa también se observa un crecimiento similar entre los controles y los cultivos expuestos a PVP.

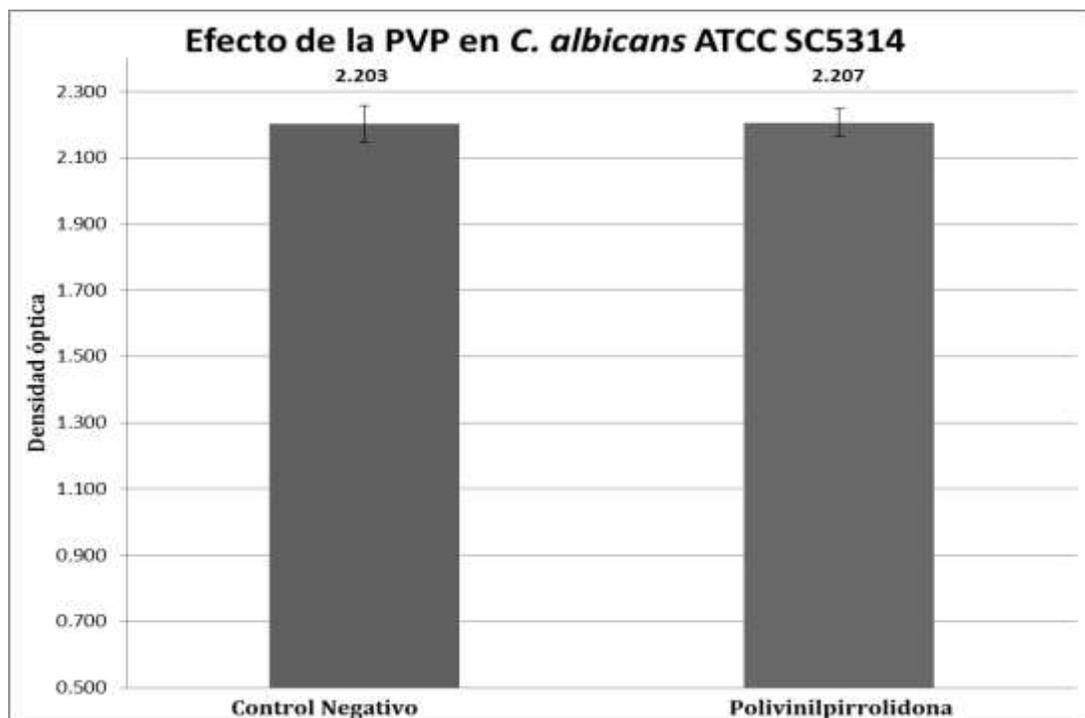


Figura 19. Efecto de la PVP en el crecimiento de *C. albicans*. La concentración de la PVP fue de $50,000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. En la figura se observa que el crecimiento entre el control (sin tratamiento) y la PVP son muy similares.

Tabla 15. Efecto de la PVP en el crecimiento del *C. albicans*

Tratamiento	Concentración ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Medición
Control	N/A	2.203 ($\sigma = 0.055$)
PVP	50,000	2.207 ($\sigma = 0.042$)

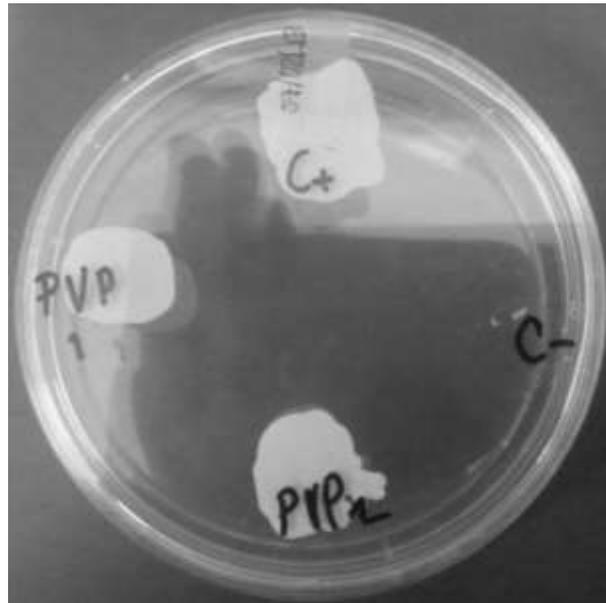


Figura 20. Crecimiento comparativo en cultivos de *C. albicans* tratados con PVP. Los cultivos con tratamiento de $50,000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de PVP (PVP_1 y PVP_2), el control sin tratamiento (C^+) y el blanco (C^-), medio YPD, sin células ni tratamiento.

VII.1.2) Determinación la concentración mínima inhibitoria media (CI_{50}) de las AgNPs vs la CI_{50} del FLZ en *C. albicans*.

La CI_{50} se define como la concentración de la sustancias antimicrobiana que inhibe el crecimiento del cultivo en un 50%, comparada con el control sin tratamiento. Su determinación es importante, pues es utilizada en diferentes pruebas, tales como la medida de la potencia de un fármaco antagonista, en la investigación farmacológica.

Se obtuvo la CI_{50} de las AgNPs y del FLZ, en *C. albicans* ATCC SC5314. Las CI_{50} del inóculo D.O.= 0.040 se señalan en la tabla 16. Se observa que la CI_{50} de las AgNPs es menor que la CI_{50} del FLZ. Las mediciones se obtuvieron por espectrofotometría.

Por otro lado, para el cultivo de D.O.=0.082, se diluyeron las muestras en medio YPD, para contar las UFC, por el método de cuenta en placa. Se seleccionaron las placas que tuvieran entre 30 y 300 colonias. En la figura 21 se muestra un cultivo representativo de las placas con YPDA, utilizadas para determinar la CI_{50} por el método de cuenta en placa. En los cultivos de D.O.=0.082, la CI_{50} de las AgNPs fue de $60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, mientras que la DL_{50} del FLZ fue de $125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Tabla 16. Determinación de la CI_{50} para los diferentes tratamientos.

Tratamiento	Concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Medición
Control	N/A	2.151 ($\sigma = 0.032$)
FLZ	31	1.002 ($\sigma = 0.025$)
AgNPs	18	1.029 ($\sigma = 0.012$)

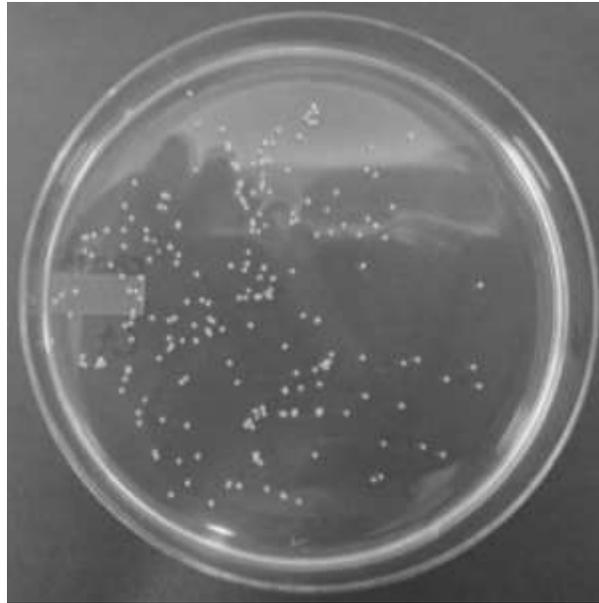


Fig. 21: Imagen representativa de una de los cultivos para realizar el método de cuenta en placa. Ésta técnica se utilizó para determinar la CI_{50} de los cultivos tratados con AgNPs y para el control positivo. El cálculo de células por mililitro se realizó para diferentes concentraciones.

VII.1.3) Evaluación del efecto fungicida / fungistático de las AgNPs.

Las sustancias fungistáticas son aquellas que inhiben el crecimiento de los hongos, mientras que las sustancias fungicidas son aquellas que los matan. La determinación de efecto fungicida *vs* el efecto fungistático es importante en la clínica.

Esta prueba se realizó para evaluar si el efecto de las AgNPs en *C. albicans*. Los sub-cultivos con AgNPs y el $AgNO_3$ no presentaron crecimiento después de haber sido re-inoculados en medio YPD sin tratamiento, en tres sub-cultivos sucesivos, de 24 horas cada uno. En los cultivos tratados con FLZ si se observó el crecimiento desde el primer sub-cultivo.

En las tabla 17 se muestran los resultados para los tres sub-cultivos y para la placa YPDA, que fue inoculado al tercer sub-cultivo, mientras que en la figura 22 se observan imágenes de los sub-cultivos. Se midió por turbidez (observación visual y espectrofotometría), y se observó por microscopía óptica y por siembra en placa al tercer sub-cultivo.

Tabla 17. Determinación del efecto fungicida/fungistático de los tratamientos con plata y el FLZ. Se utilizó un inóculo de D.O.= 0.040. El apartado de crecimiento es cualitativo, por lo que el signo (-) indica que no hubo crecimiento, mientras que el signo (+) señala el crecimiento, independientemente de su cantidad. El cultivo en YPDA se realizó de manera simultánea con el tercer sub-cultivo en YPD.

Tratamiento	Concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Concentración equivalente	Crecimiento (sub-cultivos)			
			1	2	3	YPDA*
Control (-)	N/A	N/A	+	+	+	+
AgNPs	42	CMI x1	-	-	-	-
	84	CMI x2	-	-	-	-
	210	CMI x5	-	-	-	-
AgNO ₃	90	CMI x1	-	-	-	-
	180	CMI x2	-	-	-	-
	450	CMI x5	-	-	-	-
FLZ	31	CI ₅₀ x1	+	+	+	+
	63	CI ₅₀ x2	+	+	+	+
	125	CI ₅₀ x4	+	+	+	+

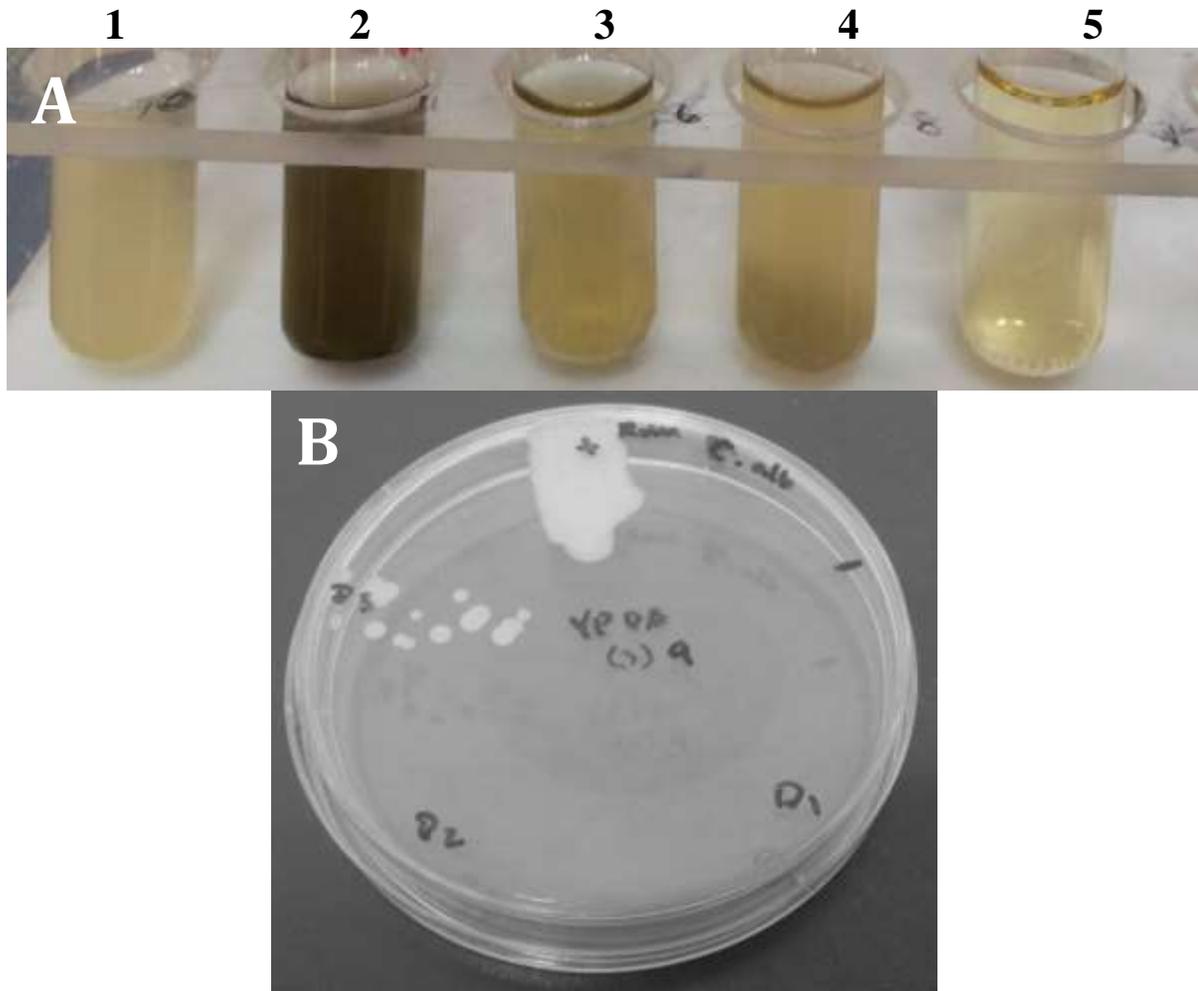


Fig. 22. Esquema de re-inoculación para determinar el efecto fungicida.

(A) cultivos en medio líquidos YPD, ajustado a 2 ml (1= control sin tratamiento, 2=AgNPs, 3=AgNO₃, 4=FLZ y 5=control YPD) y (B) Cultivo post-tratamiento inoculado en YPDA al tercer sub-cultivo en YPD. Se agregaron 20 µl de cada tratamiento en placas YPDA y se distribuyeron con un asa microbiológica. D1=AgNPs, D2=AgNO₃ y D3=FLZ. El Control sirvió para señalar el crecimiento normal de *C. albicans* sin tratamiento, mientras que el blanco (medio YPD) para garantizar la esterilidad del medio.

VII.1.4) Evaluación para determinar si se presenta el “efecto paradoja” en las AgNPs

El efecto paradoja, en los antibióticos, se define como una notable reducción en la capacidad para inhibir microorganismos, cuando se usan concentraciones superiores a la CMI (Holm *et al.*, 1990). Aunque no se conocen sus implicaciones en la clínica, es importante determinarlo.

No se observó crecimiento en los cultivos tratados con AgNPs y AgNO₃, en concentraciones equivalentes a la CMI y superiores. Por otro lado, en todos los cultivos tratados con FLZ si se observó crecimiento.

En la figura 23 se muestra la curva de crecimiento de *C. albicans* expuesta a diferentes concentraciones de FLZ. Se observa que la respuesta al tratamiento de FLZ no sigue una tendencia lineal. En la tabla 18 se presenta el crecimiento de *C. albicans* tratada con FLZ, mientras que la tabla 19 se observan los resultados para los cultivos expuestos a las AgNPs y el AgNO₃.

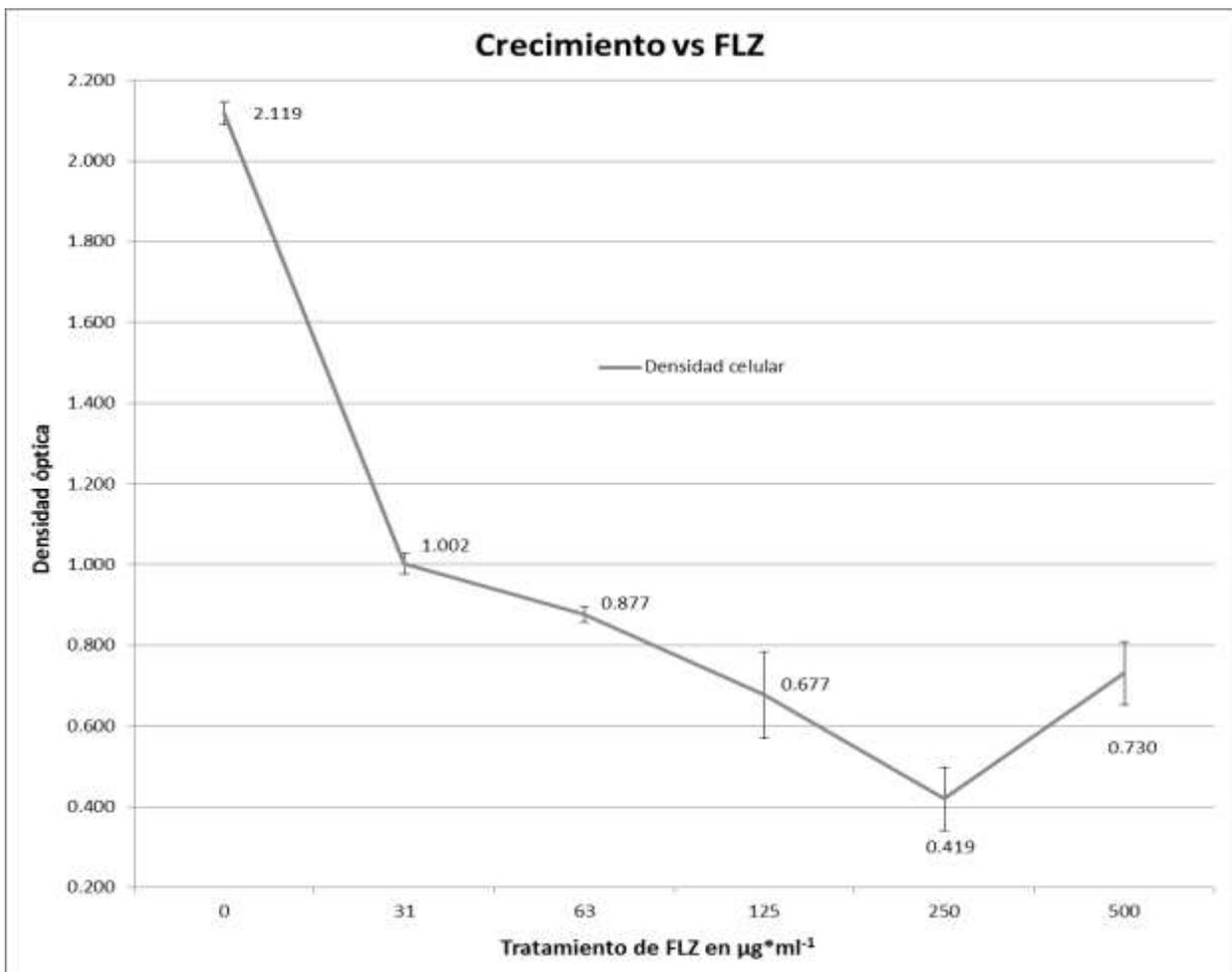


Fig. 23. Curva de crecimiento de *C. albicans* expuesta al FLZ. *C. albicans* (DO= 0.040) expuesta a diferentes concentraciones de FLZ, con la finalidad de determinar su efecto en el crecimiento.

Tabla 18. Crecimiento de *C. albicans* tratada con FLZ.

Concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Absorbancia ($\lambda=520\text{ nm}$)
Control sin tratamiento	2.199 ($\sigma = 0.028$)
31	1.002 ($\sigma = 0.025$)
63	0.877 ($\sigma = 0.019$)
125	0.677 ($\sigma = 0.107$)
300	0.419 ($\sigma = 0.079$)
500	0.730 ($\sigma = 0.078$)

Tabla 19. Determinación de la presencia del efecto paradoja en los tratamientos con AgNPs y AgNO_3 . El signo (-) representa la ausencia de crecimiento, mientras que el signo (+) el crecimiento, independientemente de su abundancia.

Tratamiento	Cantidad de plata en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ vs crecimiento.						
	3000	1800	900	150	90	42	18
AgNPs	-	-	-	-	-	-	+
AgNO ₃	-	-	-	-	-	+	+

VII.1.5) Evaluación de los efectos en el tratamiento combinado de AgNPs – FLZ

El estudio de los efectos que pudiesen tener dos o más sustancias en un tratamiento combinado es relevante en la clínica. Se ha reportado que los antibióticos pueden tener diferentes interacciones entre sí, generando efectos sinérgicos o antagónicos. Evaluar el efecto resultante de un tratamiento combinado, entre las AgNPs y el FLZ, es relevante en este tipo de estudios.

Los cultivos expuestos a los tratamientos combinados de AgNPs-FLZ se inocularon en placa de YPDA, después de una exposición durante 24 horas. No hubo crecimiento en los

tratamientos con la combinación de $42 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de AgNPs con el FLZ (42/300 y 42/31). En los cultivos con $18 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de AgNPs con FLZ (18/300 y 18/31) si se observó crecimiento.

En la tabla 20 se muestran los resultados del crecimiento, mientras que en la figura 24 se muestra una gráfica comparativa del crecimiento con respecto al control. En las figura 25 se muestran imágenes de los cultivos en placa, después de exponerse a los tratamientos combinados de AgNPs-FLZ.

Tabla 20. Respuesta del crecimiento vs los diferentes tratamientos combinados de AgNPs-FLZ. Los cultivos expuestos a la CMI no tuvieron crecimiento.

Tratamientos $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$		Crecimiento	Absorbancia
AgNPs	FLZ		
42 [€]	300	-	0.037 ($\sigma = 0.004$)
	31	-	0.039 ($\sigma = 0.003$)
18	300	+	0.475 ($\sigma = 0.025$)
	31	+	0.670 ($\sigma = 0.085$)
Control FLZ ($31 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)		+	1.002 ($\sigma = 0.025$)
Control sin tratamiento		+	1.958 ($\sigma = 0.064$)

[€]Las absorbancias de los cultivos tratados con $42 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de AgNPs + FLZ (31 y $300 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) no representan crecimiento. La absorbancia se debe a la presencia de AgNPs en el medio.

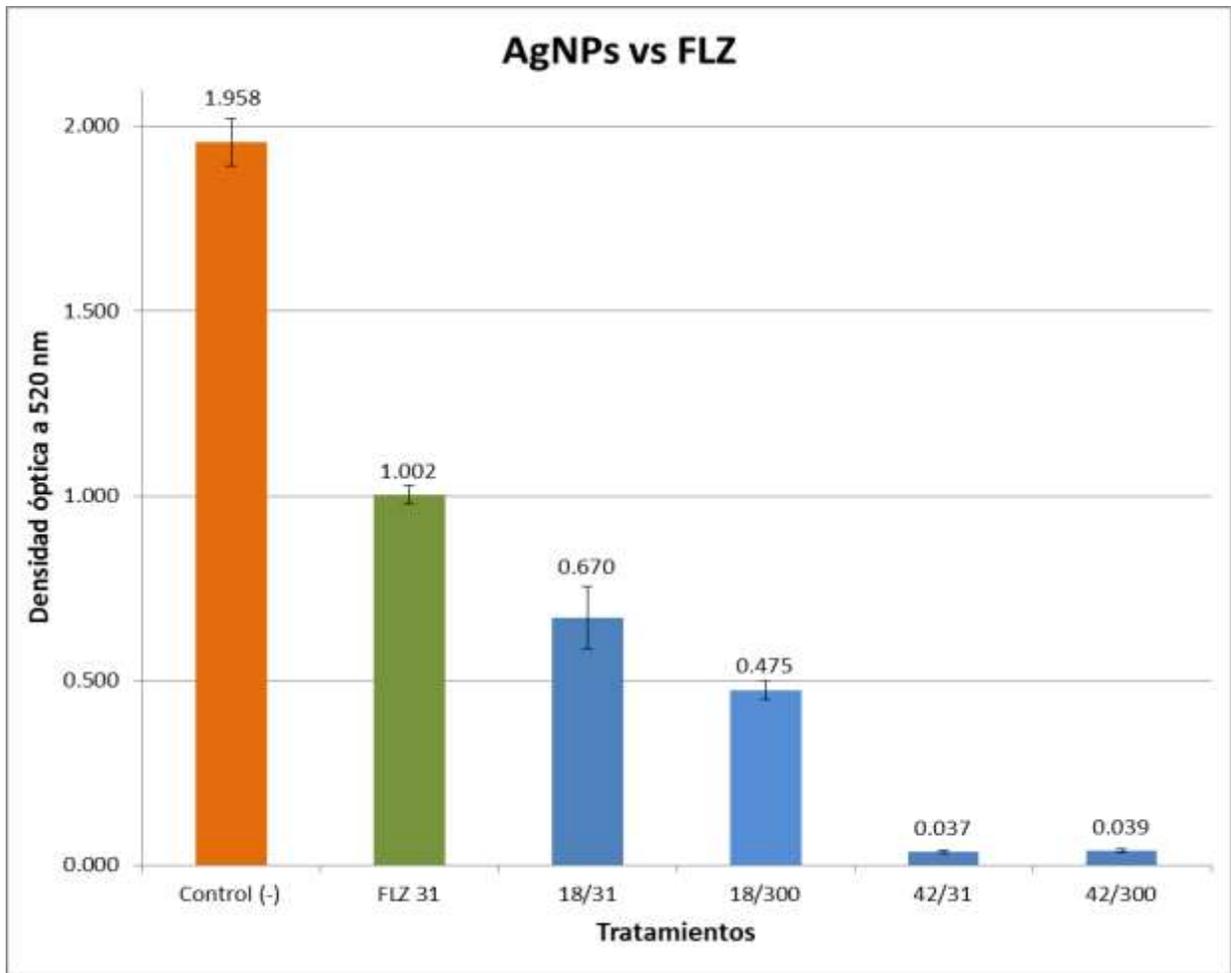


Fig. 24. Gráfica de crecimiento para contrastar la respuesta a los tratamientos combinados. AgNPs/FLZ. AgNPs/FLZ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$): 18/300 y 18/31. Se incluye el Control negativo (sin tratamiento) y un tratamiento con $31 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ FLZ. Las barras que representan a los cultivos tratados con $42 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de AgNPs + FLZ (31 y $300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) no representan crecimiento. La absorbancia se debe a la presencia de AgNPs en el medio.

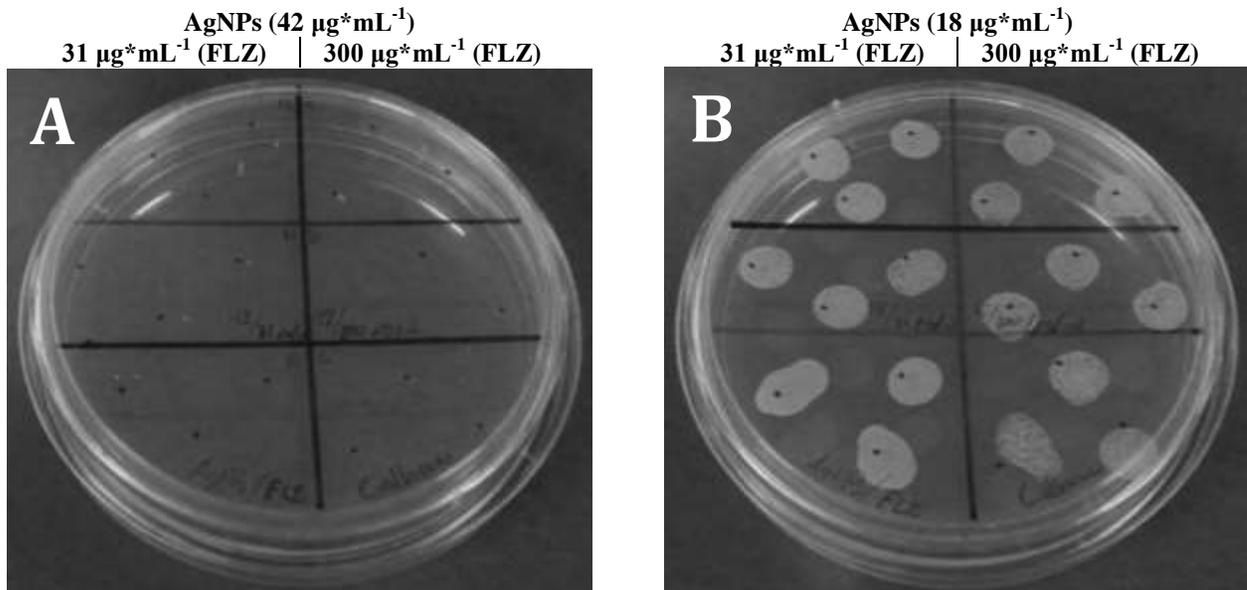


Fig. 25. Efecto de la interacción entre AgNPs y FLZ. Efecto combinado del FLZ y de las AgNPs. No se observó antagonismo en el tratamiento. Fotografías AgNPs/FLZ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$): (A) 42/31 (izquierda) y 42/300 (derecha); y (B) 18/31 (izquierda) y 18/300 (derecha).

VII.2 Comparación del efecto de la CMI en otras especies del género *Candida* y en aislados clínicos de las especies representativas

Debido a diferencias biológicas propias inherentes a cada ser vivo, algunas especies de microorganismos presentan resistencias, o susceptibilidades, intrínsecas contra distintas sustancias antimicrobianas. Con la finalidad de evaluar la respuesta de diferentes especies a los tratamientos con AgNPs, se probó la CMI obtenida de la ATCC SC5314 en cepas de referencia y en aislados clínicos de las especies más representativas del género *Candida*.

Se observó crecimiento en algunos aislados clínicos de *C. albicans*, tanto para la CMI ($150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) como para la CMIx2 ($300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de las AgNPs. En la tabla 21 se muestran los resultados de los aislados de *C. albicans*.

Tabla 21. Efecto del CMI en aislados clínicos de *C. albicans*. Resultados de la exposición a las AgNPs, expuestas a la CMI y a la CMIx2

Aislado clínico	Crecimiento vs tratamientos		Efecto
	150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	
*ATCC SC5314	-	-	Susceptible
A20	-	-	Susceptible
A30	+	-	Resistente a CMI
A36	+	+	Resistente a CMI x2
A43	-	-	Susceptible
A47	-	-	Susceptible
A66	+	-	Resistente a CMI
A75	+	-	Resistente a CMI
A81	-	-	Susceptible
A84	+	-	Resistente a CMI
A90	-	-	Susceptible
A140	+	-	Resistente a CMI
LHR17	+	+	Resistente a CMI x2
GRL25	+	+	Resistente a CMI x2
GRNL26	-	-	Susceptible
VPBO27	-	-	Susceptible
CHRE31	-	-	Susceptible
MDN33	-	-	Susceptible
GGK43	+	+	Resistente a CMI x2
CMA55	-	-	Susceptible
RSM62	+	+	Resistente a CMI x2
LZNA83	+	+	Resistente a CMI x2

No se observó crecimiento en ninguno de los aislados clínicos de las especies de *Candida* no-*albicans* tratados con las AgNPs. Las concentraciones utilizadas fueron la CMI ($150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y la CMIx2 ($300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de las AgNPs. En la tabla 22 se muestran los resultados de los efectos en el crecimiento. En la figura 26 se muestran imágenes de los cultivos de los aislados

clínicos de las cuatro especies. En la figura 27 se presenta una gráfica que muestra la cantidad de aislados clínicos y cepas de referencia y su respuesta al tratamiento.

Tabla 22. Efecto del CMI en aislados clínicos de *Candida no-albicans*. Resultados de la exposición a la CMI y a la CMIx2 de AgNPs en las cepas de *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*.

Especie	Aislado clínico	Crecimiento vs tratamiento		Efecto
		CMI	CMIx2	
<i>C. glabrata</i>	*ATCC 2001	-	-	Susceptible
	A2	-	-	Susceptible
	A32	-	-	Susceptible
	A52	-	-	Susceptible
	A54	-	-	Susceptible
	A83	-	-	Susceptible
	A125	-	-	Susceptible
	A134	-	-	Susceptible
	A136	-	-	Susceptible
	P7	-	-	Susceptible
	SCV72	-	-	Susceptible
	PBF35	-	-	Susceptible
	TRY32	-	-	Susceptible
	HGMJ79	-	-	Susceptible
POG90	-	-	Susceptible	
<i>C. parapsilosis</i>	*ATCC 46143	-	-	Susceptible
	LAS4	-	-	Susceptible
	HTD19	-	-	Susceptible
	UTG47	-	-	Susceptible
	PDN56	-	-	Susceptible
<i>C. tropicalis</i>	*MYA5664	-	-	Susceptible

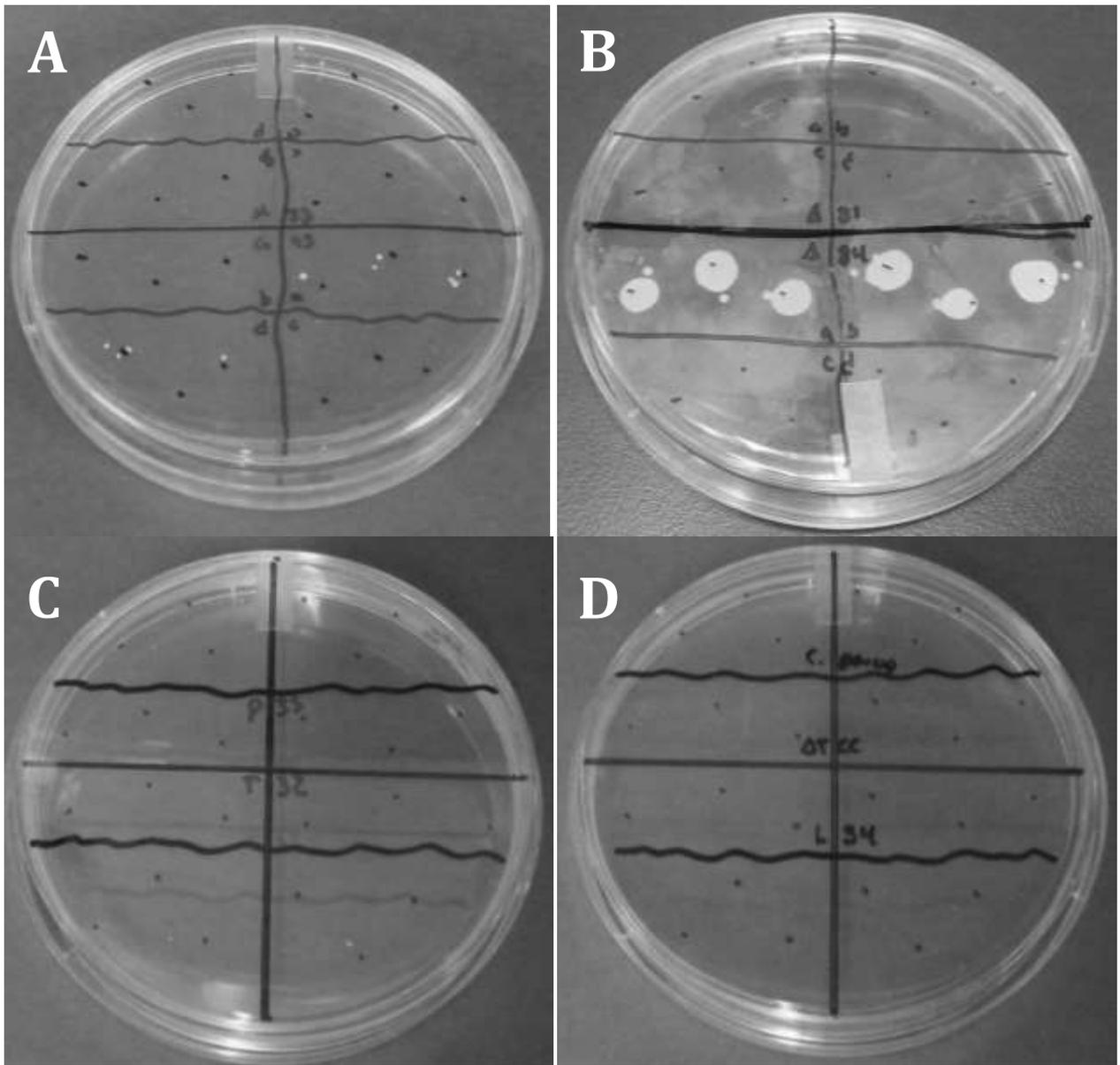


Fig. 26. Imágenes representativas para evaluar el efecto de la CMI de las AgNPs en los aislados clínicos del género *Candida*. Se evaluó la respuesta de las diferentes cepas a los tratamientos sometidos a la CMI y a la CMIx2, inoculada en placa YPDA. (A) y (B) aislados clínicos de *C. albicans*. Se observa desde la inhibición total hasta el crecimiento denso. En los cultivos de las especies de *Candida* no-*albicans*, (C), *C. glabrata* y (D) *C. parapsilosis*, no se observó crecimiento.

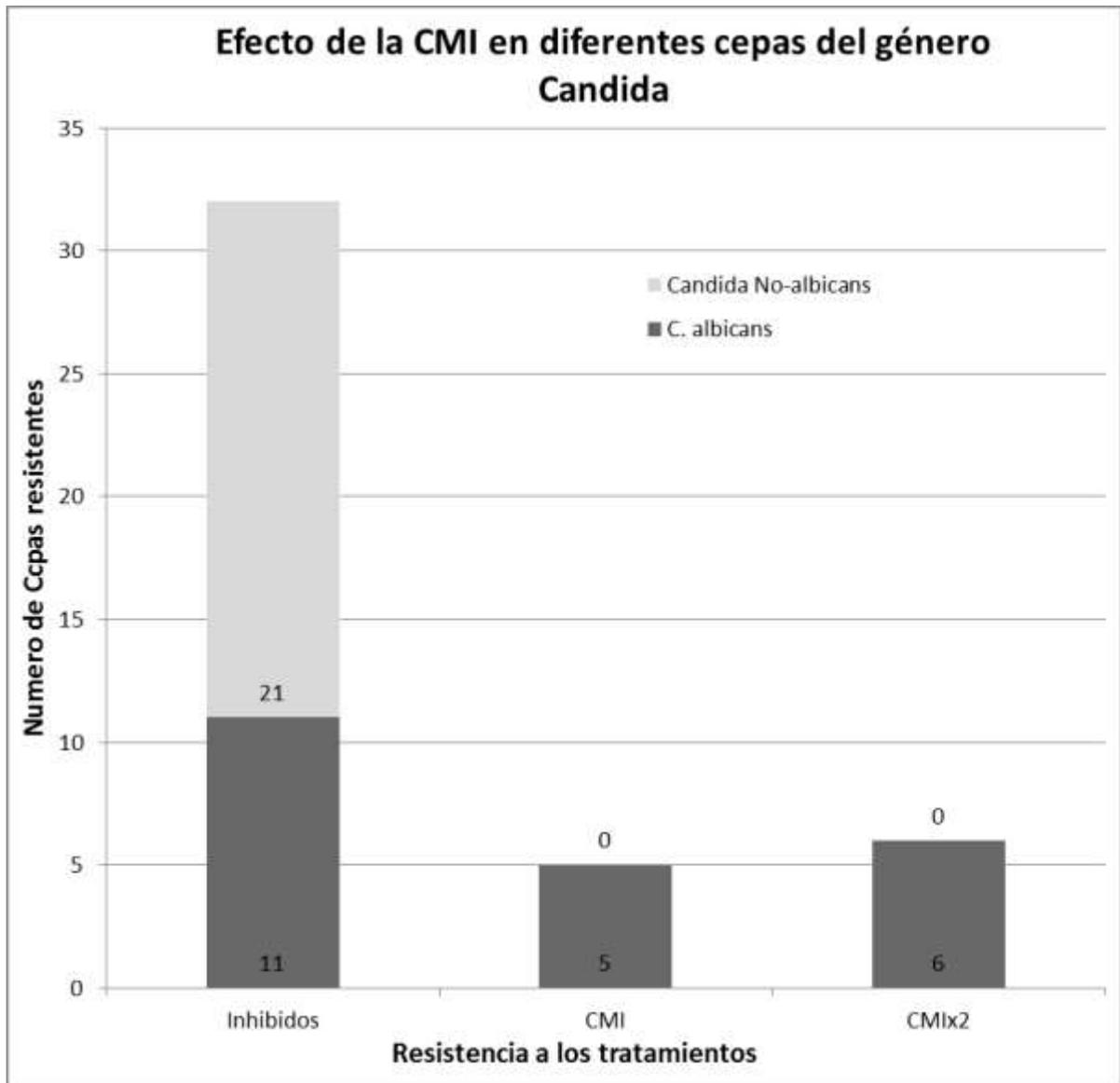


Fig. 27. Gráfica de la respuesta general, a la CMI de las AgNPs, de las cepas de referencia y de los aislados clínicos del género *Candida*. El número en las barras indican la cantidad de cepas, mientras que el “0” indica que no hubo cepas resistentes. En total se analizaron 43 cepas, incluyendo las 4 cepas de referencia y 39 aislados clínicos.

VII.3 Análisis Microscópico

Con la finalidad de analizar con gran detalle la interacción y efecto de las AgNPs en las células de *C. albicans* ATCC SC5314, se realizaron análisis microscópicos. Las observaciones se realizaron por medio de diferentes técnicas de microscopía óptica y electrónica. Los análisis en

las diferentes escalas proporcionaron una visión más amplia de los efectos provocados por las AgNPs.

VII.3.1) Microscopía óptica:

En las observaciones realizadas en por medio de Microscopía Óptica de Campo Claro se analizaron a las células con tratamiento de AgNPs (fig. 28a y 28b). También se observaron estructuras irregulares (fig. 28c) y a las células sin tratamiento (28d).

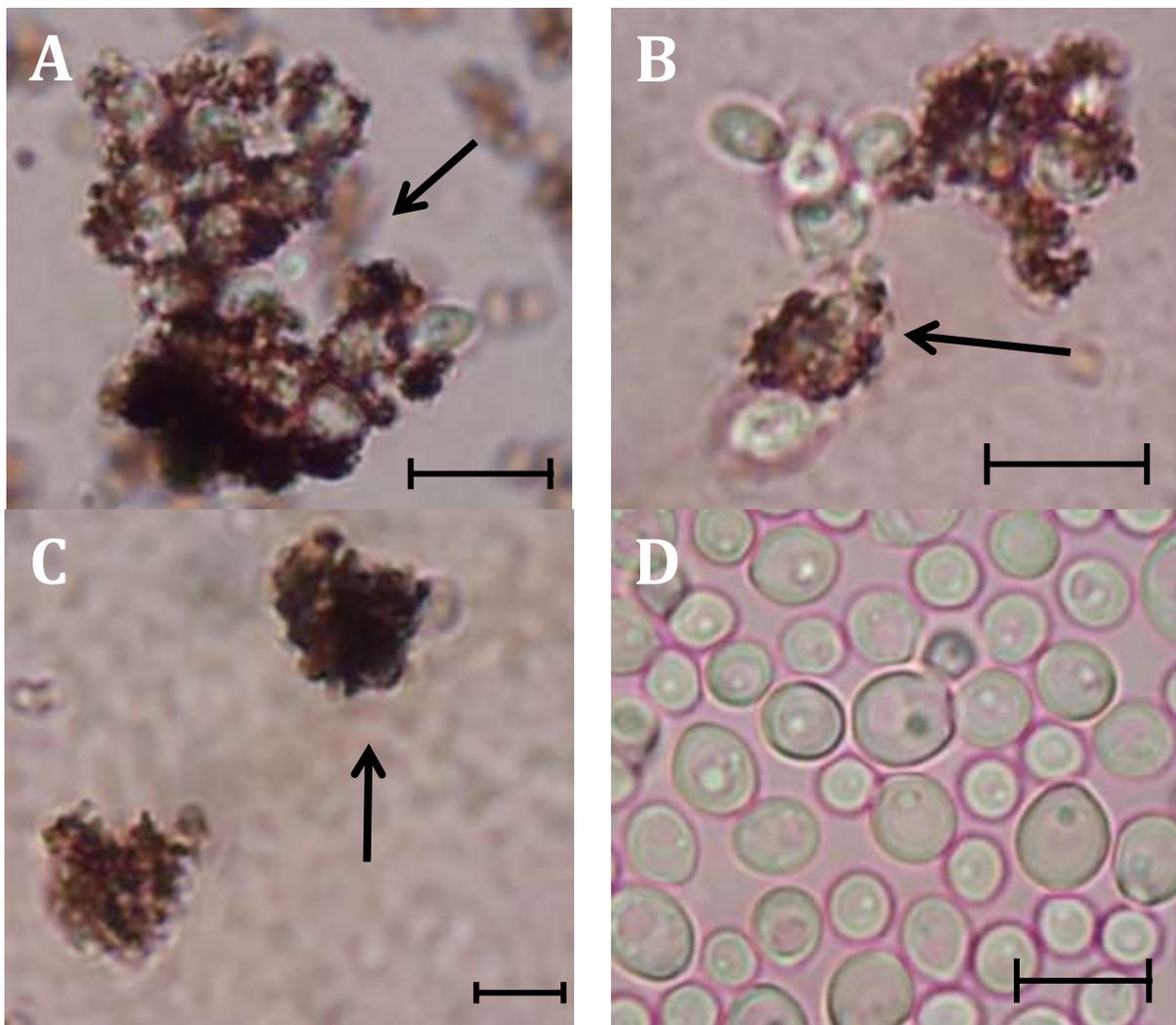


Fig. 28. Interacción entre células de *C. albicans* y AgNPs. Se observa una acumulación de AgNPs alrededor de las células (A y B). Además, se observaron otras acumulaciones de AgNPs (C). En (D) se presenta el control (células sin tratamiento). La barra de escala representa 5 μm .

Por medio de microscopía confocal se observaron y compararon los cultivos con y sin tratamiento. Las células sin tratamiento, teñidas con DAPI, presentan núcleos definidos, (figura 29). Por otro lado, las células tratadas con la CI_{50} de las AgNPs, teñidas con DAPI, no presentan un núcleo bien definido (figura 30). Las muestras se excitaron con luz UV.

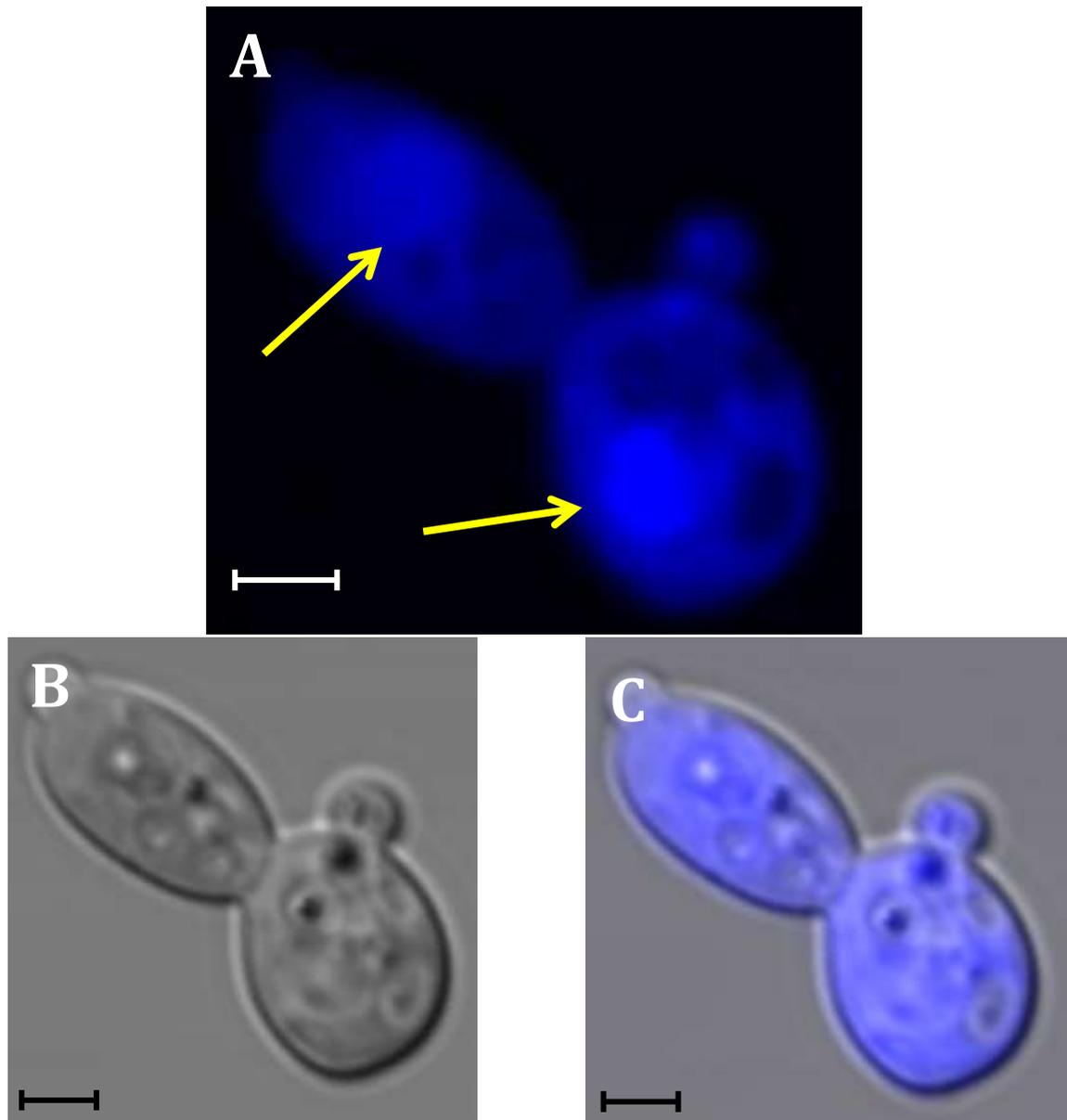


Fig. 29. Microscopía de fluorescencia, de *C. albicans* sin tratamiento, teñidas con DAPI. (A) Campo claro (B) Fluorescencia y (C) Combinación de imágenes. Se observan los núcleos bien definidos en las células observadas. La barra de escala representa 1 μ m.

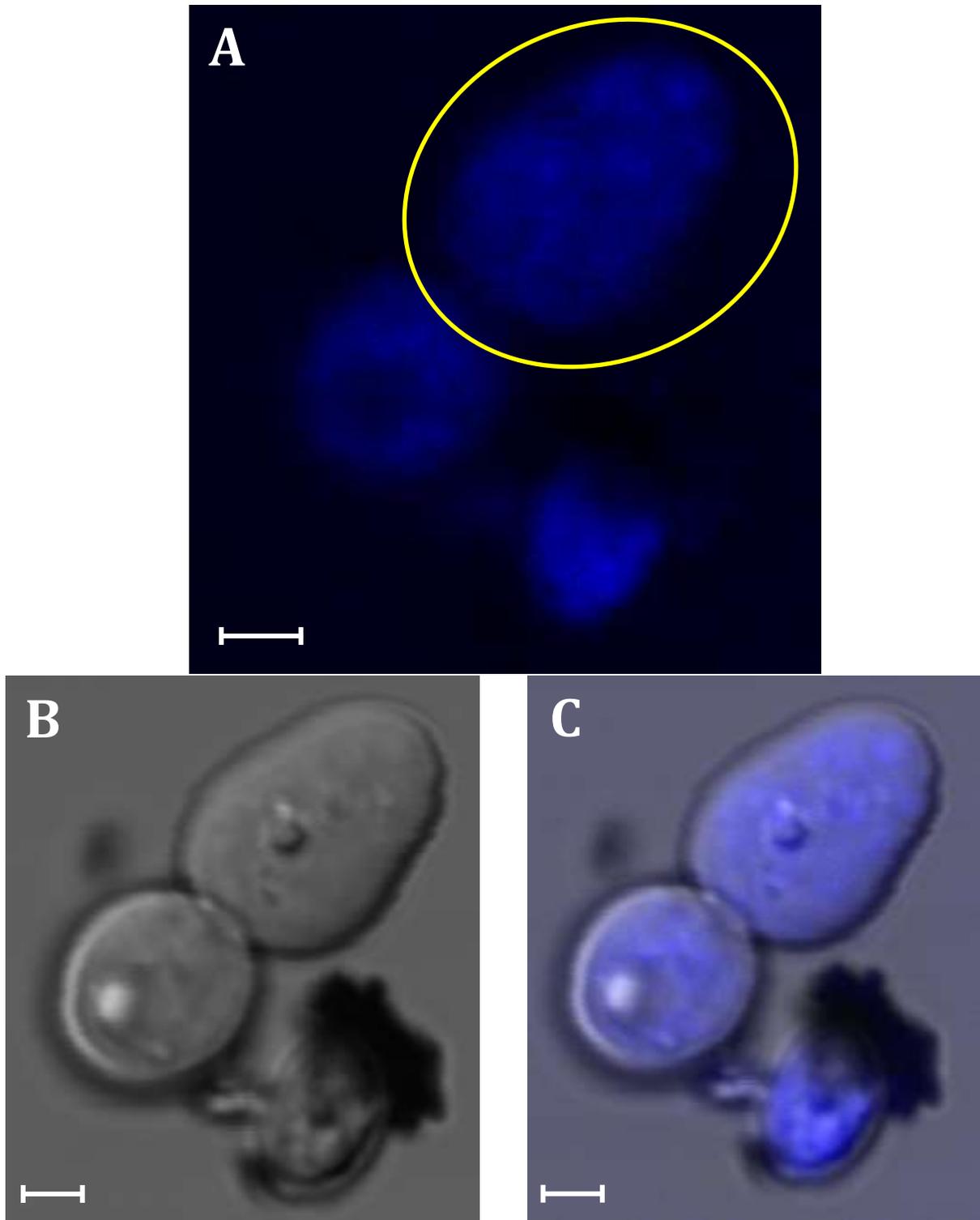


Fig. 30. Microscopía de fluorescencia, de *C. albicans* con tratamiento, teñidas con DAPI. (A) Campo claro (B) Fluorescencia (DAPI) y (C) Combinación de imágenes. Los núcleos no se observan definidos, se observa una fragmentación y dispersión del material genético. La barra de escala representa 1 μm .

Para observar la fluorescencia de las AgNPs y localizarlas mejor, las muestras tratadas con AgNPs también se excitaron con luz azul, tal y como se observa en la figura 31. Se observa la

emisión independiente de las AgNPS (31 C) con respecto al DAPI (31 B). Por otro lado, en los cultivos expuestas a bajas concentraciones de AgNPs (menores a la CI_{50}) se observaron hifas y pseudohifas en los cultivos (Figura 32).

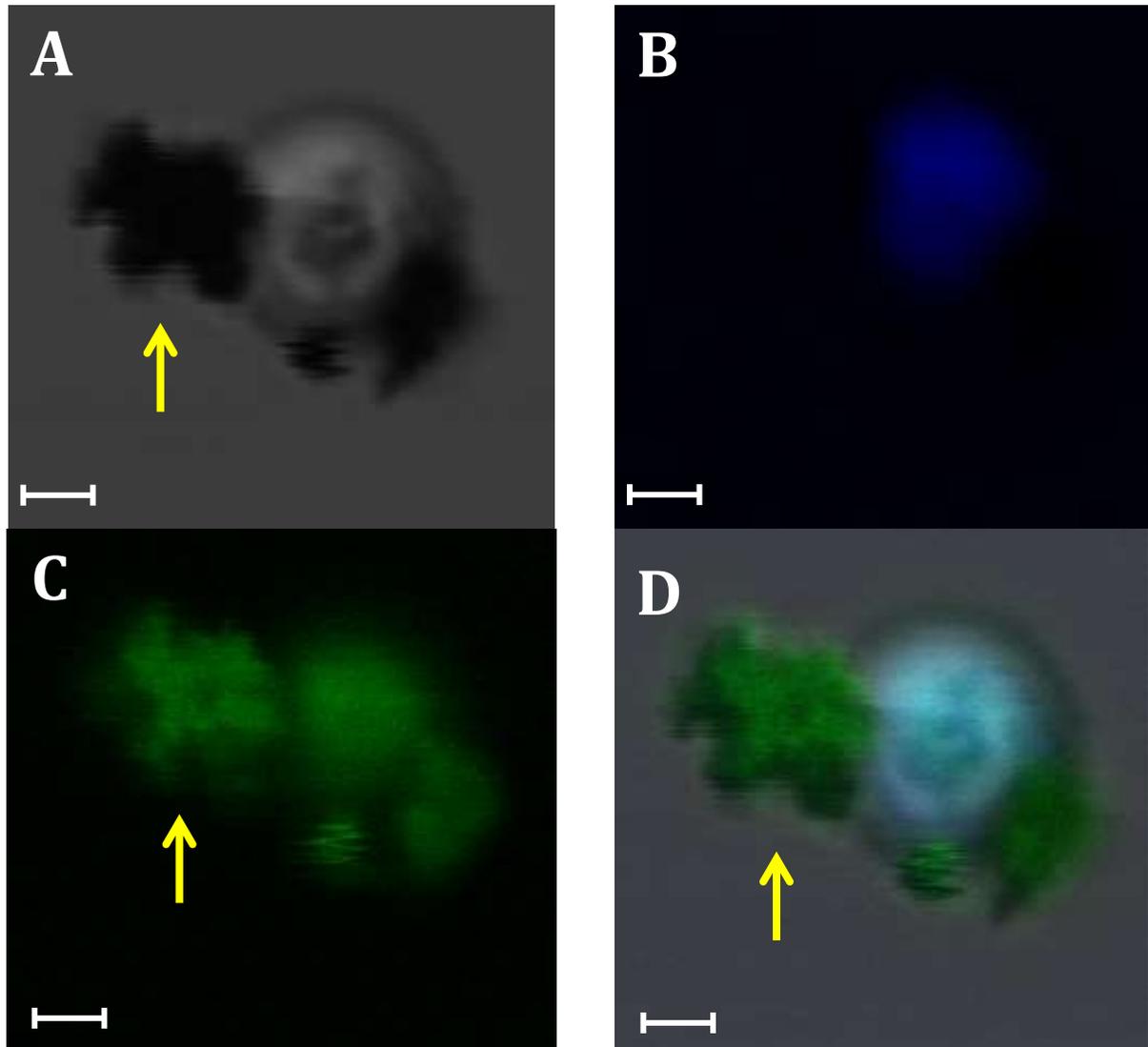


Fig. 31. Microscopía de fluorescencia, de *C. albicans* expuestas a la CI_{50} de las AgNPs. Las células se tiñeron con DAPI y se excitaron con luz UV y azul. (A) Campo claro (B) Excitación en UV, (C) excitación en luz verde y (D) Combinación de imágenes. La barra de escala representa 1 μ m.

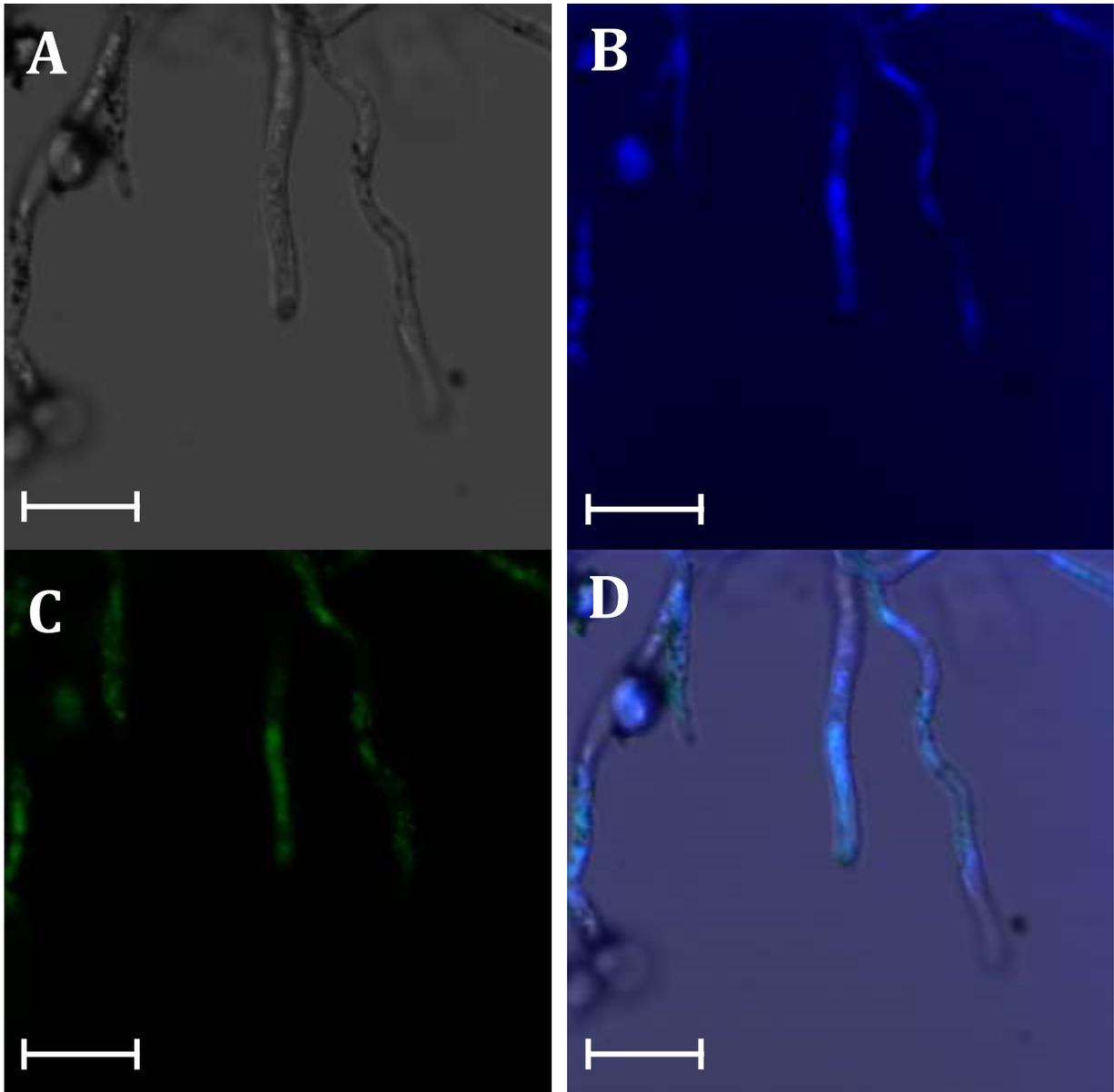
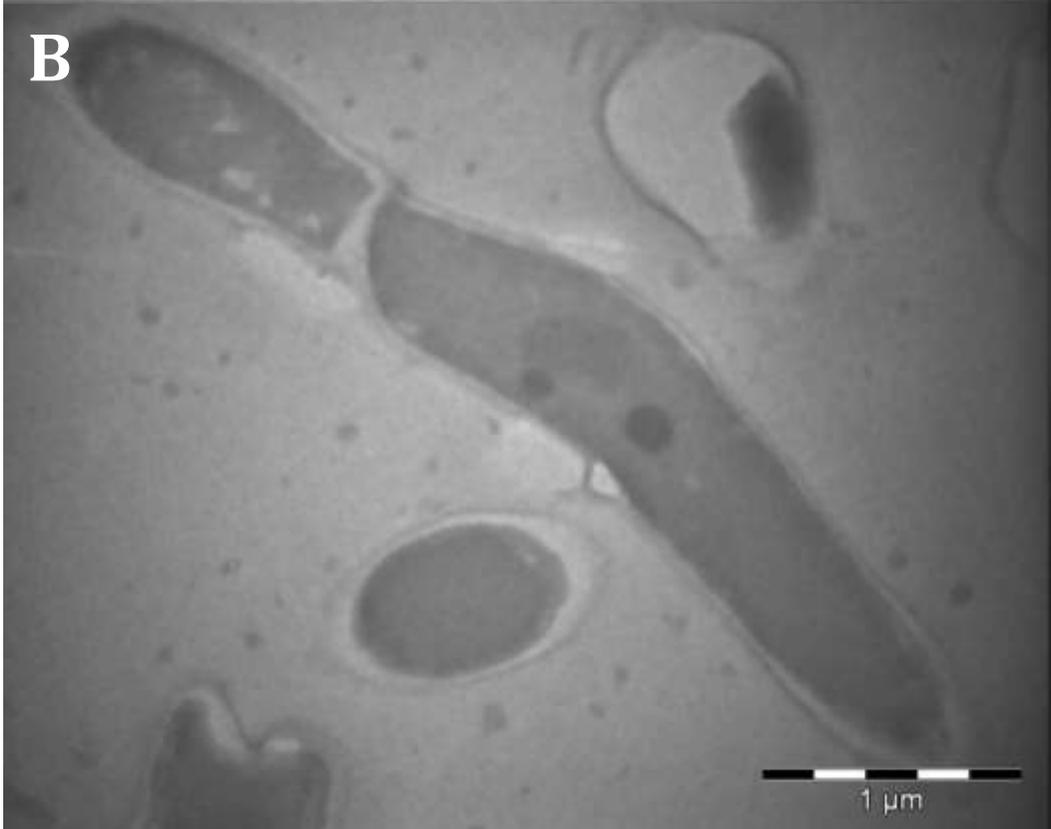
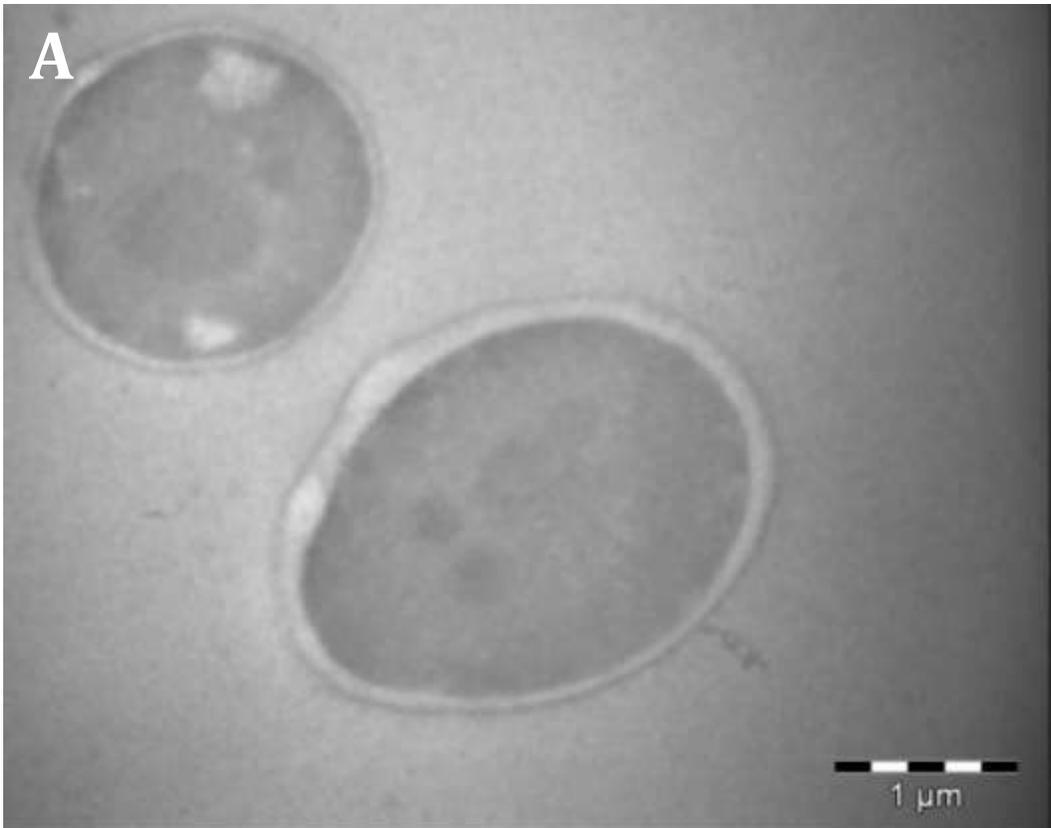
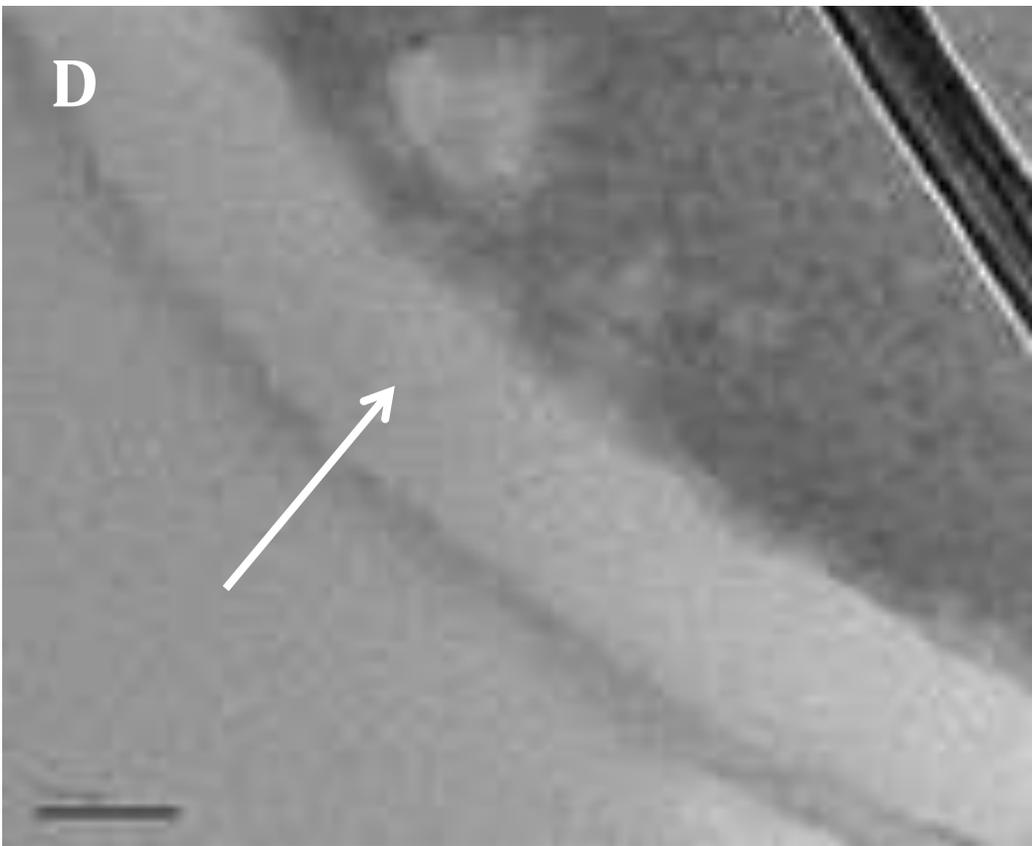
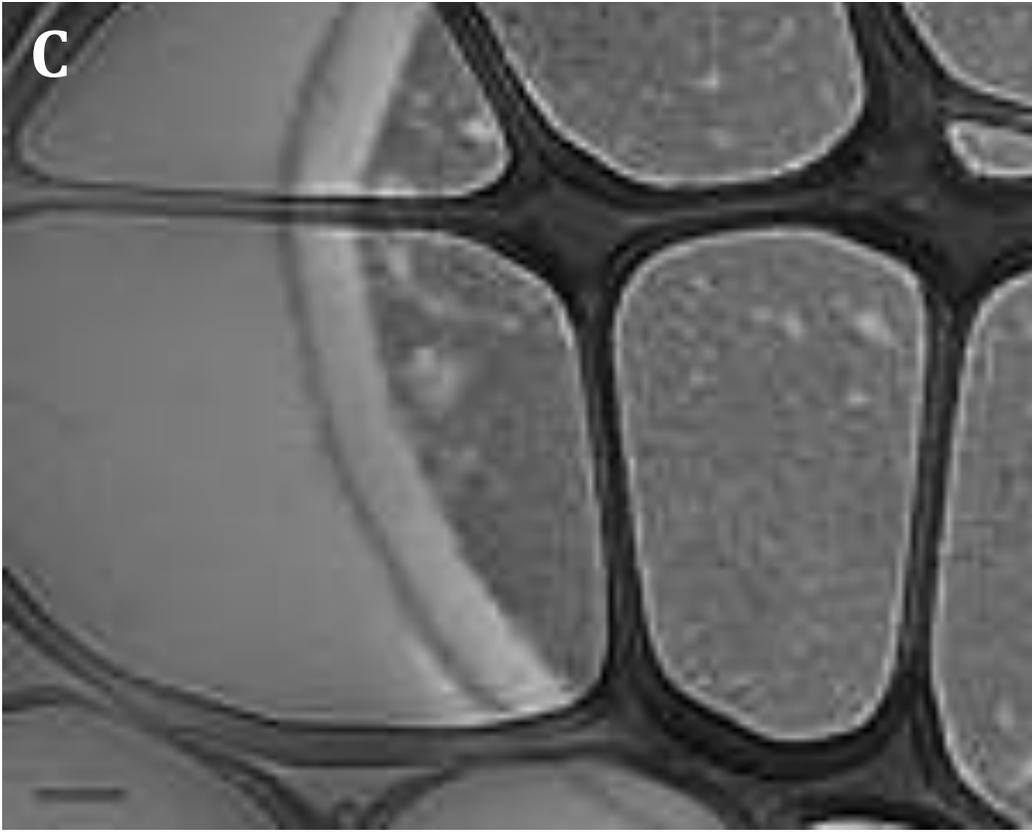


Fig. 32. Presencia de hifas en cultivos de *C. albicans* expuesta a la CI_{50} de las AgNPs. Las células se tiñeron con DAPI y se excitaron con luz UV y azul. (A) Campo claro (B) Excitación en UV, (C) excitación en luz verde y (D) Combinación de imágenes. . La barra de escala representa 5 μm .

VII.3.2) Microscopía Electrónica:

Las observaciones se realizaron mediante Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HR-TEM). Se contrastaron células sin tratamiento (fig. 33) y tratadas con AgNPs (fig. 34).





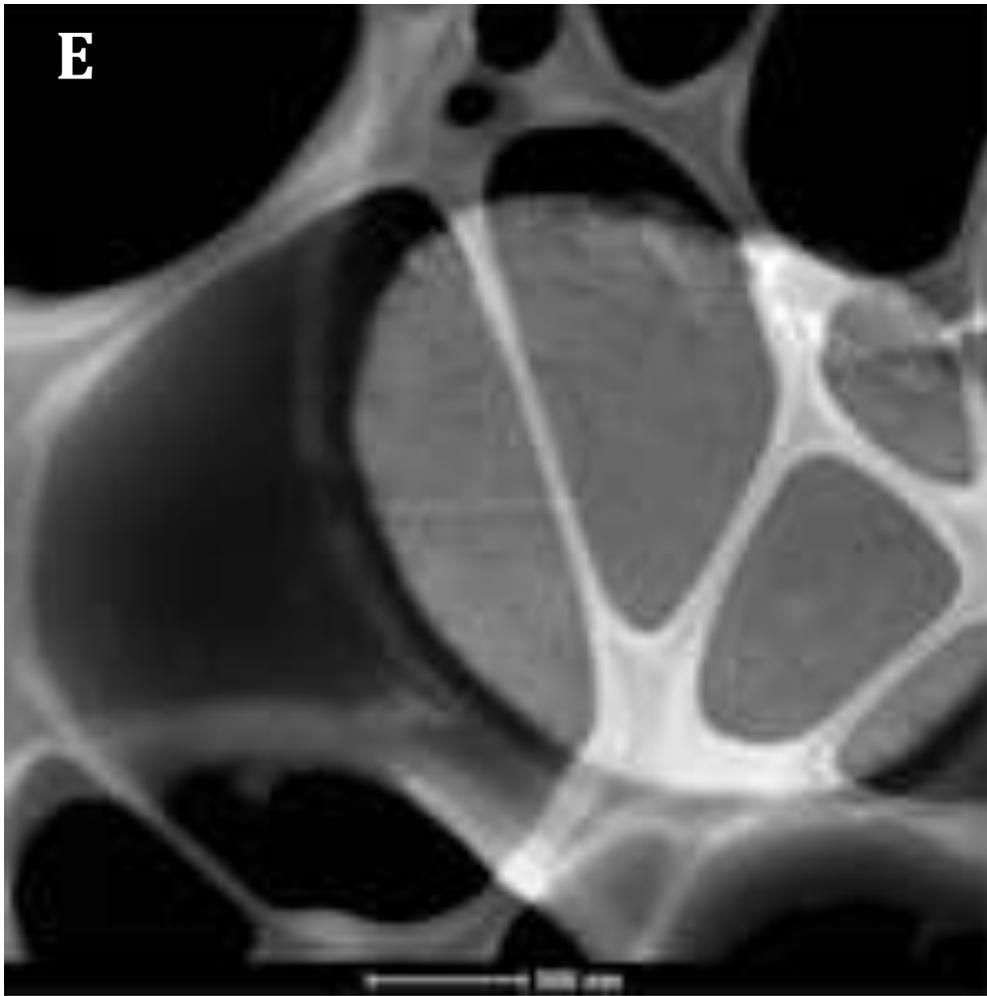
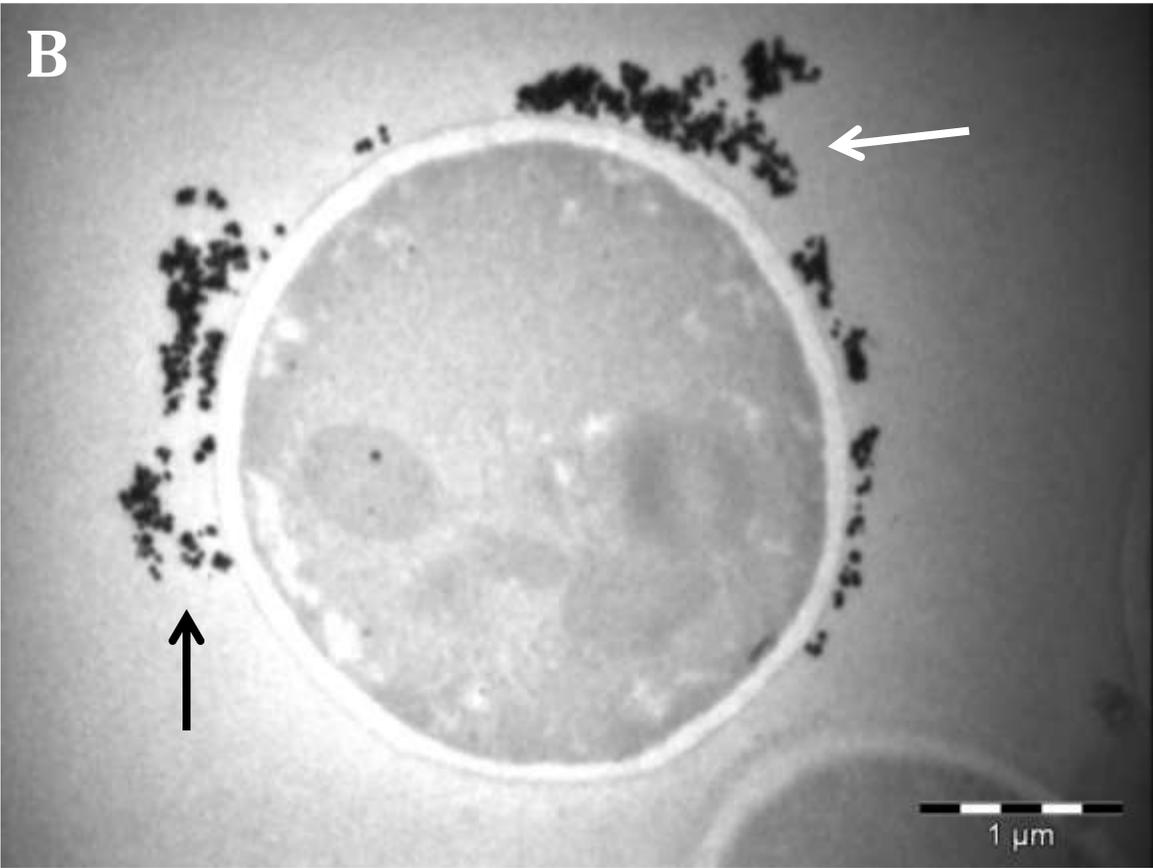
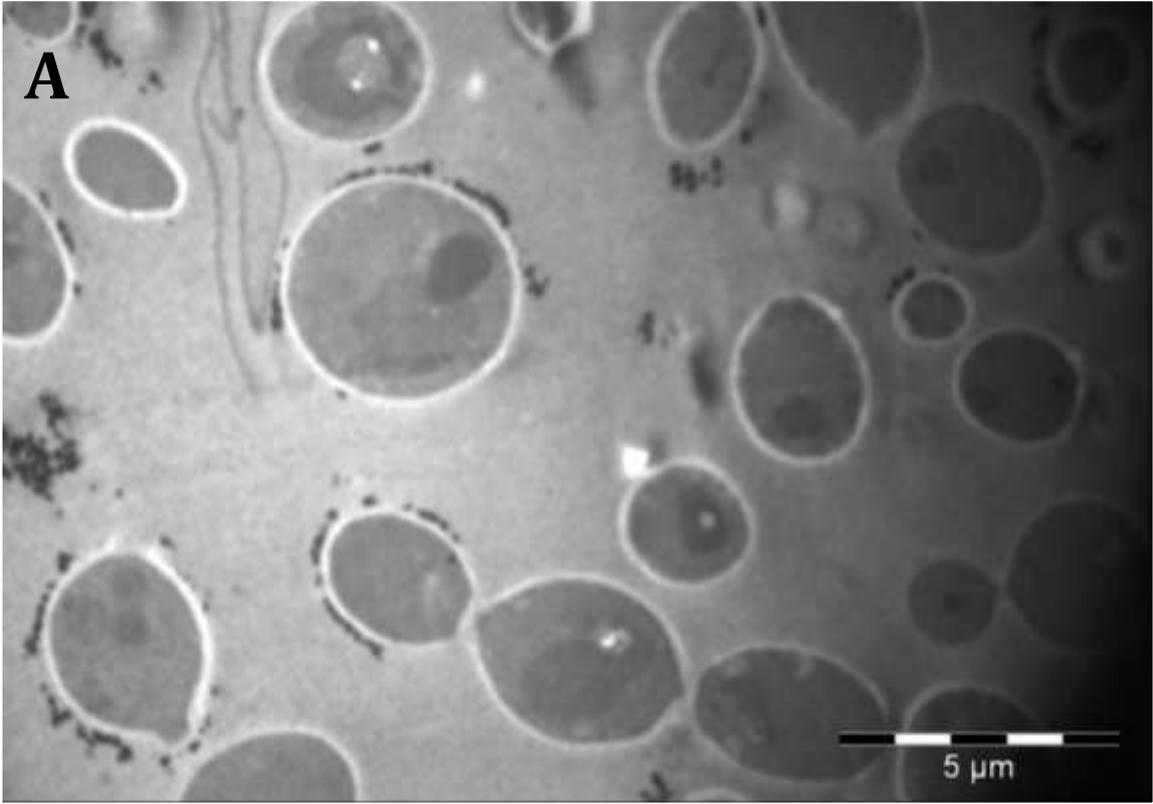


Fig. 33. Análisis ultraestructural *C. albicans*. (A), (B) y (E) Imágenes de las células completas de *C. albicans* sin tratamiento. En (B) se observa la forma de pseudohifa. En (C) se observa una región a mayor aumento, mientras que en (D) se aprecia la pared celular (flecha). De (A) a (D) las imágenes corresponde a TEM de campo claro, mientras que (E) se obtuvo mediante TMD de campo oscuro.

Las micrografías electrónicas mostraron la presencia de partículas oscuras, AgNPs, en diferentes regiones de la célula, desde el exterior (fig. 34), hasta en la pared celular (fig. 35) y en el interior (fig. 36).



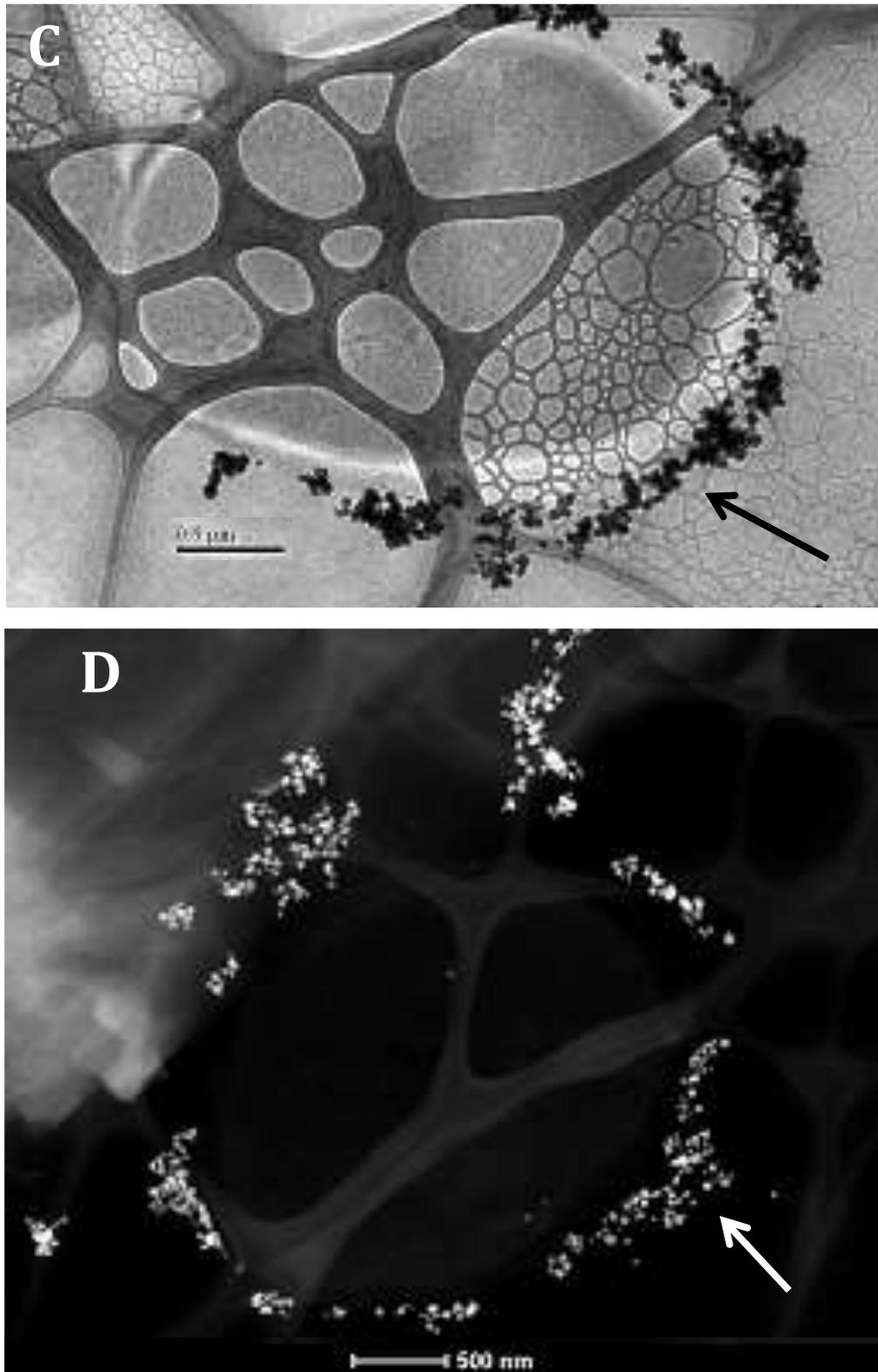
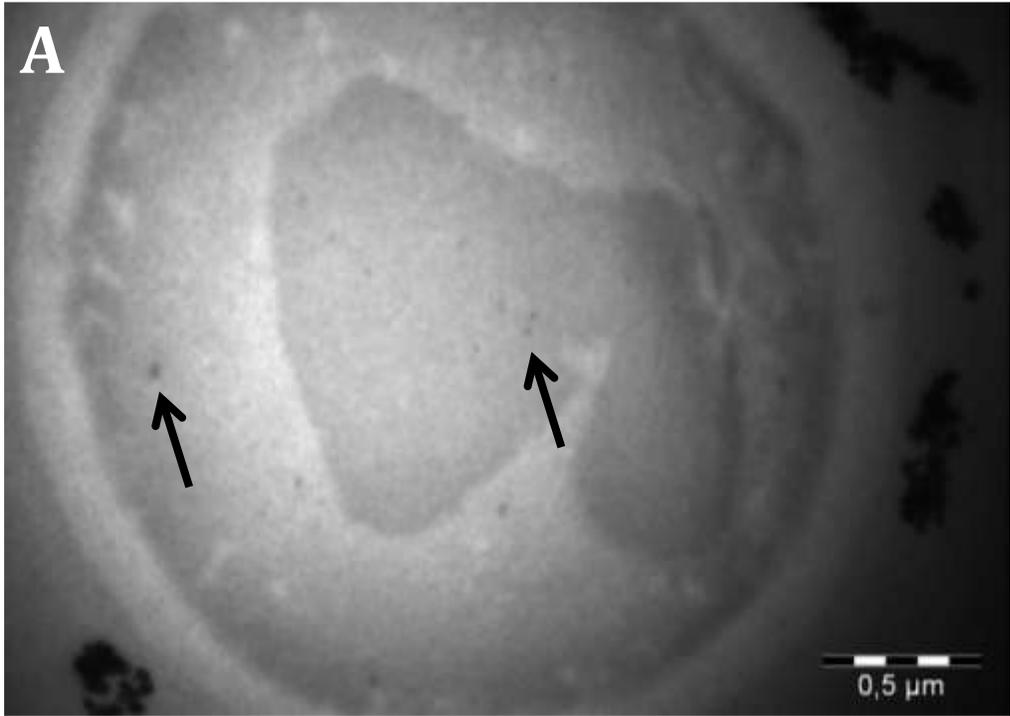


Fig. 34. Acumulación de las AgNPs en el exterior de las células. Se observa que las AgNPs tienden a agregarse y acumularse en la parte exterior de la célula. (A) a (C), TEM de campo claro y (D) TEM de campo oscuro.



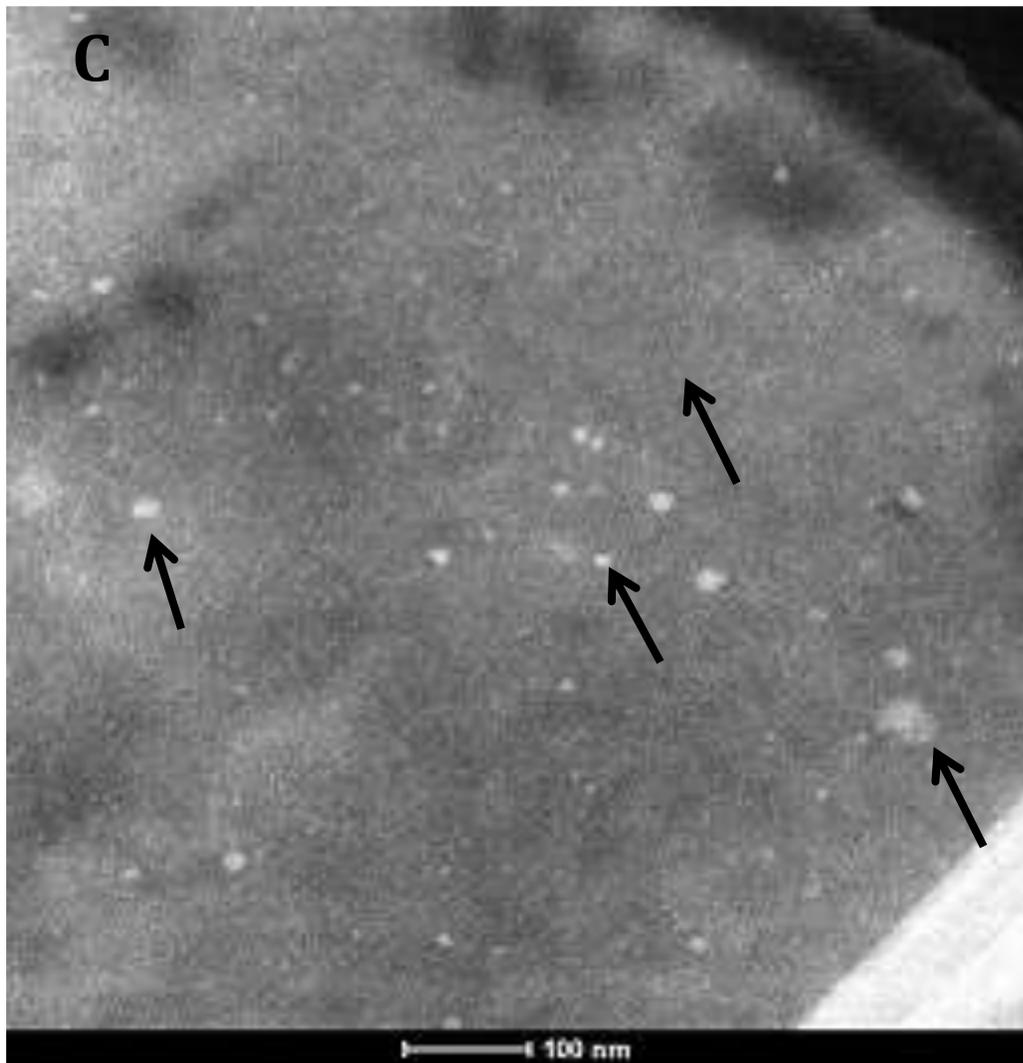


Fig. 35. Distribución de las AgNPs en el interior de las células. Se observa su distribución una distribución no específica, prácticamente en toda la célula. En (A) se observan en el citosol y en el núcleo (estructura oscura, deformada). En (B) y (C) se observan diferentes formas y tamaños de las AgNPs. (A) TEM de campo claro, (B) y (C), TEM de campo oscuro.

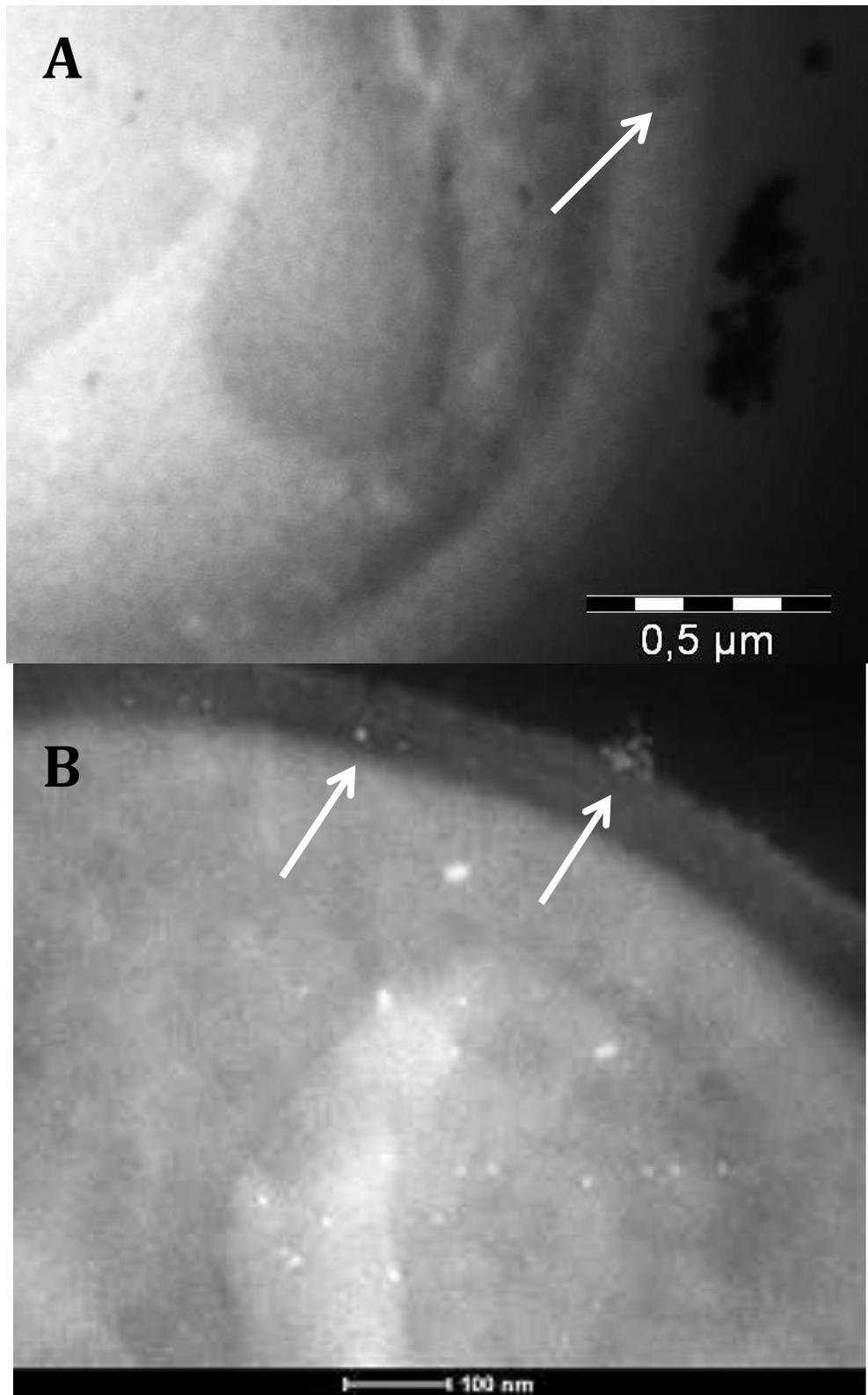


Fig. 36. Presencia de las AgNPs en la pared celular. Se observa que las AgNPs pueden quedarse en la pared celular y acumularse. (A) TEM de campo claro y (B) TEM de campo oscuro.

Para determinar si realmente eran AgNPs las partículas encontradas en el interior de las células. Se realizaron análisis de EDS lineal y puntual. Se determinó la presencia de plata en las estructuras identificadas como AgNPs. Los perfiles químicos realizaron en las células sin tratamiento (fig. 37) y con tratamiento (fig. 38).

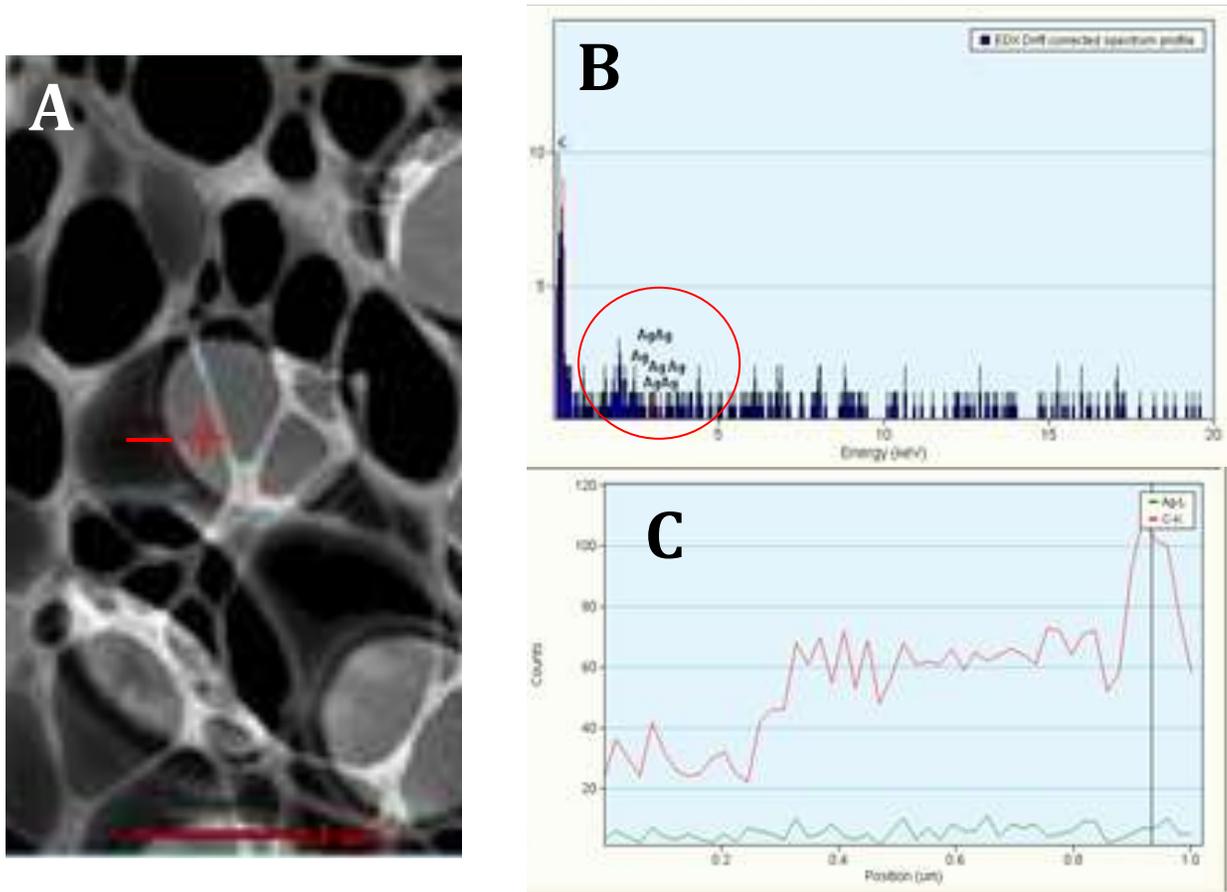


Fig. 37. Análisis de EDS/EDX de las células de *C. albicans*, sin tratamiento. Se realizó un análisis de composición química (EDS/EDX) para demostrar la presencia de plata en el interior de las células. (A) regiones analizadas de la célula. La línea representa el transecto del análisis lineal, mientras que el (+) la región puntual. (B) Análisis de composición química, en donde se observa la ausencia de plata. Se observan los símbolos (Ag) para mostrar que no se encontró en la muestra (no hay picos de plata en la gráfica). (C) análisis para mostrar que no hay plata en la muestra (línea verde, en la base de la gráfica).

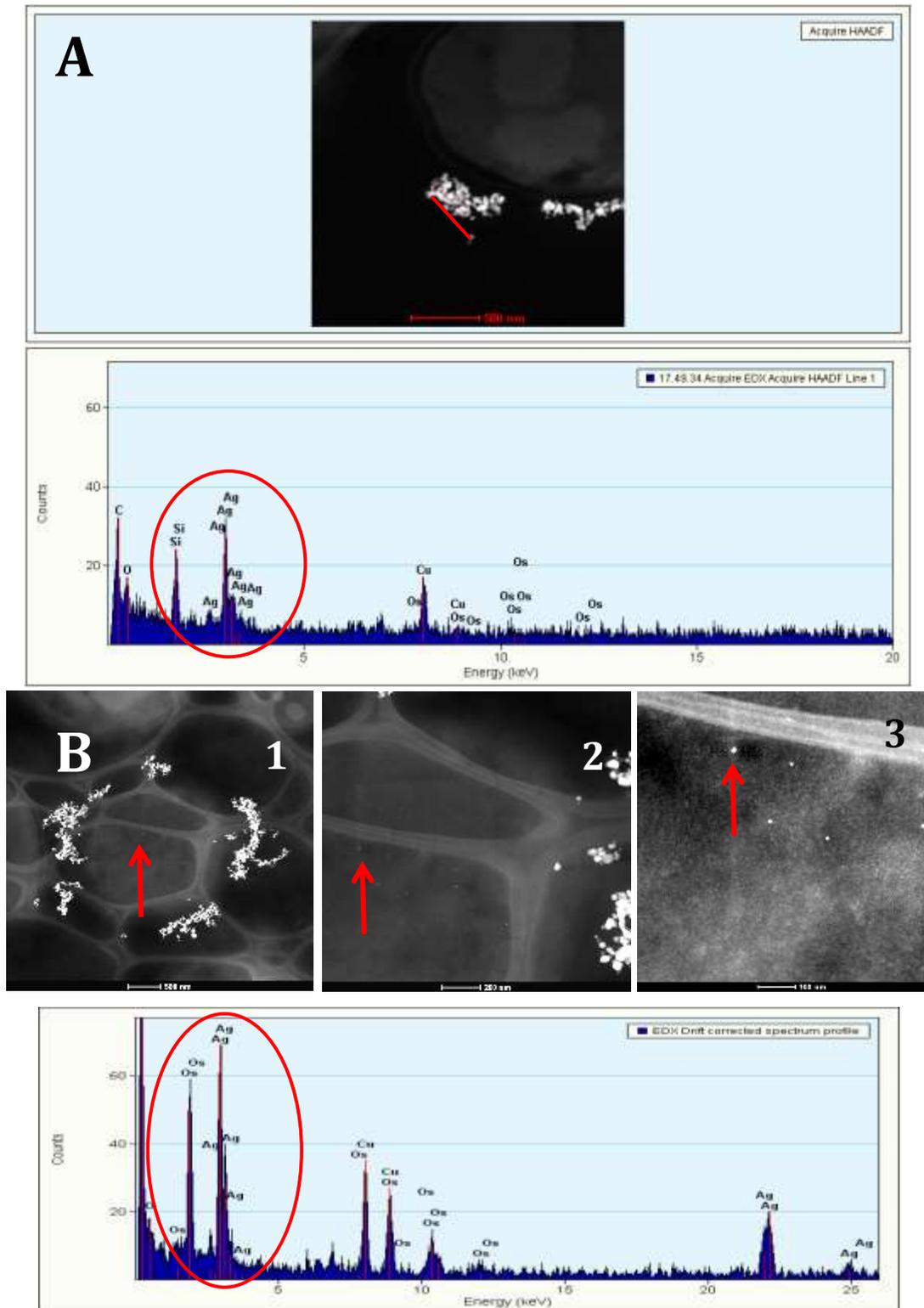


Fig. 38. Análisis de EDS/EDX en las células de *C. albicans*, con AgNPs. Se realizaron análisis de composición química, (A) lineal y (B) puntual, para determinar la presencia de plata en el interior de las células. Si se encontró plata, los picos se señalan en los círculos rojos. En B (1, 2 y 3, se muestra, en diferentes aumentos, la región de la célula en donde se realizó el análisis. Las barras de escala corresponden a 500 nm (1), 250 nm (2) y 150 nm (3)

Por otro lado, se realizó un análisis de cristalografía en las células con tratamiento, con la finalidad de determinar la estructura de las AgNPs (figuras 35).

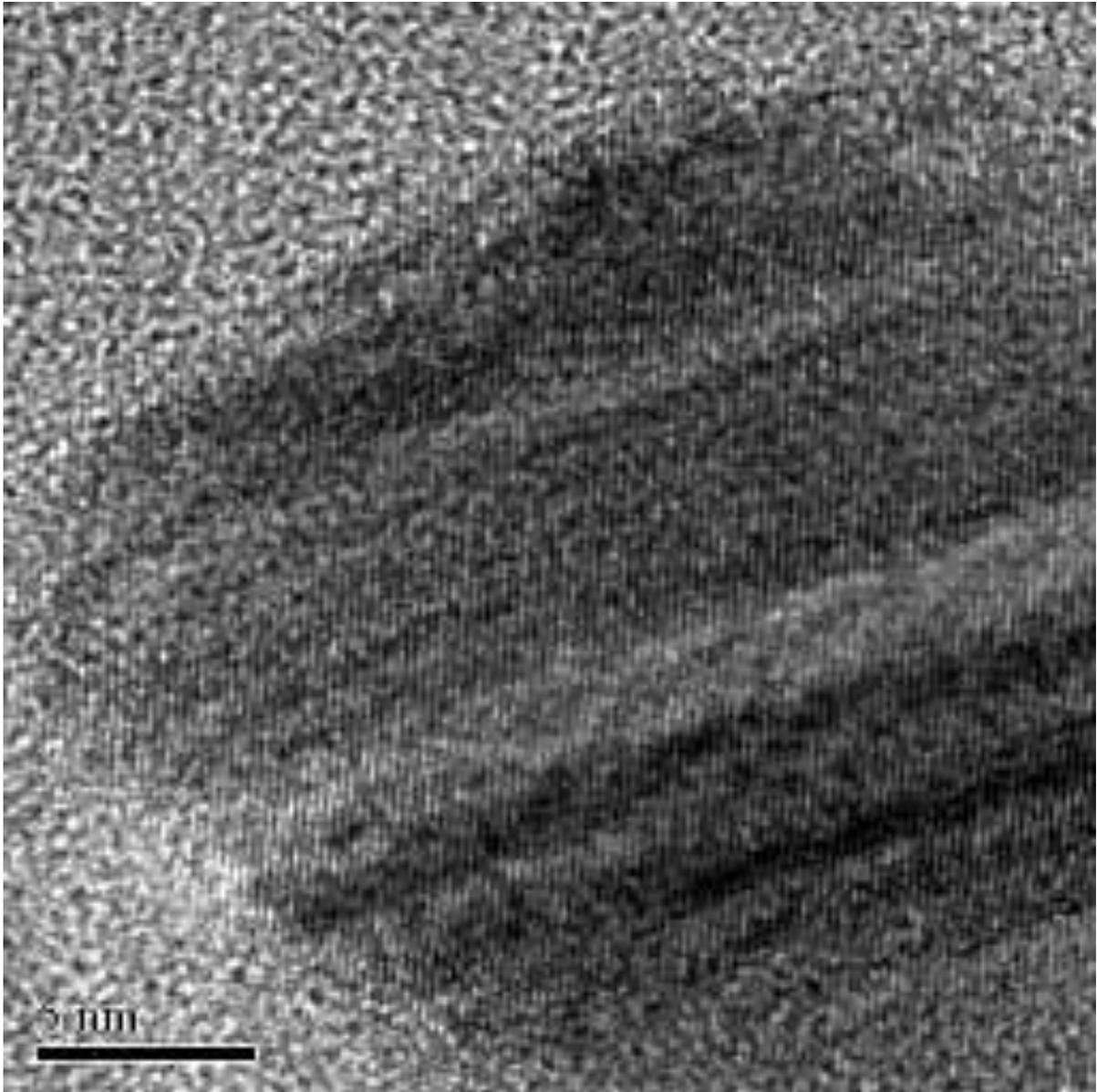


Fig. 39. Análisis cristalográfico de las AgNPs. Se realizó un análisis cristalográfico para demostrar la estructura cristalina de las partículas encontradas en el interior de la célula.

VII.4 Análisis de resistencia

La aparición de cepas resistentes a los antibióticos es un problema grave en la clínica. Se ha sugerido que los microorganismos no podrían generar resistencia contra las AgNPs (Panáčěk *et al.*, 2009; Prucek *et al.*, 2011, Noorbakhsh, 2011), pero no se han reportado estudios experimentales que aborden éste hecho.

Para evaluar la posibilidad de que *C. albicans* pudiese generar resistencia contra las AgNPs, se diseñó un protocolo basado en un estudio de Hebeke & Solotorovsky (1962), utilizando al FLZ como antifúngico de referencia.

Los cultivos de *C. albicans* ATCC SC5314 fueron expuestas a tratamientos continuos de la CI_{50} de las AgNPs y del FLZ en sub-cultivos sucesivos. Después de los ciclos de tratamientos, las células se dejaron crecer en medio YPDA sin tratamiento. De cada réplica se preparó un cultivo con una D.O.=0.040 y las alícuotas de los cultivos se expusieron a las CI_{50} del FLZ y a la CMI de las AgNPs (31 y 42 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivamente). Como control adicional, unas réplicas de las muestras del control negativo, se expusieron también a los mismos tratamientos. Los cultivos se dejaron incubar a 37 °C, a 250 rpm.

Los cultivos expuestos a AgNPs no mostraron crecimiento en medio YPD. Estos cultivos se inocularon en YPDA para determinar si había crecimiento (fig. 40) y se dejaron incubar a 37°C por 24 horas. Los cultivos no mostraron crecimiento.

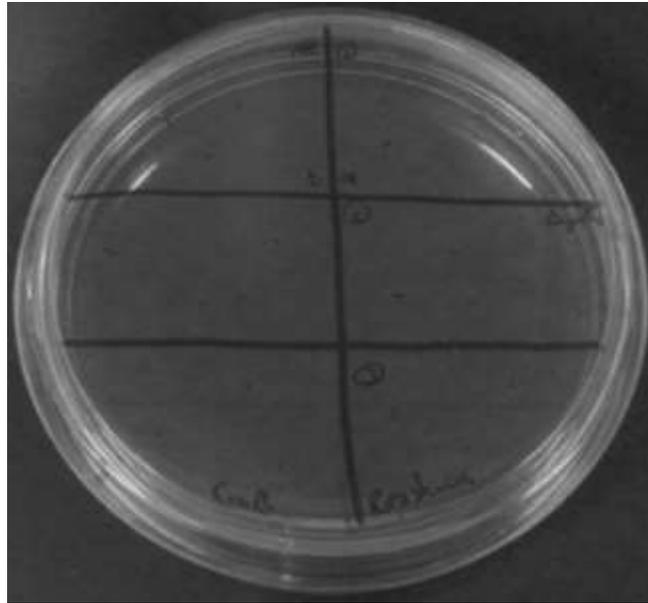


Figura 40. Cultivos expuestos a la CMI de las AgNPs ($42 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) sembrados en YPDA. No hubo crecimiento a las 24 horas. Todas las muestras son réplicas de los cultivos de *C. albicans* expuesto a las AgNPs.

Tabla 23. Respuesta de los cultivos post-tratamiento. La absorbancia de los cultivos tratados con las AgNPs no representa crecimiento. Se presenta sólo como un dato adicional. Esta absorbancia se da por la presencia de AgNPs en el medio.

Tratamiento original	Nuevo tratamiento		Medición D.O. (desv. std.)
	$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	Concentración equivalente	
Control negativo	N/A	N/A	1.855 ($\sigma= 0.162$)
	42 (AgNPs)	CMI	0.052 ($\sigma= 0.012$)
	31 (FLZ)	DL ₅₀	0.788 ($\sigma= 0.113$)
AgNPs	42	CMIx1	0.049 ($\sigma= 0.005$)
	126	CMIx3	0.126 ($\sigma= 0.008$)
FLZ	31	DL ₅₀ x1	0.771 ($\sigma= 0.045$)
	150	DL ₅₀ x3	0.630 ($\sigma= 0.050$)

A las 24 horas de crecimiento, los cultivos se midieron por espectrofotometría, a una $\lambda = 520$ nm. Los resultados de las mediciones se muestran en la tabla 23. Además, en la figura 41 se muestra de manera gráfica el crecimiento de los cultivos expuestos a FLZ, post-tratamiento.

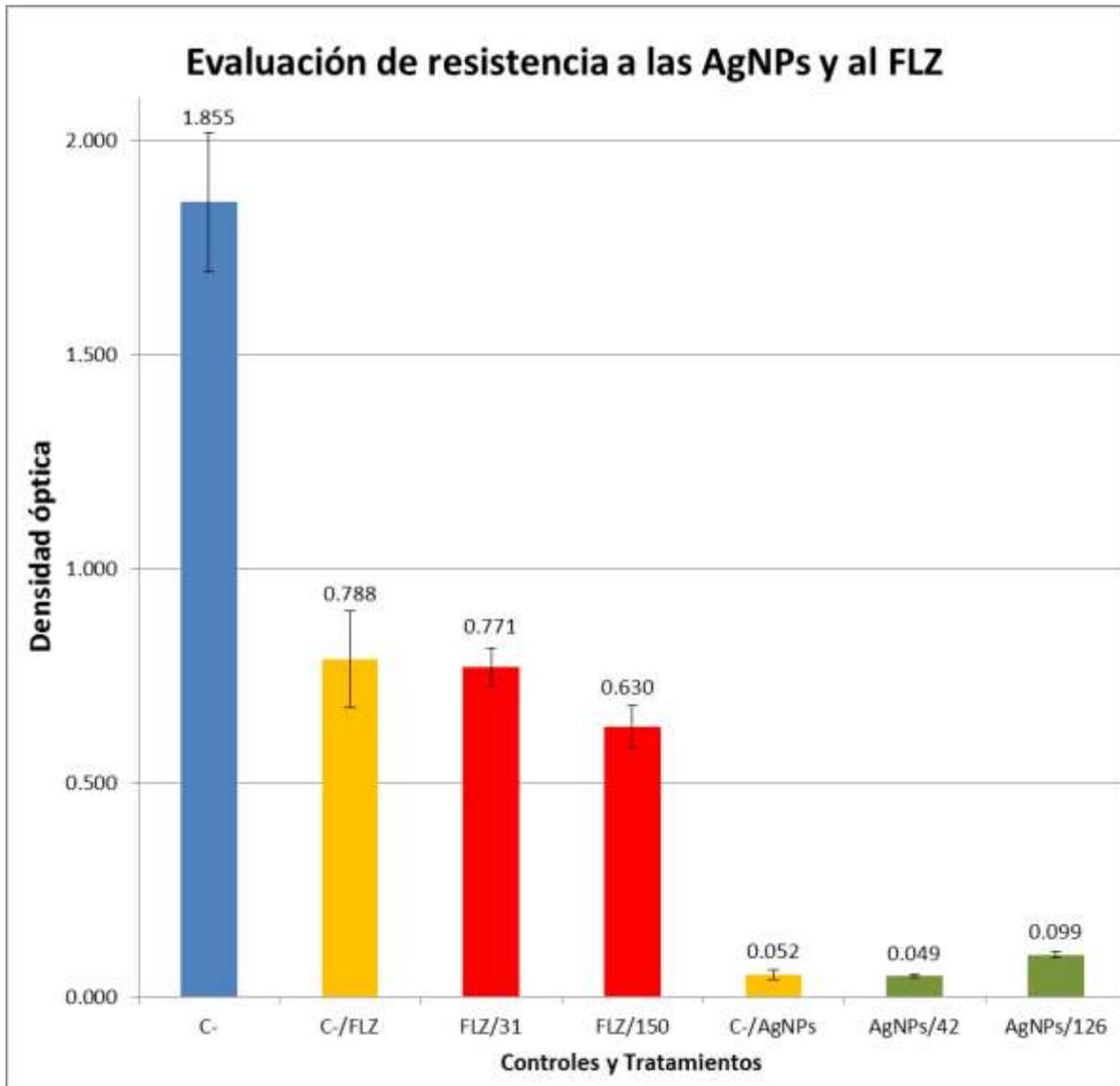


Figura 41. Respuesta de los cultivos a los diferentes tratamientos. “C-“= control negativo, sin tratamiento; “C-/FLZ”=control negativo con $31 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de FLZ; “FLZ/31”= cultivo expuesto a la prueba de resistencia, tratado con $31 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de FLZ; “FLZ/150”= cultivo expuesto a la prueba de resistencia, tratado con $150 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de FLZ; “C-/AgNPs”=control negativo tratado con $42 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AgNPs; “AgNPs/42”= cultivo expuesto a la prueba de resistencia, tratado con $42 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AgNPs y “AgNPs/126”= cultivo expuesto a la prueba de resistencia, tratado con $126 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AgNPs.

Capítulo VIII

DISCUSIÓN

La creación de nuevas sustancias antifúngicas representa un gran reto para la investigación biomédica. Algunos autores (Huh *et al.*, 2011; Taubes, 2008) consideran que la tendencia en la tasa de producción de nuevos antibióticos es más lenta que la capacidad que tienen los microorganismos para generar resistencia. En éste contexto, es necesario considerar a las nuevas tecnologías y materiales para la industria farmacéutica. Es prioritario desarrollar sustancias de bajo costo, estables, fáciles de sintetizar y que tengan un amplio rango de acción, además de que sean poco tóxicas para el hombre. Es aquí en donde la bionanotecnología ofrece un panorama de exploración completamente nuevo.

El uso de materiales nanoestructurados en biomedicina es un tema relativamente nuevo. La nanotecnología ofrece materiales con propiedades únicas y novedosas. Muchos nanomateriales son fáciles de sintetizar, son de bajo costo y pueden tener una buena estabilidad. Algunos de estas nanoestructuras, pueden tener relevancia en las áreas biomédicas. En el caso de enfermedades infecciosas, los materiales más estudiados han sido las nanopartículas metálicas, especialmente las de plata (AgNPs) y las de dióxido de titanio (TiO₂NPs).

Un problema importante asociado al uso de nanomateriales, es el poco conocimiento de sus efectos e interacciones en los sistemas biológicos. Aunque hay estudios con diferentes microorganismos, particularmente en bacterias (Duran *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010) y hongos (Rai *et al.*, 2009; Huh & Kwon, 2011; Hwang *et al.*, 2012) se sabe muy poco sobre sus mecanismos de acción. En el caso de protozoarios y virus, los estudios son más escasos todavía.

En el presente trabajo se estudió el efecto inhibitorio que tienen las AgNPs en el hongo patógeno *Candida albicans* y se comparó con el efecto que tienen el AgNO₃ y el Fluconazol. Se evaluaron las propiedades de relevancia antimicrobianas, de las AgNPs, que ya se habían

evaluado en otros trabajos (Huh *et al.*, 2011; Rai *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009; Hwang *et al.*, 2012), tales como su efecto a diferentes concentraciones, su interacción con antifúngicos, etc. También se evaluaron características que no se han considerado en otros trabajos, tales como el efecto paradoja y la respuesta de las células ante tratamientos sucesivos. Asimismo, se realizó un estudio comparativo con aislados clínicos de diferentes especies del género.

VIII.1.- Efecto de las AgNPs en *Candida albicans*

VIII.1.1 Determinación de la CMI de las AgNPs.

Las AgNPs presentaron un efecto inhibitorio en todos los cultivos de *C. albicans* ATCC SC5314. Por lo tanto, se determinó su CMI y su CI_{50} . En contraste con el $AgNO_3$, La CMI de las AgNPs fue relativamente baja en los diferentes inóculos probados, por lo que muestran una buena potencia farmacológica. El desempeño de las AgNPs fue igual (cultivo D.O.=0.082) o mejor (cultivo D.O.=0.040) que el desempeño del $AgNO_3$ (tabla 14).

Bajo condiciones similares, las AgNPs mostraron una mayor capacidad que el $AgNO_3$ para inhibir a las células de *C. albicans*. Hay numerosos estudios que muestran que el $AgNO_3$ no es recomendable para atender, de forma regular, problemas la salud, debido a sus efectos tóxicos (Fung & Bowen, 1996; Hidalgo & Domínguez, 1998; Herrera *et al.*, 2001; White *et al.*, 2003; Kwon *et al.*, 2009; Asharani *et al.*, 2009).

El efecto tóxico de las nanopartículas se puede regular mediante modificaciones en su forma, tamaño, funcionalzante, etc. Además, se ha observado que las AgNPs ofrecen ventajas adicionales en la clínica, lo que las vuelve más atractivas. Entre sus propiedades destacan su capacidad antiinflamatoria (Nadworny *et al.*, 2008, Jaya *et al.*, 2009), y en la regeneración de tejidos con quemaduras (Klansen, 2000). Además de sus efectos antimicrobianos, las AgNPs son antivirales (Rogers *et al.*, 2008). Además, por comunicación personal con diferentes grupos, se ha confirmado sus propiedades antivirales y antimicrobianas en diferentes taxa.

Al evaluar la CMI, se encontró que ésta es equivalente a la concentración mínima fungicida (CMF). Los cultivos expuestos a la CMI no mostraron crecimiento en sub-cultivos posteriores, en medios libres del tratamiento. La determinación de la CMF tiene relevancia en la clínica, debido a que no sólo se inhibe el crecimiento, sino que las células son incapaces de recuperarse.

Aunque no todas las NPs que se utilizan para evaluar el efecto antimicrobiano se funcionalizan con otras moléculas, las AgNPs que se usan en este trabajo están funcionalizadas con PVP. Por tal motivo, la evaluación de la interacción entre la molécula funcionalizante y las células es una prueba importante. Los resultados ayudan a discernir con mayor certidumbre qué componente está ejerciendo la acción antifúngica. Esto es particularmente cierto cuando la molécula funcionalizante se considera biocompatible, como en el caso de la PVP (Bühler, 2006).

En cultivos expuestos a la PVP, se demostró que ésta sustancia no presenta efectos antifúngicos contra la cepa de referencia (*C. albicans* ATCC SC5314). Los cultivos expuestos a una concentración de $50,000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ mostraron un crecimiento similar al del control negativo. En la tabla 12 se muestran los resultados para el PVP y el control sin tratamiento (2.203 y 2.207 de absorbancia, respectivamente). En los datos se observan que no existen diferencias notables entre el crecimiento de los tratamientos con respecto al control. Por lo tanto se puede atribuir el efecto antifúngico a la plata y no a la PVP.

VIII.1.2) Determinación la CI_{50} de las AgNPs vs la CI_{50} del FLZ en *C. albicans*:

La DL_{50} de las AgNPs fue menor que la del FLZ: 18 vs $31 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectivamente (tabla 17). Esto sugiere que, *in vitro*, las AgNPs son más potentes que el FLZ. En base a lo demostrado en otros trabajos, como los que se citan en la tabla 24 y en el presente estudio, la CMI y la CI_{50} muestran que las AgNPs son una alternativa viable para inhibir el crecimiento de *C. albicans*.

Las concentraciones de AgNPs de la CMI y la DL_{50} difieren de los datos sugeridos por otros autores (tabla 24). Es importante resaltar que en los diferentes trabajos se utilizaron distintos parámetros, tales como: cepas de referencia, inóculos iniciales, medios de cultivo, métodos de evaluación, etc.

Tabla 24. Concentraciones de AgNPs utilizadas en algunos trabajos con *C. albicans*. Se comparan las respuestas de los cultivos con los tratamientos de AgNPs, en base a sus densidades iniciales y al parámetro evaluado. La tabla no es exhaustiva, es un ejemplo representativo para mostrar las diferencias entre las concentraciones de plata utilizadas por algunos trabajos.

Autor	Características de las AgNPs	Concentración		Inóculo inicial Cel.*ml ⁻¹
		μg*ml ⁻¹	Parámetro**	
Presente estudio	Esferoides de 3-10 nm	42	CMI / CMF	1 x 10 ⁴
		150		2.5 x 10 ⁶
		600		4.4 x 10 ⁷
		18	CI ₅₀	1 x 10 ⁴
		60		2.5 x 10 ⁶
Kim <i>et al.</i> ,(2008)	Esferoides de 3 nm	7*	DL ₈₀	0.5 a 2.5×10 ³
Kim <i>et al.</i> ,(2009)	Esferoides de 3 nm	2	CMI	2 x10 ⁴
Panáčeka <i>et al.</i> ,(2009)	Esferoides de 25 nm	27	CMF	2.5 × 10 ⁶
Monteiro <i>et al.</i> ,(2011)	Esferoides de 5 nm	3.3*	CMI	1 ×10 ³
Nasrollahi <i>et al.</i> ,(2011)	No se menciona	2000	CI ₉₀	No se menciona
		500	CI ₅₀	
Stevanović <i>et al.</i> ,(2012)	Esferoides de 4.5 nm	0.12	CMI	0.5 a 2.5×10 ³

Nota: *Sólo se señala la máxima concentración del rango reportado por el autor.
 **CMI=concentración mínima inhibitoria; CMF= concentración mínima fungicida; CI_X= concentración inhibitoria; DL_X = Dosis letal. X=50, 80, 90, etc., que representa el porcentaje de inhibición.

Las diferencias entre las respuestas de *C. albicans* reportadas en otros trabajos, también puede atribuirse a distintos factores asociados a las AgNPs. Entre estos factores destacan: el tamaño, forma y constitución de las nanopartículas, las moléculas funcionalizantes, método de síntesis, etc. (tabla 25). Además, las características estructurales inciden en las propiedades físico-químicas de las nanopartículas. Por lo tanto, muchas de las diferencias encontradas entre los diferentes trabajos (incluyendo al presente estudio), puede ser debido a los diferentes tamaños y formas de las AgNPs.

Una característica importante de las AgNPs utilizadas en el presente estudio, es que están funcionalizadas con PVP. Además de sus funciones como estabilizador, anti-agregante y para proporcionar biocompatibilidad, ésta sustancia podría actuar como un regulador de liberación de iones de plata, induciendo a que se liberen gradualmente. Esto podría explicar porque se requieren mayores concentraciones de AgNPs que en otros estudios, pero falta realizar los respectivos ensayos.

Tabla 25. Diferencias entre las AgNPs utilizadas en algunos trabajos con *C. albicans*. Se comparan diferentes AgNPs, en base a sus diferentes métodos de síntesis y sus diferencias físico-químicas. La tabla no es exhaustiva, es un ejemplo representativo para mostrar las diferencias entre las concentraciones de plata utilizadas por algunos trabajos. Las moléculas implicadas incluyen a los precursores y a los catalizadores.

Autor	Método de síntesis	Moléculas implicadas	Funcionalizante
Kim <i>et al.</i> ,(2008, 2009)	Reducción de Ag ⁺ mediante NaCl	Ag, HNO ₃ y NaCl	No reportado
Hwang <i>et al.</i> ,(2013)			
Panáček <i>et al.</i> ,(2009)	Modificado de Trolens (Kvitek <i>et al.</i> , 2005)	Ag ⁺ , sacáridos y NH ₃ .	No reportado
Monteiro <i>et al.</i> ,(2011)	Turkevich <i>et al.</i> ,(1951)	AgNO ₃ , Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ , NH ₃ .	No reportado
Nasrollahi <i>et al.</i> ,(2011)	Reducción de AgNO ₃ mediante PVP	NaBH ₄ , AgNO ₃ , PVP	No reportado
Stevanović <i>et al.</i> ,(2012)	Modificado de Yu (2007)	AgNO ₃ , NH ₄ OH	α, γ, L-ácido glutámico (PGA)

Es importante mencionar se observó que las AgNPs utilizadas en este estudio sedimentan lentamente en medio YPD y se difunden lentamente en medio YPDA. Éste sedimentación no se observó en diluciones con agua destilada ni en agua destilada des-ionizada. Por otro lado, no se evaluó la respuesta de sedimentación en otras condiciones. La evaluación de estas condiciones permitiría entender mejor su interacción con el medio celular interno y externo. La sedimentación

podría incidir, directa y negativamente, en la eficacia de las AgNPs, por lo que es necesario evaluarse de manera cuantitativa en diferentes medios.

VIII.1.3) Evaluación del efecto fungicida / fungistático de las AgNPs.

Las AgNPs presentan diversas características antimicrobianas relevantes, tales como su efecto fungicida. Las sustancias fungistáticas son aquellas que inhiben el crecimiento de los hongos, mientras que las sustancias fungicidas son aquellas que los matan. Otra forma de definir a éstas últimas, es por la CMI (Graybil *et al.*, 1997). Siguiendo el método señalado en el punto VI.2.4, se determinó que el efecto de las AgNPs es fungicida. Los cultivos tratados con la CMI, la CMIx2 y la CMIx5 (42, 84 y 210 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; respectivamente) fueron incapaces de recuperarse post-tratamiento, incluso después de inocularse en medio libre del tratamiento, en sub-cultivos sucesivos.

El AgNO_3 también presentó un efecto fungicida, y se probó en las mismas concentraciones de plata que las AgNPs. Los cultivos tratados con AgNO_3 respondieron de manera similar a los cultivos tratados con AgNPs, a concentraciones similares. En los sub-cultivos sucesivos, post-tratamiento, libres de AgNO_3 , las células fueron incapaces de recuperarse.

Según lo esperado, el FLZ no presentó una CMI total, por lo que se utilizó la DL_{50} , $\text{DL}_{50}\times 2$ y la $\text{DL}_{50}\times 4$ (31, 63 y 125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; respectivamente). Los cultivos tratados con FLZ crecieron normalmente al re-inocularse en medio YPD libre de tratamiento. No se encontró ninguna concentración de FLZ que inhibiera completamente a los inóculos utilizados.

VIII.1.4) Evaluación para determinar si se presenta el “efecto paradoja” en las AgNPs

El efecto paradoja, en los antibióticos, se define como una notable reducción en la capacidad para inhibir microorganismos, cuando se usan concentraciones superiores a la CMI (Holm *et al.*, 1990). Éste efecto se ha observado en diferentes antibióticos, tanto antibacterianos como antifúngicos. En el caso de éstos, la mayoría señala éste efecto en las equinocandinas (Stevens *et al.*, 2004; Stevens *et al.*, 2005; Bink, 2011), pero también se citan antifúngicos de otras clases, como el itraconazol (Arikam *et al.*, 2005). No se conoce con certeza cuales son las repercusiones

en la clínica (Holm *et al.*, 1990), aunque se han tratado de elucidar los mecanismos en diferentes antifúngicos (Stevens *et al.*, 2004).

No se encontraron trabajos sobre el efecto paradoja en el fluconazol, aunque hay un estudio que señala que en combinación FLZ-Ibuprofeno, presenta efecto paradoja (Arai *et al.*, 2005). Los resultados muestran que el efecto paradoja que presenta el FLZ es en concentraciones equivalentes a $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (figura 23).

Hasta donde se sabe, no existen trabajos que hayan determinado si se presenta el efecto paradoja con AgNPs o con otras nanopartículas o nanomateriales. Durante los ensayos, las células expuestas se re-inocularon en YPDA para verificar el efecto antifúngico. En todos los casos se presentó una inhibición total y ningún cultivo presentó crecimiento post-tratamiento. Como se observa en la tabla 19, en los cultivos tratados con AgNPs, no hubo crecimiento celular ni tampoco con AgNO_3 , cuando se expusieron a concentraciones iguales o superiores a la CMI (42 y $90 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectivamente).

El efecto paradoja no se presentó en los cultivos tratados con plata. Esto se podría asociar a un daño cada vez mayor en la célula, de tal forma que la célula muere o es incapaz de recuperar su actividad normal y de reproducirse. En base a la hipótesis de que las AgNPs tengan un mecanismo de acción no específico y que liberen Ag^+ , es factible pensar en la dificultad de que las AgNPs tengan interacciones negativas entre sí. Esto es contrario a lo que se observa en los antibióticos tradicionales en los que, al incrementar la concentración, se manifiesta una interacción negativa con ellos mismos.

VIII.1.5) Evaluación de los efectos en el tratamiento combinado de AgNPs – FLZ

El estudio de los efectos combinados que pudiese existir entre las AgNPs y los antibióticos es un elemento importante. Los antibióticos pueden tener diferentes interacciones entre sí, tanto positivas como negativas (Fothergill *et al.*, 2006). Dependiendo de la interacción, los tratamientos combinados van a tener un efecto sinérgico o antagónico

Evaluar el efecto combinado de las AgNPs con antibióticos tiene una relevancia en la clínica, debido a que las AgNPs podrían potenciar el efecto antimicrobiano de las diferentes sustancias. Los antibióticos tienen un efecto más o menos específico, según su naturaleza, y esa especificidad limita su mecanismo de acción. Actualmente se utilizan combinaciones de antibióticos para tratar algunas infecciones. Por lo tanto es importante evaluar los efectos de los tratamientos combinados antes de llevarlos a la clínica. Las AgNPs tienen un efecto inhibitorio no específico, por lo que su espectro de acción es muy amplio. Si se determina que tiene un efecto sinérgico con distintos antibióticos, podría ayudar a reducir las concentraciones usadas de dichas sustancias, reduciendo en consecuencia sus efectos secundarios. Al mismo tiempo, se utilizarían dosis más bajas de las AgNPs, reduciendo también sus posibles daños.

Existen pocos estudios que han evaluado los efectos entre diferentes antibióticos con distintos nanomateriales. Entre los estudios que evalúan tratamientos combinados de antibióticos y AgNPs, se han observado efectos sinérgicos y antagónicos. Se han determinado efectos sinérgicos con amoxicilina (Li *et al.*, 2005), ampicilina, kanamicina, erytromicina, y cloranfenicol (Fayaz *et al.*, 2010), penicilina G, clindamicina, y vancomicina (Shahverdi *et al.*, 2007), etc. Por otro lado, también se han detectado interacciones antagonistas, como las señaladas por De Sousa *et al.*, (2006) con la combinación amoxicilina-AgNPs- *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), así como con el cloranfenicol por parte de Jaya *et al.*, (2009).

En este trabajo se probaron dos concentraciones de AgNPs en combinación con dos concentraciones de FLZ, con resultados favorables en todos los casos (tabla 20). Además, se contrastó el crecimiento con controles sin tratamiento y sólo con FLZ. No se observaron efectos antagónicos en las pruebas de interacción entre los diferentes tratamientos. Los resultados muestran que las AgNPs y el FLZ presentan un efecto sinérgico. Los tratamientos con $18 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AgNPs (DL_{50}) + $31 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de FLZ, mostraron un crecimiento mucho menor que aquellos tratados sólo con $31 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de FLZ (figura 24). Los tratamientos tratados con $42 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AgNPs (CMI) + FLZ, no presentaron crecimiento en ninguna de las réplicas, por lo que se conservó la capacidad inhibitoria de las AgNPs a pesar de la presencia del FLZ.

VIII.2 Comparación del efecto de la CMI en otras especies del género *Candida* y en aislados clínicos de las especies representativas.

Algunas especies del género *Candida* pueden presentar distintos grados de resistencia contra algunos antifúngicos, como en el caso de *C. glabrata* vs el FLZ. Ésta misma diversidad en la respuesta a los tratamientos se puede observar en la variedad de cepas de una misma especie (Lewis & Kontoyiannis, 2012).

Existen reportes en donde se muestran diferencias muy grandes en las respuestas a los tratamientos con AgNPs. Kim *et al.*,(2008), Panáček *et al.*,(2009) y Monteiro *et al.*,(2011) reportan diferencias muy grandes entre las CMI a las AgNPs en las diferentes especies de *Candida*, como se observa en la tabla 26. Se observa que en general obtuvieron una mayor CMI para *C. parapsilosis*, mientras que *C. tropicalis* y *C. glabrata* tienen una CMI superior a *C. albicans*, pero inferior a *C. parapsilosis*.

Tabla 26. Concentraciones de AgNPs utilizadas en diferentes especies de *C. albicans*. Se muestran los resultados de algunos trabajos que han utilizado AgNPs (de síntesis química) para determinar la CMI de diferentes especies del género *Candida*. La tabla no es exhaustiva, es un ejemplo representativo para mostrar las diferencias entre las respuestas de las diferentes especies de *Candida*, en diferentes estudios.

Autor	Especie	Parámetro evaluado	Concentración de AgNPs ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)
Presente estudio	<i>C. albicans</i>	CMI / CMF	150-450
	<i>C. glabrata</i>		≤ 150
	<i>C. parapsilosis</i>		≤ 150
	<i>C. tropicalis</i>		≤ 150
Kim <i>et al.</i> , (2008)	<i>C. albicans</i>	CMI	2-4
	<i>C. glabrata</i>		1-7
	<i>C. parapsilosis</i>		4-25
	<i>C. tropicalis</i>		7
Panáček <i>et al.</i> , (2009)	<i>C. albicans</i> I	CMI	0.42
	<i>C. albicans</i> II		0.21
	<i>C. parapsilosis</i>		1.69
	<i>C. tropicalis</i>		0.84
Monteiro <i>et al.</i> , (2011)	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	CMI	0.8–1.6
	<i>C. albicans</i> 324LA/94		0.4–0.8
	<i>C. glabrata</i> ATCC 90030		0.4–0.8
	<i>C. glabrata</i> D1		1.6–3.3

En el presente estudio, no se determinó la CMI individual para cada una de las especies de *Candida* no-*albicans*. Sin embargo, tanto las especies no-*albicans* como los aislados clínicos se expusieron a la CMI obtenida para *C. albicans* ATCC SC5314. Ninguna de las cepas de referencia ni los aislados clínicos de *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*, sobrevivieron al tratamiento ($150 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AgNPs). Debido a la disponibilidad de los aislados clínicos, se evaluó a una cantidad diferente de aislados por cada especie de *Candida*. Por tal motivo, se requiere extender el estudio para incluir más especies y aislados clínicos del género, con la finalidad de tener una mayor certeza de la respuesta de cada especie.

Contrario a lo esperado, se observó que algunos aislados clínicos de *Candida albicans* pudieron crecer a pesar de los tratamientos con AgNPs. Estos aislados clínicos presentaron distintos grados de resistencia contra la concentración de AgNPs equivalente a la CMI y a la CMIx2 (150 y 300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivamente) de *C. albicans* ATCC SC5314. La respuesta del crecimiento vs los tratamientos fue diferente en algunas cepas, pues mientras algunas, como la cepa GGK43, mostraron un crecimiento incipiente, otras cepas, como la A84, tuvieron un crecimiento abundante (figura 26).

Se desconoce cuál es la relación entre la capacidad de sobrevivir de las cepas resistentes a la CMI de AgNPs y su fisiología. Aparentemente, el efecto e interacción de las AgNPs se presenta independientemente de la respuesta que tengan las cepas de *Candida* vs los tratamientos. Un trabajo por realizar, con las cepas de *C. albicans*, es contrastar su resistencia a los antifúngicos vs su resistencia contra las AgNPs.

VIII.3 Análisis microscópico

Existen pocos trabajos que reportan, a nivel microscópico y ultraestructural, la interacción de las AgNPs vs *Candida*. Ésta poca productividad se presenta tanto para los análisis por medio de microscopía óptica como por medio microscopía electrónica de barrido (SEM) (Ghosh *et al.*, 2010; Nasrollahi *et al.*, 2011), y del microscopio electrónico de transmisión (TEM) (Kim *et al.*, 2009). Por lo tanto, para determinar la presencia y distribución de las AgNPs en las células, éstas se observaron pre- y post-tratamiento, por microscopía óptica y electrónica.

VIII.3.1) Microscopía óptica:

Al exponer los cultivos de *C. albicans* a las AgNPs, se observa a simple vista que se forma un precipitado. Al observarse bajo el microscopio se hace evidente, que dicho precipitado se debe a la acumulación de las AgNPs en el exterior de las células (fig. 32a). En la periferia de la célula se encontraron acumulaciones masivas de AgNPs, al punto de ser visibles bajo la microscopía

óptica (figura 28). La naturaleza y tipo de interacción de estos cúmulos se desconocen, pues no se sabe hasta qué punto interactuaron con el medio, con biomoléculas extracelulares, con la pared celular, etc. Por medio de microscopía óptica, se observó una gran cantidad de estructuras rodeadas de AgNPs, posiblemente células muertas.

Se observó que *C. albicans* puede conservar su capacidad de cambiar de forma levaduriforme a hifal incluso después de exponerse a las AgNPs. Esto difiere de lo que había reportado Kim *et al.*, (2008), quien reportó que las AgNPs inhibían la transición dimórfica de *C. albicans*. Es importante destacar que, en el experimento de Kim *et al.*, se indujo la transición dimórfica por medio de suero fetal bovino, mientras que en el presente estudio dicha transición ocurrió de manera espontánea. Así, Kim *et al.*, reportan las células no pudieron cambiar de forma (figura 8), en el presente trabajo se observó la presencia de pseudohifas e hifas, post-tratamiento con AgNPs, en concentraciones menores a la CMI (figura 28).

VIII.3.2) Microscopía Electrónica:

Las AgNPs se distribuyen de manera no específica en el interior de la célula (fig. 31b y c). Se observó su presencia en el interior y exterior de una estructura celular, posiblemente el núcleo. En la mayoría de las células observadas, esta estructura estaba muy deformada y en otras, no se presentaba. Estas observaciones, sumadas a las de microscopía de fluorescencia (fig. 29), que muestran los efectos de fragmentación nuclear, sugieren que las AgNPs tienen un efecto directo sobre el núcleo, ya sea afectando a las proteínas y/o directamente al material genético. Esto concuerda con lo reportado por Hwang *et al.*, (2012), en donde se observa la fragmentación nuclear por medio del DAPI y TUNEL, post-tratamiento con AgNPs.

Se encontraron AgNPs en diferentes regiones de la pared celular, pero no se observaron daños en dicha estructura (fig. 33d). Kim *et al.*, (2009) reportaron la presencia de “pozos” en la pared celular de las células tratadas con AgNPs (figura 9), algo que no se observó en el presente estudio. Las variaciones entre los resultados obtenidos por otros grupos y el presente estudio, podría deberse a las diferencias entre las diferentes AgNPs. Las distintas nanopartículas tienen características diversas (tamaño, forma, funcionalizante, etc.) y presentan diferentes propiedades, y por lo tanto, interacciones.

Otra observación destacada, fue que en el interior de la célula, las AgNPs tienen diferentes formas y tamaños (fig. 34). Esto podría deberse a procesos dinámicos de acumulación y degradación de las AgNPs en el interior de las células. Incluso, debido a lo que se sabe sobre biosíntesis de AgNPs, la presencia de iones de plata Ag^+ , podría propiciar la síntesis de nuevas AgNPs en el interior de la célula, con características físico-químicas diferentes.

La microscopía electrónica de transmisión de campo oscuro reveló una mayor cantidad de AgNPs que las observadas con campo claro. Las AgNPs se encuentran distribuidas en toda la célula, desde el citoplasma hasta la pared celular. Esto podría apoyar la hipótesis de que las AgNPs tienen un mecanismo de acción generalista, por lo que se encuentran en diferentes regiones de la célula.

Los resultados por EDS confirman la presencia de plata en las células tratadas con AgNPs, mientras que en las células control no se detectó plata. Se realizaron análisis lineales y puntuales, en diferentes regiones de la célula y sólo se encontró plata en las muestras de células con tratamiento.

Por otro lado, se realizaron análisis por cristalografía en las nanopartículas, para determinar su naturaleza estructural. Los resultados muestran un arreglo cristalino, por lo que se confirma que la plata está en forma de nanopartículas.

En base a las observaciones a nivel ultraestructural de las AgNPs y a los resultados comparativos con el AgNO_3 y el FLZ, se considera que las AgNPs son más potentes. La mayor potencia inhibitoria de las AgNPs se podría asociar a los posibles mecanismos de acción de las AgNPs. Éstas podrían estar actuando como reservorios de plata, liberando iones de plata de manera gradual, incrementando la duración de los efectos. Por otro lado, en el AgNO_3 , los Ag^+ se disocian más rápido, por lo que el efecto, aunque fungicida, podría ser en un intervalo de tiempo más reducido.

VIII.4 Análisis de resistencia

Como se mencionó en la introducción, la aparición de cepas resistentes a los antibióticos es un problema grave. La mayoría de las sustancias antimicrobianas presenta éste inconveniente, que depende de factores tales como la naturaleza de la sustancia, la variabilidad genética de los microorganismos y la interacción entre ambos.

Se ha sugerido que los microorganismos no podrían generar resistencia contra las AgNPs (Panáčĕk *et al.*, 2009; Pucek *et al.*, 2011, Noorbakhsh, 2011), pero no se han reportado estudios experimentales que aborden ésta hipótesis. Además, se han encontrado algunas cepas que son naturalmente resistentes a la plata iónica, lo que es motivo de preocupación para algunos autores (Li *et al.*, 1997; Percival *et al.*, 2005). Por otro lado, otros investigadores consideran que la generación de resistencia contra las AgNPs sería muy improbable, en base a lo que se sabe de la interacción con la plata iónica con los sistemas biológicos (Chopra, 2007).

En el presente trabajo, se realizó un estudio preliminar para evaluar la capacidad de *C. albicans* para generar resistencia contra las AgNPs. El experimento se elaboró en base a un estudio de Hebeke & Solotorovsky (1962), debido a que reportan la aparición de cepas resistentes a un antifúngico. En el presente estudio se expusieron al FLZ y a las AgNPs.

Después de exponerse de forma continua a las CI_{50} de las AgNPs y del FLZ, en sub-cultivos sucesivos, no se observó la generación de cepas resistentes. Las cepas expuestas presentaron una respuesta de crecimiento similar a aquellas que no habían sido sometidas a los tratamientos a lo largo de experimento (figura 38).

Es importante destacar que éste fue un estudio preliminar, por lo que se sugiere realizar algunas modificaciones y probar diferentes métodos, para determinar la factibilidad de que aparezcan cepas resistentes a las AgNPs. Aunque se considera que sería improbable la generación de la resistencia a las AgNPs, la capacidad de adaptación y evolución de las células se debe de tomar en cuenta.

Faltan realizar muchos estudios para conocer mejor las interacciones y mecanismos de acción que tienen las AgNPs con las células de *C. albicans*. Otros autores han reportado daño en la mitocondria (Hwang *et al.*, 2012), por lo que se debería evaluar ese efecto con diferentes tipos de AgNPs, incluyendo las utilizadas en el presente estudio.

No se conocen los mecanismos de acción de las AgNPs, pero una propuesta es la liberación gradual de Ag^+ en la célula. Se sabe que la plata iónica no tiene blancos específicos, pero interactúa de forma negativa con grupos funcionales y con proteínas, particularmente a las enzimas, aminoácidos, etc. También afecta al material genético. Por otro lado, una desventaja que tiene la plata iónica, es su baja estabilidad y que se precipita fácilmente. Parte de éste problema se soluciona con las AgNPs, pues están funcionalizadas con un polímero biocompatible, que además retarda la agregación y podría promover la liberación gradual de los iones de plata.

Las propiedades y efectos que ejercen las AgNPs les confieren muchas ventajas que relevantes para la clínica. Aunque falta por estudiar y explicar mejor los posibles mecanismos de acción y que sus propiedades fisicoquímicas pueden variar por muchos factores, su capacidad antimicrobiana es constante en los diferentes estudios.

CONCLUSIONES

- La concentración mínima inhibitoria de las AgNPs es igual o mejor que la CMI del AgNO₃. La concentración mínima inhibitoria es mayor que las IC reportadas (IC₉₀, IC₈₀). LA CMI fue equivalente a la CMF.
- La concentración mínima inhibitoria media (IC₅₀) de las AgNPs en *C. albicans* ATCC SC5314 es similar a la del AgNO₃ y menor que la del FLZ.
- Las AgNPs presentaron un efecto fungicida. Después de la exposición a la CMF, los cultivos son incapaces de recuperar el crecimiento.
- El efecto paradoja no se observó en las AgNPs ni en el AgNO₃, aunque sí se presentó en el FLZ.
- Las AgNPs tienen una interacción sinérgica con el FLZ. Los tratamientos combinados de AgNPs + FLZ presentaron una mayor inhibición que el tratamiento de sólo FLZ.
- La CMI de las AgNPs (150 µg*ml⁻¹) de *Candida albicans* ATCC SC5314 inhibió al 50% de los aislados clínicos, pero el otro 50% resistió parcialmente al tratamiento.
- La CMI de las AgNPs (150 µg*ml⁻¹) de *Candida albicans* ATCC SC5314 inhibió totalmente a las cepas de referencia de *Candida no-albicans* y a los aislados clínicos.
- Las AgNPs se encontraron en diferentes regiones de las células de *C. albicans*, como la pared celular y el citoplasma.
- Se observaron AgNPs de diferentes tamaños en el interior y exterior de las células. Pero se desconocen las interacciones involucradas a los cambios en la estructura de las AgNPs.

- Las AgNPs inciden en la fragmentación nuclear. No se observaron daños en la pared celular, pero si diferencias en la topología de las membranas entre las células control y las células con tratamiento.
- La CI_{50} y la CMI a las AgNPs y del FLZ se mantienen constantes después de exponer a *C. albicans*, de manera continua, sub-cultivos sucesivos.
- Los resultados obtenidos complementan a las investigaciones actuales sobre el uso potencial de los nanomateriales en la biomedicina.

REFERENCIAS

- ALLAKER R., REN G. (2008). Potential impact of nanotechnology on the control of infectious disease, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102(1):1–2.
- ARAI R., SUGITA T. & NISHIKAWA A. (2005). Reassessment of the in vitro synergistic effect of fluconazole with the non-steroidal anti-inflammatory agent ibuprofen against *Candida albicans*. *Mycoses* 48(1):38–41. DOI: 10.1111/j.1439-0507.2004.01052.x
- ARIKAN S., SANCAK B., HASCELIK G. (2005). In vitro activity of caspofungin compared to amphotericin B, fluconazole, and itraconazole against *Candida* strains isolated in a Turkish University Hospital. *Med Mycol.* 43(2):171-178.
- ASHARANI P., MUN G., HANDE M., VALIYAVEETIL S. (2009). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* 3:279–290.
- ATIYEH B., COSTAQLIOLA M., HAYEK S. & DIBO S. (2007) Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature. *Burns* 33:139–148.
- BAKER C., PRADHAN A., PAKSTIS L., POCHAN D., SHAH S. (2005) Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol* 5:244–249. DOI:10.1166/ jnn.2005.034
- BENAROUDJ N., LEE D. & GOLDBERG A. (2001) Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *J Biol Chem* 276:24261–24267.
- BINK A., PELLENS K., CAMMUE B., & THEVISSSEN K.. (2011). Anti-Biofilm Strategies: How to Eradicate *Candida* Biofilms? *The Open Mycology Journal*, 5:29-38.
- BOWMAN J. SCOTT HICKS P., KURTZ M. , ROSEN H., SCHMATZ D. , LIBERATOR P., & DOUGLAS C. The antifungal echinocandin caspofungin acetate kills growing cells of *Aspergillus fumigatus* in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 46(9):3001–3012.
- BÜHLER, V. (2006). Polyvinylpyrrolidone excipients for pharmaceuticals. Berlin, Springer.
- BUZEA C., PACHECO I., & ROBBIE K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases* 2(4): MR17-MR172

- CARLSON C., HUSSAIN S.M., SCHRAND A., BRAYDICH-STOLLE L., HESS K., JONES R.L. (2008). Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *Journal of Physical Chemistry: Part B* 112:13608–13619.
- CASSELL G & MEKALANOS J. (2001). Development of Antimicrobial Agents in the Era of New and Reemerging Infectious Diseases and Increasing Antibiotic Resistance. *JAMA* 285(5):601-605. DOI:10.1001/jama.285.5.601
- CASTRO-LONGORIA E, VILCHIS-NESTOR A, AVALOS-BORJA M. (2010). Biosynthesis of silver, gold and bimetallic nanoparticles using the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Colloids Surf B* 3:42–48. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2010.10.035.
- CHOPRA I. (2007). The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause of concern? *J Antimicrob Chemother* 59: 587–590.
- CHU J., FEUDTNER C., HEYDON K., WALSH T., & ZAOUTIS T. (2006). Hospitalizations for endemic mycoses: a population-based national study. *Clin. Infect. Dis.* 42:822–825.
- CLANCY C. & NGUYEN M.. (2012). Systemic candidiasis: Candidemia and deep-organ infections. In: Calderone R.A. & Clancy C.J. (ed.) *Candida & Candidiasis* (pp. 387-401) Washington DC, ASM Press.
- CLAYTON Y.& NOBLE W. (1966) Observations on the epidemiology of *Candida albicans*. L. *Clin. Pathol.* 19:76-78
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard, 2nd ed., M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
- DAVIES A.N., BRAILSFORD S., BROADLEY K. & BEIGHTON D. (2002). Oral yeast carriage in patients with advanced cancer. *Oral microbial. Immunol.* 17:79-84.
- DE SOUSA, A.; MEHTA, D. & LEAVITT, R. (2006). Bactericidal activity of combinations of Silver–Water Dispersion™ with 19 antibiotics against seven microbial strains. *Curr. Sci.* 91:926-9
- DOUGLAS C., DÍPPLITO J., SHEI G., MEINZ M., ONISHI J., MARRINAN J., LI W., ABRUZZO G., FLATTERY A., BARTIZAL, K., MITCHELL A. & KURTZ M. (1997). Identification of the *FKS1* gene of *Candida albicans* as the essential target of 1,3-beta-D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 41:2471-79

- DURÁN N, MARCATO P, DE CONTI R, ALVES O, COSTAB F & BROCCIB M. (2010). Potential Use of Silver Nanoparticles on Pathogenic Bacteria, their Toxicity and Possible Mechanisms of Action. *J. Braz. Chem. Soc.* 21(6):949-959
- EGGIMANN P., GARBINO J. & PITTET D. (2003) Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect. Dis.* 3:685–702.
- ENDO M., TAKESAKO K., KATO I. & YAMAGUCHI H. (1997) Fungicidal action of aureobasidin A, a cyclic depsipeptide antifungal antibiotic, against *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother* 41:672–676
- FABREGA J., ZHANG R., RENSHAW J., LIU W., LEAD J. (2011). Impact of silver nanoparticles on natural marine biofilm bacteria. *Chemosphere* 85:961–966
- FAYAZ A.M., BALAJI K., GIRILAL M., YADAV R., TECH M., KALAICHELVAN P.T. & VENKETESAN R. (2010) Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria, *Nanomedicine* 6:103–109.
- FENG Q., WU J., CHEN G., CUI F., KIM &., KIM J. (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *E. coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Res* 52:662-8.
- FITZPATRICK D., LOGUE M. STAJICH J & BUTLER G. (2006). A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *BCM Evol. Biol* 6:99.
- FOTHERGILL A.W., RINALDI M. G. & SUTTON D. A. (2006). Antifungal Susceptibility Testing. *Infect Dis Clin N Am* 20:699–709
- FRIDKIN, S. K. (2005). The changing face of fungal infections in health care settings. *Clin. Infect. Dis.* 41:1455–1460.
- GALLIS H, DREW R, PICKARD W (1990). Anfotericina B: 30 years of clinical experience. *Rev. Infec. Dis.* 12:308-329
- GARCÍA E., QUEZADA M., MORENO J., SÁNCHEZ G., MORENO E. y PÉREZ M.. (2006). Actividad antifúngica de aceites esenciales de canela (*cinnamomum zeylanicum blume*) y oregano (*origanum vulgare* L.) y su efecto sobre la producción de aflatoxinas en nuez pecanera. *Rev. Mex. De Fit* 24(1):8-12.

- GAY-ANDRIEU F., MAY J., LI D., SUN., CHEN H., CALDERONE R. & ALEX D. (2012). Insights in antifungal drug discovery. In: Calderone R.A. & Clancy C.J. (ed.) *Candida & Candidiasis* (pp. 387-401) Washington DC, ASM Press.
- GHOSH P., HAN G., DE M., KIM C., ROTELLO V. (2008). Gold nanoparticles in delivery applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60:1307–1315
- GHOSH S., KAUSHIK R., NAGALAKSHMI K., HOTI S., MENEZES G., HARISH B. & VASAN H. (2010). Antimicrobial activity of highly stable silver nanoparticles embedded in agar–agar matrix as a thin film. *Carbohydrate Research* 345:2220–2227
- GOFFEAU A. (2008) Drug resistance: the fight against fungi. *Nature* 452:541–542.
- GRAYBILL J., BURGESS D. & HARDIN T. (1997). Key issues concerning fungistatic versus fungicidal drugs. *Europ. J. of Clin. Microb. and Inf. Dis.* 16(1):42-50
- GUDLAUGSSON O., GILLESPIE S., LEE K., VANDE BERG J., HU J., MESSER S., HERWALDT L., PFALLER M & DIEKEMA D. (2003). Attributable mortality of nosocomial candidemia revisited. *Clin. Infect. Dis.* 37:1172-1177.
- GUZMAN M., DILLE J., GODET S. (2012). Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 8:37–45
- HEBEKA E. & SOLOTOROVSKY M. (1962). Development of strains of *Candida albicans* resistant to candidin. *J. Bacteriol.* 84:237-241
- HERRERA M., CARRION P., BACA P., LIEBANA J. & CASTILLO A. (2001) In vitro antibacterial activity of glass-ionomer cements. *Microbios* 104:141–148
- HIDALGO E. & DOMÍNGUEZ C. (1998). Study of cytotoxicity mechanisms of silver nitrate in human dermal fibroblasts. *Toxicology Letters.* 98(3):169–179. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274\(98\)00114-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274(98)00114-3).
- HOLM S., TORNQVIST I. & CARS O. (1990). Paradoxical effects of antibiotics. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 74:113-117.
- HUH A. & KWON Y. (2011). “Nanoantibiotics”: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *J. Control Release.* 156:128-145. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.07.002.
- HWANG I., LEE J., HONG HWANG J., KIM K. & LEE D. (2012). Silver nanoparticles induce apoptotic cell death in *Candida albicans* through the increase of hydroxyl radicals. *FEBS Journal* 279: 1327–1338

- Institute of Bionanotechnology in Medicine (IBNAM, 2013). Recuperado 30 de julio de <http://www.ibnam.northwestern.edu/about.html>
- MUKHA I., EREMENKO A., SMIRNOVA N., MIKHENKOVA A., KORCHAK G, GORCHEV V. & CHUNIKHIN A. (2012) Antimicrobial activity of stable silver nanoparticles of a certain size. *App. Biochem. and Microbiol.* 49(2):199-206
- JAYA J., SUMIT A., JYUTIKA R., PRATIBHA O., SANJEEV K. & KISHORE P. (2009). Silver Nanoparticles in Therapeutics: Development of an Antimicrobial Gel Formulation for Topical Use. *Mol. Pharmaceutics* 6(5):1388–1401. DOI: 10.1021/mp900056g
- KIM J., KUK E., YU K., KIM J., PARK S., LEE H., KIM S., PARK Y., PARK Y., HWANG C., KIM Y., LEE Y., JEONG D., CHO M. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles, *Nanomedicine* 3:95–101.
- KIM K., WOO S., SEOK-KI M., JONG-SOO C., JONG G. & DONG G. (2008). Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18(8):1482–1484
- KIM K., SUNG W., SUH B., MOON S., CHOI J., KIM J. & LEE D. (2009). Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. *BioMetals* 22(2): 235-42. DOI: 10.1007/s10534-008-9159-2
- KING R., LEE J., & MORRIS A. (1980). Adherence of *Candida albicans* and other *Candida* species to mucosal epithelial cells. *Infect. Immun.* 27:667-674
- KLASEN H. (2000) (a). Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. *Burns* 26:117–138.
- KLASEN H.J. (2000) (b). A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns* 26:131–138. doi:10.1016/S0305-4179(99)00116-3
- KVITEK L, PRUCEK R, PANACEK A, NOVOTNY R, HRBAC J, ZBORIL R. (2005) The influence of complexing agent concentration on particle size in the process of SERS active silver colloid synthesis. *Journal of Materials Chemistry*; 15:1099–1105
- KVITEK L., VANICKOVA M., PANÁČEK A., SOUKUPOVA J., DITTRICH M., VALENTOVA E. (2009). Initial study on the toxicity of silver nanoparticles (NPs) against *Paramecium caudatum*. *Journal of Physical Chemistry: Part C*, 113:4296–4300.
- KWON H., LEE J., LEE S. & LEE A. (2009). A case of argyria following colloidal silver ingestion. *Ann Dermatol* 21(3):308–310.

- LEE J., KIM K., SUNG W., KIM J. & LEE D. (2010). The Silver Nanoparticle (Nano-Ag): a New Model for Antifungal Agents. In Pozo D. (ed.), *Silver Nanoparticles*, InTech ed. Recuperado 15 de julio del 2013 de: <http://www.intechopen.com/books/silver-nanoparticles>
- LEWIS R. & KONTOYIANNIS D. (2012). The impact of antifungal drug resistance in the clinic. In: Calderone R.A. & Clancy C.J. (ed.) *Candida & Candidiasis* (pp. 387-401) Washington DC, ASM Press.
- LI P., LI J., WU C., WU Q. & LI J. (2005). Synergistic antibacterial effects of β -lactam antibiotic combined with silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16:1912 DOI:10.1088/0957-4484/16/9/082
- LI W, XIE X, SHI Q, ZENG H, OU-YANG Y & CHEN Y (2010). Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:1115–1122. DOI 10.1007/s00253-009-2159-5
- LI X-Z, NIKAIDO H, WILLIAMS K. (1997) Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag and are deficient in porins. *J Bacteriol.* 179:6127–32.
- LIU L. YANG J., XIE J., LUO Z., JIANG J., YANG Y. & LIU S (2013). The potent antimicrobial properties of cell penetrating peptide-conjugated silver nanoparticles with excellent selectivity for Gram-positive bacteria over erythrocytes. *Nanoscale* 5: 3834-3840. DOI: 10.1039/C3NR34254A
- MANZANO-GAYOSSO P., MÉNDEZ-TOVAR L., ARENAS R., HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ F., MILLÁN-CHIU B., TORRES-RODRÍGUEZ J., CORTÉS-GONZÁLEZ E., FERNÁNDEZ R. y LÓPEZ-MARTÍNEZ R.; (2011). Levaduras causantes de onicomycosis en cuatro centros dermatológicos mexicanos y su sensibilidad antifúngica a compuestos azólicos. *Revista Iberoamericana de Micología* 28(1):32–35
- MARTIN G. S, MANNINO D. M., EATON S. & MOSS M. (2003). The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.* 348:1546–1554.
- MARTINEZ-GUTIERREZ F., BOEGLIB L., AGOSTINHO A., MORALES E, BACH H, RUIZ F & JAMES G. (2013). Anti-biofilm activity of silver nanoparticles against different microorganisms. *Biofouling* 29(6):651-660. DOI:10.1080/08927014.2013.794225
- MATTHEWS R. (1994). Pathogenicity determinants of *Candida albicans*: potential targets for immunotherapy? *Microbiobgy* 140:1505-1511.

- McNEIL M., NASH S., HAJJEH R., PHELAN M., CONN L., PLIKAYTIS B., & WARNOCK D. (2001). Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980–1997. *Clin. Infect. Dis.* 33:641–647.
- MELAIYE A., SUN Z., HINDI K., MILSTED A., ELY D. & RENEKER D. (2005) Silver (I)-imidazole cyclophane gem-diol complexes encapsulated by electrospun tecophilic nanofibers: formation of nanosilver particles and antimicrobial activity. *J Am Chem Soc* 127:2285–2291. DOI:10.1021/ja040226s
- MOHANRAJ V. & CHEN Y. (2006). Nanoparticles – A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 5(1):561-573
- MOLERO G., DÍEZ-OREJAS R., NAVARRO-GARCÍA F., MONTEOLIVA L., PLA J., GIL C., SÁNCHEZ-PÉREZ M., NOMBELA C. (1998). *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. *Internatl Microbiol* 1:95–106.
- MONTEIRO D., GORUP L., SILVA S., NEGRI M., DE CAMARGO E., OLIVEIRA R., BARBOSA D & HENRIQUES M. (2011): Silver colloidal nanoparticles: antifungal effect against adhered cells and biofilms of *Candida albicans* and *Candida glabrata*, *Biofouling: The J. of Bioadhesion and Biofilm Res.*, 27(7):711-719 DOI:10.1080/08927014.2011.599101
- MONTEIRO D., SILVA S., NEGRI M., GORUP L., DE CAMARGO E., OLIVEIRA R., BARBOSA D., HENRIQUES M. (2013). Silver colloidal nanoparticles: effect on matrix composition and structure of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *J. of Applied Microbiol.* 114(4):1175–83, DOI: 10.1111/jam.12102
- MORAN G., COLEMAN D. & SULLIVAN D. (2012). An introduction to the medically important *Candida* species. In: Calderone R.A. & Clancy C.J. (ed.) *Candida & Candidiasis* (pp. 387-401) Washington DC, ASM Press.
- MORONES J., ELECHIGUERRA J., CAMACHO A., HOLT K., KOURI J., RAMIREZ J., (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16:2346–2353.
- NADWORNY P., WANG J., TREDGET E. & BURRELL .R. (2008). Anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver in a porcine contact dermatitis model. *Nanomedicine* 4: 241–251.
- NASROLLAHI A., POURSHAMSIAN K. & MANSOURKIAEE P. (2011). Antifungal activity of silver nanoparticles on some of fungi. *Int. J. Nano. Dim* 1(3):233-239.

- National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID, 2009). Understanding Microbes in Sickness and in Health. NIH Publication No. 09-4914, p 12. Recuperado 31 de Julio de 2013 de: <http://www.niaid.nih.gov/topics/microbes/documents/microbesbook.pdf>
- National Library of Medicine, (NLM, 2013). Infectious diseases. Recuperado 09 de julio de: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/infectiousdiseases.html>
- National Nanotechnology Initiative (NNI, 2013) Recuperado 12 de Julio de <http://www.nano.gov/nanotech-101/what/definition>
- Nature Nanotechnology. (NN, 2013). Recuperado 03 de agosto de <http://www.nature.com/nnano/focus/index.html>
- NETT J.& ANDES D. (2012). Antifungals: Drug Class, Mechanisms of action, pharmacokinetics/pharmacodynamics, drug-drug interactions, toxicity, and clinical use. In: Calderone R.A. & Clancy C.J. (ed.) *Candida & Candidiasis* (pp. 387-401) Washington DC, ASM Press.
- NOORBAKHS F. (2011). Antifungal Effects of Silver Nanoparticle alone and with Combination of Antifungal Drug on Dermatophyte Pathogen *Trichophyton Rubrum*. IPCBEE 5:364-367, Singapore, IACSIT Press. Recuperado de <http://www.ipcbee.com/vol5/81-X20006.pdf>
- NUCCI M. & MARR K. (2005). Emerging fungal diseases. Clin. Infect. Dis. 41:521–526
- PANÁČEKA A., KOLÁŘB M., VEČEŘOVÁB R., PRUCEKA R., SOUKUPOVÁA J., KRYŠTOFC V., HAMALB P., ZBOŘILA R. & KVÍTEK L. (2010). Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. Biomaterials 30(31):6333-6340 DOI:10.1016/j.biomaterials.2009.07.065
- PARK E., YI J., KIM Y, CHOI K. & PARK K. (2010). Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. Toxicology in Vitro 24:872–78
- PARK H., KIM J., LEE J., HAHN J., GU M. & YOON J. (2009) Silver-ion-mediated reactive oxygen species generation affecting bactericidal activity. Water Res 43:1027–32.
- PERCIVAL S, BOWLER PG, RUSSELL D. (2005). Bacterial resistance to silver in wound care. J Hosp Infect 60: 1-7

- PEREA S., LOPEZ-RIBOT J., KIRKPATRICK W., MCATEE R., SANTILLAN R., MARTINEZ M. (2001). Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45:2676–2684.
- PFALLER M. (1998). The epidemiology of invasive mycoses narrowing the gap. *Clin. Infect. Dis.* 27:1148–1150.
- PFALLER M., MESSER S., BOYKEN L., HOLLIS R., RICE C., TENDOLKAR S. & DIEKEMA D. (2004). In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and fluconazole against 4,169 clinical isolates of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* collected during 2001 and 2002 in the ARTEMIS global antifungal surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 48(3):201-205.
- PFALLER, M. & DIEKEMA D. (2004). Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J. Clin. Microbiol.* 42:4419–4431.
- PFALLER, M. & DIEKEMA D. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews.* 20:133–63.
- PHILLIPS A.J., SUDBERY I. & RAMSDALE M. (2003) Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 14327–14332.
- PONTÓN J., MORAGUES M.D., GENÉ J., GUARRO J. & QUINDÓS G. (2002). Hongos y actinomicetos alérgicos. *Revista Iberoamericana de Micología* 25-26. Recuperado 05 de agosto del 2013 de: <http://hongos-alergicos.reviberoammicol.com/files/025.PDF>
- POZNIAKOVSKY A., KNORRE D., MARKOVA O., HYMAN A., SKULACHEV V. & SEVERIN F. (2005) Role of mitochondria in the pheromone- and amiodarone induced programmed death of yeast. *J Cell Biol* 168:257–269.
- PRUCEK R., TUČEK J., KILIANOVÁ M., PANÁČEK A., KVÍTEK L, FILIP J., KOLÁŘ M., TOMÁNKOVÁ K. & ZBOŘIL R. (2011). The targeted antibacterial and antifungal properties of magnetic nanocomposite of iron oxide and silver nanoparticles. *Biomaterials* 32:4704-4713

- QUINTERO-MORA M., LONDOÑO-OROZCO A., HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ F., MANZANO-GAYOSSO P., LÓPEZ-MARTÍNEZ R., SOTO-ZÁRATE C., CARRILLO-MIRANDA L., PENIERES-CARRILLO G., GARCÍA-TOVAR C. Y CRUZ-SÁNCHEZ T. (2008). Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento in vitro de *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol* 25: 22-26
- RAI M., YADAV A., GADE A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotech. Adv.* 27(1): 76-83. DOI:10.1016/j.biotechadv.2008.09.002.
- RE F., MORESCO R. & MASSERINI M. (2012). . Nanoparticles for neuroimaging. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 45 073001. DOI:10.1088/0022-3727/45/7/073001
- REVANKAR S. & SOBEL J. (2012). Mucosal Candidiasis. In: Calderone R.A. & Clancy C.J. (ed.) *Candida & Candidiasis* (pp. 387-401) Washington DC, ASM Press.
- ROGERS J., PARKINSON C., CHOI Y., SPESHOCK J. & HUSSAIN S. (2008). A preliminary assessment of silver nanoparticle inhibition of monkeypox virus plaque formation. *Nanoscale Res Lett* 3:129–133.
- SAAG M., DISMUKES W. (1998) Azole antifungal agents: emphasis on new triazoles. *Antimicrob Agents Chemother* 32(1):1–8.
- SAVILLE S., LAZZELL A., MONTEAGUDO C. & LOPEZ-RIBOT J. (2003). Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot. Cell* 2:1053-1060.
- SCORZONI L., BENADUCCI T., FUSCO A., SIQUEIRA D., SILVA V. & SOARES M. (2007). The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp. *Braz. J. Microbiol.* 38:3 <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822007000300001>
- SCOTT D. II (2009). The direct medical costs of healthcare-associated infections in U.S. hospitals and the benefits of prevention. National Center for Preparedness, Detection, and Control of Infectious Diseases. Recuperado el 03 de Julio del 2013 de: http://www.cdc.gov/hai/pdfs/hai/scott_costpaper.pdf
- SHAHVERDI A., FAKHIMI A., SHAHVERDI H. & MINAIAN S. (2007). Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *Nanomedicine* 3(2):168–171.
- SIEGEL R. (2008). Emerging gram-negative antibiotic resistance: daunting challenges, declining sensitivities, and dire consequences, *Respir. Care* 53(4):471–479.

- SILVER S. (2003) Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol Rev* 27:341–353. DOI:10.1016/S0168-6445(03) 00047-0
- SOBEL J.(2007). Vulvovaginal Candidiasis. *Lancet* 369: 1961-71
- SONDI I., SALOPEK-SONDI B. (2004) Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci* 275:177–182. DOI:10.1016/j.jcis.2004.02.012
- STEVANOVIĆ M., ŠKAPIN S., BRAČKO I., MILENKOVIĆ M., PETKOVIĆ J., FILIPIĆ M., USKOKOVIĆ D. (2012). Poly(lactide-co-glycolide)/silver nanoparticles: Synthesis, characterization, antimicrobial activity, cytotoxicity assessment and ROS-inducing potential. *Polymer* 53:2818-28.
- STEVENS D., ESPIRITU M & PARMAR R. (2004). Paradoxical Effect of Caspofungin: Reduced Activity against *Candida albicans* at high drug concentrations. *Antimicrob. Agents Chemother* 48(9):3407-3411. DOI: 10.1128/AAC.48.9.3407-3411.2004
- STEVENS D., WHITE T., PERLIN D. & SELITRENNIKOFF C. (2005). Studies of the paradoxical effect of caspofungin at high drug concentrations. *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease* 51(3):173-178. DOI:10.1016/j.diagmicrobio.2004.10.006
- SUH W., SUSLICK K., STUCKY G. & SUH Y. (2009). Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. *Progress in Neurobiology* 87: 133–70
- TALYOR P., STAPLETON P. & LUZIO J.; 2002. New ways to treat bacterial infections, *Drug Discov. Today* 7(21):1086–1091.
- TAUBES G. (2008). The bacteria fight back, *Science* 321:356–61.
- WALSH, T. , GROLL A., HIEMENZ J., FLEMMING R., ROILIDES E., & ANAISSIE E. (2004). Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clin. Microbiol. Infect.* 10(1):48–66
- WEINBERG H., GALYEAN A., LEOPOLD M.. (2011). Evaluating engineered nanoparticles in natural waters. *Trends in Analytical Chemistry*, 30(1): 72-83
- WHITE J., POWELL A., BRADY K., RUSSELL-JONES R. (2003). Severe generalized argyria secondary to ingestion of colloidal silver protein. *Clinical and Experimental Dermatology*. 28(3): 254–256.
- WHITE T., HOLLEMAN S., DY F., MIRELS L., STEVENS D. (2002). Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 46:1704–13.

- WILSON L. S., REYES C. M., STOLPMAN M., SPECKMAN J., ALLEN K., & BENEY J. (2002). The direct cost and incidence of systemic fungal infections. *Value Health* 5:26–34.
- World Health Organization, WHO (1997). The world health report 1997 - conquering suffering, enriching humanity. Recuperado 03 de agosto del 2013 de: http://www.who.int/whr/1997/media_centre/50facts/en/
- World Health Organization, WHO (2000). Millennium Development Goals (MDGs). Recuperado 16 de Julio del 2013 de: http://www.who.int/topics/millennium_development_goals/en/
- World Health Organization, WHO (2008). What are the International Health Regulations? Recuperado 16 de Julio del 2013 de: <http://www.who.int/features/qa/39/en/index.html>
- YAMANAKA M., HARA K. & KUDO J. (2005) Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis. *Appl Environ Microbiol* 71:7589–7593.
- YANG W., SHEN C., JI Q., AN H., WANG J., LIU Q. & ZHANG Z. (2009) Food storage material silver nanoparticles interfere with DNA replication fidelity and bind with DNA. *Nanotechnology* 20, 085102.
- YOU J., ZHANG Y. & HU Z. (2011). Bacteria and bacteriophage inactivation by silver and zinc oxide nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 85:161–167
- YU D-G (2007). Formation of colloidal silver nanoparticles stabilized by Na⁺-poly(@c-glutamic acid)-silver nitrate complex via chemical reduction process. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*; 59:171-178.
- ZHAO G.J., STEVENS S.E. (1998) Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of *Escherichia coli* to the silver ion. *Biometals* 11:27–32. DOI:10.1023/A:1009253223055