



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD LEÓN

CAMPO DEL CONOCIMIENTO DE CIENCIAS ODONTOLÓGICAS: BIOMATERIALES

**Análisis del efecto de nanopartículas de plata y dióxido de titanio  
en la inhibición de *Candida albicans* mediante RNA-seq**

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

PALOMA NETZAYELI SERRANO DÍAZ

TUTOR: Dra. Laura Susana Acosta Torres ENES LEÓN

COTUTOR Julio Vega Arreguín ENES LEÓN

León, Gto.

Enero 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# Dedicatorias

*A Dios, a la vida, al universo,*

*A mis padres Javier y Francisca, por ser mi pilar en la vida. Por haberme apoyado en todo momento, por la motivación constante, pero más que nada, por su amor.*

*A mis hermanas Isabel, Citlalli, Mónica, Celeste y Verónica, por ser las mejores amigas y por su apoyo incondicional, por creer en mí.*

*A cada una de esas personas que me enseñaron durante estos dos años, que han sido ejemplo de vida y de ser humanos.*

*Finalmente, pero no menos importantes a mis profesores, aquellos que marcaron y dejaron en mí algo de ellos. Dra. Laura Acosta, Dra. Cony Arenas, Dr. René García, Dra. Blanca Millán, Dr. Víctor Castaño, Dra. Genoveva, Dra. Ana María Presas, Dr. David Williams, y que me ayudaron en asesorías.*

*¡a todos ustedes!*

# Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad de crecimiento profesional y personal.

Agradecimiento a la ENES Unidad León de la UNAM por brindarme la oportunidad de seguir siendo parte de esta comunidad, mi Escuela.

Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) DGAPA/UNAM PAPIIT-TA200414

Programa de Apoyo a Proyectos para la Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME) DGAPA/UNAM PAPIME-PE202214

Agradecimiento a la Mtra. Lourdes Palma Tirado por la realización del análisis de Microscopía Electrónica de Transmisión.

Al Dr. David Williams y a su grupo de investigación: Dr. Daniel Morse, Dr. Joshua Twigg por la confianza al abrirme las puertas en su laboratorio de investigación en la Universidad de Cardiff en Reino Unido. Por compartir tanto conocimiento y no solo académico. Por permitirme ver el mundo, la vida, la ciencia desde otra perspectiva, por haber revolucionado mi mundo.

Gracias por la experiencia de una estancia de investigación que marcó mi vida y me enseñó que la ciencia es un idioma universal, y que mientras estés haciendo lo que te gusta las jornadas largas o los fracasos son parte de la experiencia del crecimiento personal.

Al Dr. Julio Vega Arreguín por su apoyo científico en todo momento.

A la Dra. Laura Acosta por su apoyo incondicional y ser una persona inspiradora.

## Índice

<b>Lista de abreviaturas</b> .....	6
<b>Resumen</b> .....	8
<b>Abstract</b> .....	9
<b>Introducción</b> .....	10
<b>Marco teórico</b> .....	12
<b>Antecedentes</b> .....	21
<b>Planteamiento del problema</b> .....	23
<b>Pregunta de investigación</b> .....	24
<b>Justificación</b> .....	25
<b>Objetivo</b> .....	26
<b>Hipótesis</b> .....	27
<b>Metodología de la investigación</b> .....	28
<b>Material y método</b> .....	29
<b>Etapa 1: Síntesis y caracterización de nanopartículas</b> .....	30
Síntesis y caracterización de AgNPs.....	30
Síntesis y caracterización de nanopartículas de dióxido de titanio.....	32
<b>Etapa 2: Estudio del efecto antifúngico de AgNPs y TiO<sub>2</sub>NPs en <i>Candida albicans</i>: planctónica y en biopelícula</b> .....	35
Actividad antifúngica de las nanopartículas de plata y dióxido de titanio en <i>Candida</i> spp.....	35
Ensayo de difusión en agar.....	35
Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	36
Microscopía con tinción BacLight™ LIVE / DEAD®.....	39
Concentración mínima de erradicación de biopelícula (CMEB).....	40
CDC biofilm biorreactor.....	41
Microscopía confocal de barrido láser (CLSM) de biopelículas de <i>Candida albicans</i> .....	42
SEM de las biopelículas de <i>Candida albicans</i> expuestas a nanopartículas.....	42
<b>Etapa 3: Citotoxicidad de AgNPs y TiO<sub>2</sub>NPs en FGH y co-cultivo</b> .....	43
Determinación de la actividad citotóxica.....	43
Efecto de AgNPs y TiO <sub>2</sub> NPs en co-cultivo celular de <i>Candida albicans</i> y FGH.....	44
<b>Etapa 4: Estudio de perfil transcriptómico de <i>Candida albicans</i></b> .....	46
Efecto de AgNPs en el crecimiento de <i>Candida albicans</i> a las 24 horas.....	47
Extracción de RNA y cuantificación de <i>Candida albicans</i> para su estudio mediante la expresión de genes mediante secuenciación de RNA en contacto con nanopartículas de plata.....	50
<b>Resultados y Discusión</b> .....	50
<b>Etapa 1: Síntesis y caracterización de nanopartículas</b> .....	53
Síntesis y caracterización de AgNPs.....	53
Síntesis y caracterización de nanopartículas de dióxido de titanio.....	54
<b>Etapa 2: Estudio del efecto antifúngico de AgNPs y TiO<sub>2</sub>NPs en <i>Candida albicans</i>: planctónica y en biopelícula</b> .....	55
Actividad antifúngica de las nanopartículas de plata y dióxido de titanio en <i>Candida</i> spp.....	55

Ensayo de difusión en agar .....	55
Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	57
Microscopía con tinción BacLight™ LIVE / DEAD®.....	60
Concentración mínima de erradicación de biopelícula (CMEB).....	62
CDC biofilm biorreactor.....	63
Microscopía confocal de barrido láser (CLSM) de biopelículas de <i>Candida albicans</i> .....	64
SEM de las biopelículas de <i>Candida albicans</i> expuestas a nanopartículas.....	64
<b>Etapa 3: Citotoxicidad de AgNPs y TiO<sub>2</sub>NPs en FGH y co-cultivo</b> .....	67
Determinación de la actividad citotóxica.....	67
Efecto de AgNPs y TiO <sub>2</sub> NPs en co-cultivo celular de <i>Candida albicans</i> y FGH.....	72
Etapa 4: Estudio de perfil transcriptómico de <i>Candida albicans</i> .....	75
Efecto de AgNPs en el crecimiento de <i>Candida albicans</i> a las 24 horas .....	75
Extracción de RNA y cuantificación de <i>Candida albicans</i> para su estudio mediante la expresión de genes mediante secuenciación de RNA en contacto con nanopartículas de plata.....	75
<b>Conclusiones</b> .....	102
<b>Referencias</b> .....	105
<b>Anexos</b> .....	115

## Lista de abreviaturas

nm.- Nanómetros

NPs.- Nanopartículas

AgNPs- Nanopartículas de plata

TiO<sub>2</sub>NPs.- Nanopartículas de dióxido de titanio

PMMA.- Polimetil metacrilato

DNA.- Ácido desoxirribonucleico

RNA.- Ácido ribonucleico

mRNA.- Ácido ribonucleico mensajero

cDNA.- Ácido desoxirribonucleico complementario

FGH.- Fibroblastos gingivales humanos

D.O.- Densidad óptica

DMSO.- Dimethyl sulfoxide / Dimetil sulfóxido

h.- Horas

TEM.- Transmission Electron Microscopy / Microscopía Electrónica de Transmisión

UV-Vis.- Ultra Violet Visible Light / Luz Ultra Violeta Visible

XRD.—Difracción de rayos X

SEM.- Scanning Electron Microscopy /Microscopía Electrónica de Barrido

CMI.- Concentración mínima inhibitoria

MTT.- 3-2,5-diphenyltetrazolium bromide

PBS.- Tampón Fosfato Salino

PMMA.- Polimetil metacrilato

CLSI.- Clinical and Laboratory Standards Institute

ATCC.- American Type Culture Collection

MOPS.- *3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid*

DEPC.- Dietilpirocarbonato

CLSM.-Confocal Laser Scanning Microscopy/ Microscopia Confocal de Barrido Láser

CMEB.- Concentración mínima inhibitoria de erradicación de biopelícula

CDC Bioreactor.- Center for Disease Control (CDC) Bioreactor

MAPK.- Mitogen-activated protein kinase / Proteínas quinasas activadas por mitógenos

CHC- Candidiasis crónica hiperplásica

SCC- Carcinoma de células escamosas

CAC- Candidiasis crónica atrófica

PMC- Candidiasis pseudomembranosa

rpm.- Revoluciones por minuto

$\lambda$ .- Longitud de onda

$\mu$ L.- Microlitros

mL.- Mililitros

Mg.- Miligramos



## Resumen

**Introducción:** La microbiota de la cavidad bucal es compleja, aislando más de 700 especies. La mayoría de las bacterias residentes en la cavidad oral son compatibles con la salud del huésped, entre estos, *Candida albicans*, que es parte de la microbiota habitual; sin embargo, también es uno de los patógenos infecciosos más importantes que causan varias formas de candidiasis.

**Objetivo:** El objetivo de la presente investigación fue estudiar el efecto global de la respuesta génica de las nanopartículas de plata (AgNPs) y dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>) en *Candida albicans* (ATCC 90028), así como el efecto antifúngico y la citotoxicidad en células orales como fibroblastos gingivales humanos (FGH) ATCC CRL-2014.

**Método:** AgNPs y TiO<sub>2</sub>NPs se sintetizaron mediante el método de reducción química y el método sol-gel respectivamente. Se realizó la caracterización de TEM, XRD y UV-Vis. Se realizaron pruebas de susceptibilidad y difusión de agar en *Candida albicans*. Los AgNPs se agregaron a concentraciones de 0.10 mg / mL a 1.62 mg / mL y para TiO<sub>2</sub>NPs de 0.5 a 5 mg / mL incubados a 37°C durante 24 h. Se midieron las zonas de absorbancia e inhibición. La viabilidad celular de las líneas celulares de FGH se cuantificaron mediante el método MTT en placas de 96 pocillos y se incubaron a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h. Las células se trataron con AgNPs a diferentes concentraciones mencionadas anteriormente y se incubaron durante 24 h adicionales. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm. Se realizaron análisis estadísticos ANOVA de Una Vía y la prueba Tukey. Se realizó la extracción de RNA de *Candida albicans* tratada con AgNPs y el análisis transcriptómico utilizando RNA-seq.

**Resultados:** Se obtuvieron AgNPs esféricas con un tamaño de partícula en  $33.5 \pm 9.8$  nm y un pico de absorbancia UV-Vis en 420 nm. La concentración mínima inhibitoria fue de 0.020 mg / mL. El ensayo de citotoxicidad demostró para FGH (ATCC) un CC<sub>50</sub> de 1.06 mg / ml en AgNPs y en FGH (cultivo primario) efecto no citotóxico y hermético. La expresión génica diferencial se observó en varios genes regulados al alza, como ERG11, ERG3, PLD1, PHR1 implicados en la biosíntesis del ergosterol y diacilglicerol. Además de genes regulados a la baja, como ALS3, ALS1 que están implicados en la adherencia y SAP6, SAP4 y virulencia de *Candida albicans* sugiriendo un papel de estos genes en la respuesta celular a AgNPs.

**Conclusión:** El método de reducción química fue efectivo para obtener AgNPs esféricas. Los AgNPs mostraron efectividad contra *Candida albicans* y mostraron una actividad citotóxica moderada para el HGF. El análisis de RNA-seq indicó la expresión génica diferencial en varios genes afectados por el tratamiento con AgNPs. Estos resultados pueden conducir a aplicaciones potenciales de AgNPs en la mejora de materiales dentales.

## Abstract

**Introduction:** The microbiota of the oral cavity is complex, isolating more than 700 species. Most of the bacteria resident in the oral cavity are compatible with the health of the host. Among these, *Candida albicans*, which is part of the normal flora; however, it is also one of the most important infectious pathogens causing various forms of candidiasis.

**Objective:** The aim of the present research is to study the global gene response effect of AgNPs and titanium dioxide nanoparticles ( $\text{TiO}_2$ ) in *Candida albicans* (ATCC 90028) as well as anti-candida effect and cytotoxicity on oral fibroblast cells human gingival fibroblast (HGF) ATCC CRL-2014.

**Methods:** AgNPs were synthesized by chemical reduction method and  $\text{TiO}_2$ NPs using sol-gel method. TEM, XRD and UV-Vis characterization was performed. Agar diffusion and susceptibility tests were performed for *Candida albicans*. AgNPs were added at concentrations from 0.10 mg/mL to 1.62 mg/mL and for  $\text{TiO}_2$ NPs from 0.5 to 5 mg/mL incubated at 37°C for 24 h. Absorbance and inhibition zones were measured. Cell viability of HGF cell lines were seeded onto 96-well plate and incubated at 37°C in 5%  $\text{CO}_2$  for 24 h. Cells were then treated with AgNPs at different concentrations mentioned above and incubated for an additional 24 h. Absorbance was measured with a microplate reader at a wavelength of 570 nm. One-Way ANOVA and T-Student statistical analyses were performed. RNA extraction of *Candida albicans* treated with AgNPs was made and transcriptomic analysis using RNA-seq.

**Results:** Spherical AgNPs were obtained with a particle size in  $33.5 \pm 9.8$  nm and UV-Vis absorbance peak in 420nm. Minimum inhibitory concentration was 0.020 mg/mL. Cytotoxicity assay demonstrated for HGF(ATCC) a  $\text{CC}_{50}$  of 1.06 mg/mL for AgNPs and for HGF (primary culture) non-cytotoxic and slightly hermetic effect. Differential gene expression was observed in several upregulated genes such as ERG11, ERG3, PLD1, PHR1 involved in ergosterol and diacylglycerol biosynthesis. As well as downregulated genes such as ALS3, ALS1 for *Candida albicans* adherence and SAP6, SAP4 virulence genes. Suggesting a role of these genes in the cellular response to AgNPs.

**Conclusion:** Geranium leaf assisted method was effective for obtaining spherical AgNPs. AgNPs showed effectivity against *Candida albicans* and showed moderate cytotoxic activity for HGF. RNA-seq analysis indicated differential gene expression in several genes affected by the AgNPs treatment. These results may lead to potential applications of AgNPs in the enhancement of dental materials.

# Introducción

*Candida albicans* es un microorganismo que existe en armonía con otros miembros del microbiota. Sin embargo, existen cambios que alteran su balance, por ejemplo, variaciones del pH en el medio local, el uso de antibióticos o alteraciones del sistema inmunológico causado por infección o terapia inmunosupresiva pueden propiciar la proliferación rápida de *Candida albicans* y causar infecciones (Vande Velde, Kucharíková, Schrevens, Himmelreich, & Van Dijck, 2014).

*Candida albicans* es la especie fúngica más predominante de todas las especies fúngicas que se aíslan de dispositivos médicos incluyendo catéteres, marcapasos, válvulas cardíacas, prótesis articulares, lentes de contacto así como de prótesis dental (Kojic & Darouiche, 2004). *Candida albicans* forma biopelículas bien estructuradas compuestas por múltiples tipos celulares (células redondas de levaduras, células de pseudohifas ovaladas, así como células de hifas alargadas) embebidas en una matriz extracelular. Biopelículas de *Candida albicans* son resistentes a antifúngicos, haciendo las infecciones difíciles de combatir. Los cuatro grupos de antifúngicos más utilizados para el tratamiento de infecciones micóticas son los azoles, polienos, equinocandinas y análogos de nucleósidos (Gulati & Nobile, 2016). Los azoles, no son efectivos ante biopelículas de *Candida albicans*, lo cual limita la variedad de antimicrobianos para combatir estas infecciones y remarca la necesidad del desarrollo de nuevas formas para terapéutica antifúngica (Silva, Rodrigues, Araújo, Rodrigues, & Henriques, 2017).

Las nanopartículas, actualmente son consideradas una alternativa a los antibióticos y parecen tener alto potencial como opción a la problemática de resistencia bacteriana (Rai, Deshmukh, Ingle, & Gade, 2012). Las partículas metálicas de tamaño nanométrico, muestran propiedades físicas y químicas específicas, que permiten la creación de nuevos materiales, herramientas y sistemas nanométricos con múltiples aplicaciones en biología y medicina entre ellas su aplicación en el control de proliferación de microorganismos interviniendo en los mecanismos de

funcionamiento celular de bacterias y hongos (Salata, 2004).

El mecanismo de acción antimicrobiano de las nanopartículas de plata no ha sido completamente dilucidado sin embargo se sabe que los iones de plata se unen a proteínas y ácidos nucleicos que están cargados negativamente causando cambios estructurales y deformaciones en estructuras como la pared bacteriana así como formando especies reactivas de oxígeno (Franci et al., 2015). Mediante especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como radicales hidroxilo, anión superóxido así como peróxido de hidrogeno, las partículas de dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub> NPs) cuando se ponen en contacto con la superficie del microorganismo promueven la peroxidación de los fosfolípidos poliinsaturados, que es el principal componente lipídico de la membrana del microorganismo (Maness et al., 1999). Mediante microscopia electrónica de barrido se ha reportado que la lisis del microorganismo tiene lugar a través del daño a la pared celular ocasionada por el radical hidroxilo (OH) (Hernday, Tuch, Andes, & Alexander, 2013).

El genoma de los seres vivos es el conjunto de genes que se encuentran distribuidos en cromosomas. La información genética cifrada en el núcleo celular se expresa a través de los mecanismos de transcripción y traducción (Bruce et al., 2015). La transcripción es un proceso en función del estímulo intracelular o extracelular que conlleva a la expresión y represión de genes en respuesta al estímulo (Sedano, Carolina, Carrascal, & Ernesto, 2012). Algunas herramientas han permitido estudiar el perfil transcriptómico de *Candida albicans* utilizando tecnologías de secuenciación masiva (NGS), entre ellas RNA-seq el cual es un método que permite secuenciar, descubrir y cuantificar las transcripciones de ARN en todo el transcriptoma (Bruce et al., 2015), lo cual, ha permitido describir diferencias entre dos condiciones en diferentes especies estudiadas aplicando tratamientos con nanopartículas (Gliga, Di Bucchianico, Lindvall, Fadeel, & Karlsson, 2018).

El objetivo de la presente investigación es estudiar el efecto biológico y en la expresión de genes de las nanopartículas de plata y dióxido de titanio en *Candida albicans*.

# Marco teórico

## *Candida albicans*

*Candida albicans* es una levadura dimórfica que presenta dos fases: la primera, fase de levadura de morfología redonda-ovoide, con un tamaño aproximado entre 4-6 µm. Y la segunda fase, la micelial que se compone de hifas. La determinación del crecimiento de una fase u otra depende de nutrientes, condiciones de temperatura; en medios ricos en nutrientes y a 37° C se ha observado una fase levadura.

*Candida albicans* se compone de un genoma diploide de 8 cromosomas homólogos en los cuales están organizados 14.4 megabases (Fraser & Fraser, 2015). Es una especie heterocigota, lo cual se ha relacionado con su patogenicidad así como su inestabilidad genómica proveniente de las diferencias alélicas que producen diferencias estructurales y funcionales en las proteínas codificadas; propiciando mutaciones de pérdida de heterocigocidad lo cual proporciona ventajas fenotípicas (Satpati, Manohar, Acharya, & Dixit, 2017).

Es residente habitual de la microbiota humana. Sin embargo bajo condiciones que rompen la homeostasis tales como cambios de pH, cambios nutricionales o alteraciones en el sistema inmunológico dan lugar a rápida proliferación de *Candida albicans* (Gulati & Nobile, 2016). Siendo la especie mas aislada en candidiasis. Los rangos en porcentaje de la colonización de *Candida albicans* oscila en un rango del 20 al 40% en sujetos sanos y se convierte en una cifra predominante en la flora de sujetos inmunocomprometidos que oscila a más del 60% (Signoretto et al., 2009).

## **Candidiasis oral**

*Candida* es el nombre abreviado que se usa para describir una clase de hongos que incluye más de 150 especies de levadura. En individuos sanos, *Candida* es parte de la microbiota de mucosas tales como como las orejas, los ojos, el tracto

gastrointestinal, la boca, la nariz, los órganos reproductivos, los senos paranasales, la piel, la vagina, etc. Cuando ocurre un desequilibrio en la microbiota normal, causa un crecimiento excesivo de *Candida albicans* (Kagan et al, 2013).

*Candida albicans* se encuentra en 60% de los pacientes desdentados mayores de 60 años de edad. En la cavidad oral existen diversas especies de *Candida* entre estas: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. tropicalis*. El término de Candidiasis; es una infección fúngica (micosis) de cualquiera de las especies de *Candida*, de las cuales *Candida albicans* es la más común (Aitken-Saavedra et al, 2018).

La colonización y formación de biopelículas de *Candida albicans* se ha descrito de la siguiente manera: Comienza con la adhesión de células redondas de levaduras a una superficie sólida que se presenta dentro de los primeros 60-90 min. El siguiente paso consiste en la proliferación celular, así como una etapa temprana de filamentación de las células adheridas. Por último, le sigue una etapa de maduración de la biopelícula resultando en una red compleja de varias capas de células polimórficas, incluyendo hifas, pseudohifas y levaduras encapsuladas en una matriz extracelular dando una apariencia estructurada, así como protectora de agentes físicos o químicos. La última etapa es la fase dispersión en la que levaduras colonizan nuevos nichos (Gulati & Nobile, 2016).

### **Resistencia de *Candida albicans* ante tratamiento de antifúngicos**

Con el descubrimiento de los antibióticos a finales del siglo XX se resolvió una gran necesidad a nivel mundial, el tratamiento en infecciones causadas por microorganismos que conllevaban a epidemias y con ello alta mortandad repercutiendo a su vez en una mayor incidencia de infecciones causadas por hongos (Ferrari et al, 2012).

Los principales grupos de antifúngicos utilizados en la clínica para el tratamiento de candidiasis son equinocandinas, azoles, análogos de nucleósidos, polienos sin

embargo en la actualidad nos enfrentamos a la problemática en relación a la terapéutica aplicada debido a su reportada resistencia a tratamientos actuales (Gulati *et al*, 2016) . Se han hecho estudios para profundizar en el conocimiento de los mecanismos de resistencia adquiridos por *Candida* en los que se incluyen mecanismos desconocidos u otros mecanismos como la mutación de genes que regulan la síntesis de proteínas como se describen en la Tabla 1 (Ferrari *et al.*, 2012). En la actualidad se siguen estudiando tanto *in vitro* como clínicamente nuevos agentes antifúngicos que puedan ser utilizados en el tratamiento de este tipo de infecciones, con el fin de mejorar los existentes o descubrir nuevas dianas celulares y que además sean seguros en su aplicación (Wiederhold *et al*,2017), entre estos, y con el impacto de la llegada de los nanomateriales han sido propuestas las nanopartículas como agentes antimicrobianos (Ip *et al*, 2006).

**Tabla 1.-** Antifúngicos utilizados en la terapéutica clínica, mecanismo de acción y resistencia (Wiederhold *et al*, 2017).

Agente antifúngico	Mecanismo de acción y diana celular	Mecanismo de resistencia
<b>Polienos</b>	Unión al ergosterol	Ausencia de ergosterol (perdida de la función, mutación en ERG3 o ERG6)
<b>Azoles</b>	Inhibición de la función del citocromo p450:	Flujo de salida mediado por transportadores de múltiples fármacos, disminución de la afinidad en Erg11p por mutaciones, alteraciones en la vía biosintética del ergosterol.
<b>Alilamina</b>	Inhibición de la escualeno epoxidasa (ERG1)	Desconocido
<b>Morfolina</b>	Inhibición de la esterol $\Delta$ 14 reductasa (ERG24) y la $\Delta$ 7-8 isomerasa (ERG2)	Desconocido

<b>Análogos de los nucleósidos</b>	Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos.	Defecto en la citosina permeasa. deficiencia o falta de enzimas implicadas en el metabolismo de 5-FC, desregulación de la vía biosintética de pirimidina
<b>Equinocandinas</b>	inhibición de la $\beta$ -1,3 glucano sintasa (FKS1 y 2)	Alteración de la afinidad de las equinocandinas para $\beta$ (1,3) - glucano sinteasa.

## Nanomateriales

Los materiales nanoestructurados tienen propiedades fisicoquímicas únicas como su tamaño controlable, gran área de superficie, alta reactividad, interacciones biológicas únicas y estructuras funcionalizables (Zhang, Liu, Shen, & Gurunathan, 2016). La nanotecnología es una tecnología del siglo XXI que ha impactado en la vida cotidiana por sus diversas aplicaciones en diversas áreas tales como: medio ambiente, electrónica, cosmética, industria textil, medicina; esta última como transportadores de medicamentos e incluso como alternativa a agentes antimicrobianos (Raghunath et al, 2017).

Las nanopartículas, se definen como nanoestructuras que van de un tamaño de 1-100 nm (Bapat et al., 2018) las cuales son obtenidas mediante procesos químicos o biológicos a partir de un precursor tales como la plata, oro, zinc, titanio, entre otros, que han demostrado ser efectivas ante diversos microorganismos; por ejemplo la capacidad microbicida de nanopartículas de plata (AgNPs) se ha evaluado sobre diversos microorganismos, tales como *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Vibrio cholerae*, *Enterobacter cloacae*, *Candida albicans*, *S. epidermidis*, *S. epidermidis resistente a meticilina* y *S. aureus resistente a meticilina* (Shahverdi, Fakhimi, Shahverdi, & Minaian, 2007).



En la actualidad se han empezado a utilizar las nanopartículas de plata (AgNPs) en diferentes aplicaciones médicas, entre ellas, en soluciones tópicas o bien inmovilizadas en dispositivos médicos (Naderi, Karponis, Mosahebi, & Alexander M. Seifalian, 2018) o en el área odontológica se ha añadido a materiales tales como el polimetilmetacrilato (PMMA) demostrando ser antifúngicos (Acosta-Torres, Mendieta, Nuñez-Anita, Cajero-Juarez, & Castaño, 2012).

### **Nanopartículas metálicas y óxido metálicas**

Las nanopartículas metálicas surgen a partir de precursores de metales, debido a su característico plasmón de resonancia localizado; poseen propiedades fotoeléctricas únicas (Raghunath & Perumal, 2017).

Las nanopartículas óxido metálicas son un tipo de nanopartículas que surgen de la combinación de óxidos con metales de los grupos 3-12 de la tabla periódica. Tienen aplicaciones como catalizadores, transportadores de fármacos, semiconductores además como agentes antimicrobianos debido en gran parte a su gran superficie de contacto (Raghunath & Perumal, 2017); su función antimicrobiana va relacionada al tamaño de la partícula y medio acuoso así como intensidad de la luz utilizada. Cabe destacar que el tipo de síntesis es de gran importancia ya que esto le brinda las características deseadas, entre estos métodos de síntesis se encuentran: sol-gel, química, biosíntesis y electroquímica por mencionar algunas (Nel, 2007).

El mecanismo de acción antimicrobiano no ha sido dilucidado completamente, se ha reportado que se debe a la combinación de diversos mecanismos entre ellos: generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), interacciones electroestáticas, daño a proteínas y enzimas, fotólisis y genotoxicidad (Han et al., 2018)

## **Nanopartículas de plata**

Las nanopartículas de plata (AgNPs) han sido ampliamente estudiadas en el área biomédica debido a su amplio uso por sus propiedades antimicrobianas. Se ha estudiado su efecto en más de 650 especies de microorganismos, entre ellos levaduras como *Candida albicans*. Se han reportado diversas formas de sintetizar este tipo de nanopartículas metálicas entre ellas síntesis a partir de componentes de microorganismos, síntesis química, síntesis asistida por plantas (Makarov et al., 2014)

El mecanismo de acción antimicrobiano no ha sido dilucidado completamente sin embargo se ha reportado que formas más comunes de acción pueden ser la absorción libre de iones de plata causando desnaturalización y oxidación de la pared celular propiciando daño en organelos lo que conlleva a lisis celular. la alteración de ATP y la prevención de la replicación del ADN ya que modifica el perfil de fosfotirosina de los péptidos interrumpiendo la transducción de señales evitando la multiplicación de microorganismos así la formación de especies reactivas de oxígeno (Dayem et al., 2017).

## **Nanopartículas de dióxido de titanio**

Las nanopartículas de dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>NPs) son nanopartículas sintetizadas a partir de un precursor de titanio. Existen tres fases cristalinas de titanio: anatasa, brookita y rutilo. Dependiendo de la disposición de los átomos es la fase que se obtendrá la cual también va en función al tipo de síntesis, así como tratamientos aplicados tales como la temperatura. Existen diversos métodos para la obtención de estas nanopartículas, como el método por sol-gel (Gupta et al., 2011).

El efecto antimicrobiano de las TiO<sub>2</sub>NPs, por ser altamente fotocatalíticos, se ha reportado que al estar en contacto con una fuente de luz ultravioleta se potencializa

su efecto antimicrobiano debido a que el efecto de la luz conducirá a la alteración fotoquímica de la membrana celular, la permeabilidad de  $\text{Ca}_2^+$ , la disminución en la actividad de la superóxido dismutasa (SOD), el daño a las proteínas / ADN y la división celular anormal. Generación de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  es la razón principal en donde la generación y liberación de electrones ocurre a través de la luz. Estos electrones son atrapados por  $\text{TiO}_2\text{NPs}$  generando más ROS (Vatansever et al., 2013).

Se ha reportado que en ensayos antimicrobianos en diferentes bacterias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans* la adición de luz UV debido a la generación de ROS, propicia el efecto antimicrobiano debido a la naturaleza foto catalítica de  $\text{TiO}_2\text{NPs}$  propiciando lisis de microorganismos en presencia de  $\text{TiO}_2\text{NPs}$  variando de microorganismo a microorganismo dependiendo de su estructura como grampositivo o gramnegativo (Ranjan et al, 2016).

## **Secuenciación**

El ADN es una doble hélice. Cada una de las hélices es un polímero integrado por millones de nucleótidos que son los monómeros del polímero. Cada nucleótido está formado por una desoxirribosa, una base púrica o pirimídica y un grupo fosfato. Las dos cadenas de ADN son anti paralelas y se unen entre sí a través de puentes de hidrógeno que se forman entre las bases complementarias (A·T y G·C) de las dos hebras del ADN. Obteniendo una estructura tipo doble hélice, donde las bases de los nucleótidos se encuentran orientadas hacia el interior, mientras que los grupos fosfato y las desoxirribosas lo hacen hacia el exterior, formando los esqueletos fosfodiéster de cada hélice (Henry et al., 2008).

Las funciones de los ácidos nucleicos son de almacenamiento, expresión y replicación de la información biológica. Los genes son secuencias de ADN que contienen toda la información necesaria para sintetizar las proteínas, moléculas esenciales que realizan todas las funciones celulares. El ADN de una determinada especie de organismos tiene una secuencia de bases propia: su estructura primaria

está agrupada en unidades funcionales llamadas genes. Cuando un gen se activa para dar lugar a su proteína correspondiente ese gen se está expresando en esa célula (Aris, 2012). De acuerdo al dogma central de la biología molecular la expresión de la información hereditaria fluye de la secuencia genómica de DNA y pasa a RNA mensajero y por ultimo pasa a ser una manifestación fenotípica en la forma de un polipéptido funcional (Farrell, 2010).

El primer paso en la síntesis de proteínas es la síntesis de una molécula de ARN mediado por la enzima ARN polimerasa, en dirección 5' a 3'a partir de un segmento de una de las cadenas del ADN. En la transcripción, el orden de los desoxirribonucleótidos de uno o varios genes se transfiere uno por uno a una secuencia de ribonucleótidos complementaria. El estudio del RNA comenzó a la par que el estudio con DNA. En los eucariontes, los ARN transcritos son transportados del núcleo al citoplasma, a través de la membrana nuclear. Además, los genes de los eucariontes contienen intrones, estructuras de ADN que interrumpen la región del gen que codifica para la proteína (exón). Al transcribirse un gen en los núcleos de las células de los eucariontes, el ARN resultante incluye tanto las regiones de los intrones como las de los exones. Esta molécula de ARN se “procesa” para dar lugar al mRNA maduro que se exporta del núcleo de la célula al citoplasma, donde luego se traduce en proteína (Alberts, 2015).

El avance en la secuenciación de los ácidos nucleicos ha sido una herramienta que ha generado muchos conocimientos en el campo de la genómica. Hasta el 2001 se habían reportado los genomas completos de 599 virus, 185 organelos, 31 eubacterias, 7 arqueobacterias, un hongo, dos animales y una planta (Internacional Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Esta información nos ha permitido entender como se asocian las enfermedades con la variabilidad genética, la función de genes caracterizados en otros organismos, el patrón de expresión de genes nuevos, el aislamiento de genes específicos por reacción en cadena de la polimerasa, la similitud o variación genética entre especies diferentes, la organización de la información genética, el origen de algunos genes (Wang et al, 2009).

## **RNAseq**

El transcriptoma es el conjunto de transcritos en una célula bajo cierta condición específica que incluye mRNA, RNAs no codificantes, así como pequeños RNAs. Se han desarrollado varias herramientas para su estudio entre estas los microarreglos los cuales son superficies de sílices en las cuales esta ancladas oligos de los cuales ya se tiene conocimiento y que al momento de colocar la muestra van a hibridar con sus oligos complementarios; posteriormente pasan a través de equipos especializados que cuantifican mediante fluorescencia los genes expresados, dependiendo de la intensidad de la misma es la expresión o supresión de los genes implicados (Sedano et al., 2012).

Existe otra herramienta de reciente aparición que además de tener ventajas sobre la herramienta anterior también permiten cuantificar y determinar la secuencia de cDNA. Es un método por el cual el RNA total es convertido a cDNA., cada molécula con o sin amplificación es secuenciada de manera masiva; se pueden obtener secuenciaciones sencillas o dobles. Las lecturas van típicamente de 30-400 bp, dependiendo del equipo utilizado, entre estos están Illumina IG, SOLID, así como Roche 454. Resultado de la secuenciación se obtienen lecturas en referencia a un transcriptoma para producir un mapa que contiene tanto estructura del transcriptoma, así como el nivel de expresión de cada gen (Zhang, 2009).

## Antecedentes

RNA seq ha sido utilizado en diversos estudios para analizar el efecto en la expresión de genes en células y microorganismos de materiales antimicrobianos, entre estas nanopartículas. El efecto de nanopartículas metálicas: AgNPs, TiO<sub>2</sub>NPs, ZnONPs, así como quantum dots (QDs) en *Chlamydomonas reinhardtii* mediante RNAseq, arrojando resultados en los cuales se observó que altos niveles de transcritos en genes de estrés se vieron inducidos, solo ZnONPs causó estrés global no específico (Simon, 2016).

El análisis de RNAseq también ha sido utilizado en organismos como levaduras, específicamente en *Candida albicans*. El mecanismo antifúngico del aceite de ajo fue estudiado en el cual se obtuvieron dos grupos: el primero el grupo control donde no se aplicó ningún tratamiento a la levadura y el segundo grupo, el grupo experimental al cual se aplicó el tratamiento de aceite de ajo. En el grupo tratado observaron que se indujo la expresión de genes de gran importancia entre los que destacan los implicados en procesos de óxido-reducción, patogénesis, así como de respuesta celular a fármacos. Principalmente genes 19KEGG de la vía metabólica que tiene que ver con procesos celulares vitales como fosforilación oxidativa, ciclo celular, así como distribución de proteínas en el retículo endoplásmico. Conllevando a un mal funcionamiento metabólico en *Candida albicans* (Li, 2016).

RNAseq también se ha utilizado para el estudio del efecto de nanopartículas en células tal como en el estudio que se llevo a cabo con FeO<sub>3</sub>NPs en células de branquias y de hígado en pez cebra. Los resultados arrojaron información de relevancia ya que mediante este método se observó que FeO<sub>3</sub>NPs inducen una respuesta inmune y de inflamación, así como estrés oxidativo, daño al DNA y apoptosis en las células del hígado. Lo cual demostró que mediante este tipo de estudios al analizar los genes que se expresan diferencialmente se puede tener información acerca de la respuesta al estímulo con algún agente en células y microorganismos; por lo tanto, comprender mecanismo de acción (Zheng, 2018).

## **Planteamiento del problema**

La falta de conocimiento a nivel molecular del efecto AgNPs y TiO<sub>2</sub>NPs como agentes antimicrobianos debido a la incidencia de infecciones micóticas causadas por *Candida albicans* y a la creciente resistencia a antimicrobianos convencionales que han generado nuevas estrategias para disminuir la colonización de los microorganismos.

## **Pregunta de investigación**

¿Cuáles son los genes que se expresan diferencialmente en *Candida albicans* después de estar en contacto con AgNPs y TiO<sub>2</sub>NPs a concentraciones antifúngicas y no citotóxicas?

## **Preguntas específicas**

¿Qué efecto antimicrobiano presentará cada uno de los grupos de nanopartículas?

¿Cuál es el grado de citotoxicidad de las AgNPs y TiO<sub>2</sub>NPs en fibroblastos gingivales humanos (FGH)?

¿Cómo reaccionará *Candida albicans* ante los agentes antimicrobianos?

¿ Cuáles son los genes que se expresan en *Candida albicans* y cuáles no se expresan al estar en contacto con AgNPs y TiO<sub>2</sub>NPs?



## **Justificación**

Al identificar el mecanismo de acción molecular de las AgNPs y TiO<sub>2</sub>NPs en la inhibición de *Candida albicans* se podría proponer con certeza el uso de nanopartículas como una alternativa terapéutica ante la creciente resistencia de las infecciones micóticas sin ocasionar daños en el hospedero.

# Objetivo

Identificar el mecanismo de acción bajo dosis no citotóxicas y antifúngicas por el cual *Candida albicans* es inhibida por las AgNPs y TiO<sub>2</sub>NPs mediante el análisis el transcriptoma con RNA-seq.

## Objetivos específicos

1. Sintetizar AgNPs por la técnica química asistida por infusión de geranio y TiO<sub>2</sub>NPs-anatasa mediante la técnica sol-gel.
2. Determinar morfología y tamaño de partícula de las AgNPs y TiO<sub>2</sub>NPs mediante UV-VIS y TEM.
3. Analizar el efecto antifúngico de las nanopartículas sobre *Candida albicans* planctónica, en biopelícula así como en 19 cepas de *Candida* spp.
4. Evaluar la citotoxicidad de las AgNPs y TiO<sub>2</sub>NPs para determinar qué tipo de nanopartículas tiene mejor desempeño antifúngico sin causar toxicidad en cultivos de FGH.
5. Analizar mediante RNA-seq los cambios en la expresión global de genes en *Candida albicans* al aplicar AgNPs, así como de TiO<sub>2</sub>NPs respectivamente.

## **Hipótesis**

Las AgNPs y TiO<sub>2</sub>NPs tienen efecto sobre *Candida albicans* en la expresión de genes que se observan en la levadura sin alterar la biocompatibilidad de los FGH.

# Metodología de la investigación

## Diseño de estudio

Tipo de estudio: Experimental

Diseño de estudio: Puro, descriptivo, prospectivo, comparativo.

Universo de estudio

- A. Agentes antimicrobianos: AgNPs y TiO<sub>2</sub>NPs
- B. Microorganismo: *Candida albicans* ATCC 92800
- C. Tipo de muestra: No probabilística

Criterios de selección:

D. Criterios de inclusión:

- a. Agentes antimicrobianos: AgNPs esféricas (20-50 nm) y TiO<sub>2</sub>NPs (5-50 nm)
- b. Microorganismos: *Candida albicans*.
- c. Fibroblastos gingivales humanos cultivados *ex vivo* a una adecuada densidad celular.
- d. RNA extraído de *Candida albicans* que haya sido expuesto a AgNPs y TiO<sub>2</sub>NPs.

E. Criterios de exclusión

- a. Nanopartículas anisotrópicas.
- b. Especies de *Candida krusei*, *glabrata* y *tropicalis*.
- c. Fibroblastos con más de 10 divisiones celulares.
- d. RNA con nivel de absorbancia <2.0 del coeficiente 260/280

F. Criterios de eliminación

- a. Cultivos contaminados.
- b. Cajas Petri con superficies irregulares o áreas no sembradas en el agar.
- c. RNA que haya sido degradado o no este puro.

# Método

## Etapa 1: Síntesis y caracterización de nanopartículas

- ① Síntesis de AgNPs y TiO<sub>2</sub>NPs.
- ② Caracterización de nanopartículas mediante UV-Vis y TEM.

## Etapa 2: Estudio del efecto antifúngico de AgNPs y TiO<sub>2</sub>NPs en *Candida albicans*: planctónica y en biopelícula

- ③ Efecto antimicrobiano: ensayo de difusión en agar.
- ④ Ensayo de susceptibilidad antifúngica de AgNPs y TiO<sub>2</sub>NPs en *Candida albicans*
- ⑤ Ensayo de susceptibilidad antifúngica de AgNPs y TiO<sub>2</sub>NPs en 19 cepas de *Candida spp* y tinción BacLight.
- ⑥ Estudio de susceptibilidad de *Candida albicans* en biopelícula, observación del efecto de AgNPs en SEM, Microscopía Confocal.

## Etapa 3: Citotoxicidad de AgNPs y TiO<sub>2</sub>NPs

- ⑦ Determinación de la actividad citotóxica mediante ensayo MTT en *Candida albicans*.
- ⑧ Co-cultivo celular de FGH y *Candida albicans*

## Etapa 4: Estudio de perfil transcriptómico

- ⑨ Extracción de RNA de *Candida albicans*
- ⑩ Estudio del transcriptoma de *Candida albicans* en contacto con nanopartículas mediante RNA-seq.

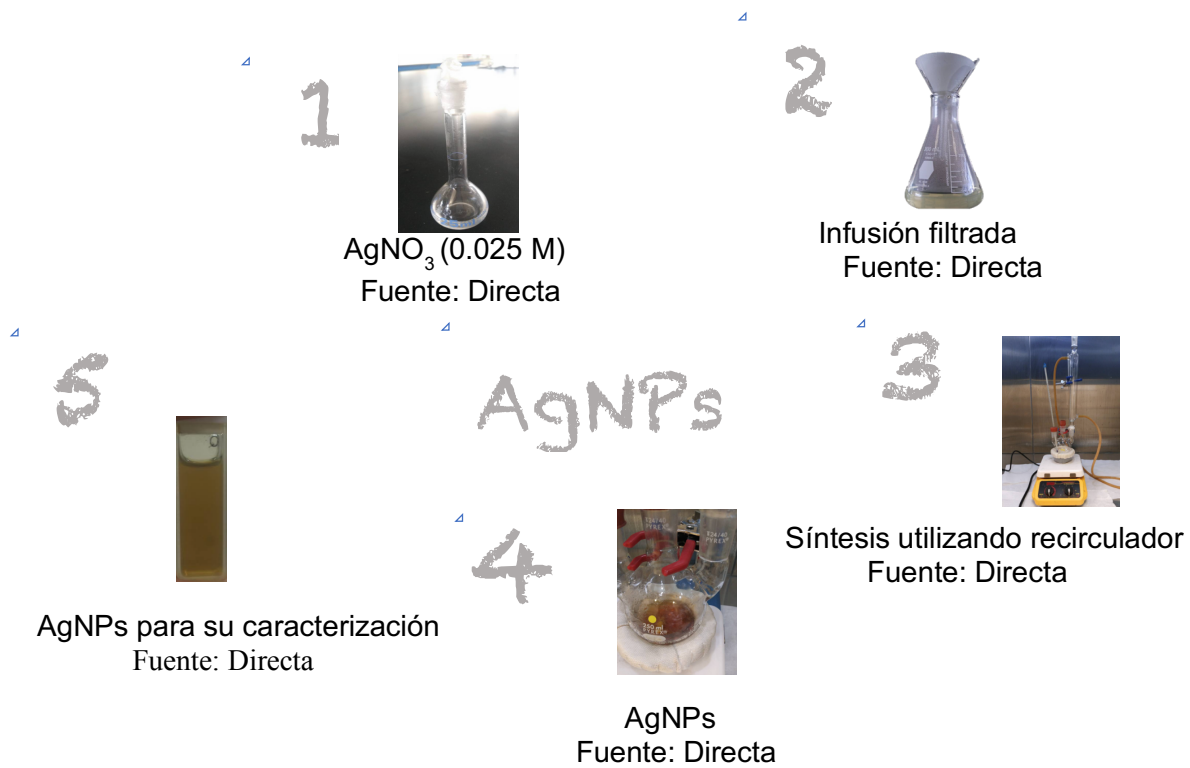
# **Etapa 1: Síntesis y caracterización de nanopartículas**

## **Síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs)**

La síntesis de AgNPs se realizó mediante síntesis química utilizando como precursor nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ; Sigma, México) y una infusión de geranio filtrada. El precursor fue preparado en un matraz graduado a una concentración molar de en la cual se pesaron 0.1061 g de  $\text{AgNO}_3$  y se agregaron 20 mL de agua desionizada. Para la infusión de geranio se pesaron 12.14 g de hojas tiernas de geranio y se colocaron en un vaso de precipitado con 100 mL de agua en ebullición por 5 minutos. Se obtuvieron 70 mL de infusión la cual se paso por un filtro de papel de espesor de 0.2  $\mu\text{m}$ . Se colocaron 20 mL de etilenglicol en un matraz y se llevo a ebullición a 185°C. Como agente reductor se adicionaron 5 mL de infusión de geranio previamente preparada y se dejó en agitación por 5 minutos. Posteriormente se incorporó la solución de  $\text{AgNO}_3$  una gota cada 2 min hasta obtener un cambio en la coloración de la solución (amarillo ámbar). Se llevó a cabo la síntesis por un periodo de 90 min. Obteniendo 20 mL de AgNPs.

## **Lavado de nanopartículas de plata**

En 4 tubos falcon se colocaron 5 mL de síntesis y se llevaron acabo 3 lavados. Para el primer lavado se añadió 1mL de alcohol etílico absoluto por cada mL de AgNPs. Se centrifugó por 10 min a 4600 rpm. Se retiró el sobrenadante y para el segundo lavado se utilizaron 1mL de alcohol por cada mL de AgNPs y se centrifugó por 10 min. Se retiró el sobrenadante y para el tercer lavado se agregaron 5 mL de agua desionizada a 4600 rpm. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las AgNPs en 2 mL de agua desionizada. Obteniendo 8 mL en total de AgNPs.



**Figura 1.** Representación del flujo para la síntesis de nanopartículas de plata.

## **Síntesis de Nanopartículas de dióxido de titanio**

### **Solución 1**

Alcohol isopropílico	1.5 mL
Ácido nítrico 70%	0.045 mL
Agua destilada	0.45 mL

### **Solución 2**

Alcohol isopropílico	1.2 mL
Isopropóxido de titanio 97%	2 mL

La solución 2 se agregó a la solución 1, la cual ya se encontraba bajo sonicación previamente por 3 min. Se tapó el recipiente donde se llevó a cabo la reacción y se dejó sonicando por 60 min. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente.

Se retiró el vial con el producto obtenido y se dejó reposar por 24 horas.

A las 24 horas se llevó a cabo el tratamiento térmico para el cual el gel obtenido se colocó en un mortero de porcelana y a 550° C en la mufla thermolyne por 3 horas.

Una vez que se transcurrieron las 3 horas se obtuvo un aglomerado de polvos grisáceos por lo que se molieron en el mismo mortero; debido a la coloración se decidió que se completaran las 24 horas a 550° C para obtener un polvo blanco que es indicativo de la fase cristalina deseada.

Una vez que se cumplieron las 24 horas se caracterizaron mediante UV-Vis, XRD, RAMAN y TEM.





**Figura 2.** Representación del flujo para la síntesis de nanopartículas de dióxido de titanio técnica sol-gel.

### Lavado de nanopartículas de dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>)

De la síntesis (en polvos) se resuspendió en etanol en un tubo falcon. Posteriormente se colocaron en ultrasonido por 10 min a una frecuencia de 40 Hz. Se agitaron por 10 min en vortex. Posteriormente se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min. El sobrenadante se decantó y se alternó el lavado con agua/etanol, se repitió la metodología 5 veces para eliminar exceso de reactantes.

## **Caracterización de nanopartículas mediante UV-Vis, TEM, Raman y XRD**

### **Espectroscopia de UV-Vis**

Se colocaron 200  $\mu\text{L}$  de nanopartículas y 1800  $\mu\text{L}$  de agua destilada en una celda de cuarzo y se analizó en un espectrofotómetro de UV-Visible Multiskan™ GO (Thermo Scientific™; Finland). Para las AgNPs se colocó en una absorbancia a una longitud de onda de 300-600 nm y para las TiO<sub>2</sub>NPs longitud de onda de 200-400 nm.

### **Microscopía Electrónica de Transmisión**

Se colocaron 10  $\mu\text{l}$  de AgNPs y de TiO<sub>2</sub> respectivamente en un eppendorf con 1.5 mL de agua destilada para obtener una solución la cual se colocó sobre una rejilla para microscopía y así permitir la evaporación de la muestra la cual posteriormente fue observada en un Microscopio Electrónico de Transmisión (JEOL-1010).

### **Difracción de rayos X (XRD)**

La muestra de TiO<sub>2</sub>NPs en polvo fue colocada en un portamuestras circular de vidrio Corning de aproximadamente 2.5 cm de diámetro. El equipo de rayos X utilizado fue de la marca Rigaku Miniflex con una radiación de Cu-K $\alpha$ , longitud de onda de 1.54 Å; de 10 a 70 en ángulo 2 theta .

### **Espectroscopía Raman**

Las muestras también se analizaron mediante espectroscopía Raman dispersiva en un aparato Senterra (Bruker) equipado con láser  $\lambda = 685$  nm y FT-Raman (Nicolet 910) con  $\lambda = 1064$  nm en el láser, junto con un microscopio Olympus. La muestra se depositó directamente sobre un soporte sin preparación adicional

## **Etapa 2: Estudio del efecto antifúngico de AgNPs y TiO<sub>2</sub>NPs en *Candida albicans*: planctónica y en biopelícula**

### **Ensayo de difusión en agar**

Se preparó agar Dextrosa Sabouraud (Oxoid LTD) disolviendo 6.5 g de agar Dextrosa Sabouraud por cada 100 mL en un matraz y se esterilizó en autoclave (134 °C, 2 atm de presión). Se colocaron 20 mL en cajas Petri de 10 cm de diámetro. Posteriormente con un asa se tomó un inóculo de la levadura *C. albicans* ATCC 90028 y se colocó en medio de cultivo agar dextrosa Sabouraud broth. Se incubaron a 37 °C durante 24 h.

Se preparó caldo Tryptic Soy Broth (Sigma-Aldrich) para inoculación de la solución madre y transcurridas las 18 horas se ajustó la solución al patrón de turbidez McFarland de 0.5 (equivalente a  $1 \times 10^8$  UFC/mL). Se inoculó la solución ajustada al patrón de turbidez 0.5 de McFarland (200 µL) y se sembraron con la técnica de estriado con un hisopo estéril. Posteriormente se colocaron adiciones en los discos de sensibilidad concentraciones de nanopartículas de 0.10 mg / mL a 1.62 mg/mL para AgNPs y para TiO<sub>2</sub>NPs de 0.5 a 5 mg / mL de 6 mm de diámetro (Sigma-Aldrich) mediante la técnica de inmersión de disco en la solución de nanopartículas de plata (AgNPs) y de dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>NPs) por 60 segundos colocándose en las cajas previamente cultivadas.

Se dejaron en incubación a 37°C por 24 horas. Las zonas de inhibición fueron medidas mediante el software TPSDig 2. Se obtuvieron promedios y desviación estándar.

## **Ensayo de susceptibilidad antifúngica de AgNPs y TiO<sub>2</sub>NPs en *Candida albicans***

*Candida albicans* ATCC 90028 se cultivó aeróbicamente a 37 ° C en Agar Dextrosa Sabouroad durante 48 h. Luego se cultivó una colonia en medio RPMI 1640 (sin glutamina, con rojo fenol, tamponado a pH 7,0 usando MOPS) y se dejó incubando por 12 h. Se preparó un inóculo estandarizado usando un espectrofotómetro en O.D. 600, equivalente a aproximadamente  $1 \times 10^7$  CFU/mL. Este inóculo se diluyó a continuación 1: 1000 para dar una concentración final de trabajo de  $1 \times 10^4$  CFU / mL.

En una placa de 96 pocillos, se prepararon diluciones seriadas de nanopartículas de plata o dióxido de titanio desde 1,35 mg / ml a 0,042 mg / mL. Se añadieron 100  $\mu$ L de cada concentración de nanopartículas a los pocillos por triplicado, seguido de un volumen igual de inóculo de *Candida albicans*. Los controles positivos se prepararon utilizando medio RPMI 1640 sin nanopartículas, pero con *Candida albicans*. También se incluyó un control negativo solo para medios. Para corregir los cambios en la densidad óptica debidos a las suspensiones de nanopartículas, se añadieron diluciones en serie de nanopartículas a un volumen igual de medio RPMI 1640.

## **Ensayo de susceptibilidad antifúngica de AgNPs y TiO<sub>2</sub>NPs en 19 cepas de *Candida spp***

La metodología se llevo acabo siguiendo la metodología del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI-M27-A3-2008). En total, 20 cepas de *Candida* obtenidas de la colección de cepas de Cardiff Dental School, Cardiff, Reino Unido (Tabla 1) se cultivaron aeróbicamente a 37 ° C en Sabouraud Dextrosa Agar durante 48 h. Luego se cultivó una colonia de cada especie durante la noche en medio RPMI 1640 (sin glutamina, con rojo fenol, tamponado a pH 7,0 usando MOPS). Se preparó un inóculo estandarizado usando un espectrofotómetro en O.D. 600, equivalente a aproximadamente  $1 \times 10^7$  CFU/mL. Este inóculo se diluyó a continuación 1:1000 para dar una concentración final de trabajo de  $1 \times 10^4$  CFU/mL

En una placa de 96 pocillos, se prepararon diluciones en serie de nanopartículas de plata o dióxido de titanio desde 1,35 mg/mL a 0,042 mg/mL. Se añadieron 100 µL de cada concentración de nanopartículas a los pocillos por triplicado, seguido de un volumen igual de inóculo de *Candida*. Los controles positivos se prepararon utilizando medio RPMI 1640 sin nanopartículas, pero con *Candida*. También se incluyó un control negativo solo para medios. Para corregir los cambios en la densidad óptica debidos a las suspensiones de nanopartículas, se añadieron diluciones en serie de nanopartículas a un volumen igual de medio RPMI 1640. Para las nanopartículas de dióxido de titanio se hicieron dos grupos: tratado con luz UV y sin tratamiento con luz UV. El grupo tratado con luz UV se expuso a la lámpara UV durante 20 minutos. Todas las suspensiones se incubaron aeróbicamente durante 24 horas a 37 °C. La absorbancia se midió por densidad óptica utilizando un lector de placas espectrofotométrico (Fluorostar OMEGA). Las lecturas de absorbancia se corrigieron restando la absorbancia media de la suspensión de nanopartículas de prueba de pocillos de prueba equivalentes. Se consideró que una reducción en la absorbancia corregida en blanco de al menos el 80% en comparación con los pocillos de control positivos era indicativa de la inhibición del crecimiento de *Candida*.

**Tabla 2.** Cepas de *Candida spp.* utilizadas en este estudio

Cepa nº	ID clínico	Fuente de aislamiento	Superficie de colonización	Invasión
<b>S1</b>	<i>C. albicans</i> ATCC 90028			
<b>S2</b>	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019			
<b>S3</b>	<i>C. albicans</i> DW1/93	Normal, mucosa oral	++	Baja
<b>S4</b>	<i>C. albicans</i> Pb1/93	Normal, mucosa oral	++	Baja
<b>S5</b>	<i>C. albicans</i> Lri/93	Normal, mucosa oral	++	Baja
<b>S6</b>	<i>C. albicans</i> 408/99	SCC lengua	++	Baja
<b>S7</b>	<i>C. albicans</i> 135bm2/94	CHC, SCC y mucosa bucal	+++	Alta
<b>S8</b>	<i>C. albicans</i> 289t/00	SCC, lengua	++	Baja
<b>S9</b>	<i>C. albicans</i> 408/99	SCC lengua	++	Baja
<b>S10</b>	<i>C. albicans</i> 819/00	Queratosis sublingual	++	Baja
<b>S11</b>	<i>C. albicans</i> 970/00	CAC, mucosa oral	+++	Alta
<b>S12</b>	<i>C. albicans</i> 40/01	PMC, paladar	+	ninguna
<b>S13</b>	<i>C. albicans</i> 243/00	Liquen plano	++	Baja

<b>S14</b>	<i>C. albicans</i> Ptr/94	CHC, mucosa bucal	+++	Alta
<b>S15</b>	<i>C. albicans</i> 705/93	CHC, mucosa bucal	+++	Alta
<b>S16</b>	<i>C. albicans</i> 848/99	CHC, lengua	++	Baja
<b>S17</b>	<i>C. albicans</i> 458r/94	CHC, mucosa bucal	++	Baja
<b>S18</b>	<i>C. albicans</i> 324la/94	CHC, comisura	+++	Alta
<b>S19</b>	<i>C. albicans</i> 1190/97	CHC, mucosa bucal	+++	Alta
<b>S20</b>	<i>C. albicans</i> 480/00	SCC, mucosa oral	++	Baja

+ Colonizador escaso de superficies orales

++Colonizador moderado de superficies orales

+++ Colonizador extenso de superficies orales

CHC- candidiasis crónica hiperplásica

SCC- carcinoma de células escamosas

CAC- candidiasis crónica atrófica

PMC- candidiasis pseudomembranosa

### **Microscopía de fluorescencia con tinción BacLight™ LIVE / DEAD®**

Mediante microscopía de fluorescencia se observaron las levaduras viables y no viables de *Candida albicans* para lo cual se tiñeron 50 µL de *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* 970/00, *C. albicans* 819/00 y *C. parapsilosis* ATCC 22019 con

10 µL de colorante BacLight™ LIVE / DEAD® preparado en 1 mL de agua destilada esterilizada en una mezcla de 1 µL de colorante de ácido nucleico fluorescente verde SYTO® 9 y 1 µL de colorante de ácido nucleico fluorescente rojo, yoduro de propidio.

### **Concentración mínima de erradicación de biopelícula (MBEC)**

Se estudió el efecto de las nanopartículas en biopelículas de 4 cepas de *Candida* en placas de 96 pocillos: *Candida albicans* ATCC 90028, *C. albicans* 970/00, *C. albicans* 819/00 y *C. parapsilosis* ATCC 22019 se cultivaron como se describió anteriormente. Se preparó un inóculo usando un espectrofotómetro en O.D. 600, equivalente a  $1 \times 10^7$  CFU/mL, y 100 µL agregados en pocillos por triplicado de una placa de 96 pocillos y se incubaron durante 24 horas aeróbicamente a 37°C para permitir la formación de biopelículas. Después de este período de incubación, el medio de cultivo se aspiró suavemente de cada pocillo. Los pocillos se lavaron dos veces con 100 µL de PBS para eliminar cualquier célula no adherente.

Posteriormente, se añadieron 100 µL de suspensión de nanopartículas de prueba, en concentraciones que varían de 1,35 mg/mL a 0,042 mg/mL con una incubación aeróbica adicional a 37°C durante 24 h. Las suspensiones de nanopartículas se eliminaron de nuevo, y los pocillos se lavaron dos veces con 100 µL de PBS. Las biopelículas de *Candida* se resuspendieron luego en 100 µL de medio RPMI 1640 y se midió una lectura de absorbancia en un espectrofotómetro a 620 nm.

Finalmente, las biopelículas re suspendidas se incubaron aeróbicamente a 37°C durante 24 h, antes de una absorbancia adicional de 620 nm. El MBEC se definió como la concentración de nanopartículas que dio como resultado un aumento de la absorbancia inferior al 20% durante 24 h.



## **Actividad antibiopelícula de nanopartículas en *Candida albicans***

### **CDC Biofilm Biorreactor**

Mediante la metodología de CDCD biorreactor de biopelícula se cuantificó el efecto de las nanopartículas en superficies de PMMA en contacto con *Candida albicans* ATCC 92800.

Se fabricaron 24 discos de resina acrílica autopolimerizados (Kemdent; Associated Dental Products Ltd.) en un molde de silicona (10 mm de diámetro) y se prepararon de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los discos de acrílico se incubaron en saliva artificial (Russel et al, 1975) durante 24 h antes de su uso.

Posteriormente, discos colocados en un Reactor de Biofilm de CDC (Biosurface Technologies). Se prepararon 4 L de Infusión cerebro corazón y se añadieron al biorreactor. El biorreactor y el medio se esterilizaron luego en autoclave a 121°C durante 15 min. *C. albicans* ATCC 90028 se cultivó durante la noche a 37°C en Infusión cerebro corazón y se preparó un inóculo estandarizado usando un espectrofotómetro en O.D. 600, equivalente a  $1 \times 10^7$  CFU/mL. El biorreactor CDC se conectó a través de una bomba multicanal (Watson-Marlow Sci-Q 205U) a 25 RPM durante 24 h para permitir un flujo constante de medios frescos. Se añadió suspensión de *C. albicans* al biorreactor a través de un puerto de inyección. El biorreactor se colocó en un agitador magnético para agitar los medios. Después de 24 h de incubación aeróbica a 37°C, los discos de PMMA se retiraron del biorreactor y se lavaron con 0,9% de PBS para eliminar las células no adherentes. Posteriormente, se añadieron 100 µl de AgNPs en los discos de PMMA, que luego se incubaron a 37°C durante 24 h más. La microscopía electrónica de barrido, la microscopía de láser confocal y los recuentos viables en agar Dextrosa Sabouraud se llevaron a cabo para evaluar la efectividad de las nanopartículas de prueba en las biopelículas de *C. albicans*.

## **Microscopía de barrido láser confocal (CLSM) de biopelículas de *Candida albicans***

Las biopelículas de *Candida* en discos de PMMA se observaron en 3D mediante microscopía de barrido láser confocal para lo cual se tiñeron con 10 µL de colorante BacLight™ LIVE / DEAD® preparado en 1 ml de agua destilada esterilizada en una mezcla de 1 µL de colorante de ácido nucleico fluorescente verde SYTO® 9 y 1 µL de fluorescente rojo tinción con ácido nucleico, yoduro de propidio durante 15 min antes de la obtención de imágenes por CLSM (Leica SP5). SYTO® 9 teñidas con membranas de levadura intactas y dañadas. El yoduro de propidio penetró la levadura con las membranas dañadas, lo que resultó en una reducción del SYTO®9.

## **SEM de las biopelículas de *Candida albicans* expuestas a nanopartículas**

Después de 24 h, se prepararon discos de PMMA en los que se crecieron biopelículas de *Candida albicans* ATCC 92800 los cuales fueron no tratados y tratados con nanopartículas y fue observada la distribución de las levaduras en las superficies de PMMA bajo SEM (Tescan Vega 3, Tescan Ltd). Las biopelículas de *Candida* en discos de PMMA se fijaron en glutaraldehído al 3% durante 2 h se enjuagaron 3 veces. Luego se deshidrataron usando series de concentración de etanol al 50, 70, 90 y 100% durante al menos 30 min cada una. Luego, las muestras se sumergieron en hexametildisilazano (HMDS) en una placa de 6 pocillos en una campana extractora durante la noche. Las muestras se recubrieron por pulverización catódica (recubierto por pulverización K650x, Quorum Technologies) con oro inmediatamente antes de la obtención de imágenes por SEM (Tescan Vega 3, Tescan Ltd).

## **Etapa 3: Citotoxicidad de AgNPs y TiO<sub>2</sub>NPs en FGH y co-cultivo**

### **Determinación de la actividad citotóxica**

Mediante el ensayo la reducción de la sal de Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)(Sigma-Aldrich) se determino la actividad citotóxica de AgNPs y TiO<sub>2</sub> en fibroblastos gingivales humanos de la línea celular ATCC CRL2014 (FGH ATCC) y de cultivo primario (FGH). En su división celular 4. 100 µL con una densidad celular equivalente a  $100 \times 10^5$  cel/mL fueron colocadas en un plato de 96 pocillos en medio DMEM (Gibco) suplementado con suero fetal bovino 4%, glutamina al 1 y 2% de antibiótico estreptomina. Se incubaron por 48 h a condiciones de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C.

A las 48 h se retiro el medio de cultivo y se hicieron diluciones seriales de AgNPs y TiO<sub>2</sub> respectivamente partiendo de una concentración de 1.62 mg/mL para AgNPs y de 5 mg/mL de TiO<sub>2</sub>NPs. Las TiO<sub>2</sub>NPs fueron previamente colocadas bajo luz ultravioleta por 20 min en agitación en la parrilla eléctrica a una velocidad constante. Se incubaron a condiciones de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C por 24 h.

A las 24 horas se retiró el medio de todos los pocillos; previamente se preparó la sal de Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), (Sigma-Aldrich) a una concentración de 0.2 mg/mL en medio DMEM suplementado. Se incubaron a condiciones de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C por 4 h. A las 4 h se retiró el MTT y se colocó dimetilsulfóxido (DMSO) y se hicieron las lecturas en el espectrofotometro Multiskan™ GO. (Thermo Scientific™) a 570 nm. Se realizó el experimento por triplicado.

## **Efecto de AgNPs y TiO<sub>2</sub>NPs en co-cultivo celular de *Candida albicans* y FGH**

Se llevó a cabo el ensayo de co-cultivo celular con *Candida albicans* y fibroblastos gingivales humanos para observar el efecto de las nanopartículas estando en contacto *Candida albicans* con FGH de la línea celular ATCC CRL2014 en sus divisiones celulares 4, 5 y 6 en medio DMEM (Gibco) suplementado con suero fetal bovino 4%, glutamina al 1 y 2% de antibiótico estreptomicina. 100 µL con una densidad celular equivalente a  $100 \times 10^5$  cel/mL fueron colocadas en un plato de 96 pocillos y se dejaron incubando por 24 h. Se incubaron a condiciones de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C por las 48 h.

A las 48 horas se retiró el medio de cultivo y posteriormente 100 µL de *Candida albicans* ajustada a una escala de McFarland de 0.5 en medio DMEM sin suplementar fue colocada en cada pocillo. Se hicieron diluciones seriales de AgNPs y TiO<sub>2</sub> respectivamente partiendo de una concentración de 1.62 mg/mL para AgNPs y de 0.5 mg/mL de TiO<sub>2</sub>NPs. Las TiO<sub>2</sub>NPs fueron previamente colocadas bajo luz ultravioleta por 20 min en agitación en la parrilla eléctrica a una velocidad constante. Se incubaron a condiciones de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C por 24 h.

A las 24 h se retiró el medio de todos los pocillos; previamente se preparó la sal de Bromuro de 3-(4,5- dimetilazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)(Sigma-Aldrich) a una concentración de 0.4 mg/mL en medio sin suplementar. Se incubaron a condiciones de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C por 4 h. A las 4 h se retiró el medio con MTT y se colocó dimetilsulfóxido (DMSO) y se hicieron las lecturas en el espectrofotómetro Multiskan™ GO. (Thermo Scientific™) a 570 y 620 nm. Se realizó el experimento por triplicado.

### **Tinción con azul de tripano TC10™ Trypan blue dye, 0.4%**

Se observaron los co-cultivos de *Candida albicans* con FGH bajo microscopio óptico con tinción de azul de tripano para lo cual se retiró el medio de cultivo celular. Se realizaron 4 concentraciones de etanol al 25, 50, 75 y 100%. Se comenzó con la fijación de las muestras colocando 100 µL de etanol al 100% por 10 minutos; se retiró y se colocó 100 µL de etanol al 75% y así sucesivamente hasta llegar a la concentración de 25%. Se lavó con 100 µL de agua destilada y se retiró por completo. 20 µL de azul de tripano se colocaron en cada pocillo y se incubaron a condiciones de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C por 24 h. A las 24 h se retiró la tinción y se lavó con 100 µL de agua destilada. Se observaron en el microscopio.

## **Etapa 4: Estudio de perfil transcriptómico de *Candida albicans***

### **Efecto de AgNPs en el crecimiento de *Candida albicans* a las 24 horas**

Se colocó un cultivo de 24 horas de *Candida albicans* en agar dextrosa. A las 24 horas se tomaron tres colonias de forma y tamaño similar y se colocaron en tres matraces independientes con 100 mL de medio Broth. Se sellaron y se dejaron en agitación a 170 RPM a 37°C por 24 horas.

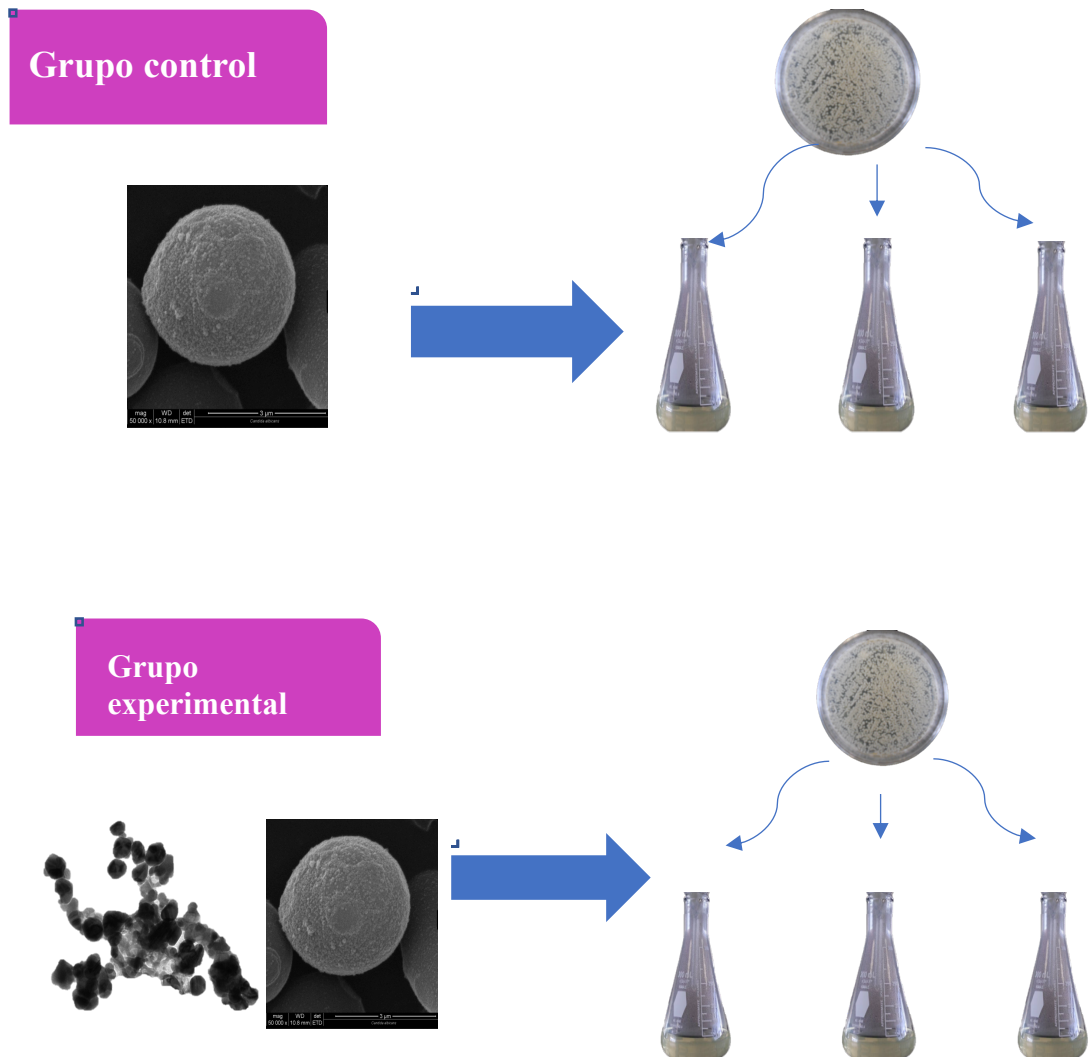
A las 24 horas se hicieron las lecturas a 620 nm en el espectrofotometro para el cual se colocaron 1800 µL de medio broth y 200 µL de *Candida* en crecimiento del matraz en agitación. Se realizó por triplicado.

### **Extracción de RNA de *Candida albicans* para su estudio mediante la expresión de genes mediante secuenciación de RNA en contacto con nanopartículas de plata y dióxido de titanio**

La extracción de RNA se realizó en *C. albicans* sin tratamiento de AgNPs y así como a *C. albicans* tratada con AgNPs a una concentración de 0.020 mg/mL y por un periodo de 24 horas a 37°C; se llevó a cabo mediante RiboPure™ Yeast Kit (Invitrogen) como se muestra en la Figura 4.

A partir de un cultivo de 24 horas en agar Dextrosa Sabouraud se tomaron 3 colonias las cuales se colocaron en 3 tubos falcon de 15 mL respectivamente con 5 mL de medio infusión cerebro corazón. Posteriormente se colocaron en incubación a 37°C en agitación a 170 RPM por un periodo de 24 horas. Fueron 2 grupos:

- 1.- Grupo control *Candida albicans* sin tratamiento de nanopartículas 24 horas.
- 2.- Grupo experimental *Candida albicans* con tratamiento de nanopartículas 24 horas.



**Figura 4.** Esquema que representa la metodología para preparar muestras previas a extracción de RNA. Esquema A representa el grupo control donde solo se colocó *Candida albicans* y el esquema B el grupo experimental en el cual se aplicó AgNPs+ *Candida albicans*.

Posterior a las 24 horas, se centrifugaron a 12,000 RPM por 2 minutos y se desechó el sobrenadante. Se adicionaron los siguientes compuestos al pellet:

- 480  $\mu$ L de buffer de lisis
- 48  $\mu$ L de 10% SDS
- 480  $\mu$ L cloroformo

Posteriormente se re suspendió mediante vortex por 15 segundos. Se transfirió la mezcla con células y agentes de lisis a un tubo previamente preparado con 750  $\mu$ L de perlas de zirconio. Se posicionaron los tubos de manera horizontal con las tapaderas apuntando hacia el centro del vortex por 10 minutos. Se centrifugaron a 16,100 xg a temperatura ambiente para separar la fase acuosa que contiene el RNA de a fase orgánica. Se transfirió la fase acuosa que contiene el RNA parcialmente purificado a un tubo falcon de 15 mL. La fase de purificación de RNA se adicionaron 1.9 mL de buffer de unión, así como 1.25 mL de etanol 100%. Se colocó un filtro a un tubo eppendorf de 2 mL y se adicionó la muestra cada 700  $\mu$ l y se centrifugo por 1 minuto a 12,000 xg hasta se pasaron los 3.7 mL. Posteriormente en el filtro se quedó el RNA purificado. Para lavar el filtro se utilizaron dos soluciones, primero la solución para lavar 1 y por ultimo la solución para lavar 2/3 dos veces. Por ultimo se disperso en 50  $\mu$ L de solución eluyente a 95°C.

## **Cuantificación de RNA**

La calidad y cantidad de ARN se estimaron midiendo la absorbancia a 280 nm y 260 nm mediante espectroscopía UV, utilizando NanoDrop colocando 1  $\mu$ L de cada una de las muestras.



## **Gel de electroforesis**

Se pesaron 0.40 g de agarosa y se añadieron 100 mL de agua DEPC. Se disolvió por un minuto y posteriormente se calentó en el microondas por 25, 15 y 10 segundos entre cada ciclo en el microondas. Se agitó por 10 segundos. Posteriormente se adicionaron 4 mL de MOPS 10X y 1.87 mL de formaldehído, así como 4  $\mu$ L de bromuro de etidio. Posteriormente se colocó en la cámara de electroforesis y se colocó un peine de 6 divisiones. Se dejó gelificar y se colocó MOPS 1X en la tina de electroforesis. Para correr cada muestra se colocaron 6  $\mu$ L de buffer de carga con 3  $\mu$ L de la muestra. En total en cada pocillo se colocaron 9  $\mu$ L. Se conectó la fuente de poder y se corrió por 30 min a 100 V.

## **Secuenciación de RNA**

El análisis de expresión diferencial de genes se llevo mediante secuenciación de RNA; para el cual se requirió del servicio de la Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática del Instituto de Biotecnología de La Universidad Nacional Autónoma de México sede en Cuernavaca, Morelos. Se solicitaron 2 µg de RNA en 50 uL de agua libre de RNAsas. Para su respectivo análisis en la plataforma Illumina Next Seq 500. Posteriormente se llevó acabo el análisis de datos.

## **Análisis de resultados**

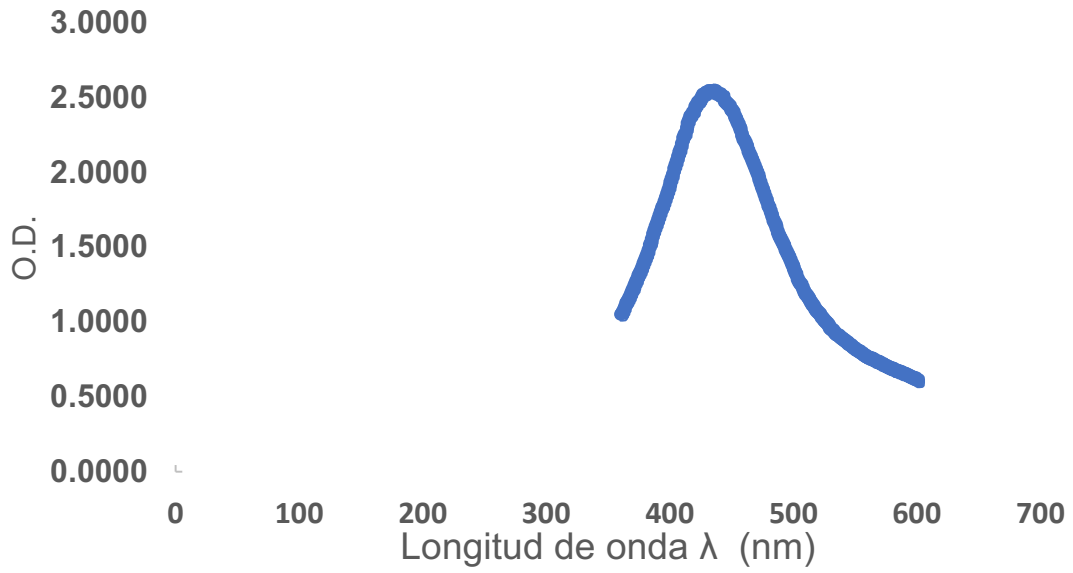
Los resultados se reportan como el promedio de tres repeticiones, así como su desviación estándar. Se realizaron pruebas de normalidad de Kolgomorov Smirnof, así como análisis de varianza ANOVA de Una Vía seguida de la prueba de tukey para determinar diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0.05$ . Se utilizó el paquete estadístico PrismaGraph 6.

# **Resultados y Discusión**

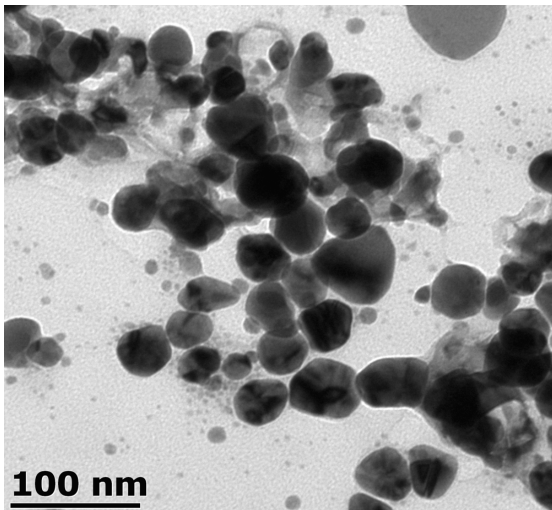
## **Etapa 1: Síntesis y caracterización de nanopartículas**

### **Síntesis y caracterización de AgNPs**

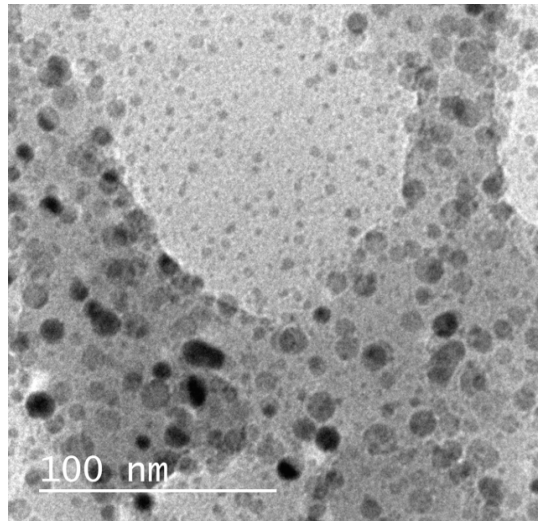
Se obtuvieron nanopartículas de morfología esférica con tamaño aproximado de entre 15-50 nm indicando una síntesis polidispersa; como se observa en la microfotografía de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de la figura 5 y 6 así como la gráfica 1 de espectroscopía de UV-Visible la cual indica pico máximo de absorbancia en 412 nm, infiriendo ya un tamaño de partícula de entre 35-50 nm (Kamat,1998; Nair,2003). Se ha reportado que las síntesis asistidas con infusiones de plantas son efectivas en la obtención de nanopartículas de plata, en específico con hojas de geranio, de morfología esférica con tamaños de entre 16-40 nm (Sayeed et al., 2015). La cual se ha reportado en la literatura como fotosíntesis. Diferentes extractos están constituidos por diversos agentes reductores orgánicos tales como compuestos fenólicos, terpenos, polisacáridos, razón por la cual el extracto influye en las características de la nanopartícula (Kumar et al, 2012; Mukuthan et al, 2012).



**Gráfica 1.** Espectro UV-Vis de AgNPs



**Figura 5.** Microfotografía de TEM AgNPs  
Fuente: Directa

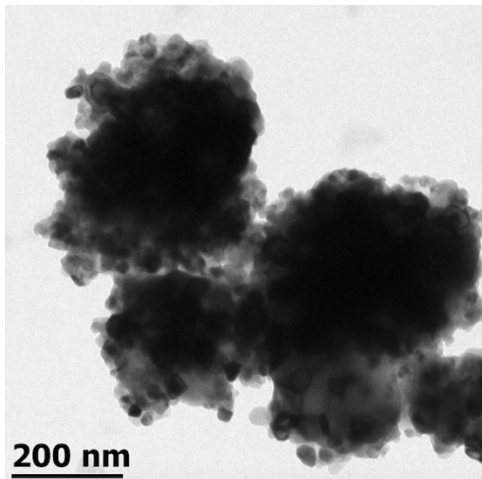


**Figura 6.** Micrografía de TEM AgNPs  
Fuente: Directa

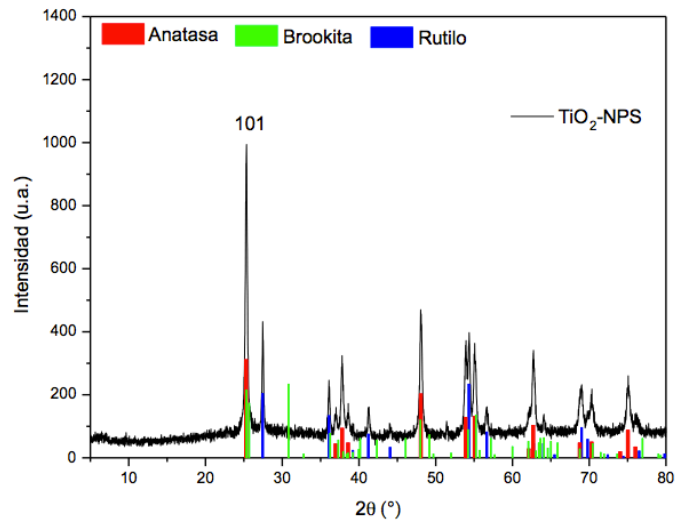
## Síntesis y caracterización de nanopartículas de dióxido de titanio

La síntesis de nanopartículas de dióxido de titanio se llevo a cabo mediante la técnica sol-gel anteriormente descrita. Y posteriormente se realizó tratamiento hidrotermal por 24 h a 550°C para la obtención de la fase cristalina anatasa y rutilo en menor proporción (Singh *et al*, 2017), como se muestra en la figura 8, reportaron que con la técnica sol-gel se obtiene una síntesis mayor proporción en la fase anatasa así como también rutilo en menor proporción resultados que concuerdan con los del presente estudio en el cual se observa el espectro de DRX que se obtuvo en mayor proporción la fase anatasa como se observa al sobreponer el patrón de difracción característico para TiO<sub>2</sub>NPs en color rosa indicando 101,004,200,105,211,204 y 220. La figura 7 muestra la microfotografía de microscopia electrónica de transmisión en la que se obtuvieron nanopartículas con un tamaño aproximado de entre 10-20 nm sin embargo se observan aglomeraciones de las mismas por lo cual se optó por continuar en el proyecto con nanopartículas de dióxido de titanio comerciales (Sigma-Aldrich) ya que se ha reportado que este grupo de nanopartículas cuando no esta de manera aglomerada se obtienen mejores resultados (Chen, 2005). Con el objetivo de mejorar los resultados en la síntesis de TiO<sub>2</sub>NPs se ha reportado la adición de surfactantes tales como polietilenglicol (PEG) y dodecilsulfato de sodio (SDS) (Vijayalakshmi *et al*, 2010).

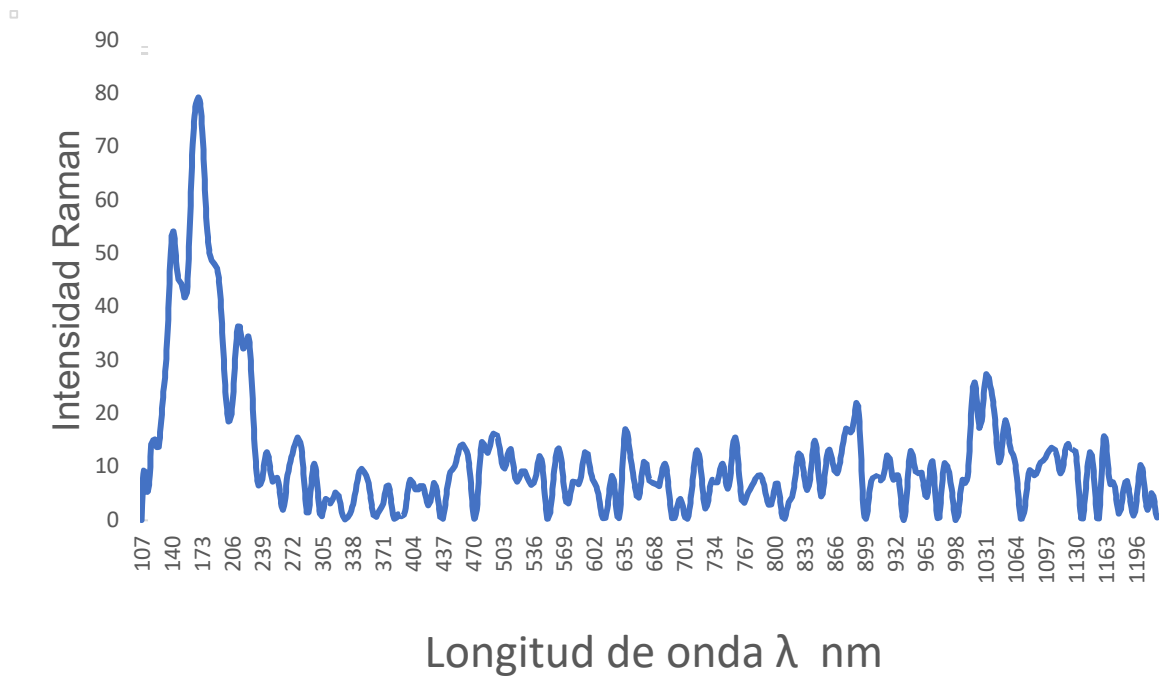
En la figura 9 la microscopia raman muestra los picos de la síntesis realizada la cual concuerda con los reportados de (Singh *et al*, 2017) (Saja *et al*, 2016) los cuales son anatasa: 143, 221,395, 516,638 y para la fase rutilo: 232,447 y 609.



**Figura 7.** Micrografía de TEM  
TiO<sub>2</sub>NPs  
Fuente: Directa



**Figura 8.** Espectroscopía rayos X de  
TiO<sub>2</sub>NPs  
Fuente: Directa



**Gráfica 2.** Espectroscopía de Raman de TiO<sub>2</sub>NPs  
Fuente: Directa

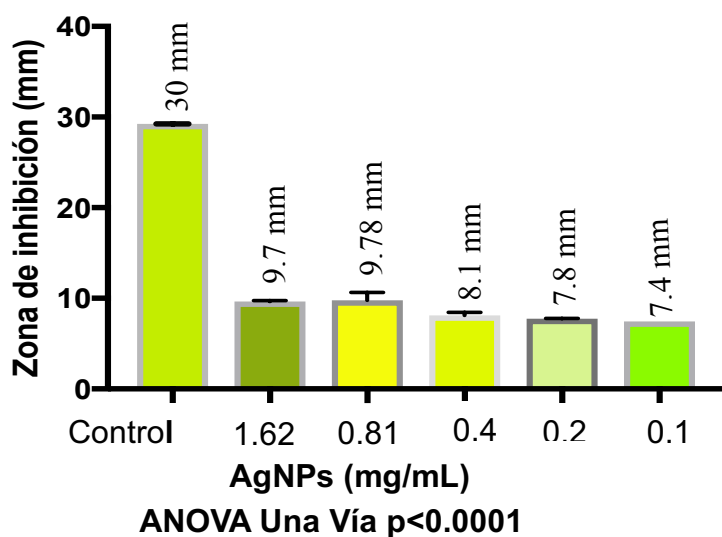
## **Etapa 2: Estudio del efecto antifúngico de AgNPs y TiO<sub>2</sub>NPs en *Candida albicans*: planctónica y en biopelícula**

**Actividad antifúngica de las nanopartículas de plata y dióxido de titanio en *Candida* spp.**

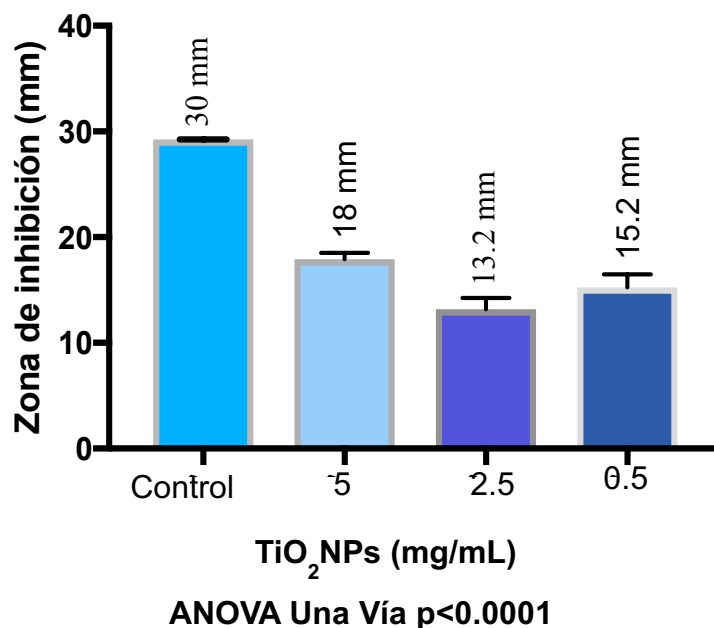
### **Ensayo de difusión en agar**

Los puntos de corte según el documento M44-A CLSI, 2004 de la Clinical and Laboratory Standard Institute para el ensayo de difusión en agar demostraron estar en el punto SDD (sensible dependiendo dosis) mostrando zonas de inhibición para el grupo de AgNPs de hasta 15 mm; en comparación del grupo control en el cual se utilizó el antifúngico anfotericina B el cual registró zonas de inhibición de hasta 30mm. En el grupo de TiO<sub>2</sub>NPs sintetizadas mediante el método sol-gel se obtuvieron zonas de inhibición de hasta 19 mm entrando en los puntos de corte (M44-A CLSI, 2004) como S (sensible) demostrando ser efectivas en este ensayo en comparación con el grupo control con anfotericina B con zonas de inhibición de hasta 30 mm. Se puede observar en el caso de las AgNPs que se observa un patrón dosis-dependiente a mayores concentraciones mayor es el efecto antifúngico como lo reportan en la literatura que a partir de dosis de 0.5 mg/mL hasta 30 mg/mL (Panacet *et al*, 2009) (Yacaman *et al*, 2015) (Matsubara *et al*, 2015). Para el grupo de TiO<sub>2</sub>NPs estudios evaluados a concentraciones de entre 0.75 mg/mL a 1.5 mg/mL (Michael *et al*, 2014)(Bonnet *et al*, 2015) en *C. albicans* siendo así que concluyen que los mejores resultados se obtuvieron en concentraciones mayores a 0.7mg/mL por lo que se optó trabajar en el presente estudio en un rango de entre 0.5-5 mg/mL se observa una tendencia no lineal en el sentido de que a concentraciones menores tuvo mayor efecto en comparación de algunas de las mayores concentraciones.

Se calcularon promedios, desviaciones estándar. Se llevó a cabo la prueba de normalidad Shapiro Wilks en el paquete estadístico SPSS versión 6. Se aplicó el análisis estadístico ANOVA de Una Vía y pos-hoc Tukey test en el software GraphPad Prism 6. Para el grupo de AgNPs se encontraron diferencias significativas en todos los grupos de dosis utilizadas a excepción del grupo de 0.81 y 0.41 mg/mL en el cual no mostró diferencia estadísticamente significativa.



Gráfica 3. Ensayo de difusión en agar AgNPs



Gráfica 4. Ensayo de difusión en agar TiO<sub>2</sub>NPs



## Concentración mínima inhibitoria (CMI)

La tabla 2 muestra los resultados de los ensayos de microdilución de las nanopartículas. Las concentraciones utilizadas en el presente estudio para el grupo de AgNPs fueron de 1.62 mg/mL a 0.0125 mg/mL. Se encontró que para las 20 diferentes especies de *Candida* probadas 8 especies: LRI/93, 970/00, 408/99, 135 BM2/94, 40/01, PBI/93, 1190/97 y DWI/93 fueron susceptibles a una concentración mínima inhibitoria de 0.0125 mg/mL, las cuales son especies de *candida* aisladas de mucosa oral normal hasta tipos de candidiasis crónicas, son de invasión baja a moderada de los tejidos de la superficie oral a excepción de dos especies 970/00 y la 135 BM2/94 que son colonizadores extensos y de alta incidencia de la cavidad oral (Malic *et al*, 2007).

Las cepas 12 cepas restantes: *Candida albicans* ATCC 90028, *C. parapsilosis* ATCC, 324LA/94, 819/00, 458R7/94, 8H8/94, 480/00, PTR/94, 289T/00, *C. Parapsilosis* 14/9/12, 243/00, 705/93 las cuales frecuentemente se encuentran en condiciones de candidiasis oral crónica hiperplásica o carcinoma de células escamosas y que además son conocidas por ser mas complejas de tratar debido a que suelen persistir a pesar del tratamiento (Apkan *et al*, 2002))(Holsmtrum *et al*, 1990), son de moderada a alta invasión de los diversos tejidos de la superficie oral (Malic *et al*, 2007).

La concentración mínima inhibitoria para estas cepas fue de  $\geq 0.25$  mg/mL de AgNPs lo cual entra dentro de los rangos reportados de entre a 0.2 a 0.35mg/mL(Monteiro *et al*, 2015)(Yacaman *et al*, 2015)y mas cercana al reportado por (Vázquez-Muñoz *et al*.,2014) en donde el reporta que con la cepa ATCC90028 fue de 0.06 mg/mL cifra que coincide con la de 0.05 mg/mL que en el presente estudio representa la concentración mínima fungicida que es la concentración a la

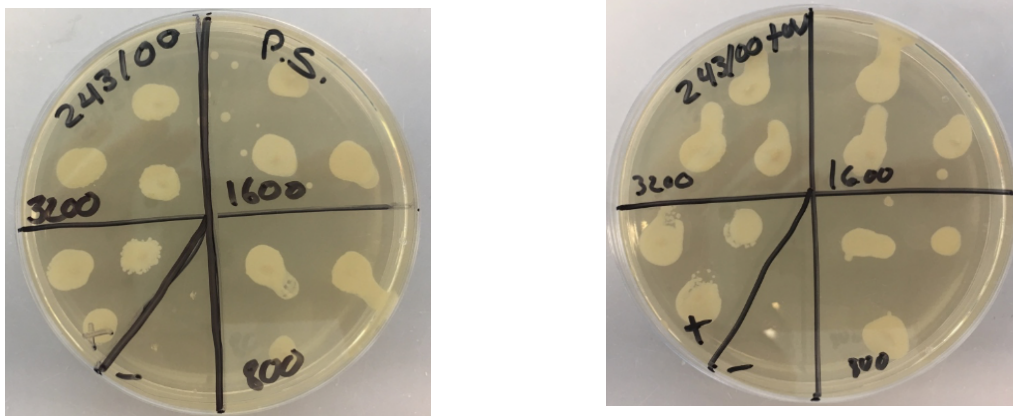
cual después de tratar el microorganismo se inocula en cajas de agar y posterior a 24 horas de incubación no exhibe crecimiento, es decir, no se recupera después del tratamiento. Cabe destacar que el tamaño de partícula está relacionado con su efecto antifúngico, entre más pequeño más efectivas han demostrado ser debido al área superficial específica de las mismas ya que al incrementarse deja expuestos átomos disponibles para reacciones redox, fotoquímicas, bioquímicas, así como fisicoquímicas con microorganismos (Marambio-Jones *et al*, 2010).

Para el grupo de dióxido de titanio se llevaron a cabo dos estudios a concentraciones de uno en el cual se incluyó el uso de luz ultravioleta por 20 minutos debido a que está reportado que el tipo de nanopartículas óxido metálicas, específicamente en nanopartículas de dióxido de titanio, son fotocatalíticas lo cual se traduce en que la luz ultravioleta les permite llegar a un estado de excitación el cual es óptimo para potencializar el efecto antimicrobiano debido a mayor formación de ROS las cuales tienen un efecto directo sobre los microorganismos (Chen *et al*, 2007).

Se observó que la concentración mínima inhibitoria para TiO<sub>2</sub>NPs fue 1.8 mg/mL como se observa en la tabla 2. La cual concuerda con reportes de la literatura en la cual mencionan que concentraciones por encima de 0.7 mg/mL se obtienen mejores resultados en cuanto al efecto antifúngico (Michael *et al*, 2014; Bonnet *et al*, 2015).

A pesar de que se aplicó la luz, no se observó diferencia en cuanto al efecto antifúngico. Las aglomeraciones en las partículas no permiten que exista un desempeño óptimo de dichas nanopartículas, dicho efecto, es en función del tamaño de partícula (Stantik *et al*, 2016) Cabe destacar que al sembrado en cajas de agar se observa que a altas concentraciones tienen un efecto fungistático ya que en la placa de 96 pocillos no se observa turbidez a partir de concentraciones de 0.08 mg/mL sin embargo al inocular las más altas concentraciones utilizadas en el presente estudio se observó crecimiento de *C. albicans* a las 24 h como se observa

en la figura 9 razón por la cual se decidió ya no analizar mediante microscopia de fluorescencia o en el análisis genético.



**Figura 9.** Se observa en la imagen a y b respectivamente caja de agar dextrosa Sabouraud inoculada con *C. albicans* + TiO<sub>2</sub>NPs a concentraciones de 1.6 mg/mL, 800 y 400 mg/mL, la caja b los inóculos estuvieron durante 20 minutos bajo luz UV. Se observan en ambos casos que en todas las concentraciones hubo crecimiento, nótese nulo crecimiento del control negativo, así como crecimiento en el control positivo.

**Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria (CMI)**

<b>Nanopartículas</b>	<b>AgNPs (mg/mL)</b>	<b>TiO<sub>2</sub>NPS (mg/mL)</b>	<b>TiO<sub>2</sub>NPS+UV luz (mg/mL)</b>
<b>Microorganismo</b>			
C alb 90028	0.025	1.6	1.6
C parap	0.025	1.6	1.6
324LA/94	0.025	1.6	1.6
819/00	0.025	1.6	1.6
458R7/94	0.025	1.6	1.6
8H8/94	0.025	1.6	1.6
480/00	0.025	1.6	1.6
PTR/94	0.025	1.6	1.6
289T/00	0.025	1.6	1.6
C. Para 14/9/12	0.025	1.6	1.6
243/00	0.025	1.6	1.6
705/93	0.025	1.6	1.6
970/00	0.0125	1.6	1.6
LRI/93	0.0125	1.6	1.6
408/99	0.0125	1.6	1.6
135 BM2/94	0.0125	1.6	1.6
40/01	0.0125	1.6	1.6
PBI/93	0.0125	1.6	1.6
1190/97	0.0125	1.6	1.6
DWI/93	0.0125	1.6	1.6

AgNPs: nanopartículas de plata

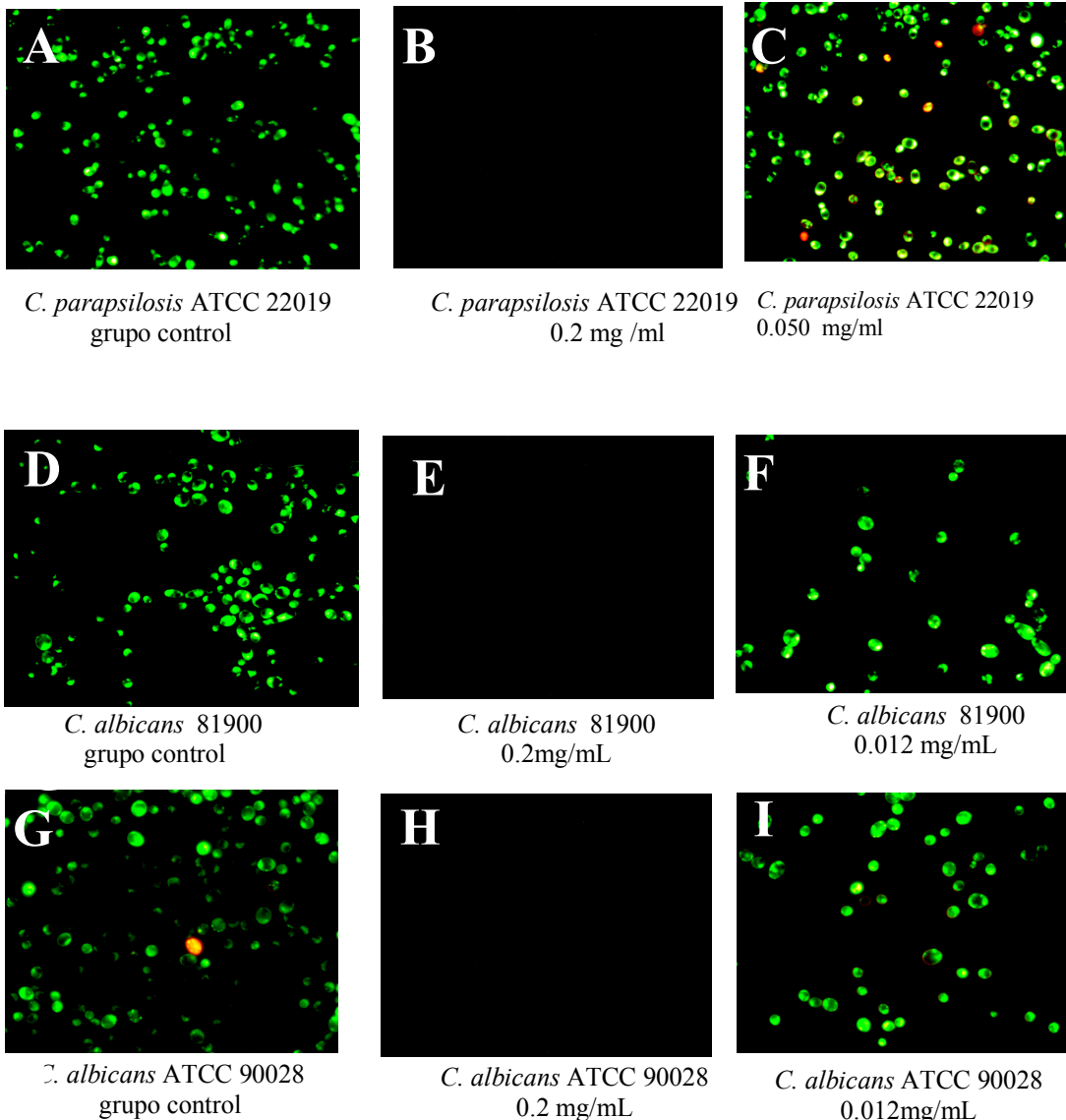
TiO<sub>2</sub>NPs: nanopartículas de dióxido de titanio

TiO<sub>2</sub>NPs+ luz UV: nanopartículas de dióxido de titanio en contacto con luz ultravioleta por 20 minutos.

### **Microscopía con tinción BacLight™ LIVE / DEAD®**

El efecto de las nanopartículas en los ensayos de microdilución se muestra mediante imágenes de microscopia de fluorescencia (figura 10) siendo complementarias a las lecturas de absorbancia, de las 4 cepas representativas: *C. albicans* ATCC 90028, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. albicans* 819/00 y *C. albicans* 970/00 se muestran los grupos controles (A, D, G y J) en los cuales se

observa crecimiento y el fluorocromo verde que significa viabilidad de *Candida* a diferencia de los que han sido tratados con AgNPs entre 0.20 donde no se observa *Candida* o a concentraciones que son menores a esta concentración en la que se observa crecimiento de *candida* y algunas que presentan el fluorocromo rojo que representa *candida* no viables (Tawakoli *et al*, 2012) en menor proporción en comparación con el grupo control.



**Figura 10:** Imágenes de microscopia de fluorescencia se muestra *C. albicans* que no fue tratada con AgNPs en las imágenes (a, d, g). *C. albicans* tratada con AgNPs a una concentración de 0.2 mg/mL (b, e, h) y para muestras tratadas con una concentración de 0.012,0.025 o 0.005 mg/mL respectivamente (c, f, i).

## Actividad antibiopelícula de nanopartículas en *Candida albicans*

### Concentración mínima de erradicación de biopelícula (CMEB)

La tabla 3 muestra los resultados de los ensayos de concentración mínima de erradicación de biopelícula para AgNPs, TiO<sub>2</sub>NPS y TiO<sub>2</sub>NPS + luz UV. CMEB se realizó con el fin de observar el efecto de las concentraciones probadas en el ensayo de susceptibilidad, el cual, se realizó en *Candida albicans* planctónica en *Candida albicans* en forma de biopelícula. Se observó que para ambos tipos de nanopartículas se necesitan mayores concentraciones de en comparación de las concentraciones que se utilizaron en los ensayos en *Candida* planctónica (CMI) como han reportado autores que han llevado a cabo el ensayo (Verma et al, 2017) (Malic et al, 2013). Esto se debe a que una biopelícula es una estructura más compleja, formada y adherida a una superficie a diferencia de las levaduras de manera planctónica que no están en este tipo de organización (Percival et al, 2011).

**Tabla 3. Concentración Mínima de Erradicación de Biopelícula (CMEB)**

Nanopartículas	AgNPs (mg/mL)	TiO <sub>2</sub> NPS (mg/mL)	TiO <sub>2</sub> NPS+luz (mg/mL)	UV
<b>Microorganismo</b>				
C alb 90028	≥0.2	>3.2	>3.2	
C parap	>0.2	>3.2	>3.2	
324LA/94	>0.1	>3.2	>3.2	
819/00	>0.1	>3.2	>3.2	
458R7/94	>0.2	>3.2	>3.2	
8H8/94	>0.2	>3.2	>3.2	
480/00	>0.2	>3.2	>3.2	
PTR/94	>0.2	>3.2	>3.2	
289T/00	>0.2	>3.2	>3.2	
C. Para 14/9/12	>0.2	>3.2	>3.2	
243/00	>0.2	>3.2	>3.2	
705/93	>0.2	>3.2	>3.2	
970/00	>0.2	>3.2	>3.2	
LRI/93	>0.1	>3.2	>3.2	
408/99	>0.1	>3.2	>3.2	
135 BM2/94	>0.1	>3.2	>3.2	

40/01	>0.1	>3.2	>3.2
PBI/93	>0.1	>3.2	>3.2
1190/97	>0.1	>3.2	>3.2
DWI/93	>0.2	>3.2	>3.2

AgNPs: nanopartículas de plata

TiO<sub>2</sub>NPs: nanopartículas de dióxido de titanio

TiO<sub>2</sub>NPs+ luz UV: nanopartículas de dióxido de titanio en contacto con luz ultravioleta por 20 minutos.

### CDC biofilm biorreactor

Se utilizó el sistema CDC biorreactor la cual es una técnica que es ampliamente utilizada para crear biopelículas para ser evaluadas con agentes antimicrobianos. El principio de esta técnica es formar una biopelícula en condiciones de alto flujo continuo. Las biopelículas desprendiendo los microorganismos de la superficie y posteriormente sembrarlos en cajas de agar para llevar a cabo recuentos de placas viables (Azeredo *et al*, 2016).

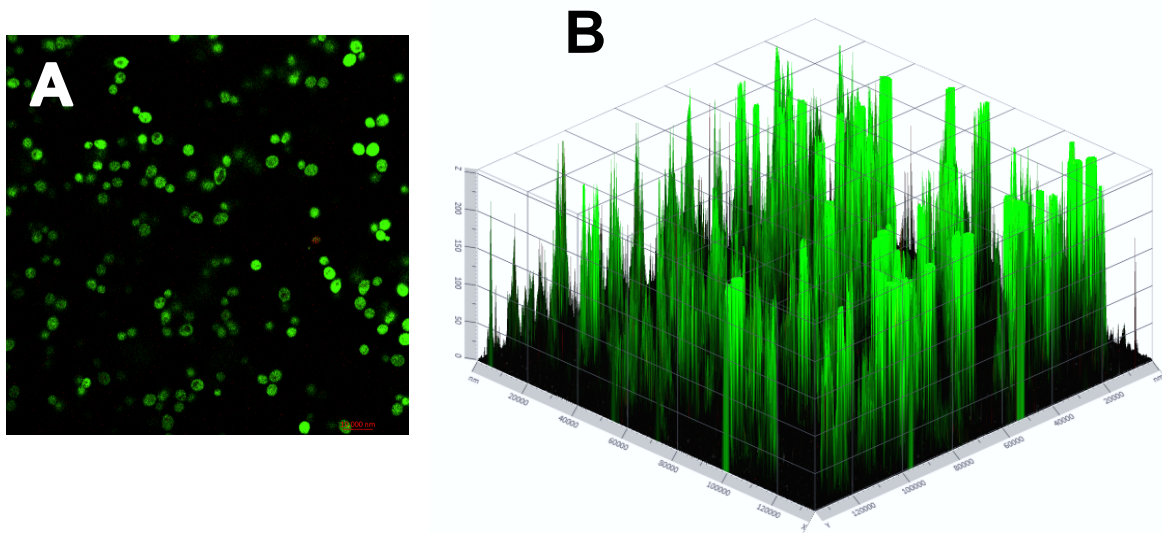
A las 24 horas de haber sido inoculada *C. albicans* se encontraban en la fase estacionaria de crecimiento en *Candida albicans* (Gulati *et al*, 2016); se pusieron en contacto con tratamiento de AgNPs a una concentración de 0.2 mg/mL. A las 24 horas se observaron en el microscopio confocal laser, se fijaron para ser observados mediante microscopía electrónica de barrido, así como inoculación en cajas de agar dextrosa para llevar a cabo el conteo de colonias.

### Microscopía confocal de barrido láser (CLSM) de biopelículas de *Candida albicans*

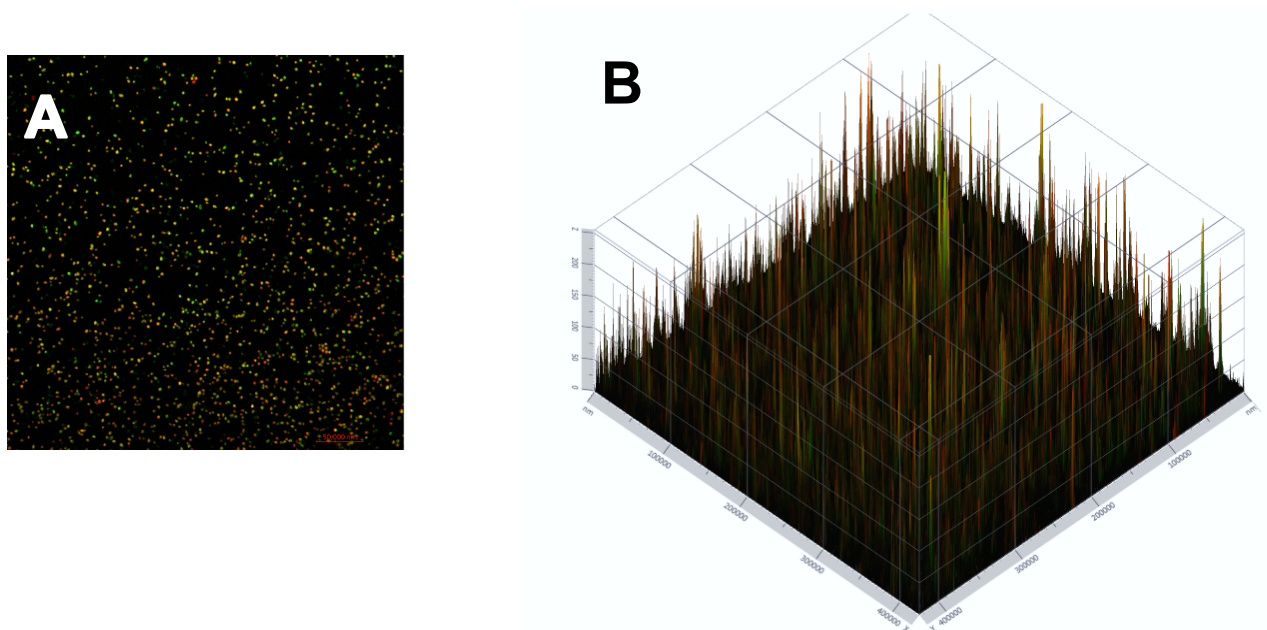
Las imágenes de microscopía confocal muestran en las figuras 11 y 12 las superficies de disco de PMMA(a) y 3D(b) respectivamente.

El grupo control, que pertenece a *Candida albicans* se observa un espesor de 200 nm de la biopelícula que se formó a las 24 horas de *Candida albicans*, así como la tinción con SYTO9 la cual se observa verde representando la viabilidad de *Candida albicans*.

El grupo que fue tratado con AgNPs muestra los fluorocromos correspondientes para SYTO9(verde) como FUN1(rojo), por lo que se observan ambos en las imágenes. El conteo de colonias mostró que para el grupo control se encontraron  $1.1 \times 10^5$  de Candida en la superficie de las muestras y para el grupo tratado con AgNPs un conteo de  $7.5 \times 10^4$ . Con lo cual se confirma que hubo efecto al aplicar las AgNPs en la reducción del número de Candida en la superficie de los discos de PMMA.



**Figura 11.** (A) superficie de disco PMMA con tinción BaLight (B)Imagen 3D de superficie discos PMMA sin tratamiento.



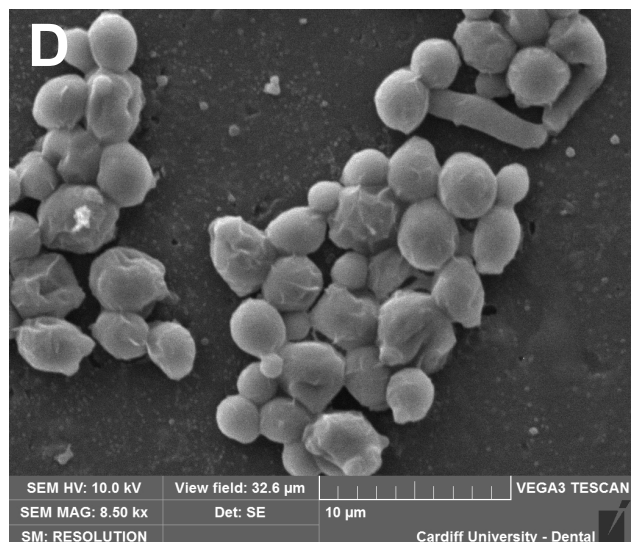
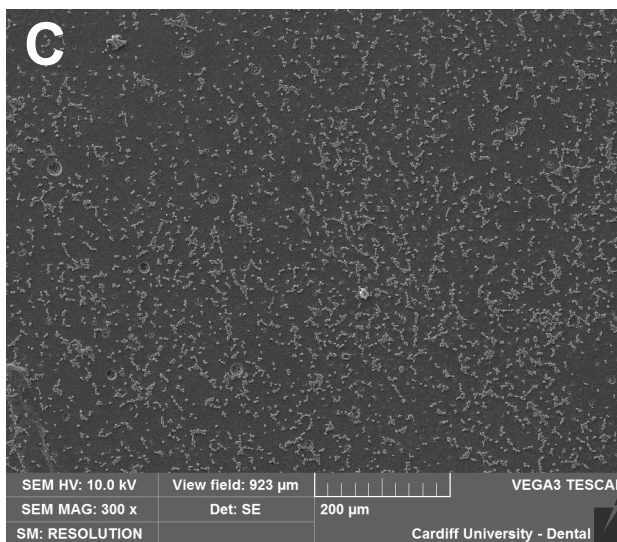
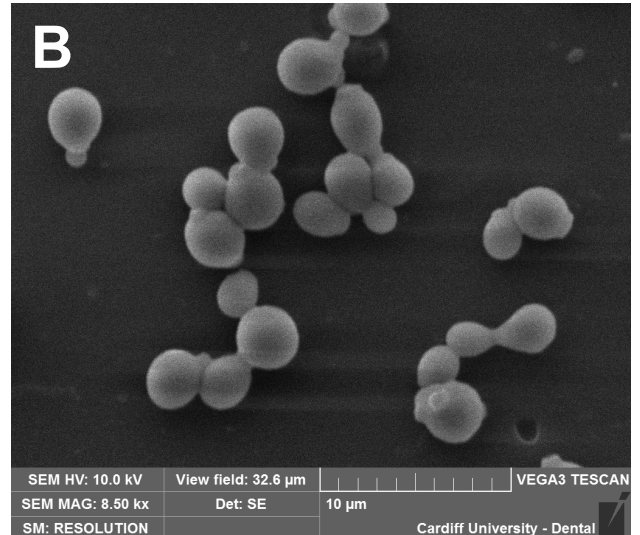
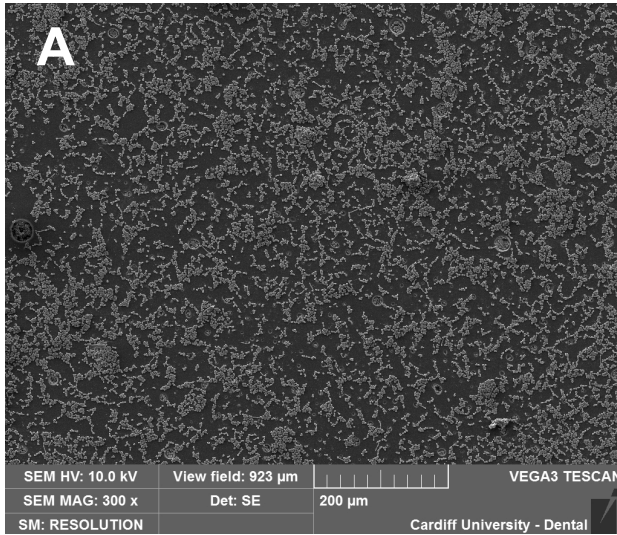
**Figura 12.** (A) superficie de disco PMMA con tinción BaLight (B) Imagen 3D de superficie discos PMMA tratados con AgNPs (0.2 mg/mL)



## **SEM de las biopelículas de *Candida albicans* expuestas a nanopartículas**

Se muestra en la imagen 13 micrografías electrónicas de barrido en las cuales se muestran los grupos controles (A y B) donde *C. albicans* no fue tratada. En la imagen (B) se observa una morfología de la levadura redonda-ovoide, así como superficie lisa. El conteo en Image J arrojó una cifra de  $17465 \pm 9.3$  de levaduras en la superficie (magnificación de 300x).

En la imagen C y D, se observan micrografías en las cuales las superficies de los discos de PMMA fueron tratados con AgNPs a una concentración de 0.2 mg/mL se puede observar en la imagen D la pared celular de *Candida albicans* claramente afectada por el tratamiento de AgNPs, así como un conteo de la imagen con magnificación de 300x de  $2626 \pm 15.7$ . Resultados que concuerdan con estudio realizados como (Yakaman et al., 2015) (Vazquez-Muñoz et al., 2014) en el cual realizaron el análisis ultra estructural de *candida albicans* en contacto con AgNPs y también se observaron cambios morfológicos importantes de la pared celular de *Candida albicans* tales como superficie rugosa como en el presente estudio.



**Figura13.** Imágenes de SEM de la superficie de los discos de PMMA. Las muestras no tratadas (A y B), (C y D) tratadas AgNPs(0.2 mg/mL)

## **Etapa 3: Citotoxicidad de AgNPs y TiO<sub>2</sub>NPs en FGH y co-cultivo**

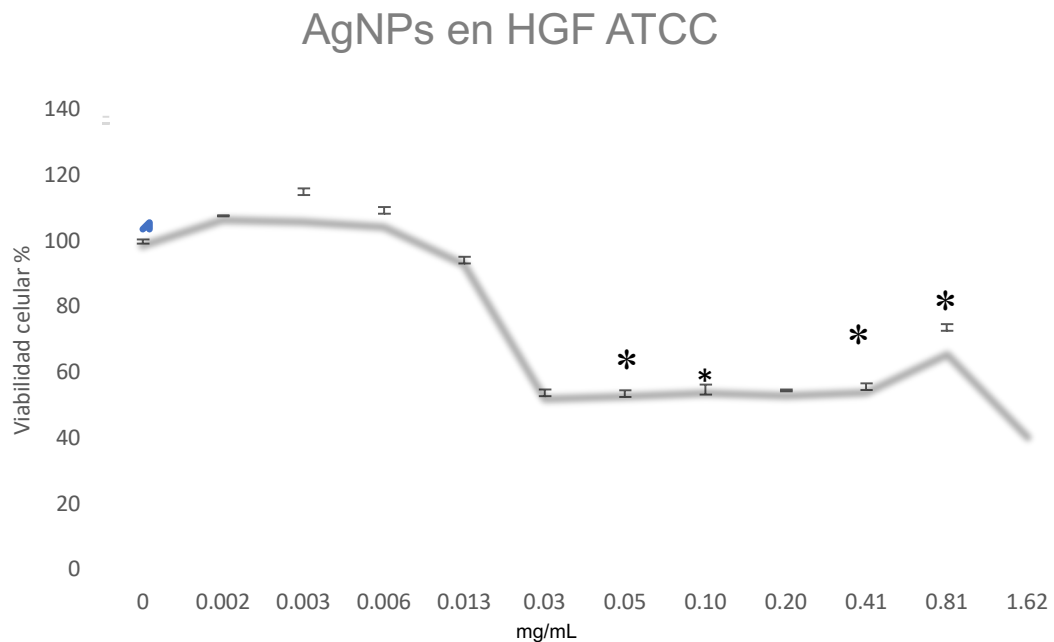
### **Determinación de la actividad citotóxica**

Se observan cuatro gráficas de las cuales dos corresponden al efecto de las nanopartículas en cultivos de FGH de línea celular ATCC CRLZ-2014 y la otra gráfica correspondiente al efecto en células de cultivo primario respectivamente a cada grupo de nanopartículas.

La grafica 5 corresponde a fibroblastos gingivales humanos (FGH) ATCC en contacto con AgNPs. Se observa un efecto dosis-dependiente en el cual, a mayor concentración, menor es la viabilidad celular siendo encontrando una 50<sub>cc</sub> de 1.06 mg/mL lo cual nos dice que a esta concentración el 50% de nuestras células ya no son viables. Cabe destacar que también se encontró un efecto de hormesis el cual esta reportado que es el efecto en el cual a mayores concentraciones se da el efecto contrario, es decir, en vez de reducir la viabilidad estaría propiciando un efecto de proliferación celular como se observa a en el rango de las concentraciones que va de 0.4 a 0.81 mg/mL (Bell *et al*, 2014). Este efecto debido a que afecta las vías de señalización de MAPK, una enzima heretotrimerica que cumple un papel clave en la regulación de vías catabólicas durante el estrés celular y que regulan el crecimiento celular, la diferenciación, la apoptosis (Vilchis, 2016; Jiao et al., 2014)

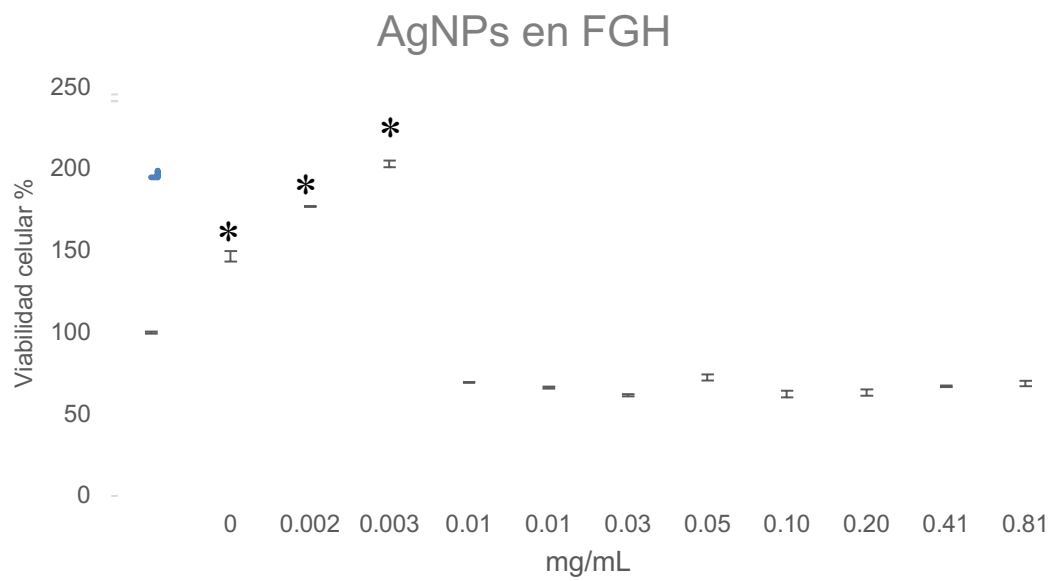
La gráfica 6 corresponde al mismo grupo de AgNPs en contacto con FGH de cultivo primario, en la cual se observa que a pesar que se utilizaron las mismas dosis que en el grupo de línea celular ATCC no se observa una 50<sub>cc</sub> lo cual es una ventaja ya que demuestra dentro de la clasificación, ser ligeramente tóxico lo cual nos estaría hablando de biocompatibilidad. También muestra el efecto de hormesis en dos periodos tanto a las concentraciones de 0.003-0.002 y de 0.03-0.1mg/mL, efecto que ha sido reportado en este tipo de nanopartículas (Jiao et al., 2014).

Para las nanopartículas de dióxido de titanio se observa que a las concentraciones utilizadas no se llega a la 50<sub>cc</sub>, con lo cual muestran ligera citotoxicidad y biocompatibilidad (García-Contreras *et al*, 2016). Se observa en TiO<sub>2</sub>NPs en contacto con FGH de cultivo primario a concentraciones de 0.001-0.002 estimula la proliferación celular siendo así que cuando llega a concentraciones mas altas se ve nuevamente decaída la viabilidad celular.

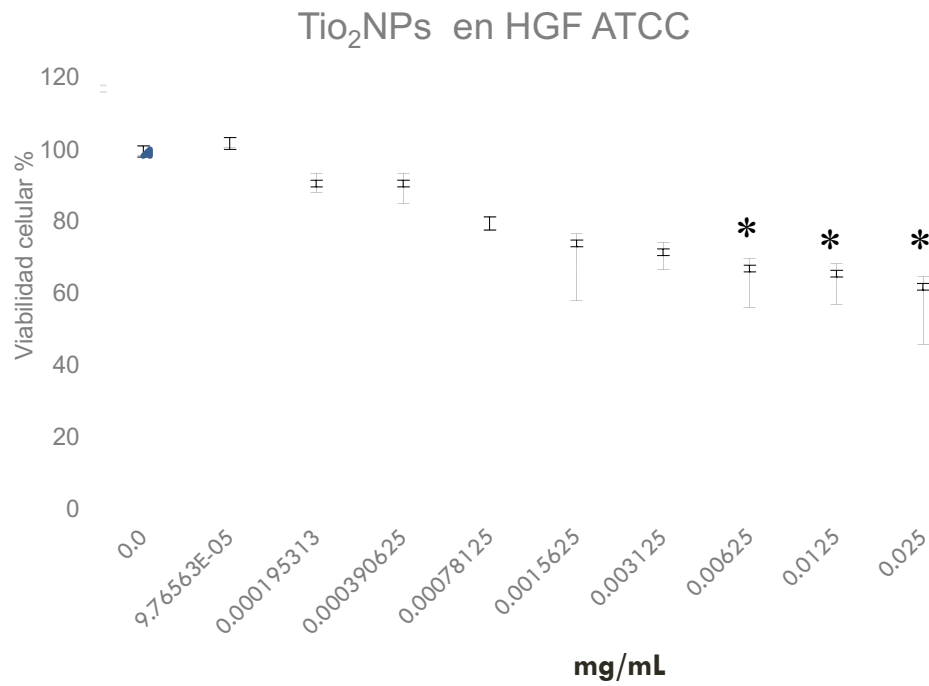


**Gráfica5.** ensayo MTT AgNPs en HGF ATCC CRL-2014

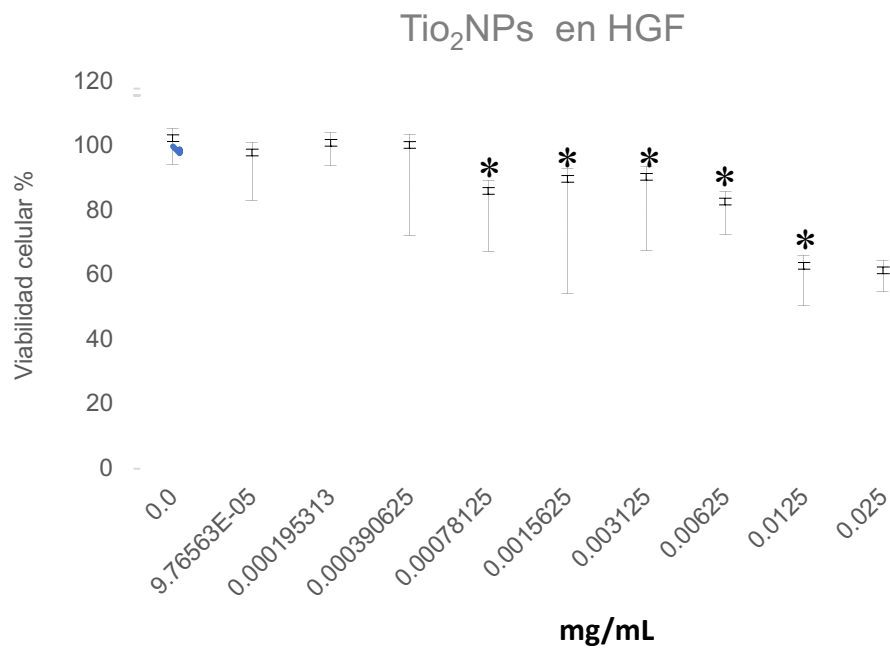
**cc50**  
**1.06 mg/mL**



**Gráfica 6.** ensayo MTT AgNPs en FGH cultivo primario



**Gráfica 7.** ensayo MTT TiO<sub>2</sub>NPs  
en HGF ATCC CRL-2014



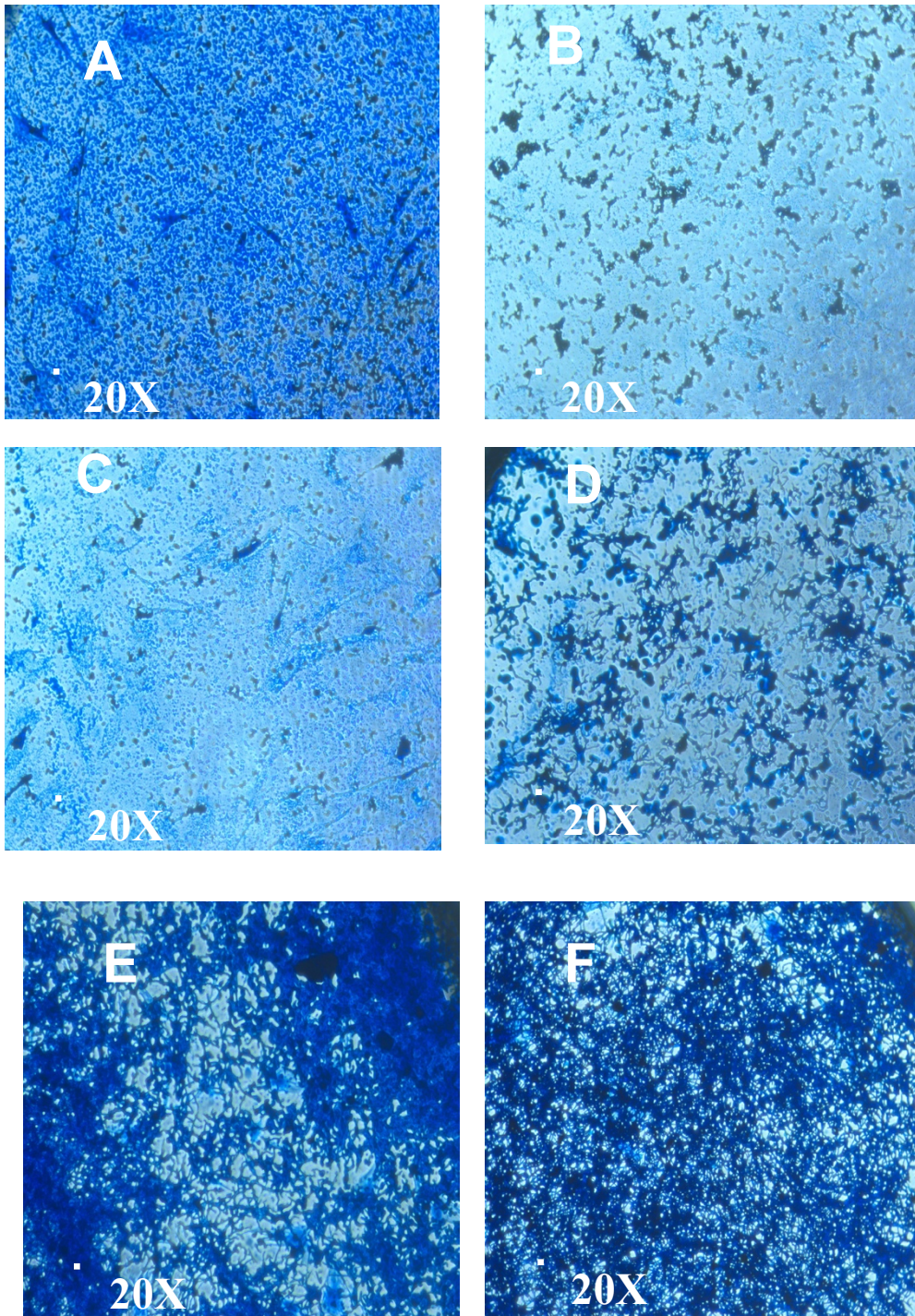
**Gráfica 8.** ensayo TiO<sub>2</sub>NPs en HGF

## **Efecto de AgNPs y TiO<sub>2</sub>NPs en co-cultivo celular de *Candida albicans* y FGH**

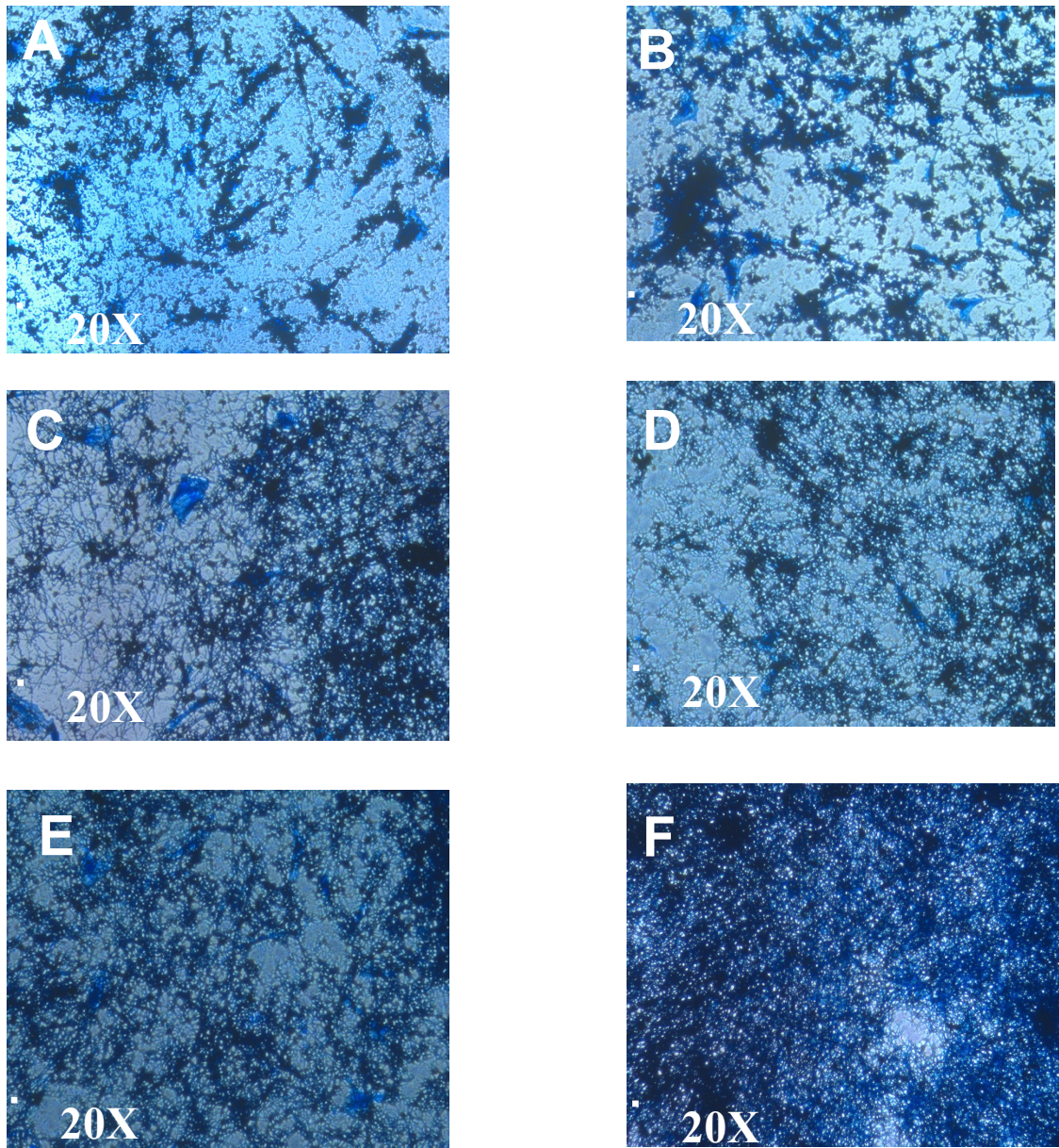
Las diferentes concentraciones probadas muestran efectos diferentes en los FGH en conjunto con *Candida albicans*, se observa que el efecto de las nanopartículas no es selectivo por células o la levadura. Se aplicó tinción con azul de tripano el cual es azul intenso en las células o levaduras. En las figuras 14 y 15 las micrografías A muestran los grupos controles para cada tipo de nanopartícula respectivamente en las cuales se observa la integridad en cuanto a morfología tanto de células como de *Candida*. AgNPs demostró a que las mayores concentraciones tuvo efecto modificando morfología de las especies estudiadas.

Las nanopartículas de dióxido de titanio demostraron no tener efecto en los FGH observándose una tinción intensa tanto en los FGH como en *Candida albicans* así como morfología del fibroblasto similar a la del grupo control en la que no tiene adicionado ningún tratamiento de nanopartículas, a menores concentraciones existe un efecto en la morfología en el crecimiento de *Candida albicans* propiciándolo en forma de hifa, condición que solo se ve favorecida bajo ciertas condiciones específicas como temperatura, nutrientes o pH inclusive por el efecto de otras especies bacterianas (Morse *et al*, 2018).





**Figura 14.** Micrografía AgNPs en contacto con FGH ATCC + *Candida albicans*. La figura A) muestra el grupo control *Candida albicans*+FGH, la figura B) muestra la mayor dosis probada 1.62 mg/mL, C) 0.81 mg/mL, D) 0.20 mg/mL, E) 0.025 mg/mL y por último la menor dosis probada 0.0031 mg/mL.

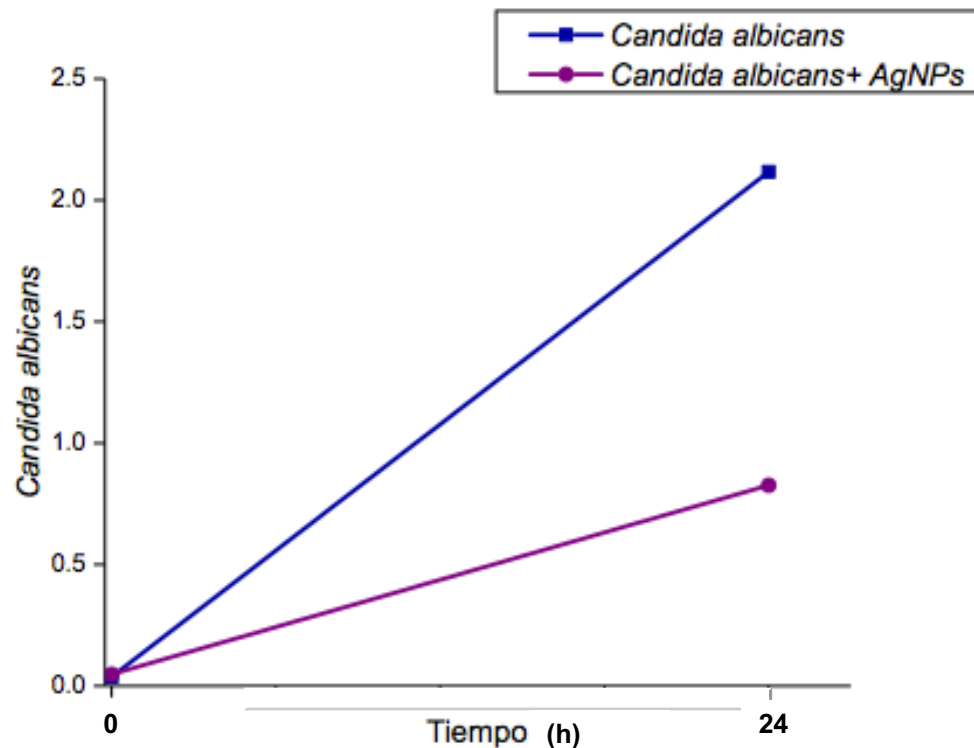


**Figura 15.** Micrografía de  $\text{TiO}_2\text{NPs}$  en contacto con FGH ATCC+ *C. albicans*. La figura A) muestra el grupo control *Candida albicans*+FGH, la figura B) muestra la mayor dosis probada 5 mg/mL, C) 1.25 mg/mL, D) 0.31 mg/mL, E) 0.078 mg/mL y por último la menor dosis probada 0.0097 mg/mL.

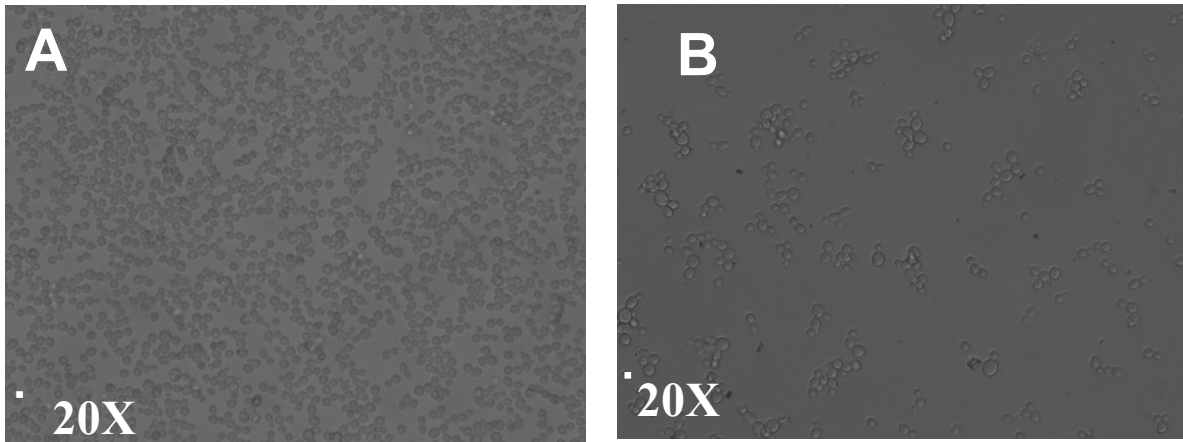
## Etapa 4: Estudio de perfil transcriptómico de *Candida albicans*

### Efecto de AgNPs en el crecimiento de *Candida albicans* a las 24 horas

El crecimiento de *Candida albicans* ATCC 90028 se cuantificó al tiempo 0 y a las 24 horas en la gráfica se observan dos líneas que corresponden a *Candida albicans* y *Candida albicans* en contacto con AgNPs a una concentración de 0.02 mg/mL confirmando efecto de las mismas en el crecimiento de *Candida albicans* también bajo microscopía como se observa en la figura 16 donde la figura A muestra el grupo control mostrando crecimiento de la levadura a diferencia de la B donde se observa un menor número de las mismas, por lo que se decidió llevar a cabo las extracciones de RNA a 24 horas para el estudio de secuenciación.



**Gráfica 9.** Efecto de AgNPs en el crecimiento de *Candida albicans* a las 24 horas

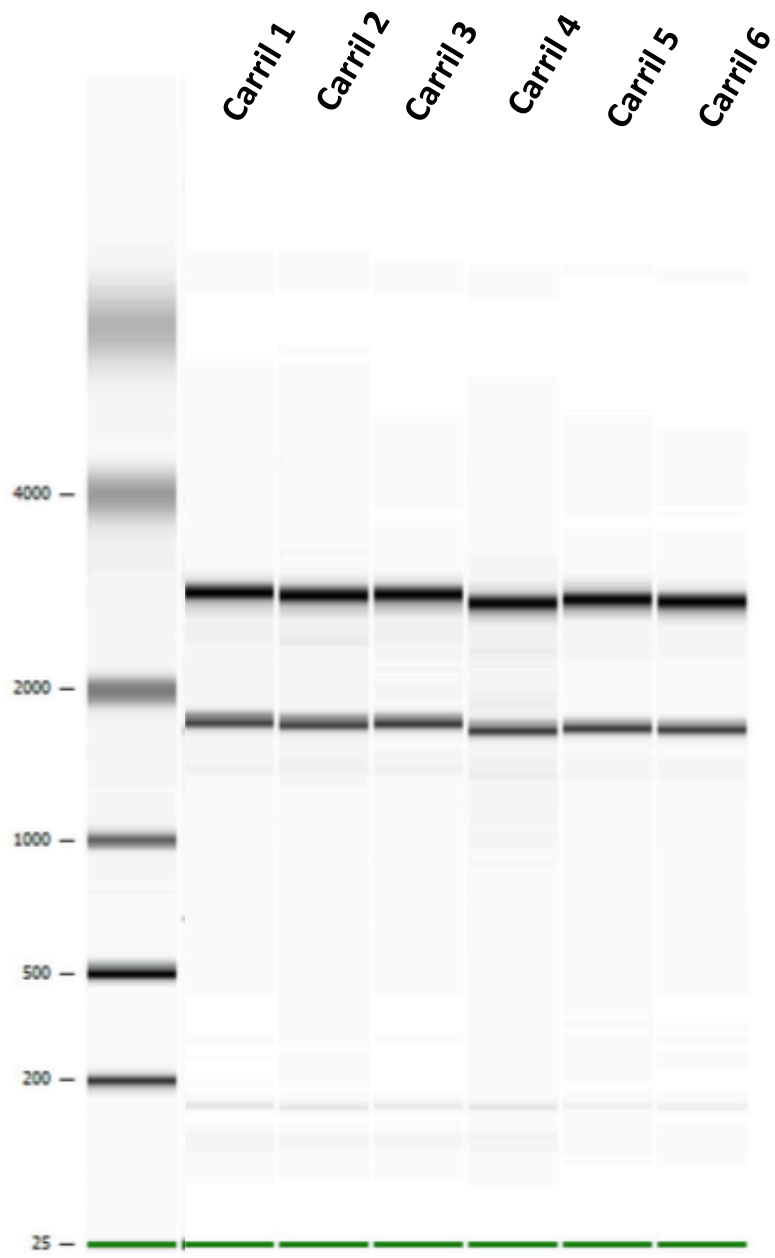


**Figura16.** Micrografía donde se muestran en las imágenes A *Candida albicans* a las 24 horas de crecimiento a 37°C en condiciones aerobias. B muestra *Candida albicans* en contacto con AgNPs a una concentración de 0.02mg/mL donde claramente se observa un efecto de las mismas sobre *Candida albicans*.

## **Extracción de RNA y cuantificación de *Candida albicans* para su estudio mediante la expresión de genes mediante secuenciación de RNA en contacto con nanopartículas de plata**

Se utilizó la concentración de 0.02 mg/mL de nanopartículas de plata debido a que la microscopia muestra que a estas concentraciones se observa un efecto de las AgNPs donde se observa reducción en cuanto al número de *candida* observadas como se observa en las figura 16 (A,B,C y D); se colocaron las mismas condiciones en cuanto a tamaño de colonia (1 mm), medio de cultivo, así como temperatura (37°C) y agitación (200 rpm). Se decidió que fuera a las 24 horas en base al efecto observado en el crecimiento a las 24 horas.

Las extracciones de RNA se llevaron a cabo mediante el kit RiboPure™ Yeast Kit (Invitrogen). Posteriormente mediante nanodrop se cuantificó su pureza y la integridad corriendo un gel de electroforesis que se muestra en la figura 17, donde observamos en la tabla 6 los valores arrojados en cada una de las muestras donde observamos concentraciones dentro de los rangos donde se observa una pureza óptima (2-2.2) (Thermo Scientific Technical Nanodrop Bulletin, 2009).



**Figura 17.** Gel de electroforesis se muestran los 6 grupos de izquierda a derecha los carriles 1,2 y 3 corresponden a los grupos control (*Candida albicans*) y los carriles 4,5 y 6 a los grupos con tratamientos (*Candida albicans* + AgNPs)

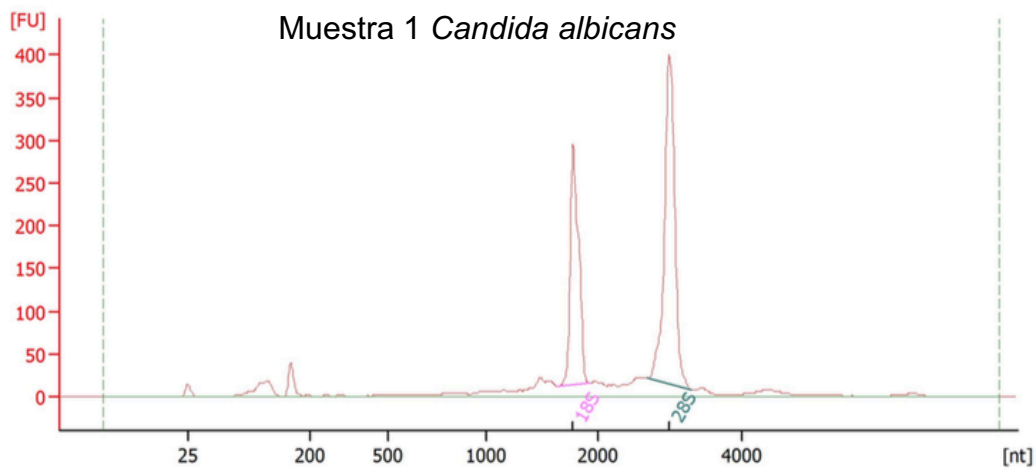
Posteriormente las muestras fueron enviadas al Instituto de Biotecnología de la UNAM, campus Cuernavaca donde las muestras antes de su proceso de secuenciación fueron cuantificadas en pureza e integridad mediante Bioanalyzer 2100, Agilent Technologies Inc que es una herramienta la cual combina técnicas como electroforesis capilar y fluorescencia (Becker *et al.* 2010).

**Tabla 6. Cuantificación de integridad y pureza muestras extraídas de RNA.**

<b>Grupo control</b>	<b>Cantidad ng/<math>\mu</math>L</b>	<b>260/280</b>
<i>Candida albicans</i> 1	1302.3 ng/ $\mu$ L	2.19
<i>Candida albicans</i> 2	1595.2 ng/ $\mu$ L	2.19
<i>Candida albicans</i> 3	1514 ng/ $\mu$ L	2.18
<b>Grupo experimental</b>	<b>Cantidad ng/<math>\mu</math>L</b>	<b>260/280</b>
<i>Candida albicans</i> + AgNPs 1	1194.4 ng/ $\mu$ L	2.23
<i>Candida albicans</i> + AgNPs 2	307.4 ng/ $\mu$ L	2.14
<i>Candida albicans</i> + AgNPs 3	732.0 ng/ $\mu$ L	2.16

Los electroferogramas de las figuras 17,18 y 19 muestran la integridad, así como cuantificación de las tres muestras que fueron del grupo control donde solo fue *Candida albicans*. Las figura 20, 21 y 22 muestran los correspondientes resultados a las muestras que fueron tratadas *Candida albicans* + AgNPs. Se observa en todos los casos el marcador utilizado, correspondiente al nt 25 dentro de los primeros picos de cada gráfica. Seguido por el pico de la subunidad 18S ribosomal y el de la subunidad 28S que idealmente es el doble en tamaño que la subunidad 18S. Los electroferogramas muestran valores RIN de entre 8.80-9.90 como se observa en las imágenes, el valor 1 dentro de la escala RIN nos estaría hablando de un RNA degradado y un valor 10 de un RNA intacto (Schroeder *et al.*, 2006)



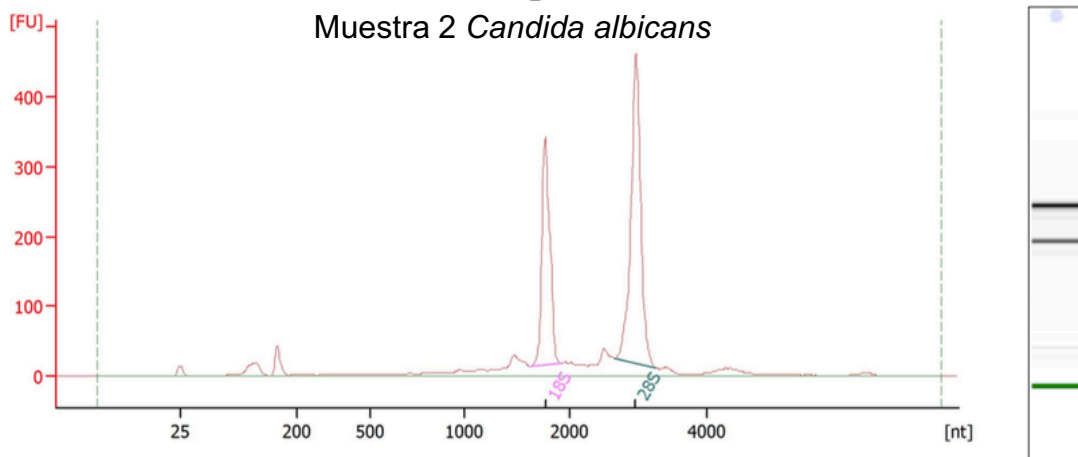


**Overall Results for sample 4 : LSAcosta\_1**

RNA Area:	1,420.9	RNA Integrity Number (RIN):	9.6 (B.02.09)
RNA Concentration:	380 ng/μl	Result Flagging Color:	<span style="background-color: #ccccff; border: 1px solid black; display: inline-block; width: 20px; height: 10px;"></span>
rRNA Ratio [28s / 18s]:	1.5	Result Flagging Label:	RIN: 9.60

**Fragment table for sample 4 : LSAcosta\_1**

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,635	1,919	333.2	23.4
28S	2,668	3,299	501.0	35.3



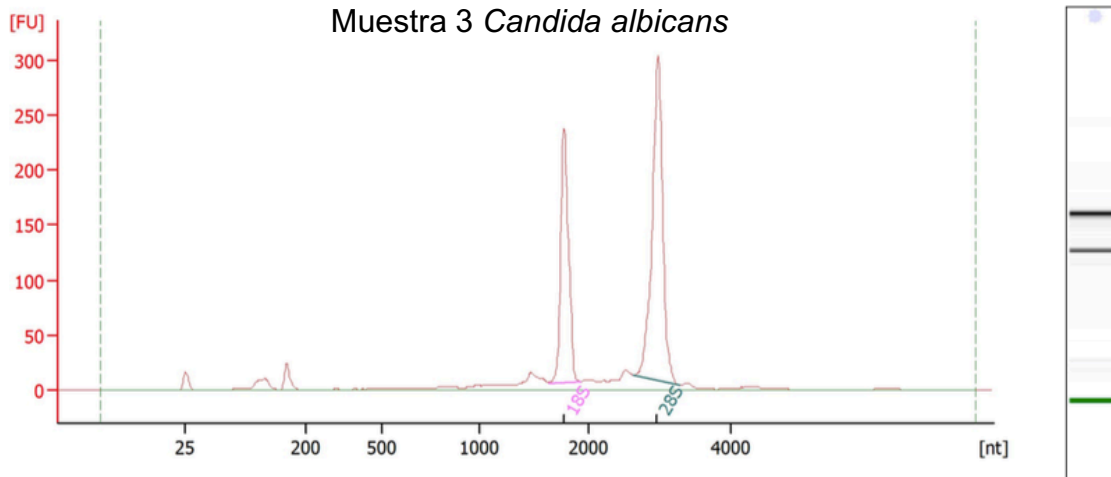
**Overall Results for sample 5 : LSAcosta\_2**

RNA Area: 1,700.9      RNA Integrity Number (RIN): 9.4 (B.02.09)  
 RNA Concentration: 455 ng/μl      Result Flagging Color:   
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.5      Result Flagging Label: RIN: 9.40

**Fragment table for sample 5 : LSAcosta\_2**

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,616	1,913	380.6	22.4
28S	2,653	3,266	587.4	34.5

**Figura 18.** Electroferogramas muestra 2 del grupo control de *C. albicans*.



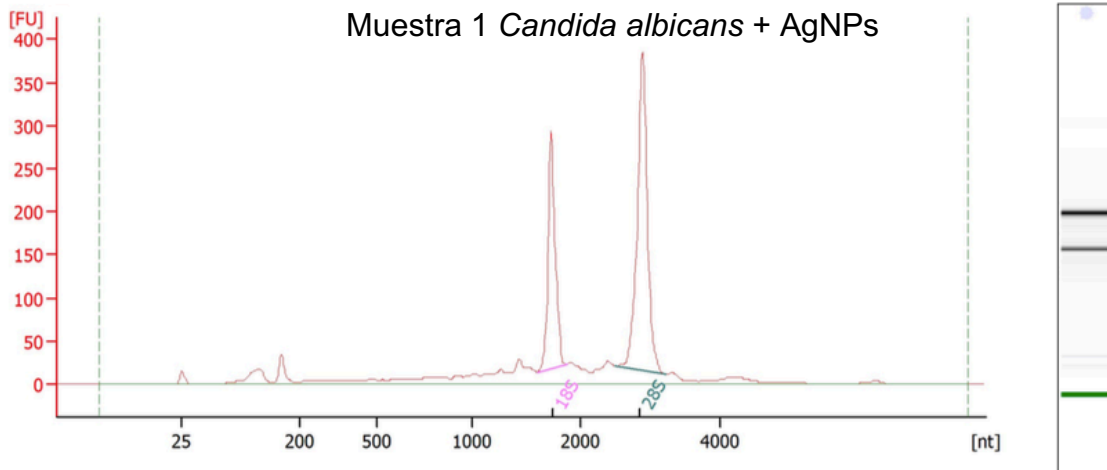
**Overall Results for sample 6 : LSAcosta\_3**

RNA Area: 996.4      RNA Integrity Number (RIN): 9.7 (B.02.09)  
 RNA Concentration: 267 ng/μl      Result Flagging Color:   
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.6      Result Flagging Label: RIN: 9.70

**Fragment table for sample 6 : LSAcosta\_3**

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,630	1,921	250.5	25.1
28S	2,616	3,280	399.4	40.1

**Figura 19.** Electroferogramas muestra 3 del grupo control de *C. albicans*.



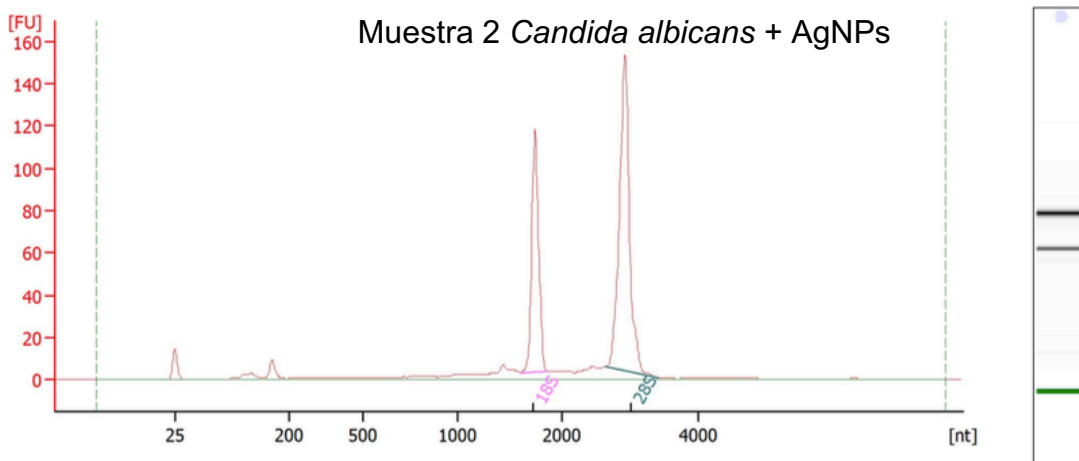
**Overall Results for sample 7 : LSAcosta\_AgCandida\_1**

RNA Area: 1,561.7 RNA Integrity Number (RIN): 8.8 (B.02.09)  
 RNA Concentration: 418 ng/μl Result Flagging Color:   
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.7 Result Flagging Label: RIN: 8.80

**Fragment table for sample 7 : LSAcosta\_AgCandida\_1**

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,596	1,871	290.5	18.6
28S	2,491	3,221	496.1	31.8

**Figura 20.** Electroferogramas muestra 1 del grupo control de *C. albicans*.



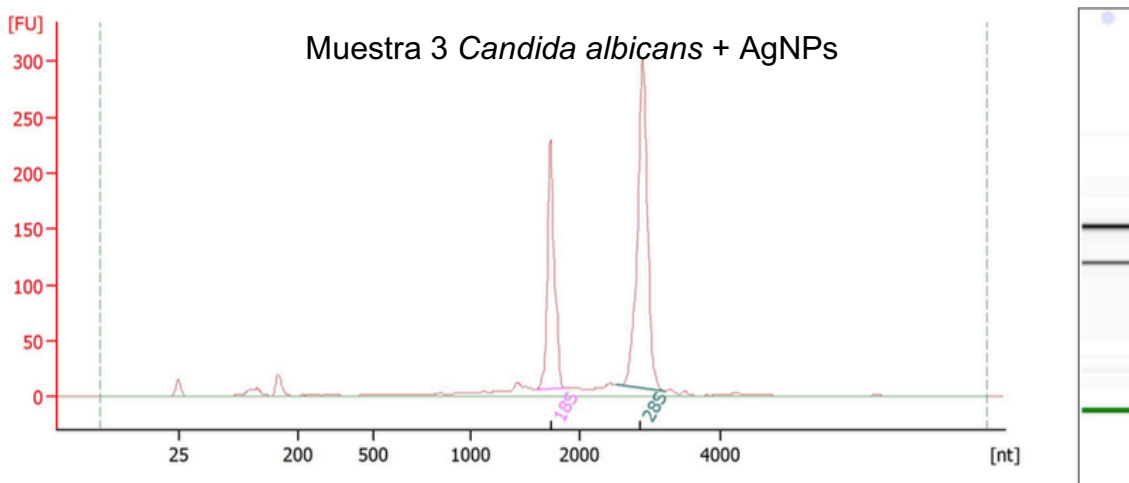
**Overall Results for sample 8 : LSAcostaAgCandida2**

RNA Area: 462.2 RNA Integrity Number (RIN): 9.8 (B.02.09)  
 RNA Concentration: 124 ng/μl Result Flagging Color:   
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.8 Result Flagging Label: RIN: 9.80

**Fragment table for sample 8 : LSAcostaAgCandida2**

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,600	1,860	115.3	24.9
28S	2,631	3,417	203.3	44.0

**Figura 21.** Electroferogramas muestra 2 del grupo control de *C. albicans*.



**Overall Results for sample 9 : LSAcostaAgCandida3**

RNA Area:	912.2	RNA Integrity Number (RIN):	9.9 (B.02.09)
RNA Concentration:	244 ng/μl	Result Flagging Color:	<span style="background-color: #ccccff; border: 1px solid black; display: inline-block; width: 20px; height: 10px;"></span>
rRNA Ratio [28s / 18s]:	1.7	Result Flagging Label:	RIN: 9.90

**Fragment table for sample 9 : LSAcostaAgCandida3**

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,594	1,882	229.6	25.2
28S	2,532	3,208	393.5	43.1

**Figura 22.** Electroferogramas muestra 3 del grupo control de *C. albicans*.





**Tabla 5. Datos generales de secuenciación.**

<b>Datos de secuenciación</b>	<b>Grupo Control</b> <i>Candida albicans</i> muestras 1,2 y 3	<b>Grupo experimental</b> <i>Candida albicans</i> +AgNPs muestras 1,2 y 3
<b>Número de reads crudos</b>	30687378	33233001
<b>Número de reads filtrados</b>	28503316 (92.88%)	30430674 (91.57%)
<b>% GC</b>	35.62	34.95
<b>Número total de bases</b>	4898699.75	4666049.25
<b>Número de contigs</b>	6295	5695
<b>Tamaño máximo de contigs</b>	14051	10610

Las tablas de la 5 a la 8 presentan los 15 genes que más se expresaron o que menos se expresaron tanto para el grupo control como para el grupo experimental. La tabla 5 muestra los 15 genes que más se expresaron en *Candida albicans* sin ser tratada con nanopartículas. Se observa que entre estos está el gen WH11, el cual, es un gen que aumenta la virulencia de *Candida albicans* así como de importancia en la fase como levadura de consistencia blanca opaca lo cual coincide con este tipo de cepa la cual ha sido tipificada por la ATCC siendo característico descrito como colonias blancas, suaves consistencia sebosa.

Varios de estos genes destacan como “ORF sin caracterizar” ya que no se sabe exactamente de qué proteína se trata aunque se infiere en su descripción

como “ortólogo” de algún gen de alguna otra especie cercana tal como *S. cerevisiae*. Algunos de estos genes son componentes de la subunidad ribosomal 60s implicados en la síntesis de proteínas , que es una actividad normal en la célula que tiene que ver con transcripción. Las metaloproteínas que son una superfamilia de proteínas las cuales son ricas en cisteína capaces de unir metales a su estructura y su función principal es mantener la homeostasis de zinc intracelular así como la detoxificación de metales relacionado al estrés capaz de proteger de los radicales libres generados por estrés oxidativo. Proteínas implicadas en la síntesis de ATP que es esencial en los procesos bioquímicos intracelulares (Srikhanta et al, 1997).

La tabla 6 muestra los 15 genes del grupo control menos expresado, entre los cuales, se encuentra la proteína con un dominio de ADN/ARN helicasa DEAD la cual es una gran familia de ARN/DNA helicasas que comparten un motivo proteico común con la secuencia de aminoácidos D E A D (Asp Glu Ala Asp) que participan en procesos del metabolismo de RNA/DNA así como en la regulación de su función. Mnn43 es una proteína que es requerida para la transferencia de manosilfosfato confiriendo una carga negativa a la pared, de importancia en las interacciones con las células fagocíticas de los sistemas inmunitarios y los péptidos antimicrobianos (González-Hernández et al, 2017). En general se observa poca expresión de genes implicados en la respuesta al estrés celular, así como biosíntesis de ATP , con lo cual se infiere que es un organismo en condiciones las cuales no necesita activar respuestas al estrés ya que se encuentra en un estado óptimo.

La tabla 7 muestra genes que se expresaron de *Candida albicans* bajo tratamiento de nanopartículas de plata, entre los cuales, se encuentra el gen de la metalotena implicado en mantener la homeostasis de zinc intracelular así como en la respuesta al estrés capaz de proteger de los radicales libres generados por estrés oxidativo el cual fue un gen de los más expresados en el grupo control, cabe destacar que a diferencia del grupo control, en el grupo experimental se expresó bajo una condición la cual lo pide debido a que está reportado que las AgNPs producen un efecto de



especies reactivas de oxígeno conllevando a una oxidación de sus componentes intracelulares provocando lisis celular.

Uno de los genes que más se expresó es el gen STF2, es una proteína involucrada en la biosíntesis de ATP, la célula al prender sus mecanismos de defensa necesita más energía para sus procesos metabólicos así como para dar respuesta al estímulo que está recibiendo, cabe destacar que es una proteína que se ve reprimida cuando *Candida albicans* se encuentra en forma de hifa lo cual concuerda con lo observado en el presente estudio debido a que *Candida albicans* se encuentra en forma de levadura (Gulati et al, 2016)

Otro de los genes más expresados fue RBT5 el cual es miembro de las proteínas GPI, que es un gen que se induce cuando hay disminución de hierro. Cabe destacar que el hierro es importante ya que tiene una gran capacidad de cesión y captación de electrones, es un cofactor esencial en numerosas reacciones intracelulares de oxidoreducción, para la cadena de respiración mitocondrial, metabolismo de los aminoácidos, síntesis de ácidos nucleicos. Por lo cual se observa que se expresa un gen de gran importancia para funciones esenciales celulares (Alvarez et al, 2013).

Otro gen mayormente expresado fue el gen regulador de la utilización de sorbosa, el cual es un monosacárido de 6 carbonos con un grupo cetona, se sabe que *Candida albicans* utiliza la sorbosa como fuente de carbono.

La tabla 8 muestra los genes que menos se expresaron cuando *Candida albicans* se encuentra en contacto con AgNPs. Entre estos, el gen de la ubiquitina, la cual es una proteína reguladora que dirige el reciclaje de proteínas, se asocia a proteínas marcándolas para su destrucción (Peña-Rangel et al, 2012).

Otro que se ve menos expresado es el transportador de potasio, lo cual hace inferir que interfiere en procesos fundamentales intracelulares ya que el potasio es

vital en la homeostasis de cationes , los cuales se ven implicados en volumen celular,pH así como el potencial de membrana.

El gen que codifica a complejos fosfatidinositol 3 quinasa la cual tiene que ver con procesos relacionados a crecimiento y supervivencia celular lo cual se observa que las AgNPs afectan a este sistema. Y por último el gen que codifica a GPI (glicosilfosfolinositol) el cual es un glucolípido que se forma de forma covalente al extremo carboxilterminal de alguna proteína. En levaduras como *S Cerevisiae* es de gran importancia ya que las proteínas que se unen a GPI para ser enviadas para su incorporación a la pared celular por lo cual un mal funcionamiento en estas conlleva a una incorrecta síntesis de la pared celular por lo que podemos observar que AgNPs afectó su síntesis.

La tabla 9 muestra genes de interés del estudio ya que en el presente estudio genes que tienen que ver con la respiración celular así como el crecimiento , respuesta al estrés así como genes que codifican proteínas de la pared celular como en estudios realizados con nanopartículas en los cuales también se vieron genes que regulan crecimiento, estrés celular así como de reproducción ( Zhang *et al*, 2016).

En los genes de interés en *Candida albicans* se observa que los genes que aumentaron su expresión fueron como el gen de la actina que es conocido por ser un gen de referencia ya que es una proteína básica para el citoesqueleto lo cual podría darnos pista de que había más movimiento de la misma ya sea por tráfico de proteínas (Morse *et al*, 2015).

Genes que se vieron más expresados fueron genes relacionados con la síntesis de componentes de la pared celular así como diacilglicerol (PLD1), PHR1 que tiene que ver con actividad transferasa y alargamiento de cadenas beta-(1,3)-glucanosiltransferasas y ERG 3 que es una proteína que cataliza la inducción de doble enlace C-5 que contribuye a la biosíntesis del ergosterol componente esencial

de la pared celular. Cabe destacar que los datos de secuenciación confirman lo observado en las microscopias SEM donde se observó cambios en la pared celular. Otros genes que se vieron mayormente expresados en comparación del grupo control fueron AHP1 el cual está implicado en respuesta al estrés oxidativo con lo cual podemos confirmar que en efecto, las nanopartículas de plata presentan un mecanismo de oxidación en *Candida albicans* como también ya se había reportado anteriormente en la primeras tablas.

CDR2 que codifica a un transportador de salida multidroga que a comparación de los genes que se vieron expresados en *Candida* cuando no estaba en contacto con las nanopartículas se observa que en esa condición no se vio expresado por lo cual podemos decir que AgNPs causaron un efecto de toxicidad que *Candida* reconoció como amenaza de manera que activó mecanismos similares a los que activa cuando está en contacto con antifúngicos (Chen *et al*, 2010)

En contraste, genes que se vieron menos expresados están ALS1 el cual es una proteína que tiene que ver con la adhesión a la superficie, razón por la cual se podría decir que en la microscopia de fluorescencia a concentraciones altas no se observan candidas adheridas a la superficie de los discos de PMMA (Morse *et al*, 2018).

ALS 3 también se vio menos expresado cabe destacar que este es un gen que también tiene que ver con la adhesión a superficies así como de invasión es importante recalcar que se vio que el gen SFT2 fue uno de los genes más expresados por lo cual *Candida albicans* intentó defenderse de la condición que le hacía falta hierro y justamente este gen ALS3 depende el funcionamiento correcto del hierro razón por la cual podría decir que se vio menos expresado (Fanning *et al*, 2013).

Genes como del grupo de MTLA se vieron también menos expresados los cuales tienen que ver con la reproducción. PHR1 también se vio menos regulado ya que es un gen que tiene que ver con la patogenicidad del organismo así como papel

esencial en morfogenesis lo cual es un dato bueno ya que podriamos decir que afecta en estops aspectos a *candida albicans* reduciendo niveles de patogenicidad. Por último proteínas de la familia SAP como SAP 4 y 6 que son de importancia ya que son de interés al ser clave en la virulencia y penetración en los tejidos activando tripsinogeno el cual tiene la función de degradar la queratina que se encuentra, en el caso de la cavidad oral, en tejidos blandos lo cual propicia su invasión por lo que también es un resultado favorable pudiendo reducir el efecto de las mismas en el hospedero (Watchler et al, 2011).

**Tabla 5. Genes que más se expresaron en el grupo control (*Candida albicans*)**

Locus	FPKM	GEN
C5_04560C_A:0-102	35825.3	CUP1 Metalotioneína; involucrado en la resistencia al cobre; cobre inducido
C5_04560C_B:0-102	33904.6	Metalotioneína; involucrado en la resistencia al cobre; Inducción de cobre. Proteína de función desconocida; hipoxia, reprimida por Hap43; inducido por ketoconazol; inducida en la candidiasis bucal faríngea; Modelo de flujo de 16 h con biopelícula reprimida, modelo de flujo en etapa tardía con biopelícula inducida;
C1_11320C_B:0-231	24347.4	Catéter de rata y biopelícula de araña inducida
C2_05180W_A:0-198	24336.1	WH11 Transcripción de levadura en fase blanca; expresión en opacos aumenta la virulencia / cambio; interruptores mutantes como WT; Hap43, hipoxia, ketoconazol inducido; requerido para la biopelícula RPMI; Bcr1 inducido en RPMI a / a biofilm
C2_05180W_B:0-198	24221.1	Transcripción de levadura en fase blanca; expresión en opacos aumenta la virulencia / cambio; interruptores mutantes como WT; Hap43, hipoxia, ketoconazol inducido; requerido para la biopelícula RPMI; Bcr1 inducido en RPMI a / a biofilm endoproteasa; inducido por el factor alfa; transcripción está regulada al alza en un modelo RHE de candidiasis oral y en aislamientos clínicos de pacientes VIH + con candidiasis oral
C1_11320C_A:0-231	22465.7	Proteína implicada en la biosíntesis de ATP; reprimido en hifas; reprimido por Efg1, Hap43; transcripción upregulated en aislamientos clínicos de pacientes VIH + con candidiasis oral; Catéter de rata, modelo de flujo y biopelícula de araña inducida.
C2_00250W_B:0-270	22293.5	Proteína implicada en la biosíntesis de ATP; reprimido en hifas; reprimido por Efg1, Hap43; transcripción upregulated en aislamientos clínicos de pacientes VIH + con candidiasis oral; Catéter de rata, modelo de flujo y biopelícula de araña inducida.
C2_00250W_A:0-270	22176.8	Inducida.
C1_06470W_B:0-156	21458.7	un componente de la subunidad ribosomal 60S; Inducido por Hap43; Biopelícula araña reprimida
C1_06470W_A:0-156	21389.6	ORF sin caracterizar; (orf19.6264.4) Ortholog de <i>S. cerevisiae</i> Rpl39; un componente de la subunidad ribosomal 60S; Inducido por Hap43
C5_03900W_B:0-255	20080.4	Regulador de la utilización de sorbosa; putativo ancla GPI; Hifa y regeneración de la pared celular inducida; regulación de genes relacionados con la morfología de las colonias por Ssn6; inducido por Tbf1, Hap43.
C3_02710W_A:0-213	16370.9	ORF sin caracterizar; (orf19.1639) Tiene dominio (s) con actividad de oxidoreductasa predicha y papel en el proceso de reducción de oxidación
C4_01050C_B:0-159	15888.3	Proteína con similitud con la porción de proteína ribosomal de <i>S. cerevisiae</i> Rpl40Bp; regulación de genes relacionados con la morfología de las colonias por Ssn6; regulado positivamente por Tbf1; Biopelícula araña reprimida
C1_08350C_B:0-192	15845.6	Ortholog de <i>C. dubliniensis</i> CD36 <i>: Cd36_02630, <i> C. parapsilosis CDC317 </i>: CPAR2_206910, <i> Candida tenuis NRRL Y-1498 </i>: cten_CGOB_00051 y <i> Pichia stipitis Pignal </i>: psti_CGOB_00173

**Tabla 6.** Genes que menos se expresaron en el grupo control (*Candida albicans*)

Locus	FPKM	GEN
C4_00780C_B:101-1317	0.530073	Los ortólogos tienen un papel en la localización de la proteína en la membrana plasmática, la orientación de la proteína en la vacuola, la endocitosis mediada por receptores, la respuesta a la feromona y el parche cortical de actina, el citosol, el endosoma, la localización de la membrana plasmática
C2_02050C_A:726-2202	0.632818	STF2 Proteína implicada en la biosíntesis de ATP; reprimido en hifas; reprimido por Efg1, Hap43; transcripción regulada al alza en aislamientos clínicos de pacientes VIH + con candidiasis ora
C2_08560W_B:1423-2678	0.663568	ORF sin caracterizar; (orf19.3623) Proteína similar a <i>S. cerevisiae</i> Smc2p, que es un componente del complejo de condensina involucrado en la condensación del cromosoma mitótico; inducido bajo tratamiento con hidroxurea
C3_00030C_A:9-1251	0.671864	Proteína con un dominio de ADN / ARN helicasa predicho como DEAD; muestra la regulación de los genes relacionados con la morfología de las colonias por Ssn6; se superpone orf19.5472;
C7_01840W_A:3321-4359	0.707256	Componente del anillo de actomiosina en el cuello del brote; la fosforilación de ser regulada por el ciclo celular en los sitios CDK regula la asociación con Bni1 / Bnr1, la degradación de Iqg1 y el desmontaje del anillo; La mutación causa defectos citocinéticos.
C3_02070C_A:39-1020	0.759019	Tiene dominio (s) con actividad de oxidoreductasa predicha y papel en el proceso de oxidación-reducción endoproteasa; inducido por el factor alfa; transcripción está regulada al alza en un modelo RHE de candidiasis oral y en aislamientos clínicos de pacientes VIH + con candidiasis oral
CR_09470W_B:1485-2463	0.761954	ORF sin caracterizar; (orf19.1943) Ortholog de <i>C. parapsilosis</i> CDC317 <i>: CPAR2_302610, <i> C. dubliniensis CD36 </i>: Cd36_51070, <i> Candida orthopsilosis Co 90-125 </i>: CORT_0E04770 y <i> Spathaspora passalidarum
C5_01260W_A:236-1192	0.784191	NRRL Y-27907 </i>: SPAPADRAFT_50634
C1_10430W_A:439-1452	0.795341	Supuesta fosfatasa alcalina vacuolar represora; Transcripción inducida por Rim101; regulado por Tsa1, Tsa1B en medios mínimos a 37 grados; posiblemente inducida por la adherencia
CR_08450C_A:41-967	0.816694	ORF sin caracterizar; (orf19.6414) Ortholog de <i> C. dubliniensis CD36 </i>: Cd36_34040, <i> C. parapsilosis CDC317 </i>: CPAR2_205850, <i> Candida tenuis NRRL Y-1498 </i>: CANTEDRAFT_132607 y <i> Debaryomyces hansenii
C1_02670C_A:1220-2409	0.816864	CBS767 </i>: DEHA2A11638g
C2_02750C_A:15-1316	0.831416	MNN43 Proteína requerida para la transferencia de manosilfosfato.
C2_08560W_A:848-1868	0.854245	ORF sin caracterizar; (orf19.5831) Ortholog de <i> C. parapsilosis CDC317 </i>: CPAR2_212260, <i> C. dubliniensis CD36 </i>: Cd36_17620, <i> Candida orthopsilosis Co 90-125 </i>: CORT_0A11590 y <i> Candida tropicalis MYA-3404
C2_05070W_A:90-2205	0.870929	</i>: CTRG_01348
		ORF sin caracterizar; (orf19.3623) Proteína similar a <i>S. cerevisiae</i> Smc2p, que es un componente del complejo de condensina involucrado en la condensación del cromosoma mitótico; inducido bajo tratamiento con hidroxurea
		FRE9 Reductasa férrica; inducido alcalino; ciclopirox olamina; Inducido por Hap43

**Tabla 7.** Genes que más se expresaron en el grupo experimental (*Candida albicans* + AgNPs)

locus	FPKM	GEN
C2_05180W_A:0-198	36038	Transcripción de levadura en fase blanca; expresión en opacos aumenta la virulencia / cambio; interruptores mutantes como WT; Hap43, hipoxia, ketoconazol inducido; requerido para la biopelícula RPMI; Bcr1 inducida en RPMI a / a biofilm; catéter de rata, biopelícula de araña inducida
C2_05180W_B:0-198	35234.1	Transcripción de levadura en fase blanca; expresión en opacos aumenta la virulencia / cambio; interruptores mutantes como WT; Hap43, hipoxia, ketoconazol inducido; requerido para la biopelícula RPMI; Bcr1 inducida en RPMI a / a biofilm; catéter de rata, biopelícula de araña inducida
C4_01050C_A:0-159	14801.9	RPL40B Proteína con similitud con la porción de proteína ribosomal de <i>S. cerevisiae</i> Rpl40Bp; regulación de genes relacionados con la morfología de las colonias por Ssn6; regulado positivamente por Tbf1; Biopelícula araña reprimida
C4_01050C_B:0-159	14460.9	Protein with similarity to the ribosomal protein portion of <i>S. cerevisiae</i> Rpl40Bp; colony morphology-related gene regulation by Ssn6; positively regulated by Tbf1; Spider biofilm repressed
C1_13210C_A:23-165	13733.2	Proteína con similitud con la porción de proteína ribosomal de <i>S. cerevisiae</i> Rpl40Bp; regulación de genes relacionados con la morfología de las colonias por Ssn6; regulado positivamente por Tbf1; Biopelícula araña reprimida
C1_06470W_A:0-156	12795.2	ORF sin caracterizar; (orf19.6264.4) Ortholog de <i>S. cerevisiae</i> Rpl39; un componente de la subunidad ribosomal 60S; Inducido por Hap43
C1_06470W_B:0-156	12733.8	ORF sin caracterizar; (orf19.6264.4) Ortholog de <i>S. cerevisiae</i> Rpl39; un componente de la subunidad ribosomal 60S; Inducido por Hap43
C1_13210C_B:41-184	9256.33	Orthologo de <i> C. parapsilosis CDC317 </i>: CPAR2_801735, <i> C. dubliniensis CD36 </i>: Cd36_84090, <i> Candida orthopsilosis Co 90-125 </i>: CORT_0B03960 y <i> Spathaspora passalidarum NRRL Y-27907 </i>: SPAPADRAFT_141253
C5_04560C_A:0-102	8315.58	Metalotioneína; involucrado en la resistencia al cobre; cobre inducido; Biopelícula de araña inducida; biofilm modelo de flujo reprimido
C5_04560C_B:0-102	8231.07	Metalotioneína; involucrado en la resistencia al cobre; cobre inducido
C2_00250W_A:0-270	7345.79	STF2 Proteína implicada en la biosíntesis de ATP; reprimido en hifas; reprimido por Efg1, Hap43; transcripción regulada al alza en aislamientos clínicos de pacientes VIH + con candidiasis oral
C2_00250W_B:0-270	7167.71	Proteína implicada en la biosíntesis de ATP; reprimido en hifas; reprimido por Efg1, Hap43; transcripción regulada al alza en aislamientos clínicos de pacientes VIH + con candidiasis oral
C4_00130W_A:0-726	6710.12	RBT5 Proteína de la pared celular unida a GPI; utilización de hemoglobina; Rfg1, Rim101, Tbf1, Fe regulado; Sfu1, Hog1, Tup1, suero, pH alcalino, antifúngicos, geldamicina reprimida; Hap43 inducido; requerido para biopelículas RPMI
C5_03900W_B:0-255	6586.33	Regulador de la utilización de sorbosa; putativo ancla GPI; Hifa y regeneración de la pared celular inducida; regulación de genes relacionados con la morfología de las colonias por Ssn6; inducido por Tbf1, Hap43.





**Tabla 8.** Genes que más se expresaron en el grupo experimental (*Candida albicans*+ AgNPs)

Locus	FPKM	GEN
C4_01560C_B:1080-2187	0.546171	Los ortólogos tienen actividad ubiquitina-ubiquitina ligasa, papel en la exportación de ATP, herencia mitocondrial, monoubiquitinación de proteínas, poliubiquitinación de proteínas y membrana plasmática, localización del complejo ubiquitina ligasa
C4_02820W_B:758-1935	0.553038	Los ortólogos tienen un papel en la recombinación meiótica recíproca.
CR_01080W_B:2975-4839	0.594752	Es probable que sea esencial para el crecimiento, basado en una estrategia de inserción de mutagénesis.
C4_03830W_B:1647-2965	0.603942	Actividad predicha de ARNt (guanina) metiltransferasa.
C1_04280C_A:52-1185	0.627445	tienen actividad de dolichyl-phosphate-mannose-glycolipid alfa-manosiltransferasa, papel en el proceso biosintético del ancla GPI y componente integral de la membrana del retículo endoplásmico, localización del complejo de la manosiletransferasa
C3_01330W_B:1695-2747	0.634385	Factor de transcripción predicho de Zn (II) 2Cys6; reprimido por el tratamiento con flufenazina; Requerido para la adherencia de las células de levadura al sustrato de silicona.
C1_06610C_A:772-1670	0.645658	Putativo transportador de potasio; similar a <i>Schwanniomyces occidentalis</i> Hak1p; inducida por anfotericina B; inducido por la fagocitosis por macrófagos; Hap43-reprimido; catéter de rata biopelícula reprimida
C3_01120W_A:65-974	0.69917	Metiltransferasa predicha; catéter de rata biopelícula inducida
C4_02670W_B:404-1371	0.704889	Subunidad putativa de los complejos de fosfatidilinositol 3-quinasa I y II; La transcripción se activa en presencia de CO2 elevado. BMT4 Beta-manosiltransferasa; para el alargamiento de las cadenas de beta-manosa en la fracción lábil al ácido del fosfopeptidomanano de la pared celular; Miembro de la familia de 9 genes; regulado por Tsa1, Tsa1B; biofilm inducido modelo de
C6_03250W_A:111-940	0.716732	flujo;
C1_02670C_A:959-2412	0.718345	MNN43 Proteína requerida para la transferencia de manosilfosfato.
C1_06610C_B:363-1426	0.730658	ORF sin caracterizar; (orf19.6249) transportador putativo de potasio; similar a <i>Schwanniomyces occidentalis</i> Hak1p; inducida por anfotericina B; inducido por la fagocitosis por macrófagos; Hap43-reprimido.
C5_01720C_A:507-1570	0.730658	RCY1 Supuesta proteína de la caja F involucrada en el tráfico de membrana endocítica y / o reciclaje; Específico de hongos (no homólogo humano o murino)
C2_08690C_A:23-1392	0.731556	ORF sin caracterizar; (orf19.3607) Ortholog de <i>C. dubliniensis</i> CD36: Cd36_22860, <i>C. Parapsilosis</i> CDC317: CPAR2_806540, <i>Candida tenuis</i> NRRL Y-1498: CANTEDRAFT_108823 y <i>Debaryomyces hansenii</i> CBS767: DEHA2B13596g

**Tabla 9.** Genes de interés, función y nivel de expresión.

ID	Nombre	Función	FPKM	
			Control	<i>C. albicans</i> + AgNPs
>C1_13700W_A	ACT1	Las actinas son proteínas altamente conservadas que están involucradas en varios tipos de motilidad celular y se expresan de manera ubicua en todas las células eucariotas	116.816	735.015
>C6_03700W_A	ALS1	Proteína principal de adhesión a la superficie celular que media tanto la adherencia del tejido de la levadura al huésped como la agregación de la levadura. Actúa como un efector descendente de la vía reguladora EFG1. Requerido para la agregación inducida por rapamicina de <i>C.albicans</i> . Se une a los glucanos y media la adherencia a las células endoteliales y epiteliales, desempeñando así un papel importante en la patogénesis de las infecciones por <i>C.albicans</i> .	1688.46	274.55
>CR_07070C_A	ALS3	Proteína de adhesión a la superficie celular que media tanto la adherencia del tejido de la levadura al huésped como la agregación de la levadura. Juega un papel importante en la formación de biopelículas y la patogénesis de las infecciones por <i>C.albicans</i> . Necesario para que <i>C.albicans</i> se una a N-cadherina en las células endoteliales y E-cadherina en las células epiteliales orales y la posterior endocitosis por estas células. Durante la infección diseminada, media el tráfico inicial al cerebro y la corteza renal y contribuye a la persistencia de hongos en los riñones.	38.6322	24.6475
>C4_03510C_A	HWP2	Proteína de la pared celular anclada a GPI requerida para la eficacia de apareamiento, formación de biopelículas, adhesión, crecimiento filamentosos y tolerancia al estrés oxidativo. Participa en la infección diseminada normal en un modelo de candidiasis sistémica de ratón	1.02554	-
>C6_03170C_A	MDR1	Bomba de eflujo multidroga de membrana plasmática que confiere resistencia a numerosos productos químicos, incluidos azoles como fluconazol, voriconazol y benzotriazoles, así como a benomil, cicloheximida, metotrexato, 4-nitroquinolina-N-óxido, sulfometuron metilo, cerulenina y forinina.	11.5909	2.42409
>C5_00660C_A	ERG11	Cataliza la desmetilación C14 de lanosterol que es fundamental para la biosíntesis de ergosterol. Transforma el lanosterol en 4,4'-dimetil colest-8,14,24-trieno-3-beta-ol	13.5566	14.7197
>C6_03500C_B	SAP4	Escisión preferencial en el carboxilo de los aminoácidos hidrófobos, pero no logra escindir 15-Leu-   -Tyr-16, 16-Tyr-   Leu-17 y 24-Phe-   -Phe-25 de la cadena B de insulina. Activa el tripsinógeno y degrada la queratina	12.0663	1.40867

		Las peptidasas aspárticas secretadas (SAP) son un grupo de diez hidrolasas ácidas consideradas como factores clave de virulencia. Estas enzimas suministran al hongo aminoácidos nutritivos y también son capaces de degradar las proteínas del huésped seleccionado involucradas en la defensa inmunológica. Durante la infección, juega un papel importante en la penetración en tejidos más profundos y en la interacción con la defensa del huésped. Activa la inmunidad sistémica del huésped e induce la producción de citoquinas inflamatorias del huésped de forma independiente de la actividad proteolítica. Contribuye a la patogenicidad corneal. Además, actúa hacia la hemoglobina humana a través de una proteólisis limitada para generar una variedad de hemocidinas antimicrobianas, lo que permite competir con los otros microorganismos del mismo nicho fisiológico utilizando los péptidos microbicidas generados a partir de la proteína huésped.	5.35431	1.20598
>C6_02710C_A	SAP6	Fosfolipasa d1; requerido para el ácido fosfatídico y para la mayoría de la producción de diacilglicerol.	6.20781	11.0454
C1_11590W_A	PLD1	Divide internamente una molécula de 1,3-beta-glucano y transfiere el extremo reductor recién generado (el donante) al extremo no reductor de otra molécula de 1,3-beta-glucano (el aceptor) formando un enlace 1,3-beta , lo que resulta en el alargamiento de las cadenas de 1,3-beta-glucano en la pared celular. Tiene actividad transferasa.	138.25	461.793
>C4_04530C_A	PHR1	Requerido para el crecimiento celular apical y juega un papel esencial en la morfogénesis. Puede ser parte integral de la capacidad patógena del organismo.	491.632	95.6406
>C1_00220W_A	PHR2	Actividad de alquil hidroperóxido reductasa Actividad de la peroxidasa de tiorredoxina homeostasis redox celular Respuesta celular al estrés oxidativo.	68.5238	729.192
>C4_02410C_A	AHP1	peróxido de hidrógeno proceso catabólico Requerido para la adaptación al estrés,	164.588	11.7059
>CR_05610C_A	SRR1	morfogénesis y virulencia		

Las proteínas de tipo apareamiento son proteínas de unión a ADN específicas de secuencia que actúan como interruptores maestros en la diferenciación de la levadura mediante el control de la expresión génica de una manera específica del tipo de célula. Corepresor transcripcional que actúa junto con ALPHA2 para reprimir la transcripción de los genes específicos de homocigotos y de los genes necesarios para el interruptor opaco blanco, un requisito previo para el apareamiento.3 Publicaciones

Diverso

El locus similar al tipo de apareamiento de *C.albicans* (MTL) contiene, además de los genes para las proteínas reguladoras (MTLA1, MTLA2, MTLALPHA1 y MTLALPHA2),  $\alpha$  y alfa idiomorfos de una fosfatidilinositol quinasa (PIKA y PIKALPHA), una poli (A) polimerasa (PAPA y PAPALPHA) y una proteína similar a la proteína de unión a oxisterol (OBPA y OBPALPHA).

La mayoría de las cepas de *C.albicans* son heterocigotas en el locus MTL y no se someten fácilmente al cambio y apareamiento opaco al blanco, pero el apareamiento se produce en cepas hemi u homocigotas. El apareamiento tiene lugar en células opacas, produce progenie tetraploide y parece ocurrir raramente, en todo caso, en la naturaleza. Se piensa que la conservación de la capacidad de apareamiento se debe al interruptor opaco blanco regulado simultáneamente, que parece jugar un papel

>C5\_05220W\_A MTLA1 importante en el comensalismo del huésped 4.14972 1.77161

Las proteínas de tipo apareamiento son proteínas de unión a ADN específicas de secuencia que actúan como interruptores maestros en la diferenciación de la levadura mediante el control de la expresión génica de una manera específica del tipo de célula. Corepresor transcripcional que actúa junto con ALPHA2 para reprimir la transcripción de los genes específicos de homocigotos y de los genes necesarios para el interruptor opaco blanco, un requisito previo para el apareamiento.3 Publicaciones

Diverso

El locus *C.albicans* (MTL) contiene, además de los genes para las proteínas reguladoras (MTLA1, MTLA2, MTLALPHA1 y MTLALPHA2),  $\alpha$  y alfa idiomorfos de una fosfatidilinositol quinasa (PIKA y PIKALPHA), una poli (A) polimerasa (PAPA y PAPALPHA) y una proteína similar a la proteína de unión a oxisterol (OBPA y OBPALPHA).

La mayoría de las cepas de *C.albicans* son heterocigotas en el locus MTL y no se someten fácilmente al cambio y apareamiento opaco al blanco, pero el apareamiento se produce en cepas hemi u homocigotas. El apareamiento tiene lugar en células opacas, produce progenie tetraploide y parece ocurrir raramente, en todo caso, en la naturaleza. Se piensa que la conservación de la capacidad de apareamiento se debe al interruptor opaco blanco regulado simultáneamente, que parece jugar un papel

>C5\_05220W\_A MTLA2 importante en el comensalismo del huésped 4.14972 1.77161

>C1_04770C_A	ERG3	Cataliza la introducción de un doble enlace C-5 en el anillo B del ergosterol. Puede contribuir a la regulación de la biosíntesis de ergosterol Transportador, cuya función fisiológica aún no está establecida. Confiere resistencia a la cicloheximida química. Actividad ATPasa, acoplada al movimiento transmembrana de sustancias. ATP vinculante anotación sobre el proceso biológico	50.0829	494.461
>C5_04140W_A	CDR1	exportación de drogas respuesta a la cicloheximida	4.24061	2.47313
>C1_03820W_A	CDR2	Transportador de salida multidroga. Confiere resistencia a los agentes antifúngicos azólicos, a otros antifúngicos (terbinafina, amorolfina) ya una variedad de inhibidores metabólicos. Actividad ATPasa, acoplada al movimiento transmembrana de sustancias. Respuesta celular al medicamento, exportación de drogas	5.81796	16.1013

## Conclusiones

Se acepta parcialmente la hipótesis enunciada ya que las AgNPs fueron efectivas en la inhibición de *Candida albicans* ATCC 92800, sin embargo, resultaron tener un efecto ligeramente citotóxico en los cultivos con fibroblastos; en cuanto a las TiO<sub>2</sub>NPs no tuvieron el efecto antifúngico esperado aunque resultaron no ser citotóxicas. El análisis del transcriptoma de *Candida albicans* en contacto con AgNPs muestra genes diferencialmente expresados en comparación del grupo control sin tratamiento, entre estos se encuentran genes implicados en la síntesis del ergosterol y diacilglicerol así como genes de importancia en la adhesión y virulencia de *Candida albicans*, lo cual sugiere que están implicados en la respuesta al estímulo de las nanopartículas.

Los métodos utilizados en la síntesis de nanopartículas fueron efectivos en la obtención de las mismas como se observa en los resultados de caracterización, sin embargo, se pueden proponer mejoras en la síntesis de TiO<sub>2</sub>NPs para su uso como antifúngico ya que la aglomeración

El presente estudio permitió, a través del método realizado paso a paso, conocer el efecto de nanopartículas de plata sintetizadas mediante una técnica asistida con hojas de geranio que demostró ser efectiva. Así como la síntesis de nanopartículas de dióxido de titanio la cual aun se debe improvisar para optimizar y poder trabajar a futuro con la misma ya que está reportado que cuando están dispersas y tienen un tamaño de entre 7-10 nm son efectivas como agentes antimicrobianos.

El ensayo de difusión en agar en el presente estudio se utilizó de manera cualitativa para probar si el efecto era positivo o nulo.

El ensayo de microdilución demostró que a concentraciones de 0.025 se muestra un efecto fungistático siendo así que se necesitarían concentraciones mayores a 0.2 mg/mL para poder observar un efecto fungicida para el grupo de AgNPs. En el caso de las TiO<sub>2</sub>NPs como ya se menciona se necesitan grandes concentraciones para tener un efecto fungistático.

Es de gran importancia remarcar que en organismos vivos *Candida albicans* no se encuentra aislada por lo que se realizó también el estudio en biopelículas de *Candida albicans* lo que demostró que se necesitan mayores concentraciones de nanopartículas. Cuando *Candida albicans* se instala en dispositivos médicos se encuentra de manera organizada en biopelícula.

El ensayo de citotoxicidad reveló que en función de la dosis es el resultado del efecto citotóxico siendo así que a concentraciones efectivas antifúngicas demostraron ser viables para su uso, sin embargo, a diferencia de otros estudios son concentraciones altas las que se utilizan en el presente estudio.

En co-cultivo las nanopartículas tuvieron un comportamiento no selectivo teniendo efecto tanto en HGF como en *Candida albicans*. Se pudo observar un efecto de proliferación de *Candida albicans* cuando estuvo en contacto con TiO<sub>2</sub>NPs. En ambos casos tipo de crecimiento de hifa.

El efecto de las nanopartículas en el crecimiento de *Candida albicans* resultó ser de gran importancia para sobre esto decidir en que momento se colocaría el tratamiento de nanopartículas en la levadura, cabe destacar que también es de importancia en la expresión de genes.

El método de extracción de RNA demostró ser efectivo ya que se obtuvieron cantidades de RNA óptimas, así como integridad para su uso en secuenciación masiva.

En cuanto a la expresión de genes se observó que principalmente genes que tienen que ver con estrés, crecimiento, así como de componentes de la pared celular se vieron modificados en su expresión en comparación al grupo control donde se observaron expresados genes que tienen que ver con funciones celulares como producción de ATP, síntesis de proteínas, así como de transcripción de levadura en fase blanca.

Como conclusión general se puede decir que realizar pruebas con mayor especificidad sería adecuado para profundizar mas en mecanismos que se encontraron interesantes, tales como reacción en cadena de polimerasa en tiempo real , escogiendo genes específicos.



## Referencias

- Acosta-Torres, L. S., Mendieta, I., Nunez-Anita, R. E., Cajero-Juarez, M., & Castano, V. M. (2012). Cytocompatible antifungal acrylic resin containing silver nanoparticles for dentures. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 4777–4786. <https://doi.org/10.2147/IJN.S32391>
- Álvarez, F., Fernández-Ruiz, M., & Aguado, J. M. (2013). Hierro e infección fúngica invasiva. *Revista Iberoamericana de Micología*, 30(4), 217–225. doi:10.1016/j.riam.2013.04.002
- Aris, V. M. (2012). Using microarrays to measure cellular changes induced by biomaterials. *Characterization of Biomaterials*, 262–285. <https://doi.org/10.1533/9780857093684.262>
- Apkan. Oral candidosis *Postgrad Med J* 2002;78:455–459
- Azeredo, J., Azevedo, N. F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A. R., Sternberg, C. (2016). Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(3), 313–351.
- Bapat, R. A., Chaubal, T. V., Joshi, C. P., Bapat, P. R., Choudhury, H., Pandey, M., Kesharwani, P. (2018). An overview of application of silver nanoparticles for biomaterials in dentistry. *Materials Science and Engineering C*, (May). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.05.069>
- Becker, C., Hammerle-Fickinger, A., Riedmaier, I., & Pfaffl, M. W. (2010). mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods*, 50(4), 237–243. doi:10.1016/j.ymeth.2010.01.010
- Bruce, A., Alexander, J., Julian, L., David, M., Raff, M., Roberts, K., & Peter, W. (2015). *Molecular Biology of the cell*.
- Chen X, Mao S. Titanium Dioxide Nanomaterials: Synthesis, Properties, Modifications, and Applications. *Chem. Rev.* 2007, 107, 2891–2959 2891
- Chen, L., Xu, Y., Zhou, C., Zhao, J., Li, C., & Wang, R. (2010). Overexpression of CDR1 and CDR2 Genes Plays an Important Role in Fluconazole Resistance in *Candida albicans* with G487T and T916C Mutations. *Journal of International Medical Research*, 38(2), 536–545

Fanning, S., Xu, W., Solis, N., Woolford, C. A., Filler, S. G., & Mitchell, A. P. (2012). Divergent Targets of *Candida albicans* Biofilm Regulator Bcr1 In Vitro and In Vivo Eukaryotic Cell, 11(7), 896–904. doi:10.1128/ec.00103-12

Farrell, R. E. (2010). *RNA and the Cellular Biochemistry Revisited. RNA Methodologies*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374727-3.00001-2>

Franci, G., Falanga, A., Galdiero, S., Palomba, L., Rai, M., Morelli, G., & Galdiero, M. (2015). Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules*, 20(5), 8856–8874. <https://doi.org/10.3390/molecules20058856>

Fraser, B., & Fraser, H. B. (2015). Downloaded from genome.cshlp.org on April 26, 2015 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1–40.

Gluga, A. R., Di Bucchianico, S., Lindvall, J., Fadeel, B., & Karlsson, H. L. (2018). RNA-sequencing reveals long-term effects of silver nanoparticles on human lung cells. *Scientific Reports*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25085-5>

González-Hernández RJ, Jin K, Hernández-Chávez MJ, Díaz-Jiménez DF, Trujillo-Esquivel E, Clavijo-Giraldo DM, Tamez-Castrellón AK, Franco B, Gow NAR and Mora-Montes HM (2017) Phosphomannosylation and the Functional Analysis of the Extended *Candida albicans* MNN4-Like Gene Family. *Front. Microbiol.* 8:2156. doi: 10.3389/fmicb.2017.02156

Gulati, M., & Nobile, C. J. (2016). *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infection*, 18(5), 310–321. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.01.002.Candida>

Han, J., Zhao, D., Li, D., Wang, X., Jin, Z., & Zhao, K. (2018). Polymer-based nanomaterials and applications for vaccines and drugs. *Polymers*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.3390/polym10010031>

Hernday, A. D., Tuch, B. B., Andes, D. R., & Alexander, D. (2013). NIH Public Access, 148, 126–138. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.048.A>

Holmstrup P, Axell T. Classification and clinical manifestations of oral yeast infections. *Acta Odontol Scand* 1990;48:57

Kamat, P. V.; Flumiani, M.; Hartland, G.V. *J. Phys. Chem. B* 1998, 102, 3123–3128.  
5. Nair, A. S.; Pradeep, T. Y. *Current Science* 2003, 84, 1560.

Kojic, E. M., & Darouiche, R. O. (2004). *Candida* Infections of Medical Devices. *Clinical Microbiology Revi*, 17(2), 255–267. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.2.255>

Lara *et al.* J Effect of silver nanoparticles on *Candida albicans* biofilms: an ultrastructural study *Nanobiotechnol* (2015) 13:91

Maness, P. C., Smolinski, S., Blake, D. M., Huang, Z., Wolfrum, E. J., & Jacoby, W. A. (1999). Bactericidal activity of photocatalytic TiO<sub>2</sub> reaction: Toward an understanding of its killing mechanism. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9), 4094–4098. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1985.tb00864.x>

Malic S, Hill KE, Ralphs JR, Hayes A, Thomas DW, Potts AJ, Williams DW. Characterization of *Candida albicans* infection of an in vitro oral epithelial model using confocal laser scanning microscopy. *Oral Microbiol Immunol* 2007; 22: 188–194. © 2007 The Authors. Journal compilation © 2007

Malic S, Williams D. Antimicrobial activity of novel mouthrinses against planktonic cells and biofilms of pathogenic microorganisms. *Microbiology Discovery* 2013,

Maraimbo-Jones C. Eric Hoek a review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *J nanopart res* (2010) 12:1531-1551.

Matsumura Y, Yoshikata K, Kunisaki S, Tsuchido T. Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. *Applied and Environmental Microbiology* 2003;69:4278-4281.

Monteiro R, Takamiya A, Feresin L, Gorup. Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms to silver nanoparticles in intermediate and mature development phases. *Journal of Prosthodontic Research* 59 (2015) 42–48

Naderi, N., Karponis, D., Mosahebi, A., & Alexander M. Seifalian. (2018). Nanoparticles in wound healing; from hope to promise, from promise to routine.

Nel, A. (2007). Toxic Potential of Materials. *Science*, 311(5726), 622–627. <https://doi.org/10.1126/science.1114397>

Ortiz-Vilchis C. AMPK role in the organism, its activation during exercise and its potential as a model for the development of mimetic drugs in the treatment of type II diabetes mellitus. *Revista Medicina e Investigación / ISSN 2214 - 3106 / Vol. 5 Núm. 1. Enero - Junio 2017 / pp. 86-93*

Panáček, A., Kolár, M., Vecerová, R., Pucek, R., Soukupová, J., Krystof, V., Hamal, P., Zboril, R., Kvítek, L. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials*, (2009) vol. 30: 6333.

Perciva SI, Malic S, Cruz H, Williams D. Introduction to Biofilms Chapter · June 2011

Poonam Verma et al JMSCR Volume 05 Issue 04 April 2017 Minimum Biofilm Eradication Concentration (MBEC) Assay of Silver and Selenium Nanoparticles against Biofilm forming *Staphylococcus aureus*

Raghunath, A., & Perumal, E. (2017). International Journal of Antimicrobial Agents Metal oxide nanoparticles as antimicrobial agents: a promise for the future. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49(2), 137–152. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.11.011>

Rai, M. K., Deshmukh, S. D., Ingle, A. P., & Gade, A. K. (2012). Silver nanoparticles: The powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 112(5), 841–852. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05253.x>

R. Michal et al. / *Ceramics International* 40 (2014) 5745–5756

Salata, O. V. (2004). Journal of Nanobiotechnology. *Journal of Nanobiotechnology*, 6(3), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-2-12>

Satpati, S., Manohar, K., Acharya, N., & Dixit, A. (2017). Comparative molecular dynamics studies of heterozygous open reading frames of DNA polymerase eta ( $\eta$ ) in pathogenic yeast *Candida albicans*. *Scientific Reports*, 7(July 2016), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep41087>

Sedano, S., Carolina, J., Carrascal, L., & Ernesto, C. (2012). RNA-seq: herramienta transcriptómica útil para el estudio de interacciones planta-patógeno. *Red de Revistas Científicas de America Latina, El Caribe, España y Portugal*, 16, 101–113. <https://doi.org/http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209126216009> Cómo

Shahverdi, A. R., Fakhimi, A., Shahverdi, H. R., & Minaian, S. (2007). Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 3(2), 168–171. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2007.02.001>

Schroeder A., Mueller O, Stocker S., Salowsky R The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *OBMC Molecular Biology* 2006, 7:3 doi:10.1186/1471-2199-7-3

Signoretto, C., Burlacchini, G., Faccioni, F., Zanderigo, M., Bozzola, N., & Canepari, P. (2009). Support for the role of *Candida* spp. in extensive caries lesions of children. *The New Microbiologica*, 32, 101–107. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19382675>

Silva, S., Rodrigues, C., Araújo, D., Rodrigues, M., & Henriques, M. (2017). *Candida* Species Biofilms' Antifungal Resistance. *Journal of Fungi*, 3(1), 8. <https://doi.org/10.3390/jof3010008>

Stankic, S., Suman, S., Haque, F., & Vidic, J. (2016). Pure and multi metal oxide nanoparticles: synthesis, antibacterial and cytotoxic properties. *Journal of Nanobiotechnology*, 14(1).

T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers .260/280 and 260/230 Ratios

Vande Velde, G., Kucharíková, S., Schrevens, S., Himmelreich, U., & Van Dijck, P. (2014). Towards non-invasive monitoring of pathogen-host interactions during *Candida albicans* biofilm formation using in vivo bioluminescence. *Cellular Microbiology*, 16(1), 115–130. <https://doi.org/10.1111/cmi.12184>

Wächtler, B., Wilson, D., Haedicke, K., Dalle, F., & Hube, B. (2011). From Attachment to Damage: Defined Genes of *Candida albicans* Mediate Adhesion, Invasion and Damage during Interaction with Oral Epithelial Cells. *PLoS ONE*, 6(2), e17046.

You X, Chen F, Zhang J. Effects of calcination on the physical and photocatalytic properties of TiO<sub>2</sub> powders prepared by sol-gel template method. *J Sol-Gel Sci Tech*, 2005, 34: 181–187

Zamudio-Arroyo J, Peña Rangel M, Riesgo-Escova J.LA UBIQUITINACIÓN: UN SISTEMA DE REGULACIÓN DINÁMICO DE LOS ORGANISMOS. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 15(2):133-141, 2012

Zhang, X.-F., Liu, Z.-G., Shen, W., & Gurunathan, S. (2016). Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), 1534. <https://doi.org/10.3390/ijms17091534>.

# **Anexos**

## **Colaboración en proyectos de investigación**

**XLIII**

Reunión Anual  
DE LA ACADEMIA DE INVESTIGACIÓN  
EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN



Puebla, Puebla, 27 al 30 de Mayo de 2018, Salón de proyecciones del Edificio Carolina

LA ACADEMIA DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN A.C.  
OTORGA LA PRESENTE  
CONSTANCIA

A

**Pérez-Duran F, Acosta-Torres LS, Serrano-Díaz P, Toscano-Torres IA,  
Olivo-Zepeda IB, Méndez-Lugo A, Ramírez MA, Núñez-Anita RE**

Por la presentación del trabajo en cartel:

***EFEECTO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA CON PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS SOBRE LA  
VIABILIDAD E INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA PLÁSMÁTICA DE ESPERMAS DE CERDO***

durante la XLIII Reunión Anual de la AIBIR que se llevó a cabo del 27 al 30 de Mayo de 2018 en la  
ciudad de Puebla, Pue.

Dra. Angélica Trujillo Hernández  
**PRÉSIDENTE**

Dra. Carolina Moraq Raya  
**SECRETARIA**



## LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA IMPIDEN EL CRECIMIENTO BACTERIANO SIN EFECTOS TÓXICOS EN EL SEMEN DE CERDO

SILVER NANOPARTICLES PREVENT BACTERIAL GROWTH WITHOUT TOXIC EFFECTS ON SWINE SEMEN

López-Pérez R.<sup>1</sup>, Acosta-Torres L.S.<sup>2</sup>, Serrano-Díaz P.<sup>2</sup>, Avilés-López Y.S.<sup>1</sup>, Toscano-Torres I.A.<sup>1</sup>, Olivo-Zepeda I.B.<sup>1</sup>, Pérez-Duran F.<sup>1</sup>, Núñez-Anita R.E.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán, México.  
\*re.nunez.anita@gmail.com.

<sup>2</sup>Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León, Universidad Nacional Autónoma de México, León Guanajuato, México.

**Keywords:** Artificial insemination; sperm; biocide.

**Palabras clave:** Inseminación artificial, espermatozoide, biocida.

### ABSTRACT

The success of artificial insemination depends on safety and seminal quality. Contaminant bacteria in the ejaculate have been associated with decreased sperm viability, increased sperm aggregation, and seminal pH variations. Silver nanoparticles (AgNPs) could be an alternative to the use of antibiotics because of their known biocidal effect, and no bacterial resistance has been reported. The aim of this work was to perform a dose-response analysis using AgNPs in suspension (obtained by reduction of silver ions), to evaluate their antimicrobial effect and toxicity in swine spermatozoa. We determined the antimicrobial activity in isolates of contaminating bacteria of the semen. Methodology: Sperm viability was evaluated through the 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. *S. aureus* was isolated from ejaculates. Toxicity/sensitivity was analyzed at concentrations of 0, 2, 4, 10 and 20 mM of AgNPs. The antibiotics Streptomycin [10 µg / ml], Amikacin [30 µg / ml] and Tetracycline [10 µg / ml] were included as controls. The biocidal effect was analyzed through bacterial growth in liquid and solid culture medium. The results showed that AgNPs inhibit *S. aureus* growth at concentrations higher than 4mM of AgNPs. None of the levels of AgNPs is cytotoxic in spermatozoa. Conclusion: AgNPs could be used in the prevention of bacterial growth in samples destined for the storage and preservation of swine germplasm without toxic effects.

### RESUMEN

El éxito de la inseminación artificial depende de la inocuidad y calidad seminal. Las bacterias contaminantes del eyaculado, se han asociado a la disminución de la viabilidad de los espermatozoides, el aumento de la agregación de los espermatozoides y cambios del pH seminal. Las nanopartículas de plata (AgNPs) podrían ser una alternativa al uso de antibióticos por su conocido efecto biocida, además no se ha reportado resistencia bacteriana. El objetivo de este trabajo fue realizar un análisis dosis-respuesta utilizando AgNPs en suspensión (obtenidas por reducción de iones plata), para evaluar el efecto antimicrobiano y la toxicidad en espermatozoides de cerdo. De hecho, la actividad antimicrobiana de AgNPs se analizó en bacterias aisladas del

Received: 11/07/2017; Accepted: 10/08/2017; Published: 23/10/2017



# **Estancia de investigación**



Registry  
Y Gofrestrefa

**Cardiff University**  
McKenzie House, 30-36 Newport Road  
Cardiff, CF24 0DE, Wales, UK  
Tel please see below  
Fax +44(0)29 2087 4130  
[www.cardiff.ac.uk](http://www.cardiff.ac.uk)

**Prifysgol Caerdydd**  
Tŷ McKenzie, 30-36 Heol Casnewydd  
Caerdydd, CF24 0DE, Cymru, DU  
Ffôn gweler isod  
Ffacs +44(0)29 2087 4130  
[www.caerdydd.ac.uk](http://www.caerdydd.ac.uk)

Miss PN Serrano Diaz  
Avenida Monteverde N°3056  
Condominio Abedul Interior Once  
Mexico  
45066

01 December 2017

TO WHOM IT MAY CONCERN

This is to confirm that Paloma Netzayeli Serrano Diaz, Student No: 1813908, is holding an unconditional place to study at Cardiff University as detailed below:

School: School of Dentistry  
Programme: Non Degree (Occasional Studies) (Academic Year)  
Route: Non Degree (Occasional Studies) (Academic Year)  
JACS Subject Code: A400 Clinical Dentistry  
Start Date: 29/Jan/2018  
End Date: 20/Apr/2018  
Attendance: Full-Time  
Fee Status: Overseas Student

Tuition Fee:  
Please refer to the University website for further information regarding tuition fees.  
<http://www.cardiff.ac.uk/study/postgraduate/funding-and-fees/fees>

Please note that for single Undergraduate and Postgraduate Students who are in the UK studying on courses for 9 months or more, the financial (maintenance) requirements for the 2017/8 academic year is the cost of the first year tuition fees plus £9,135 for living expenses.

Research Topic: MICROBIAL DISEASE RESEARCH

If you require any further information please do not hesitate to contact a member of the Admissions Team on +44 (0)29 208 79999 or email [admissions@Cardiff.ac.uk](mailto:admissions@Cardiff.ac.uk).

Sally Rutterford  
Admissions team

Telephone: +44 (0)29 2087 9999



Registered Charity, no. 1136855  
Elusen Gofrestredig, rhif 1136855

# Distinciones



LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS  
"Francisco García Salinas"  
A TRAVÉS DE LA UNIDAD ACADÉMICA DE ODONTOLOGÍA  
Y LA SOCIEDAD NACIONAL DE INVESTIGADORES EN ODONTOLOGÍA

Otorgan el presente

## RECONOCIMIENTO

A **Paloma Neztayeli Serrano Díaz**; Laura Susana Acosta Torres; Julio César Vega Arreguín; Blanca Edith Millán Chiu y René García Contreras

Por haber obtenido el **TERCER LUGAR** en la categoría de **MAESTRÍA** en investigación **BÁSICA**, modalidad **ORAL** con el trabajo titulado

**EFFECTO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y DIÓXIDO DE TITANIO EN LA INHIBICIÓN DE *Candida albicans***

en el **XXV Encuentro Nacional y XVI Iberoamericano de Investigación en Odontología** y las **IV Jornadas de Investigación en Odontología de la UAO/UAZ**, celebrados del 8 al 10 de noviembre del 2017, en la Ciudad de Zacatecas, Zacatecas

Dr. José Luis Elías Salazar  
Director de la UAO/UAZ

Dr. Jorge Alanís Tavira  
Presidente de la SNIO

# **Participación en congresos**



LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS  
"FRANCISCO GARCÍA SALINAS"  
A TRAVÉS DE LA UNIDAD ACADÉMICA DE ODONTOLOGÍA  
Y LA SOCIEDAD NACIONAL DE INVESTIGADORES EN ODONTOLOGÍA

Otorgan el presente

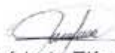
## RECONOCIMIENTO

A Paloma Neztayeli Serrano Díaz, Laura Susana Acosta Torres, Julio César Vega Arreguín, Blanca Edith Millán Chiu, René García Contreras, Ma Concepción Arenas Arrocena

Como AUTORES de la ponencia

EFFECTO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y DIÓXIDO DE TITANIO EN LA INHIBICIÓN DE *Candida albicans*

Presentada durante los trabajos del  
**XXV Encuentro Nacional y XVI Iberoamericano de Investigación en Odontología,**  
y las **IV Jornadas de Investigación en Odontología de la UAO/UAZ,**  
celebrados del 8 al 10 de noviembre de 2017  
en la ciudad de Zacatecas, Zac.

  
Dr. José Luis Elías Salazar  
Director de la UAO/UAZ

  
Dr. Jorge Alanís Tavira  
Presidente de la SNIO

UNIVERSIDAD DE  
GUANAJUATO



La Universidad de Guanajuato  
otorga la presente

# CONSTANCIA

a

PALOMA NETZAYELI SERRANO DÍAZ, MA CONCEPCIÓN ARENAS ARROCENA, RENÉ GARCÍA CONTRERAS, MARÍA DEL PILAR RODRÍGUEZ TORRES, BLANCA EDITH MILLÁN CHIU, ANA MARÍA FERNÁNDEZ PRESAS, JULIO CÉSAR VEGA ARREGUÍN, LAURA SUSANA ACOSTA TORRES

Por la presentación del trabajo:


EFFECTO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y DE DIÓXIDO DE TITANIO  
EN LA INHIBICIÓN DE CANDIDA ALBICANS


En el marco del:


III CONGRESO NACIONAL DE INNOVACIÓN UG 2017

Guanajuato, Gto., 13 y 14 de Octubre de 2017

ID:013

  
Dr. Fernando Israel Cómez Castro  
Coordinador General de la Semana de Innovación,  
Emprendimiento e Investigación en la DCNE

  
Dr. Agustín Ramon Uribe Ramirez  
Director de la División de Ciencias Naturales y Exactas

  
Dra. Claudia Leticia Mendoza Macías  
Presidente del Comité Organizador  
del 3er Congreso Nacional de Innovación



Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Odontología  
Coordinación de Educación Continua



Otorgan el presente

# Reconocimiento

A

Paloma Netzayeli Serrano Díaz

Vega-Arreguín JC, Millán-Chiu BE, García-Contreras R, Fernández-Presas AM,  
Rodríguez-Torres MP, Arenas-Arrocena MC, Acosta-Torres LS.

Por su Participación Académica en el

## 7<sup>o</sup> Congreso de Biomateriales Dentales 2017

**Efecto biológico de nanopartículas metálicas y óxido- metálicas  
en Candida albicans**

**"Por mi raza hablará el espíritu"**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx, 26 y 27 de octubre de 2017.

Mtro. José Arturo Fernández Pedrero  
Director  
Facultad de Odontología

Lic. Joaquín Sánchez Reynoso  
Director General  
COA Internacional

Lic. Daniel Stern Róvero  
Director General  
Dentadec



# IADR GENERAL SESSION

LONDON, ENGLAND • JULY 25-28, 2018

**96<sup>th</sup> General Session & Exhibition of the IADR  
IADR Pan European Regional Congress**  
ExCeL London Convention Center  
London, England

**[www.iadr.org/2018iags](http://www.iadr.org/2018iags)**

## PROGRAM BOOK



IADR/PER 2018 Meeting App  
[www.iadr.org/2018iagsapp](http://www.iadr.org/2018iagsapp)

   #IADR2018





