



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

BIOMATERIALES

**“Análisis de la respuesta transcriptómica, celular e inmunológica  
de las AgNPs en *Candida albicans*: estudio en un modelo tisular  
*in vitro*”**

## TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

**Paloma Netzayeli Serrano Díaz**

TUTORES PRINCIPALES:

**Dra. Laura Susana Acosta Torres  
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS  
SUPERIORES, UNIDAD LEÓN.**

**Dr. Julio Vega Arreguín  
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS  
SUPERIORES, UNIDAD LEÓN.**

LEÓN, GTO.

Noviembre, 2024.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **Agradecimientos**

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

Agradecimiento a la ENES Unida León de la UNAM por brindarme la oportunidad de seguir siendo parte de esta comunidad, por tantas historias.

Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) DGAPA/UNAM PAPIITIT IN211922.

A mi comité tutor: Dr. Marco Álvarez Pérez, Dra. Luz María López Marín y mis tutores, que cada semestre me llenaban de comentarios que nutrian mucho mi proyecto de investigación.

Al Dr. David Moyes su grupo de investigación: Dr. Aize Pellon, Dr. Allan Furlong por la confianza al abrirme las puertas en su laboratorio de investigación en King's College London. Por haber hecho titánica labor en tan poco tiempo, durante mi estancia de investigación.

Al Dr. Julio Vega, por estar siempre presente para mí, por su ayuda y apoyo durante todo este proceso.

A la Dra Laura Acosta Torres, por ser siempre esa persona tan inspiradora a la cual, admiro mucho.

## **Dedicatorias**

*Gracias a Dios, Gracias a la vida, Gracias al universo, Gracias a mis padres  
Gracias a cada una de esas personas que han sido mis maestros a lo largo de estos  
12 años de formación académica, que han sido ejemplo de vida y de ser humanos.*

*A mis padres Javier y Francisca, por ser mi pilar en la vida, por su amor. Pá,  
dedicada a ti. Gracias por haber sido mi maestro de vida, me habría encantado que  
compartieras este gran logro conmigo y aunque no fue posible, sé que estas cerca  
de mí día a día.*

*A mis hermanas Isabel, Citlali, Mónica, Celeste y Verónica, por su apoyo  
incondicional, por creer en mí; por esas sonrisas compartidas que me recargaban  
para poder seguir adelante en la vida.*

*A mis compañeros de Laboratorio de nanoestructuras y biomateriales, a mi amiga  
Ale, gracias por tanto compartido.*

*Finalmente a mis grandes profesores y maestros, aquellos que marcaron y dejaron  
algo de ellos en mí: Dra. Laura Acosta, Dr. David W Williams, Dra. Concepción  
Arenas, Mtra .Guadalupe Luevano, Dra. Ana María Presas, Dr. David Moyes y que  
me ayudaron en asesorías.*

*¡Gracias a ustedes!*

## Tabla de contenido

.....	1
<b>Resumen</b> .....	9
<b>Abstract</b> .....	10
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	13
Nanotecnología.....	13
Nanopartículas de plata (AgNPs) .....	14
<i>Candida albicans</i> .....	14
Candidiasis oral.....	15
Resistencia de <i>Candida albicans</i> ante tratamiento de antifúngicos .....	16
Modelos 3D en el estudio del efecto de los biomateriales .....	17
<b>ANTECEDENTES</b> .....	18
<b>5. JUSTIFICACIÓN</b> .....	22
<b>6. OBJETIVOS</b> .....	23
<b>6.1 GENERAL</b> .....	23
<b>6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	23
<b>7. HIPÓTESIS</b> .....	24
<b>8. Metodología de la investigación</b> .....	25
<b>Crterios de selección</b> .....	25
<b>Operacionalización de variables</b> .....	26
<b>10. MÉTODO</b> .....	28
<b>Etapa 1 Síntesis y caracterización de AgNPs.</b> .....	29
<b>Etapa 2 Rutas metabólicas de importancia en las que las AgNPs afectan a <i>Candida albicans</i>.</b> .....	31
<b>Fase 3 Efecto de las AgNPs en biopelículas de <i>Candida albicans</i> en un modelo de estomatitis prótesica. MatTek epioral model</b> .....	32
<b>Etapa III Propuesta de desarrollo de modelo 3D experimental</b> .....	39
<b>10. ANÁLISIS DE RESULTADOS</b> .....	46
<b>11. RESULTADOS</b> .....	47
<b>Fase 1 Síntesis y caracterización de AgNPs</b> .....	47
<b>Fase 2</b> .....	49
<b>Resultados del Análisis GSEA: Comparación entre AgNPs y Control</b> .....	49
<b>Rutas Metabólicas a la baja</b> .....	50
Biosíntesis de arginina .....	50

Metabolismo de alanina, aspartato y glutamato.....	51
Metabolismo del nitrógeno .....	53
<b>Rutas Metabólicas a la alza .....</b>	<b>54</b>
Replicación del ADN .....	54
Glucólisis/Gluconeogénesis .....	55
Proteasoma .....	57
<b>Distribución de Niveles de Expresión Génica en los Cromosomas de <i>Candida albicans</i> .....</b>	<b>59</b>
<b><i>Fase 3 Efecto de las AgNPs en biopelículas de Candida albicans en un modelo de estomatitis subprótesica.....</i></b>	<b>60</b>
<b>3.1. Desarrollo de biopelícula de <i>Candida albicans</i> y cuantificación mediante XTT .....</b>	<b>60</b>
<b>3.2 Formación de biopelículas de <i>Candida albicans</i> para estudio en modelo tisular.....</b>	<b>61</b>
Formación de biopelícula en modelo tisular.....	62
<b>3.3 Observación mediante Microscopia electrónica de Barrido (SEM) de discos de PMMA.....</b>	<b>65</b>
Cuantificación de las citocina IL-6 y GMCSFsecretada mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).....	66
Aislamiento y crecimiento celular.....	70
Formación de biopelículas en bioreactor.....	71
<b>12. DISCUSIÓN .....</b>	<b>73</b>
<b>13. CONCLUSIONES .....</b>	<b>79</b>
<b><i>Productividad generada .....</i></b>	<b>81</b>
<b><i>Artículos en colaboración .....</i></b>	<b>83</b>
<b><i>Estancia de investigación .....</i></b>	<b>85</b>
<b>14. REFERENCIAS .....</b>	<b>86</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>92</b>

## Abreviaciones y símbolos

AgNPs- Nanopartículas de plata

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.- Espectroscopia ultravioleta-visible

XRD.—Difracción de rayos X

SEM.- Scanning Electron Microscopy /Microscopia Electrónica de Barrido

CMI.- Concentración mínima inhibitoria

XTT.- 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5carboxanilide

nm.- Nanómetros

NPs.- Nanopartículas

PBS.- Tampón Fosfato Salino

CLSI.- Clinical and Laboratory Standards Institute

ATCC.-American Type Culture Collection

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

CMEB.- Concentración mínima inhibitoria de erradicación de biopelícula

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

Rpm.- Revoluciones por minuto

$\lambda$ .- Longitud de onda

$\mu$ l.- Microlitros

ml.- Mililitros

Mg.- Miligramos

## Resumen

**Introducción:** El conocimiento del mecanismo antifúngico de las nanopartículas de plata (AgNP) y la respuesta inmunológica del huésped puede contribuir en el desarrollo y mejora de materiales dentales en la erradicación de las biopelículas. **Objetivo:** El presente proyecto tuvo como objetivo estudiar el impacto en rutas metabólicas y procesos celulares así como determinar la respuesta celular e inflamatoria de *Candida albicans* (ATCC 90028) cuando se adicionan AgNPs a concentraciones antifúngicas en discos acrílicos en un modelo de tejido 3D. **Método:** Las AgNPs se sintetizaron a través de síntesis verde asistida con una infusión de geranio. Las AgNPs se caracterizaron mediante espectroscopia UV-Vis, microscopía electrónica de transmisión (TEM), análisis mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) y el potencial z. Se llevó a cabo el análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes de los datos transcriptómicos previamente filtrados mediante el software Pathview y la base de datos KEGG. Se adquirieron modelos 3D de tejido oral (Epioral™), se conformaron 6 grupos diferentes para probar el efecto antifúngico sobre *Candida albicans* mediante el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC's). El estudio de la respuesta inflamatoria de interleucina 6 (IL-6) y de factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) se llevó a cabo mediante el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) y cuantificación del daño tisular mediante el ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH). Se realizaron análisis estadísticos ANOVA de una vía ( $p < 0.05$ ) y prueba de Tukey. **Resultados:** Se obtuvieron AgNPs con morfología esférica y de un tamaño de partícula de  $33.5 \pm 9.8$  nm. El análisis de rutas metabólicas y proceso celulares mostró que principalmente se vieron afectadas rutas esenciales como de glucólisis y gluconeogénesis, ruta del metabolismo de nitrógeno así como replicación de ADN. La prueba antifúngica demostró efectividad de las AgNPs sobre modelos de tejido 3D colonizados con biopelículas de *Candida albicans*. Los ensayos ELISA mostraron diferencias entre grupos, siendo mayor expresión de citocinas en los grupos de discos de acrílico infectados con biopelículas de *Candida albicans*. El ensayo LDH mostró que los grupos infectados con *Candida albicans* expresaron mayor daño tisular. **Conclusión:** El método de síntesis fue efectivo en la obtención de AgNPs esféricas. Las AgNPs mostraron eficacia sobre las biopelículas de *Candida albicans*, mostrando efecto inmunomodulador sobre las citocinas probadas. Los modelos 3D fueron efectivos en el estudio del efecto biológico de las AgNPs. **Palabras clave:** *Candida albicans*, síntesis verde, AgNPs, efecto biológico, rutas metabólicas.

## Abstract

**Introduction:** Knowledge of the antifungal mechanism of silver nanoparticles (AgNP) and the host's immune response can contribute to the development and improvement of dental materials in the eradication of biofilms. **Objective:** The present project aimed to study the impact on metabolic pathways and cellular processes as well as to determine the cellular and inflammatory response of *Candida albicans* (ATCC 90028) when AgNPs are added to antifungal concentrations on acrylic discs in a 3D tissue model. **Method:** The AgNPs were synthesized through green synthesis assisted with a geranium leaf infusion. AgNPs were characterized by UV-Vis spectroscopy, transmission electron microscopy (TEM), analysis by fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and z-potential. Gene set enrichment analysis of the previously filtered transcriptomic data was carried out using Pathview software and the KEGG database. 3D models of oral tissue (Epioral™) were acquired, 6 different groups were formed to test the antifungal effect on *Candida albicans* by counting colony-forming units (CFU's). The study of the inflammatory response of interleukin 6 (IL - 6) and granulocyte-monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF) was carried out by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and quantification of tissue damage using the lactate dehydrogenase (LDH) assay. One-way ANOVA ( $p < 0.05$ ) and Tukey test were performed. **Results:** AgNPs with spherical morphology and a particle size of  $33.5 \pm 9.8$  nm were obtained. The analysis of metabolic pathways and cellular processes showed that essential pathways such as glycolysis and gluconeogenesis, nitrogen metabolism pathway as well as DNA replication were mainly affected. The antifungal test demonstrated effectiveness of the AgNPs on 3D tissue models infected with *Candida albicans* biofilms. The ELISA assays showed differences between groups, with greater expression of cytokines in the acrylic disc groups infected with *Candida albicans* biofilms. The LDH assay showed that the groups infected with *Candida albicans* expressed greater tissue damage. **Conclusion:** The synthesis method was effective in the obtention of spherical AgNPs. AgNPs showed efficacy against *Candida albicans* AgNP biofilms, showing immunomodulatory effect on the cytokines tested. The 3D models were effective in the study of the biological effect of AgNPs. **Keywords:** *Candida albicans*, green synthesis, AgNPs, biological effect, pathways routes.

## INTRODUCCIÓN

*Candida albicans* (*C. albicans*) es un microorganismo que existe en equilibrio con otros miembros de la microbiota humana. Sin embargo, algunos cambios en la variación del pH, el uso de antibióticos y/o alteraciones del sistema inmunológico causado por diversas enfermedades, infecciones o terapias inmunosupresoras pueden conducir a la proliferación rápida de *C. albicans*, volviéndose potencialmente patogénico (Vande Velde, Kucharíková, Schrevels, Himmelreich & Van Dijck 014).

*C. albicans* es la especie fúngica más predominante que se aísla de dispositivos médicos incluyendo catéteres, marcapasos, válvulas cardíacas, prótesis articulares, lentes de contacto y prótesis dentales (Kojic & Darouiche 2004). Este patógeno, forma biopelículas estructuradas compuestas por múltiples tipos celulares (células redondas de levaduras, células de pseudohifas ovaladas, células de hifas alargadas) embebidas en una matriz extracelular. Las biopelículas de *C. 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, por ejemplo, no son efectivos ante biopelículas de *C. albicans*, lo que limita la variedad de antifúngicos para combatir estas infecciones, incrementando así, la necesidad del desarrollo de nuevas formas terapéuticas contra *C. albicans* (Silva, Rodrigues, Araújo, Rodrigues, & Henriques 2017).

Actualmente, las nanopartículas (NPs), son consideradas una alternativa para contrarrestar la resistencia a diversos antifúngicos (Rai, Deshmukh, Ingle, & Gade 2012). Las partículas metálicas de tamaño nanométrico, muestran propiedades físicas y químicas específicas, que permiten la obtención de nuevos materiales, herramientas y sistemas 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 antifúngico 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 dando lugar a la presencia de especies reactivas de oxígeno (Franci et al., 2015; Maness et al., 1999). Mediante microscopía 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). Sin embargo a pesar de los múltiples estudios existen mecanismos, a nivel molecular, que aún no se conocen con exactitud.

Los modelos celulares 3D han sido de gran utilidad en el estudio de los efectos de biomateriales. Proporcionan un entorno tridimensional que simula las condiciones fisiológicas *in vivo*, en este caso, las condiciones de la cavidad oral. Estos modelos permiten un estudio a niveles más precisos acerca de las interacciones entre células y biomateriales, demostrando ventajas ante otros modelos celulares ya que las células pueden experimentar condiciones más realistas, influyendo en su comportamiento y respuesta a los biomateriales. Además, los modelos 3D facilitan la formación de tejidos más organizados y estructurados, permitiendo la observación de fenómenos como la respuesta inmune de una manera más cercana a la realidad biológica.

## 2. MARCO TEÓRICO

### Nanotecnología

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 un área de estudio del siglo XXI que ha impactado en la vida cotidiana por sus diversas aplicaciones en diversas áreas del conocimiento como: medio ambiente, electrónica, cosmética, industria textil, medicina; esta última como transportadores de medicamentos e incluso como alternativa a agentes antimicrobianos.

Las nanopartículas (NPs), se definen como nanoestructuras que van de un tamaño de 1-100 nm (Bapat et al., 2018) las cuales son obtenidas mediante procesos químicos, físicos o biológicos haciendo uso de ciertos precursores tales como la plata, oro, zinc, titanio, entre otros, y 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 AgNPs en diferentes aplicaciones médicas, entre ellas, en soluciones tópicas o bien inmovilizadas en dispositivos médicos (Naderi, Karponis, Mosahebi, Alexander M. Seifalian., 2018), además en el área odontológica se han añadido a materiales tales como el polimetilmetacrilato (PMMA) demostrando ser potencialmente antifúngicos (Acosta-Torres, Mendieta, Nunez-Anita, Cajero-Juarez, & Castano., 2012).

## Nanopartículas de plata (AgNPs)

Las 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 ciertos hongos como *C. albicans*. Se han reportado diversas formas de sintetizar este tipo de nanopartículas metálicas ya sea a partir de componentes de microorganismos, sustancias químicas, o sistemas verdes asistida por plantas (Abdallah & Ali, 2022).

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 (Adenosin trifosfato)* y la prevención de la replicación del ADN (Ácido desoxirribonucleico) ya que modifica el perfil de fosfotirosina de los péptidos interrumpiendo la transducción de señales evitando la multiplicación de microorganismos así como la formación de especies reactivas de oxígeno (Ahamad et al., 2022)

## ***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 de 4-6  $\mu\text{m}$ . Y la segunda fase, la micelar 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 de levadura.

*C. albicans* se compone de un genoma diploide de 8 cromosomas homólogos los

cuales están organizados en 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 cambios estructurales y funcionales en las proteínas codificadas; propiciando mutaciones de pérdida de heterocigosidad lo cual brinda 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 da lugar a rápida proliferación de *C. albicans* (Gulati & Nobile., 2016). Siendo la especie más aislada en candidiasis oral, los rangos en porcentaje de la colonización de *C. albicans* oscila del 20-40 % en sujetos sanos y se convierte en una cifra predominante en la microbiota 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 hongo que incluye más de 150 especies de levadura. En individuos sanos, *Candida* es parte de la microbiota de mucosas como: 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 *C. albicans*, asociándose principalmente en un 60% en 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 se refiere a una infección fúngica (micosis) causada por cualquiera de las especies de *Candida* (Mallya & Mallya, 2019).

La colonización y formación de biopelículas de *Candida albicans* se ha descrito de la siguiente manera: De forma inicial, se da un mecanismo de adhesión de células

redondas de levaduras a una superficie sólida que se presenta dentro de los primeros 60-90 *min*. La siguiente etapa consiste en la proliferación celular, dividida en una fase temprana de filamentación de las células adheridas, seguida por una fase 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 las 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 conlleva 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 y los polienos, sin embargo en la actualidad nos enfrentamos a la problemática en relación a la terapéutica aplicada debido a la resistencia a tratamientos antifúngicos actuales (Gulati *et al.*, 2016) .

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).

## **Modelos 3D en el estudio del efecto de los biomateriales**

Los modelos de tejidos disponibles comercialmente se han utilizado ampliamente en diversas investigaciones, usándose en ensayos de citotoxicidad química hasta la evaluación de la candidiasis (Silva *et al.*, 2011). Debido a las propiedades únicas de las nanopartículas que son relacionadas con su pequeño tamaño, surgen preocupaciones de que las nanopartículas pueden cruzar las barreras del cuerpo humano, lo que daría lugar a una exposición interna a las nanopartículas potencialmente conduce a efectos adversos.

## ANTECEDENTES

Se realizó un ensayo clínico para identificar la especie de *Candida* más prevalente en pacientes portadores de prótesis de *PMMA*, que eran pertenecientes a la Clínica de Odontología de la ENES León, UNAM, encontrándose que el 35.4 % de los pacientes evaluados presentaron estomatitis protésica causada por *C. albicans*, *Candida krusei* en un 31.3 % seguido por *Candida tropicalis* 16.7 % (González, Acosta-Torres, 2018).

Las evaluaciones previas realizadas por el grupo de investigación de Nanoestructuras y Biomateriales de la ENES UNAM León demostraron que las AgNPs son efectivas en diferentes ensayos antifúngicos; entre los cuales se llevaron a cabo los ensayos de difusión en agar obteniendo zonas de inhibición de  $8.25 \pm 1.5$  mm; en el ensayo de microdilución se encontró una concentración mínima inhibitoria (CMI) de  $0.025 \text{ mg/mL}$  (Serrano-Díaz, Acosta-Torres, Vega-Arreguín., 2019).

Adicionalmente se llevó a cabo un estudio en el cual se analizó del mecanismo de acción en la expresión de genes de *Candida albicans* en contacto con AgNPs mediante *RNAseq*, el cual arrojó resultados que sugieren que las AgNPs tienen efecto en genes de importancia asociados en la síntesis de componentes de la membrana plasmática como: *ERG11*, *ERG3*, *PLD1*, *PHR1*, genes de virulencia *SAP6*, *SAP4* y en los genes *ALS3*, *ALS1* implicados la adherencia de *C. albicans* (Serrano-Díaz, Acosta-Torres, Vega-Arreguín., 2019).

Por otro lado, Morse *et al.*, en el año 2018, evaluaron la patogenicidad de las infecciones de biopelículas asociadas a prótesis dentales en modelos de tejido *in vitro* y disponibles comercialmente con la finalidad de determinar los efectos que tenían las biopelículas con diferente composición microbiana sobre el daño inducido por la biopelícula y la invasión de los tejidos. Encontraron que en tejidos con biopelículas solo de bacterias se indujo un daño tisular leve, un aumento adicional en el daño, que fue estadísticamente significativo, causado por biopelículas solo de

*C. albicans*, y un aumento adicional en daño, que también fue estadísticamente significativo causado por biopelículas de especies mixtas.

## 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

*Candida albicans* se encuentra presente en un 40-60 % de las prótesis dentales removibles y por lo regular se le ubica en la mucosa del paladar debajo de la superficie de la prótesis superior (Ibañez-Mancera, 2017). El 65 % de los pacientes portadores de prótesis dental total están predispuestos a la infección por *Candida*. Esto debido a la adhesión de *Candida* al acrílico, la mala adaptación y la deficiente higiene por parte del paciente (García I., 2018). La necesidad de alternativas de disponer de agentes antifúngicos debido a la incidencia de infecciones micóticas y a la creciente resistencia a antifúngicos convencionales ha incrementado el desarrollo de nuevas estrategias para disminuir la colonización de dicho microorganismo. Dentro de estas han surgido las AgNPs como una posible solución terapéutica (Gulati., 2016). Conocer estos mecanismos nos permitirán proponer el uso de las AgNPs de manera segura en aplicaciones médicas o terapéuticas. Resultando beneficioso, como alternativa, en el impacto de la problemática a la resistencia antimicrobiana.

### 4.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto observado en las vías metabólicas, expresión genética de *Candida albicans*, el nivel de citocinas y daño tisular en un modelo 3D de estomatitis protésica al estar en contacto con las AgNPs?

### 4.2 PREGUNTAS ESPECÍFICAS

¿Qué vías metabólicas interactúan las AgNPs al estar en contacto con *Candida albicans*?

¿Cuáles es el efecto que se presenta en el modelo tisular oral infectado con biopelículas de *Candida albicans* al aplicar una dosis antifúngica de AgNPs?

¿Cuál es el nivel de interleucinas detectado en el modelo de estomatitis protésica tratada con AgNPs?

¿Cuál es el daño tisular detectado en el modelo de estomatitis protésica tratada con AgNPs?

## 5. JUSTIFICACIÓN

La comprensión del proceso por el cual las AgNPs incorporadas a un biomaterial dental interactúan sobre sistemas biológicos como microorganismos y células de la cavidad oral en modelos 3D tisulares *in vitro*, permitirá mimetizar las condiciones de la cavidad oral en salud y cuando se encuentra infectado por *Candida albicans* y así proponer las AgNPs como potencial alternativa en la prevención del desarrollo de biopelículas causantes de infecciones micóticas en la cavidad oral en pacientes con estomatitis protésica.

El estudio del efecto de las AgNPs sobre las rutas metabólicas de *Candida albicans* puede revelar los mecanismos moleculares subyacentes que explican el mecanismo de acción antifúngico en *Candida albicans*. Esto es crucial para identificar las rutas específicas que se ven involucradas propiciando cambios en *Candida albicans*.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 GENERAL

Determinar el efecto en las vías metabólicas, expresión genética de *Candida albicans*, el nivel de citocinas y daño tisular en un modelo 3D de estomatitis protésica al estar en contacto con las AgNPs.

### 6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener AgNPs mediante síntesis verde asistida con infusión de geranio.
2. Conocer los grupos funcionales de la síntesis mediante la caracterización de FT-IR.
3. Determinar las vías metabólicas que serán inducidas por el efecto de las AgNPs sobre *Candida albicans*.
4. Evaluar la respuesta antifúngica de las AgNPs en un modelo tisular de estomatitis protésica.
5. Analizar el efecto de las AgNPs en el nivel de citocinas y de daño tisular en un modelo tisular de estomatitis protésica infectado con *Candida albicans*.

## 7. HIPÓTESIS

Las AgNPs inducen una respuesta sobre diversas vías metabólicas, niveles de expresión de citocinas, daño tisular así como un efecto antifúngico sobre *Candida albicans* en un modelo tisular de estomatitis subprotésica.

## 8. Metodología de la investigación

Tipo de estudio: Experimental

Universo de estudio:

- A. Microorganismo: *Candida albicans*
- B. Agente antimicrobiano: AgNPs
- C. Tipo de muestra: No probabilística, se llevarán a cabo tres experimentos independientes por triplicado para cada fase experimental en donde  $n=9$ .

### Criterios de selección

Criterios de inclusión:

- a) AgNPs esféricas (30 – 50 nm).
- b) Microorganismos: *Candida albicans* ATCC 90028.
- c) Modelo tisular de espesor total, comercial EpiOral.

Criterios de exclusión

- a) Nanopartículas anisotrópicas.
- b) Especies de *Candida krusei*, *glabrata* y *tropicalis*.
- c) Modelo tisular de espesor parcial.

Criterios de eliminación

- a. Cultivos de microorganismos contaminados.
- b. RNA degradado o no puro.

## Operacionalización de variables

**Tabla 1. Variables dependientes del estudio.**

Variables dependientes	Definición conceptual	Definición operacional	Naturaleza	Unidad de medida	Escala
Expresión de genes en <i>Candida albicans</i> .	Proceso por el cual un gen se activa en una célula para elaborar ARNm y proteínas. La expresión de un gen puede medirse al observar el ARNm, o lo que la proteína hace en una célula. <sup>10</sup>	Cuantificación de genes expresados en <i>Candida albicans</i> al ser tratados con AgNPs	Cuantitativa continua	FPKM	Razón
Efecto antibiopelícula de las AgNPs en modelo tisular	Capacidad de evitar la formación de biopelículas. <sup>11</sup>	Inhibición de unidades formadoras de colonias por efecto de AgNPs	Cuantitativa discreta	UFC	Razón
Daño tisular	Lesión provocada a los tejidos del organismo.	Disminución en viabilidad celular por efecto de AgNPs	Cuantitativa continua	Absorbancia en porcentaje (%)	Razón
Inflamación	Reacción del cuerpo que ocurre cuando el sistema elabora sustancias químicas que producen una respuesta inmunitaria para combatir una infección o una herida.	Porcentaje elevado en la expresión de interleucinas	Cuantitativa continua	Absorbancia en porcentaje (%)	Razón
Estabilidad de AgNPs	Propiedad de conservar sus características físicas, químicas y biológicas entre límites específicos. <sup>8</sup>	Cualidad por la cual AgNPs mantiene sus propiedades fisicoquímicas en el tiempo	Cuantitativa continua	Absorbancia (nm)	Razón

**Tabla 2. Variables independientes del estudio.**

Independientes		Definición operacional	Naturaleza	Unidad de medida	Escala
AgNPs	Son partículas de plata de tamaño nanométrico que se pueden sintetizar en diferentes formas.	Nanomaterial sintetizado a partir de nitrato de plata.	Cualitativa	partícula	Nominal
Genoma de <i>Candida albicans</i>	Conjunto de genes en los cromosomas y disposición de los mismos. <sup>9</sup>	Conjunto de genes de <i>Candida albicans</i> .	Cuantitativa discreta	Pares de bases (pb)	Razón
<i>Candida albicans</i>	Hongo dimórfico de gran importancia médica.	Levadura de la cepa ATCC 90028	Cualitativa	microorganismo	Nominal

## 10. MÉTODO

El método se dividió en tres fases para su ejecución. En la primera fase se trabajó con la síntesis y caracterización de las AgNPs. La segunda etapa trató del análisis de las vías metabólicas que se ven afectadas al estar *Candida albicans* en contacto con las AgNPs. En la tercera etapa se estudió el efecto de las AgNPs en modelos tisulares comerciales.

### Fase 1

#### 1.1 Síntesis de AgNPs

1.2 Caracterización de AgNPs mediante espectroscopía UV-Vis, Microscopía electrónica de transmisión (TEM), análisis de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) y potencial Z.

### Fase 2

2.1 Determinar las Rutas metabólicas de importancia en las que las AgNPs afectan a *Candida albicans*.

### Fase 3

3.1. Desarrollo de biopelícula de *Candida albicans*.

3.2. Cuantificación de viabilidad de *Candida albicans* mediante XTT.

3.2. Formación de biopelículas de *Candida albicans* para estudio en modelo tisular.

3.3. Observación microscópica mediante SEM de discos PMMA.

3.4. Cuantificación de la proteína de IL-6 Y GM-CSF secretada mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

3.5. Cuantificación de niveles de Lactato deshidrogenasa(LDH).

#### 3.6. Propuesta de desarrollo de modelo 3D experimental

3.6.1. Aislamiento de células epiteliales y fibroblastos gingivales humanos.

3.6.2. Desarrollo de modelo tisular *In vitro*.

3.6.3. Desarrollo de biopelículas en biorreactor.

## Etapa 1 Síntesis y caracterización de AgNPs.

### 1.1 Síntesis de nanopartículas de plata

La síntesis de nanopartículas de plata se llevó a cabo mediante método químico en el cual se colocaron 20 mL de etilenglicol y se agregaron 5 mL de infusión de *Pelargonium-hortorum* (geranio) el cual se dejó en agitación por 10 min, posteriormente se agregó por goteo la solución de AgNO<sub>3</sub> (Nitrato de plata). Se llevó a cabo el lavado de las nanopartículas de plata para finalizar con la caracterización mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y espectroscopia UV-VIS (Figura 1).



Figura 1. Representación de síntesis de AgNPs.

## 1.2 Caracterización de nanopartículas de plata

### 1.2.1 Espectroscopia de UV-Vis

Se colocaron 200  $\mu\text{L}$  de solución de nanopartículas de plata 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*). El análisis se realizó a una longitud de onda de 300-600  $\text{nm}$ .

### 1.2.2 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de AgNPs en un tubo eppendorf con 1.5  $\text{mL}$  de agua destilada para obtener una solución que se colocó sobre una rejilla para microscopía y así permitir la evaporación de la muestra, posteriormente fue observada en un Microscopio Electrónico de Transmisión (JEOL-1010).

### 1.2.3 Caracterización mediante Espectroscopia de infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR)

La caracterización mediante *FT-IR* se llevó a cabo mediante el equipo Tensor 27, se analizó en un rango de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  en modo transmisión con resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$  en celda de diamante.

### 1.2.4 Potencial Z

El tamaño de partícula y la carga superficial se caracterizaron utilizando el analizador de tamaño Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Panalytical, Malvern, Reino Unido) utilizando cubetas de células capilares plegadas.

## **Etapa 2** Rutas metabólicas de importancia en las que las AgNPs afectan a *Candida albicans*.

A partir de los datos previamente obtenidos mediante RNA-seq (tabla 3) se analizaron los datos filtrados para encontrar las rutas metabólicas de *Candida albicans* en las que se observaron cambios en su regulación.

Se utilizó el software Pathview para la integración y visualización de datos de rutas metabólicas basándose en la información del sitio de Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Los datos fueron analizados mediante los parámetros por defecto en KEGG.

**Tabla 3. Datos previos obtenidos de RNA-seq.**

<b>Datos de secuenciación</b>	<b>Grupo Control <i>Candida albicans</i> muestras 1,2 y 3</b>	<b>Grupo experimental <i>Candida albicans</i> +AgNPs muestras 1,2 y 3</b>
<b>Número de lecturas crudas</b>	30687378	33233001
<b>Número de lecturas filtradas</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 regiones genómicas</b>	6295	5695
<b>Tamaño máximo de contigs</b>	14051	10610

## Fase 3 Efecto de las AgNPs en biopelículas de *Candida albicans* en un modelo de estomatitis protésica. MatTek epioral model

### 3.1 Formación de biopelículas de *Candida albicans*

A partir de un cultivo de 24 horas, se inoculó una colonia de *Candida albicans* ATCC90028 en medio de cultivo caldo dextrosa sabouraud. A las 16 horas se trabajó en una concentración estandarizada 0.5 McFarland (medida por densidad óptica a 600 nm). Se inocularon 100 µl en cada pocillo. Se dejaron en incubación a 37°C por 24 horas en condiciones aeróbicas. A las 24 horas las células no adheridas se eliminaron y se adicionó medio fresco a los pocillos. Las biopelículas se cultivaron durante 72 h con un cambio medio diario.



**Fig 2. Metodología en la formación de biopelículas de *Candida albicans*. Dos grupos fueron probados: PMMA modificado con AgNPs(0.05 µg/ml)**

### 3.2 Ensayo XTT

La viabilidad de las células de las Biopelículas de *Candida albicans* fueron evaluados por XTT. Las placas fueron incubadas durante 3 h en la oscuridad a 37°C. Todo el contenido de cada pocillo se centrifugó a 5000g durante 2 min, se midió el cambio colorimétrico del sobrenadante utilizando espectrofotometro UV-Vis a 620 nm.

### 3.3 Obtención de Modelo 3D de tejido oral *in vitro* para la evaluación de AgNPs

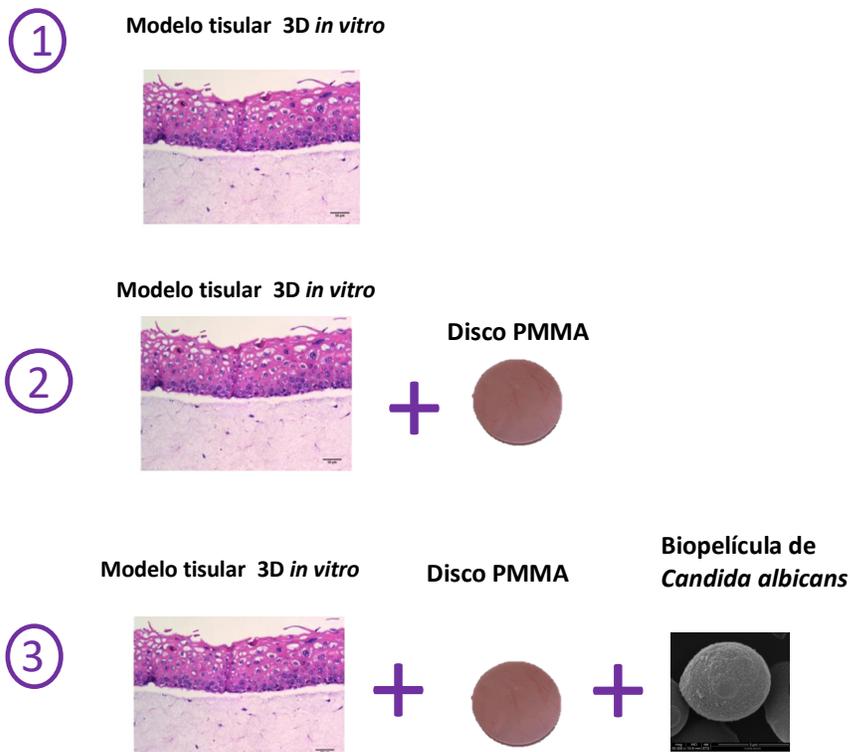
Los tejidos epiorales y epigingivales de MatTek consisten en células epiteliales orales derivadas de humanos. Las células se cultivaron para formar modelos de múltiples capas altamente diferenciados de los fenotipos bucal humano (EpiOral). Los modelos de tejido EpiOral exhiben características morfológicas y de crecimiento similares a las de *in vivo* que son uniformes y altamente reproducibles.



Fuente: Directa

Fig 3. Obtención de tejidos EpiOral.

Se trabajaron los siguientes grupos experimentales



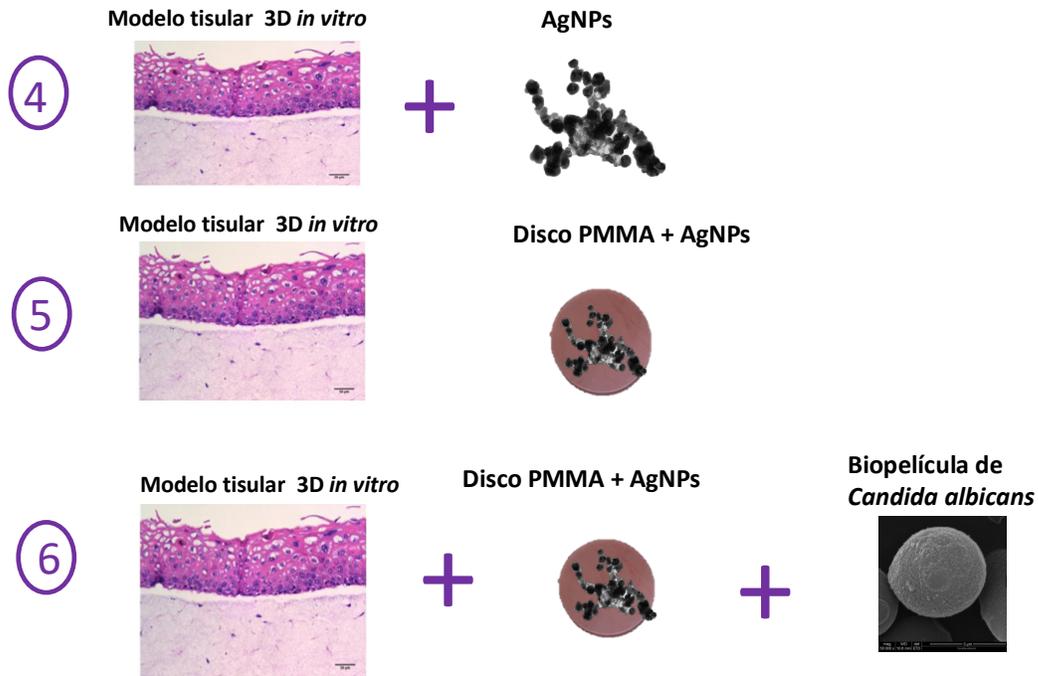


Fig 4. División de grupos en el estudio.

### 3.4 Formación de biopelícula en modelo tisular

Para la conformación de las muestras de PMMA modificadas con AgNPs se llevó a cabo mediante la técnica convencional de baño de agua. Previamente se pesaron 50 /ml de AgNPs y se adicionaron al monómero. Se confeccionaron discos de *PMMA* (opticyl) termocurable. En una proporción de 1:3 se incorporó el monómero(adicionado con AgNPs) con el acrílico y se mezcló por 30 s. Previamente en la mufla se colocó yeso tipo III junto con el molde de polivynilsiloxano para la

confección de discos de *PMMA*. Se llevó la mezcla de acrílico a la mufla y se cerró con ayuda de una prensa a 1500 *psi*. Se mantuvo por 90 *min* a 70 °C posteriormente se incrementó la temperatura a 100 °C por 30 *min*. Se dejó a temperatura ambiente por 30 *min*. Una vez terminada la reacción se obtuvo el *PMMA* el cual se pulió y se recortó para obtener discos de 10 *mm* x 2 *mm* de espesor. Se dejaron en agua por 7 días para permitir la liberación de polímeros residuales. Posteriormente se esterilizaron en el autoclave. Se incubaron con saliva artificial a 37°C por 20 *h* antes de su inoculación con *Candida albicans*.

Se inocularon 100  $\mu$ L de cada suspensión de *Candida albicans* en discos de *PMMA* a partir de una concentración estandarizada (medida por densidad óptica a 600 *nm*) durante 24 *h*. Las células no adheridas se eliminaron mediante lavado de PBS y se adicionó medio fresco a los pozos. Las biopelículas se cultivaron durante 72 *h* con un cambio medio cada 24 horas. Antes de la inoculación del tejido, el medio de cultivo de tejidos se reemplazó por medio de cultivo nuevo, los discos de acrílico con y sin biopelículas se colocaron en contacto directo con los modelos de tejidos incubando a 37 °C en 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 *h*. Después de la inoculación, los discos de acrílico se retiraron cuidadosamente con pinzas.

El número de células adherentes y presentes en los discos de *PMMA* que estuvieron en contacto con los modelos 3D se determinó enumerando las unidades formadoras de colonias (UFC) mediante el método descrito por Miles y Misra (Miles & Misra, 1938). Las muestras de acrílico se lavaron con PBS para eliminar las células no adheridas. Se sumergieron en un tubo para centrífuga con 1 ml de PBS, posteriormente fueron sonicados (Ultrasonic Processor, Cole-Parmer) durante 30 s a 40 W. Se realizaron diluciones seriadas desde 10<sup>-1</sup> hasta 10<sup>-6</sup> con solución salina (NaCl 0,9%). En agar dextrosa sabouraud se aplicó una gota de 20 l decada dilución sobre la superficie del agar. En cada placa se aplicaron las diluciones de los grupos estudiados. Las placas se secaron y se incubaron a 37 °C durante 18 *h*, después de este tiempo las colonias se contaron.

El sobrenadante se utilizó para llevar a cabo la cuantificación de las IL-6, G-CSF y GM-CSF secretada mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

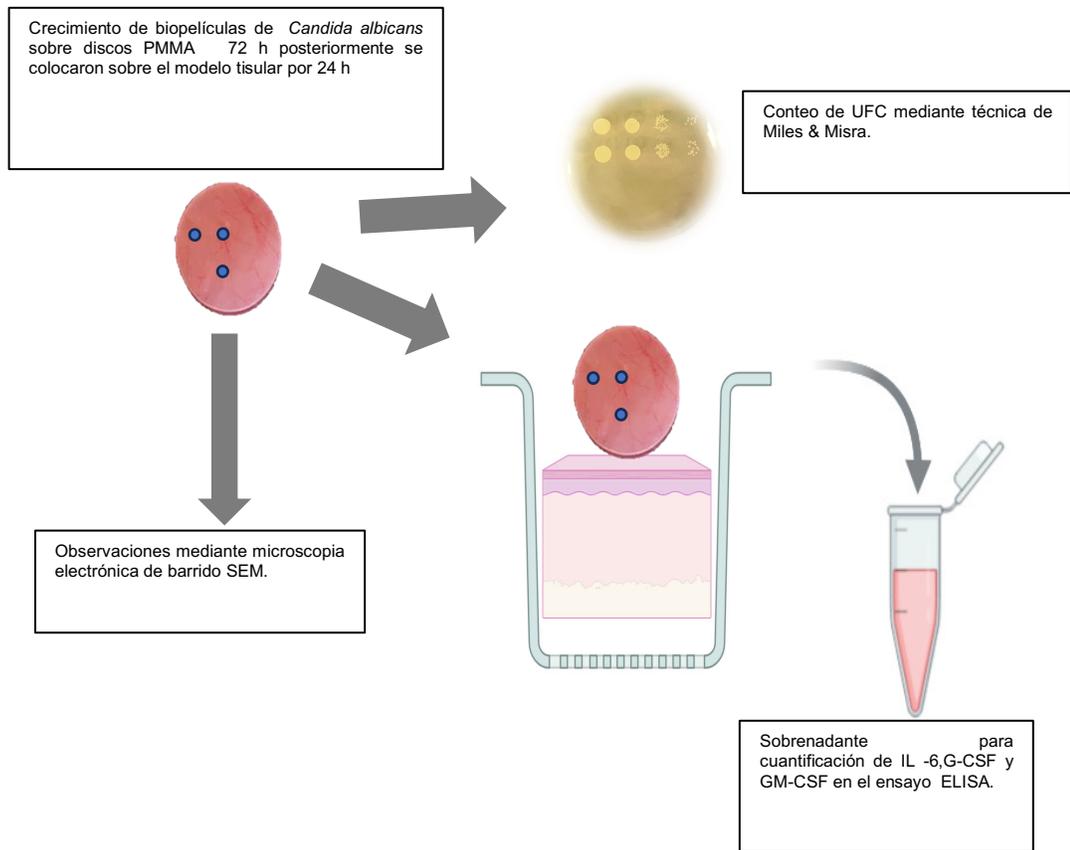


Figura 5. Metodología en el análisis de cambios celulares y cuantificación de interleucinas.

### **3.5 Observación microscópica de disco de PMMA mediante SEM .**

Las biopelículas se lavaron suavemente dos veces para eliminar las células no adherentes pipeteando PBS y luego se fijaron por inmersión usando glutaraldehído al 2.5%. Las biopelículas se deshidrataron utilizando una secuencia de concentraciones crecientes de etanol. Primero, etanol al 10% durante 10 minutos, luego se sumergió en etanol al 70% durante 30 minutos y, finalmente, tres series de 20 minutos utilizando etanol al 100%. Finalmente, las biopelículas se dejaron secar al aire durante la noche. Luego, las muestras se cubrieron con oro de 4 nm y se colocaron en un microscopio SEM de mesa para obtener imágenes. Las áreas de imágenes se seleccionaron al azar y las imágenes se observaron por triplicado.

### **3.6 Cuantificación de las citocina IL-6 y GMS-CF secretada mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)**

El ensayo de ELISA para determinar los niveles de *IL-6* y *GMS-CF*, se realizó empleando el kit *Ready-Set-Go* (*eBioscience, Thermo Fisher Scientific*), el nivel de absorbancia a 450 nm obtenido se comparó a través de los valores obtenidos para una curva estándar. Para el ensayo se utilizó una placa de 96 pocillos de alta afinidad para *ELISA* (*Corning Costar®* de 96 pozos). Se colocaron 100  $\mu\text{L}$  en cada pozo del anticuerpo en *coating buffer*, dejándose 16 hrs a 4°C. Posteriormente la placa se lavó 3 veces con *PBS pH 7.4* adicionado con 0.05% de *Tween-20* (*PBST 0.05 %*). A continuación, la placa se bloqueó con 200  $\mu\text{L}$  de *diluyente ELISA / ELISASPOT (1X)* y dejó incubando a temperatura ambiente (*TA 25°C*) durante 1 h, para eliminar el bloqueo se aspiró y lavó con *Wash Buffer*.

La curva estándar se construyó partiendo de un volumen total de 200  $\mu\text{L}$ , realizando 5 diluciones seriadas de 1:2. La placa se tapó e incubó por 16 hrs a 4°C. Posteriormente, se aspiró el sobrenadante y la placa se lavó con *PBST 0.05% 5* veces, posteriormente a cada pozo se le colocaron 100  $\mu\text{L}$  del anticuerpo conjugado con biotina y se incubó a *TA* durante 1 h. Transcurrido el periodo de incubación se aspiró el sobrenadante del primer anticuerpo, se lavó 3 veces con *PBST 0.05%* y se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  en cada pozo de estreptavidina-*HRP*, la placa se dejó

incubando a *TA* por 30 *min*. Posteriormente, se lavó 5 veces con PBST 0.05%. Finalmente, para llevar a cabo el revelado del anticuerpo, se empleó como sustrato una solución de *TMB* al 1X (3,3,5,5-tetrametil-benzidina (*TMB*) (*Thermo Fisher Scientific, INVITROGEN*®)). Para lo cual cada pozo se incubó con 100  $\mu$ L de solución de *TMB* a *TA* durante 15 *min* en oscuridad. Para detener la reacción enzimática, se adicionó 100  $\mu$ L de una solución 1N de *HCl*. Una vez que se detiene la reacción, se utilizó un espectrofotómetro para placas de ELISA y se registró la absorbancia a 450 *nm*.

### **3.7 Cuantificación del daño tisular mediante ensayo de Lactato deshidrogenasa.**

Se utilizó el kit CytoTox 96®. A partir del sobrenadante de los 6 grupos diferentes se transfirieron 50-100  $\mu$ L del sobrenadante del cultivo celular a una nueva placa de cultivo celular de 96 pozos, posteriormente se adicionaron 50  $\mu$ L del reactivo de lisis del kit CytoTox 96® a cada pozo. Se incubaron las placas durante 45 minutos a temperatura ambiente, protegida de la luz. Posteriormente se agregaron 50  $\mu$ L de la solución de detención del kit CytoTox 96® a cada pozo. Se llevaron a cabo lecturas a una longitud de onda de 490nm utilizando el espectrofotómetro UV-vis. Posteriormente se obtuvieron los porcentajes de liberación de LDH en comparación con el control positivo y el control negativo.

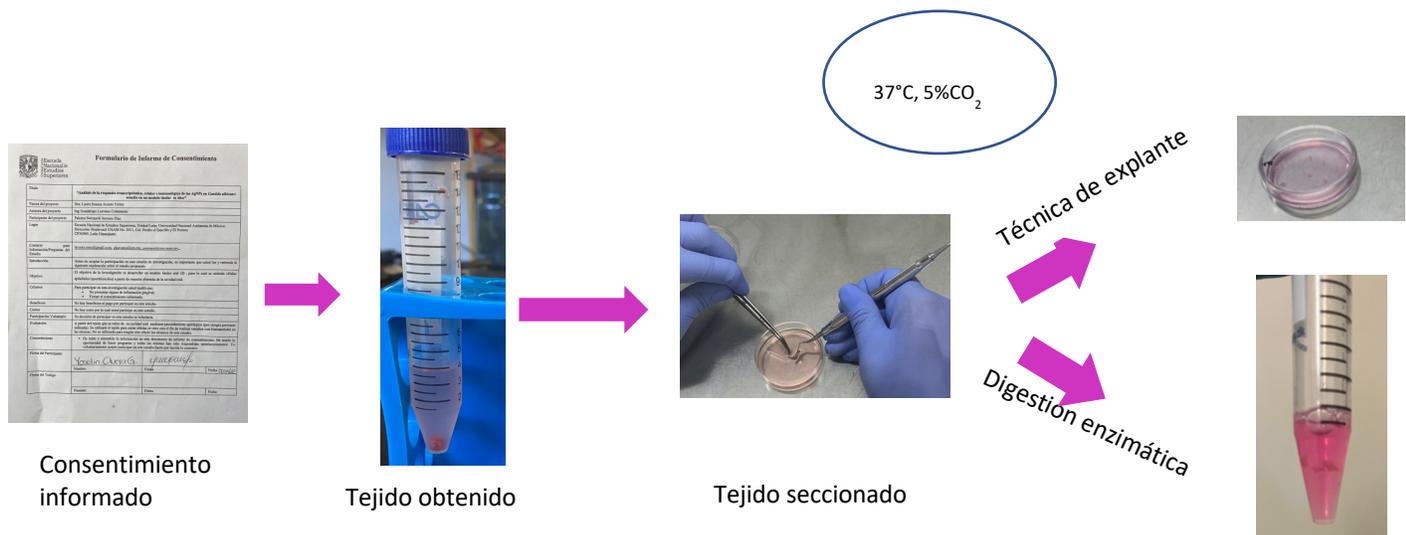
## Etapa III Propuesta de desarrollo de modelo 3D experimental

### 3.8 Aislamiento de células epiteliales y fibroblastos gingivales humanos.

#### Aislamiento y crecimiento celular

Se obtuvo tejido remanente de la zona cervical de terceros molares extraídos de pacientes a los que tenían la indicación de realizar cirugías de terceros molares, previamente se les informó acerca del proyecto de investigación y en caso de aceptar prosiguieron a la firmar el consentimiento informado.

El tejido se lavó con *PBS* (Tampón de Fosfato salino), se seccionó hasta obtener fragmentos de tejido de 2 a 3 *mm*. La muestra fue digerida con tripsina/*EDTA* al 0.05 % y se incubó por 15 *min* a 37 °C bajo agitación, se neutralizó con medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino y se centrifugó a 4000 *rpm* a 4 °C por 10 *min*. Las células se resuspendieron en medio de cultivo.



**Figura 6. Metodología en el aislamiento de células (Fibroblastos gingivales humanos y células epiteliales)**

### **Medio de cultivo para fibroblastos**

Las células se cultivaron en *DMEM* (*Gibco BRL*) suplementado con *FCS* al 10% (*Gibco BRL*), penicilina/estreptomina al 1% (*Sigma, Buchs, Suiza*) y Fungizona al 2% (*Gibco BRL*) a 37°C y 5%  $CO_2$ .

### **Medio de cultivo para células epiteliales**

Las células se cultivaron en *DMEM* (*Dulbecco's Modified Medium*) y *Ham F-12* en proporción 3:1, suplementado con suero fetal bovino (*FBS*), 5  $\mu g/mL$  de insulina (*Sigma*), 0,4  $\mu g/mL$  de hidrocortisona (*Sigma*), 24  $\mu g/mL$  de adenina (*Sigma*), penicilina y estreptomina al 1% y 10  $ng/mL$  de factor de crecimiento epidermal (*EGF*) (Luevano *et al.*, 2021)

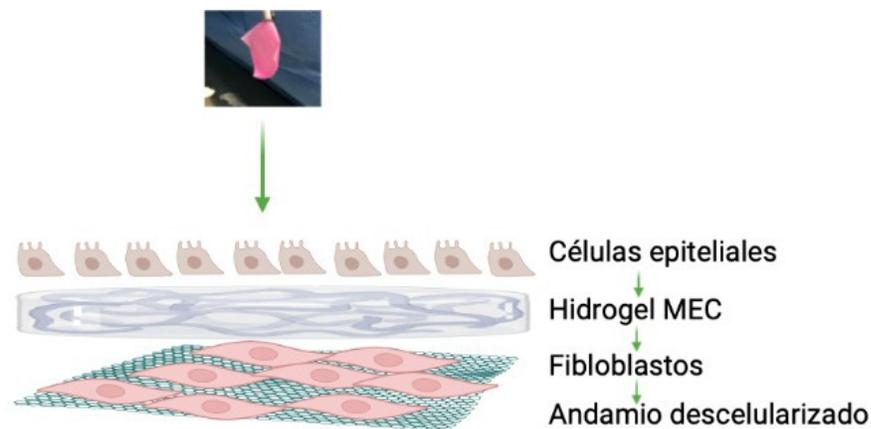
Para la siembra del material, se prepararon suspensiones celulares con una densidad de  $1 \times 10^6$  células / mL y se colocaron en placas de 24 pocillos (costar1 Corning, NY), 2 mL cada uno. Se adicionarán esponjas de colágena secas en la suspensión. Las matrices absorberán la suspensión celular. Las muestras sembradas se transferirán a placas de seis pocillos (cada esponja en un solo pocillo) preparadas con *DMEM / F12* enriquecido con *FCS* al 10%. Se permitirá que las células se adhieran a la esponja de colágena durante 7 días de incubación a 37 °C y 5% de  $CO_2$  con cambios de medio después de 3-4 días.

### **3.9 Desarrollo de modelo tisular *in vitro* 3D**

El andamio se obtuvo por colaboración con el Laboratorio de Cultivos celulares de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería Campus Guanajuato del Instituto Politécnico Nacional. El andamio será a base de pericardio bovino, procedentes de rastros que cuenten con certificación Tipo Inspección Federal (TIF), el tejido será sometido a un proceso de descelularización siguiendo el protocolo propuesto por *Mendoza et al.*, 2011. En el cual proponen un proceso de hinchamiento alcalino reversible, seguido de un tratamiento con detergente no iónico y un tratamiento adicional con nucleasas. Los andamios descelularizados

serán liofilizados y esterilizados por radiación gamma (con una dosis de 25 kGy). Finalmente los materiales serán almacenados a temperatura ambiente hasta su uso.

El andamio se hidratará con medio de cultivo 24 h previo a su uso, posteriormente se realizó sobre el mismo, el primer cultivo de células, para el cual se utilizarán fibroblastos humanos, que serán aislados a partir de tejido gingival, se prepararán suspensiones celulares con una densidad celular de  $1 \times 10^6$  cel / mL y se colocarán en placas de 24 pocillos (Corning costar, NY), el cultivo se mantendrá por 4 días en incubación a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> , realizando recambios de medio cada 48 h. Al quinto día se colocó un hidrogel de matriz extracelular (MEC), que fungirá también como un andamio para permitir la adhesión de un segundo tipo células, las cuales fueron obtenidas a partir del epitelio oral e incubadas nuevamente bajo las mismas condiciones por 3 días más. Una vez obtenidos los tejidos en 3D se realizó el ensayo metabólico *MTT* para analizar la viabilidad celular y evaluados histológicamente por tinción *H&E*.



**Figura 7. Constructo del modelo tisular.**

### 3.10 Desarrollo de biopelículas en biorreactor

#### 3.10.1 Confección de discos de *PMMA*

Mediante la técnica convencional de baño de agua termostataado se confeccionaron discos de *PMMA* (opticyrl) termocurable. En una proporción de 1:3 se incorporó el monómero con el acrílico y se mezcló por 30 s. Previamente en la mufla se colocó yeso tipo III junto con el molde de polivynilsiloxano para la confección de discos de *PMMA*. Se llevó la mezcla de acrílico a la mufla y se cerró con ayuda de una prensa a 1500 *psi*. Se mantuvo por 90 *min* a 70 °C posteriormente se incrementó la temperatura a 100 °C por 30 *min*. Se dejó a temperatura ambiente por 30 *min*. Una vez terminada la reacción se obtuvo el *PMMA* el cual se pulió y se recortó para obtener discos de 10 *mm* x 2 *mm* de espesor. Se dejaron en agua por 7 días para permitir la liberación de polímeros residuales. Posteriormente se esterilizaron en el autoclave. Se incubaron con saliva artificial a 37°C por 20 *h* antes de su inoculación con *Candida albicans*.

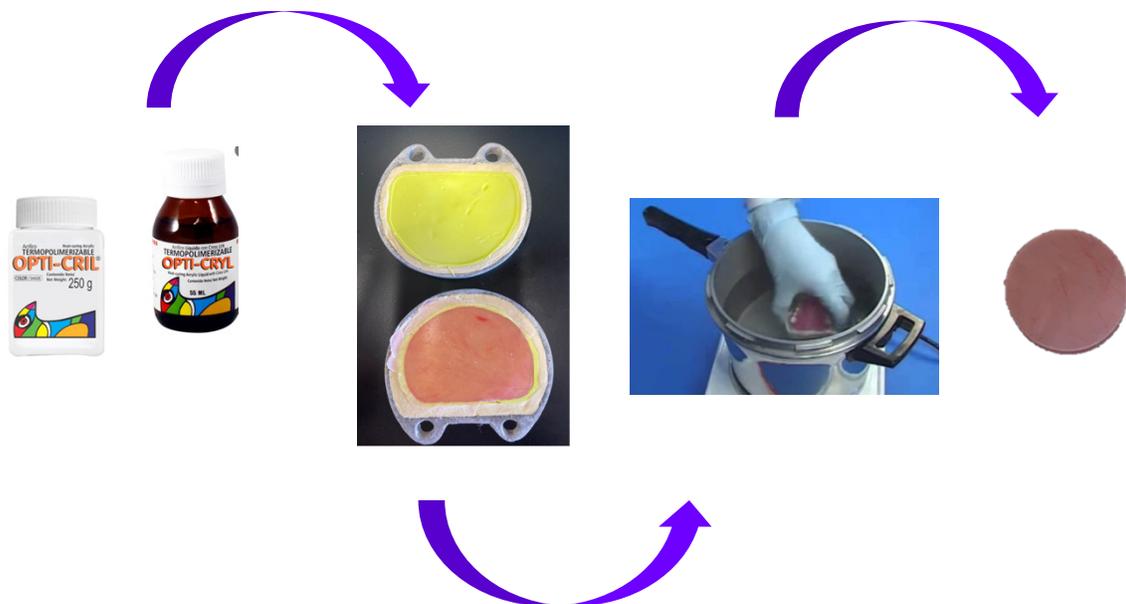
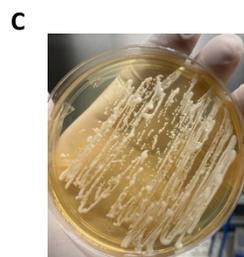
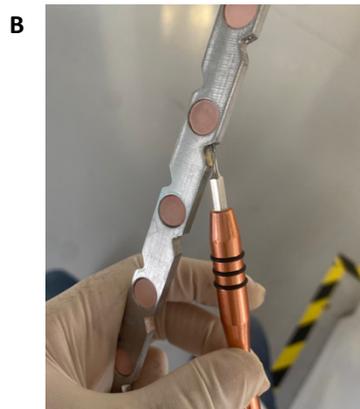
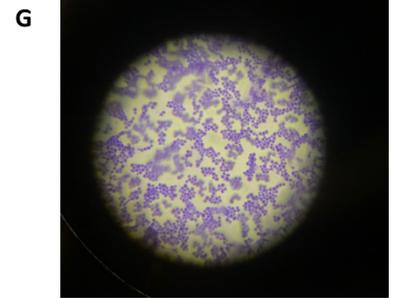


Figura 8. Confección de discos *PMMA* mediante técnica de termopolimerización

### 3.10.2 Formación de biopelículas en bioreactor

Se realizó un cultivo de *Candida albicans* ATCC 90028 sobre agar dextrosa sabouraud a 37°C, a las 24 h se tomaron 2 colonias y se resuspendieron en caldo dextrosa sabouraud por 16 horas a 37°C. Se obtuvo una solución ajustada en escala McFarland de  $1 \times 10^7$  células/mL. De la solución ajustada se colocaron 7 mL en el biorreactor para el cual los parámetros se ajustaron en la consola Applikon fueron a temperatura a 37°C y agitación constante de 80 rpm en modo de lote. Se colocaron los discos previamente inmersos en saliva artificial por 48 h en las columnas de agitación ( $n=10$ ). La mitad de los discos se dejaron por 24 h y la otra mitad por 48 h. Se retiraron los discos de la columna con ayuda de pinzas estériles y se observaron bajo microscopía óptica. Se tomaron fotografías de campos diferentes de ambos grupos y se analizaron en el software ImageJ donde se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias, se obtuvieron promedios, desviación estándar y se realizó prueba estadística *t* de student fijándose un valor  $p < 0.05$ .





**Figura 9. Proceso de modelo de biopelícula en biorreactor.**

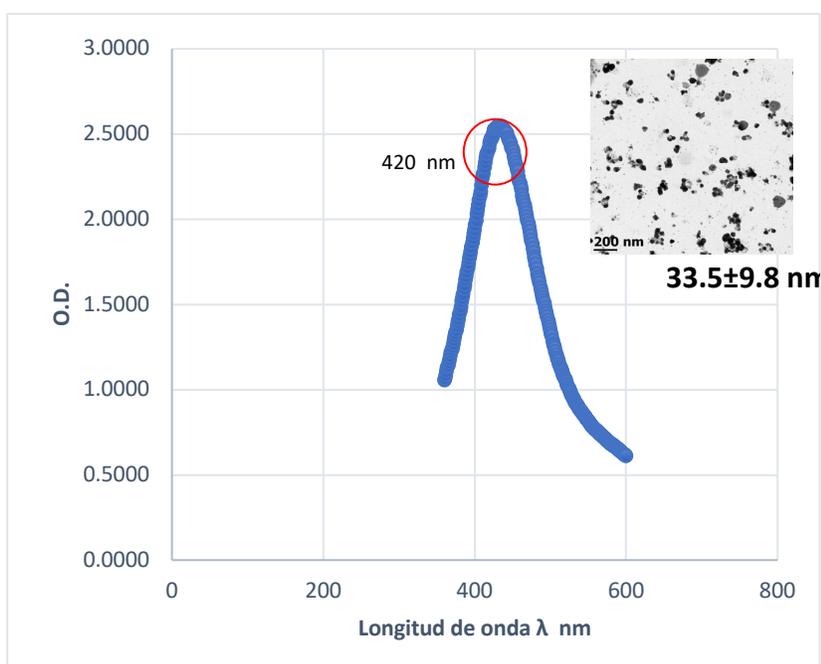
## 10. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para el tamaño de partícula, se calculó el promedio, desviación estándar y porcentajes. Para las pruebas de ELISA y citotoxicidad los resultados fueron sometidos a pruebas de normalidad de *Shapiro-Wilk* y ANOVA de una vía con *post-hoc*, *Tukey Test*. La significancia estadística fue fijada con un valor  $p < 0.05$  y un coeficiente de confiabilidad del 95 %.

## 11. RESULTADOS

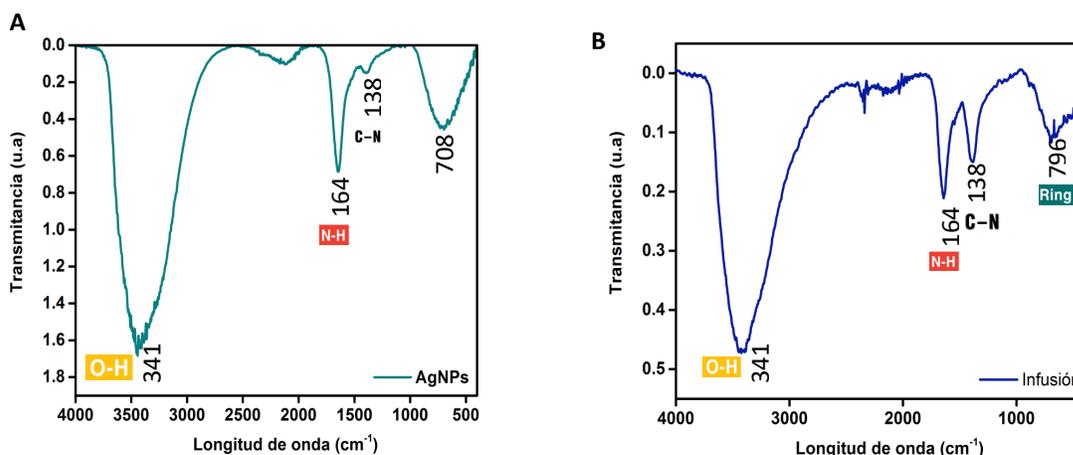
### Fase 1 Síntesis y caracterización de AgNPs

Se obtuvieron nanopartículas de morfología esférica con tamaño aproximado de entre 30-50 nm indicando una síntesis polidispersa; como se observa en la microfotografía de microscopía electrónica de transmisión (*TEM*) de la gráfica 1 así como la gráfica de espectroscopía de *UV-Visible* la cual indica pico máximo de absorbancia en 420 nm infiriendo ya un tamaño de partícula de entre 30-50 nm.



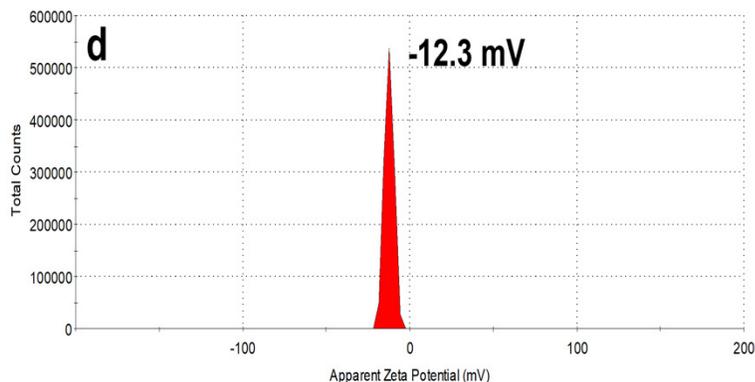
Gráfica1. UV-VIS de síntesis de AgNPs y su microfotografía de TEM.

Los espectros obtenidos por FTIR de las AgNPs (figura 10). La figura A muestra el espectro de la síntesis de las AgNPs y la figura B muestra el espectro de la infusión de geranio. Los espectros mostraron bandas ubicadas a 708, 1387, 1645, 2184 y 3418  $cm^{-1}$  donde la primera banda está asociada con enlaces C-H correspondiente al anillo fenólico, la segunda a C-N aminas aromáticas, la tercera a N-H banda correspondiente a amidas primarias y por último la quinta a enlaces N-H correspondiente a aminas.



**Figura 10. Espectros de infrarojo. (A) Análisis FT-IR de síntesis de AgNPs e (B) infusión de geranio.**

El potencial zeta de las AgNPs se muestran en la gráfica 2. Los datos determinaron la carga superficial de la partícula de -12,3 mV.



**Gráfica 2. Potencial Z**

## Fase 2

# Resultados del Análisis GSEA: Comparación entre AgNPs y Control

El análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA) realizado para comparar el grupo tratado con nanopartículas de plata (AgNPs) frente al grupo control mostró varias rutas metabólicas significativamente afectadas. La tabla 4 presenta las principales rutas metabólicas reguladas positivamente y negativamente. La primer columna muestra la dirección (alza o baja), la segunda columna menciona el nombre de la ruta metabólica afectada, la tercer columna muestra el número Normalized Enrichment Score (NES) el cual asigna un número mostrando tendencia positiva o negativa, la cuarta columna presenta el número de genes que se ven afectados y que se encuentran involucrados en la ruta metabólica y por último la quinta columna muestra el valor p.

**Tabla 4. Datos de análisis GSEA.**

Direction	GSEA analysis: AgNPs vs Control	NES	Genes	adj.Pval
Down	Arginine biosynthesis	-0.7552	14	2.9e-03
	Alanine aspartate and glutamate metabolism	-0.6153	25	1.6e-02
	Nitrogen metabolism	-0.8452	6	2.6e-02
	ABC transporters	-0.6512	14	6.1e-02
	Phenylalanine metabolism	-0.677	11	6.2e-02
	Beta-Alanine metabolism	-0.5961	18	6.2e-02
	Phenylalanine tyrosine and tryptophan biosynthesis	-0.5752	17	9.4e-02
	Up	DNA replication	0.7872	32
Glycolysis/Gluconeogenesis		0.6525	37	2.0e-05
Proteasome		0.6529	34	4.5e-05
Mismatch repair		0.7377	19	1.1e-04
Nucleotide metabolism		0.6215	34	1.8e-04
Nucleotide excision repair		0.6189	36	1.8e-04
Homologous recombination		0.7404	18	2.2e-04
Pentose phosphate pathway		0.6589	19	2.1e-03
N-Glycan biosynthesis		0.6047	27	2.1e-03
Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis		0.8023	9	4.2e-03
Base excision repair		0.6193	16	2.8e-02
Pentose and glucuronate interconversions		0.762	7	3.9e-02
Galactose metabolism		0.5891	14	6.2e-02

# Rutas Metabólicas a la baja

Las rutas metabólicas que mostraron una regulación negativa en respuesta al tratamiento con AgNPs incluyen:

## Biosíntesis de arginina

La figura 11 muestra la ruta metabólica de biosíntesis de la arginina donde se observa que 12 enzimas se encuentran coloreadas de color verde, representando baja expresión de estas enzimas tales como la glutamina sintetasa que cataliza la conversión de glutamato a glutamina, el cual, es un precursor importante en la ruta metabólica.

1 enzima se encuentra coloreada en rojo representando expresión a la alza de la enzima arginasa la cual está encargada de convertir a la arginina y ornitina en urea para su excreción.

El diagrama también muestra la relación con otras rutas metabólicas como la del ciclo del citrato, metabolismo de prolina y arginina, metabolismo del nitrógeno mostrando un efecto indirecto sobre las mismas.

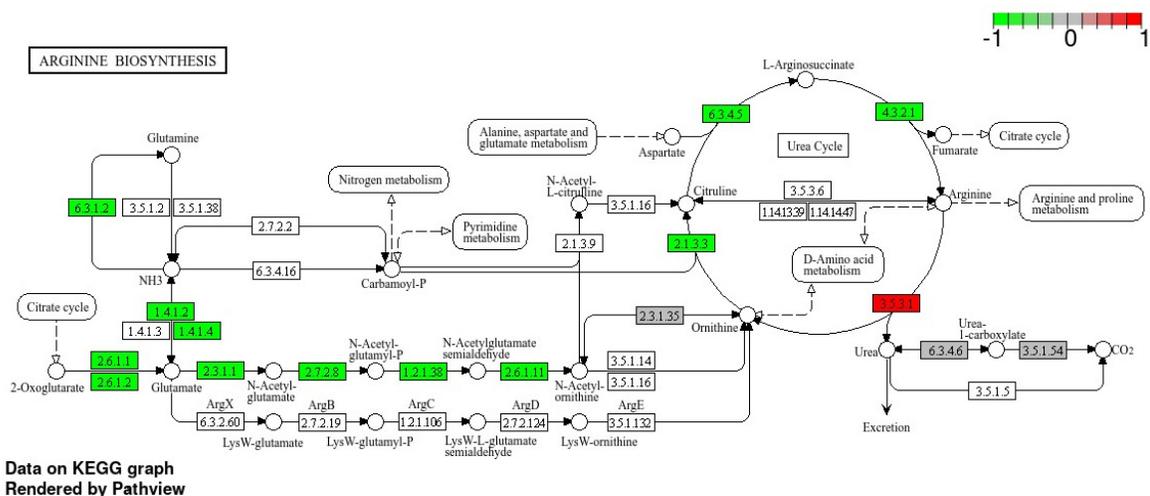


Figura 11. Diagrama de la ruta de biosíntesis de arginina.

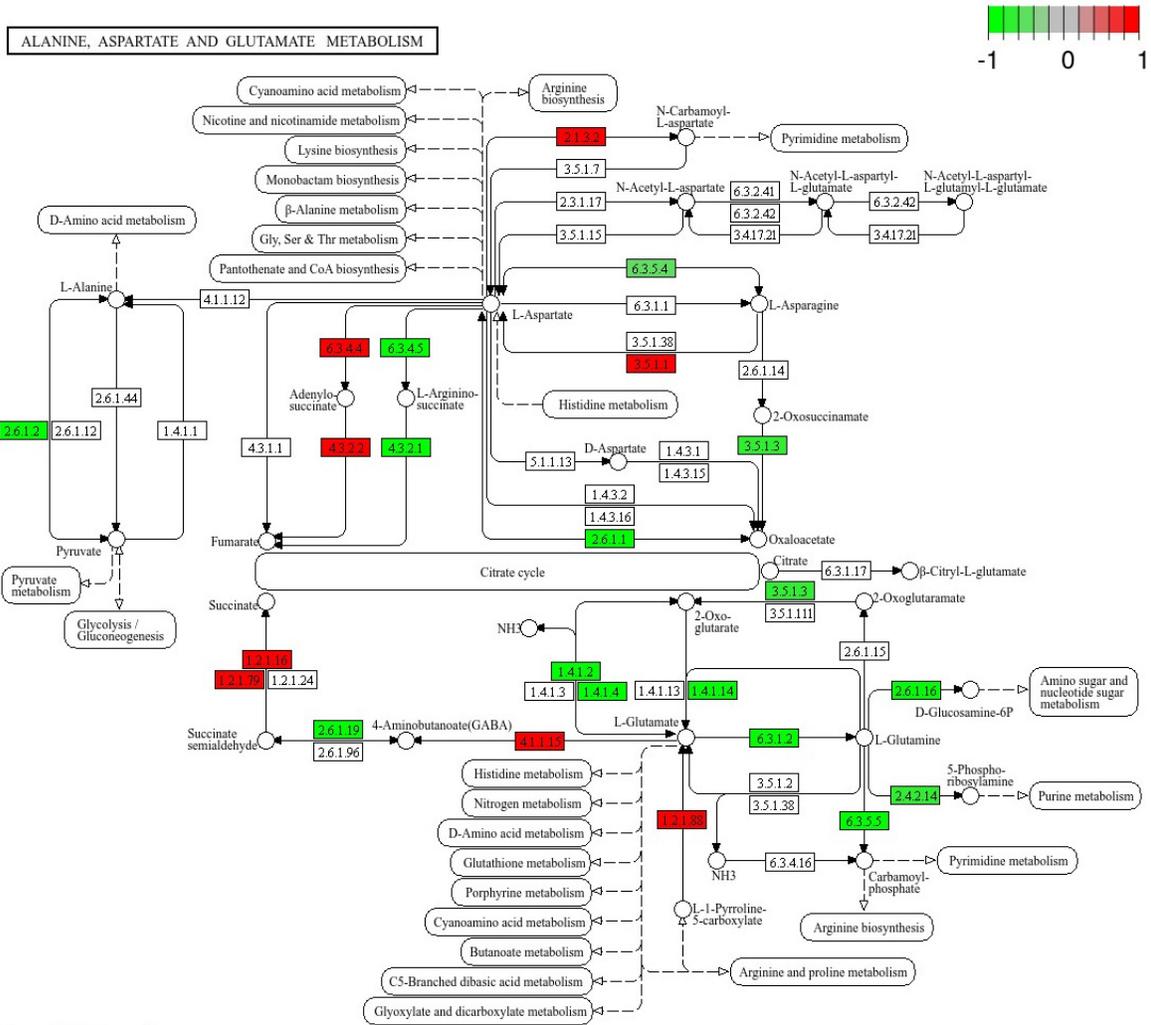
## **Metabolismo de alanina, aspartato y glutamato**

La figura 12 representa enzimas diferencialmente expresadas cuando se aplican AgNps sobre *Candida albicans*.

Entre las enzimas que se encontraron reguladas positivamente fueron arginasa que también tiene interconexión metabólica con la ruta de la biosíntesis de la arginina, Otra enzima dentro de este grupo fue la Succinato semialdehído deshidrogenasa, que se encarga de convertir la succinato semialdehído en succinato para posteriormente entrar al ciclo del ácido cítrico. Aspartato transcarbamilasa y Adenosuccinato liasa que participan en la síntesis de pirimidinas y purinas respectivamente, que son componentes de los ácidos nucleicos.

Algunas de las enzimas que se regularon negativamente fueron Aspartato quinasa, Ornitina carbamoiltransferasa, Argininosuccinato liasa Glutaminasa, Arginina desaminasa, N-Acetilglutamato sintetasa, Argininosuccinato sintetasa, entre otras.

Estas enzimas están involucradas en varias reacciones importantes dentro de las rutas de biosíntesis de aminoácidos y del ciclo de la urea, en particular en el metabolismo del glutamato, la glutamina, y otros intermediarios importantes para el funcionamiento celular en *Candida albicans*.



Data on KEGG graph  
Rendered by Pathview

Figura12. Diagrama de la ruta del metabolismo de la alanina, aspartato y glutamato.

## Metabolismo del nitrógeno

La figura 13 muestra la serie de reacciones enzimáticas que se llevan a cabo en el metabolismo del nitrógeno. Se observan enzimas tales como glutamato deshidrogenasa o glutamina sintetasa que se vieron positivamente reguladas, que tienen que ver con la formación de precursores del metabolismo de nitrógeno, por ejemplo, el glutamato. Este es un precursor de la glutamina, un aminoácido a partir del cual, *Candida albicans*, a través de su degradación puede obtener nitrógeno. Que como anteriormente se pudo observar tiene interconexión con la ruta metabólica anteriormente descrita de metabolismo de alanina, aspartato y glutamato.

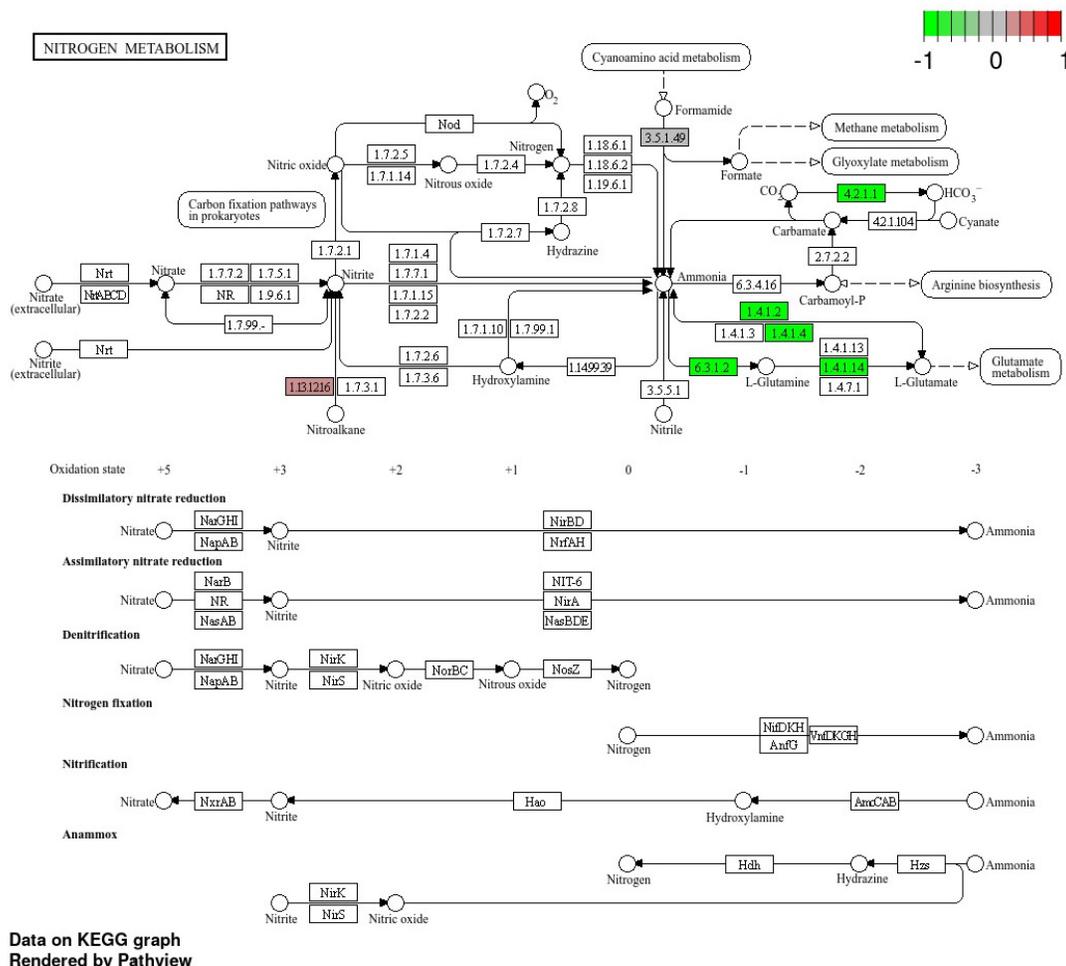


Figura13. Diagrama de la ruta del metabolismo del nitrógeno.

# Rutas Metabólicas al alza

Varias rutas metabólicas fueron significativamente reguladas al alza en *C. albicans* tratadas con AgNPs:

## Replicación del ADN

*Candida albicans* es una levadura eucariota que, al compartir esta característica con otros organismos eucariotas, realiza la replicación del ADN como un proceso esencial. Este mecanismo es fundamental para su división celular, crecimiento y propagación dentro del huésped. El presente diagrama en la figura 14 se muestra que la mayoría de las proteínas implicadas en el proceso de replicación en *Candida albicans* se observaron diferencialmente sobreexpresadas tales como las DNA polimerasa delta que se encarga de prolongar la síntesis en la cadena rezagada o la DNA polimerasa epsilon que tiene la misma función que la enzima anterior solo que esta trabaja en la cadena líder. El complejo MCM helicasa que es el encargado de desenrollar el ADN en la horquilla de replicación se observó también dentro del grupo de estas proteínas. Las proteínas clamp que unen la polimerasa al ADN y las enzimas helicasa DNA 2 y FEN 1 que unen los fragmentos de Okazaki en la cadena rezagada también fueron otros ejemplos de proteínas sobreexpresadas. Se observó una tendencia general de las proteínas implicadas en replicación a la alza.

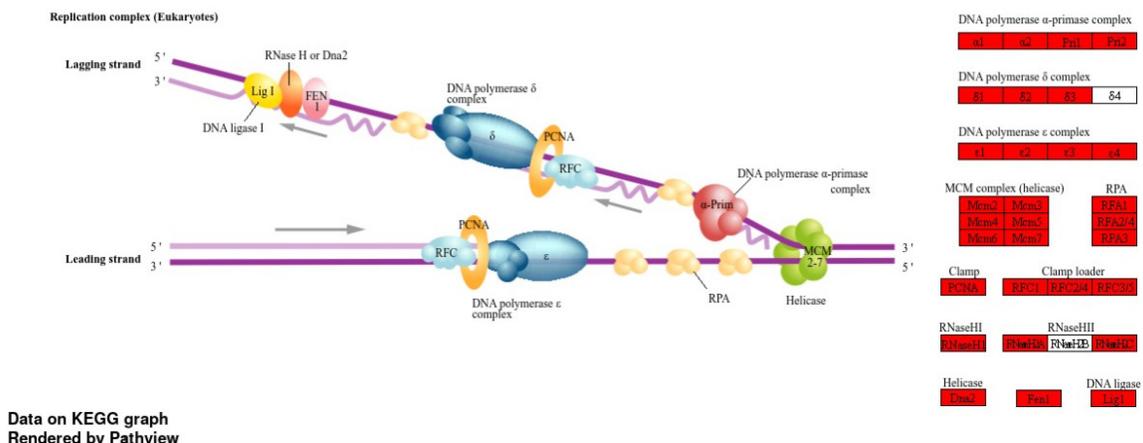


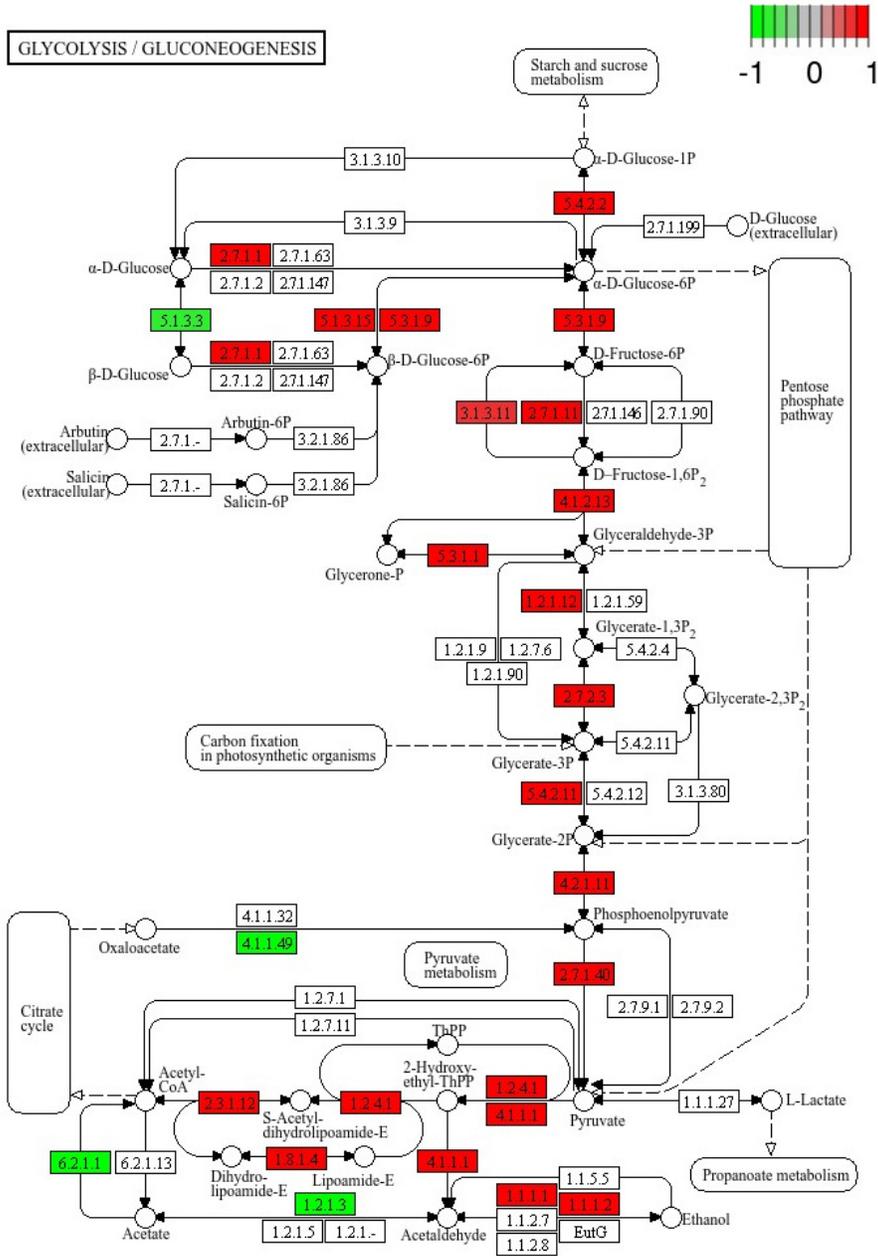
Figura14. Diagrama de la replicación de ADN.

## Glucólisis/Gluconeogénesis

La ruta de la glucólisis y gluconeogénesis son rutas, en las que, a través del metabolismo de la glucosa se obtiene piruvato que a su vez generará ATP y NADH o que lleva a cabo la biosíntesis de glucosa a partir de precursores no glucídicos.

La figura 15 muestra las enzimas que mostraron un cambio en su expresión de manera positiva fueron la fosfoglucomutasa, enzima que cataliza la transferencia del grupo fosfato del carbono 1 de la glucosa-1-fosfato a glucosa 6-fosfato, dicha conversión es esencial para el metabolismo de la glucosa.

Otra de las enzimas de este grupo es la fosfofructoquinasa que fosforila la fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-bisfosfato que es una de las fuentes más importantes de energía para *Candida albicans* en condiciones “normales”, la cual es metabolizada a través de la glucólisis.



Data on KEGG graph  
 Rendered by Pathview

Figura15. Diagrama de la vía de la glucólisis y gluconeogénesis.

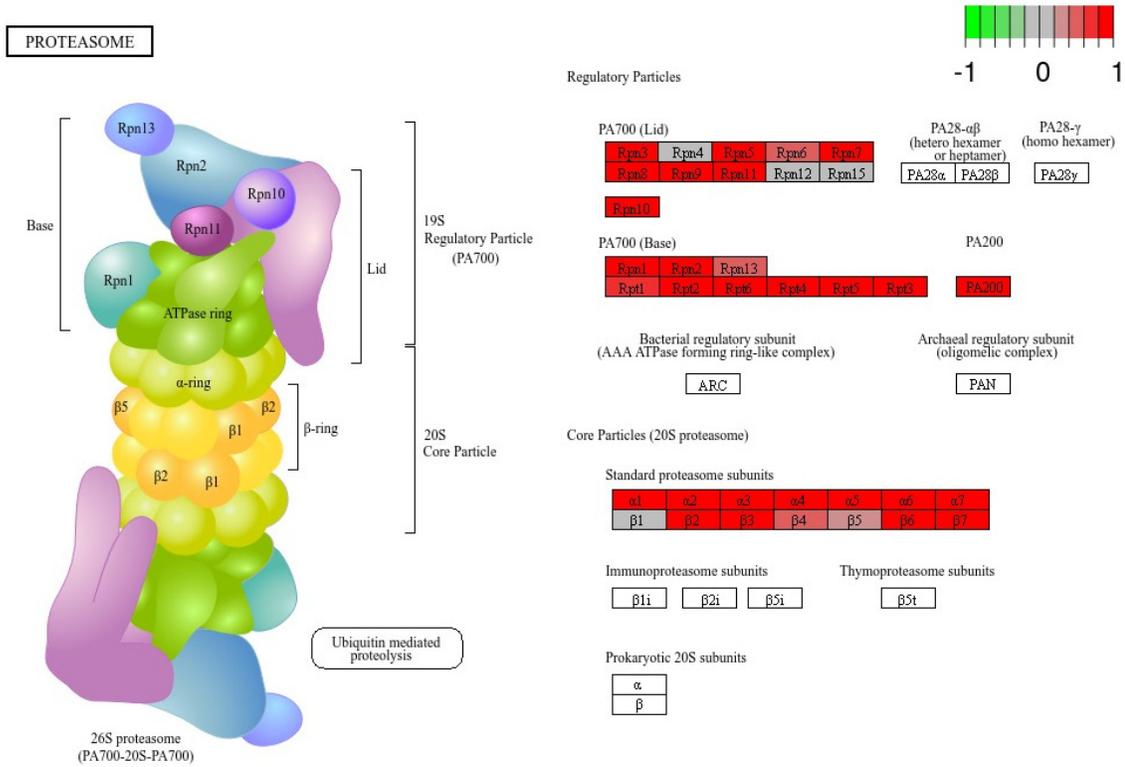
## Proteasoma

El proteasoma es un complejo enzimático en forma de cilindro que se encarga de degradar proteínas viejas, dañadas o mal plegadas. En el extremo del mismo se encuentra la tapa que es la encargada de identificar a las proteínas “marcadas” con ubiquitina que son las proteínas destinadas a entrar a este reciclaje proteico.

La figura 16 muestra las proteínas que se encontraron diferencialmente expresadas, nótese que solo hubo proteínas reguladas al alza. Estas proteínas son subunidades del complejo regulador 19s del proteosoma 26s en *Candida albicans*. El diagrama divide las proteínas como reguladoras tanto de la tapa como del centro del proteasoma.

Entre las proteínas reguladoras que se encuentran en la tapa tenemos al grupo de las RPN 3,5,6,7,8,9,10 y 11. Cabe destacar que cada una de estas cumple funciones diversas por ejemplo RPN3 es una proteína estructural de 19 s que además actúa como punto de regulación entre la subunidad 19s y la subunidad 20s. Rpn5 es vital para la identificación, degradación y reciclaje de ubiquitina. Rpn10 y 11 están encargados de la ubiquitinización, desubiquitinización y selección de proteínas para su marcaje y eficiencia.

PA200 fue otra proteína que se observó sobreexpresada que es un regulador alternativo y por último también las subunidades alfa y beta se vieron sobreexpresadas. Las estructuras alfa proporcionan estructura al proteosoma y las beta de la degradación proteica.

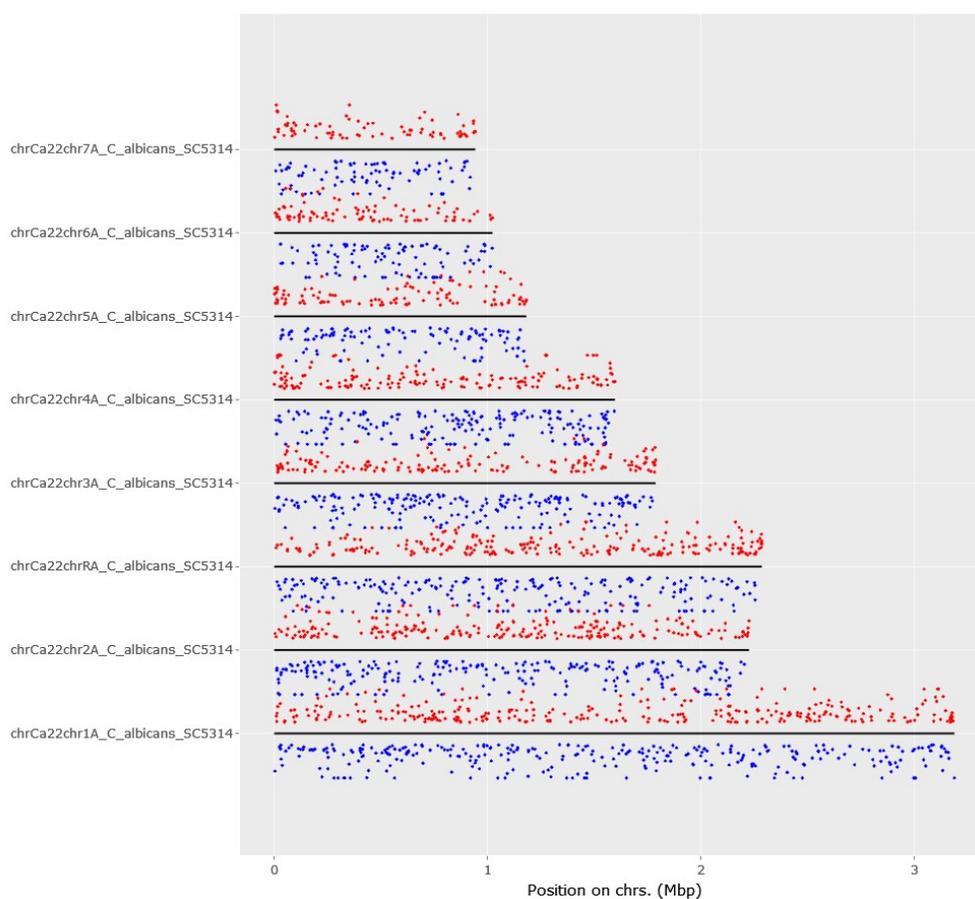


**Figura16. Diagrama de proteasoma**

## Distribución de Niveles de Expresión Génica en los Cromosomas de *Candida albicans*

La figura 17 muestra un gráfico de puntos que representa posiciones cromosómicas de *Candida albicans*. Mostrando diferencia en niveles de expresión génica, en donde, los representados en color rojo son los sobreexpresados y los de color azul los se vieron reprimidos.

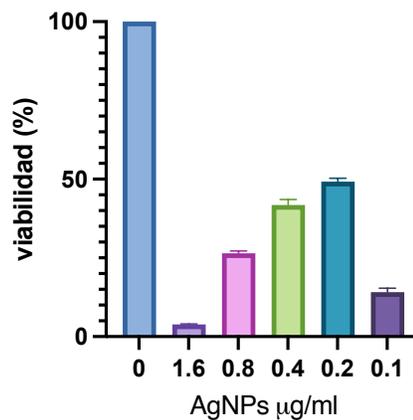
El gráfico muestra que no se observaron cambios en la expresión diferencial en una región en específica sino que en todo el genoma.



**Figura17. Gráfico de cromosomas de *Candida albicans* como respuesta al tratamiento con AgNPs.**

### Fase 3 Efecto de las AgNPs en biopelículas de *Candida albicans* en un modelo de estomatitis subprótesis

#### 3.1. Desarrollo de biopelícula de *Candida albicans* y cuantificación mediante XTT



**Grafica 3. Ensayo de XTT.** La gráfica muestra la absorbancia a 450 nm indicativa de la viabilidad de *Candida albicans* al aplicar las diferentes concentraciones de AgNPs.

Los resultados del ensayo XTT muestran crecimiento del 100% de *Candida albicans* cuando no se le aplicó ningún tratamiento. Se observa que a mayores concentraciones de AgNPs menor es la viabilidad de *Candida albicans*.

## 3.2 Formación de biopelículas de *Candida albicans* para estudio en modelo tisular.

### Formación de biopelículas de *Candida albicans*

Se realizó un cultivo de 24 h de *Candida albicans* ATCC 90028. Posteriormente se realizó un overnight utilizando medio de cultivo YPD, a las 16 hrs se retiró el cultivo. Se ajustó a  $1 \times 10^5$  células/ml, utilizando la cinética de crecimiento en la cual se utilizó como blanco tampón fosfato- salino PBS. Para llevar a cabo el presente experimento se dividieron en 6 grupos. Posteriormente se inocularon 500  $\mu$ l/mL de la solución en cada pozo de la caja de 24 pozos (n=3). A las 24, 48 y 72 hrs se realizaron cambios del medio de cultivo, enjuagando el excedente de células no adheridas con PBS.

### Obtención de modelos comerciales 3D



**Figura 18. Fotografías del proceso del estudio de los modelos 3D comerciales con biopelículas de *Candida albicans* ante la respuesta al tratamiento con AgNPs.**

Se obtuvieron 24 modelos de tejido oral comercial. El fabricante indicó que al llegar al laboratorio de investigación los tejidos fueran sometidos a cambio de medio de cultivo e incubados por 24 horas previo a su uso experimental.

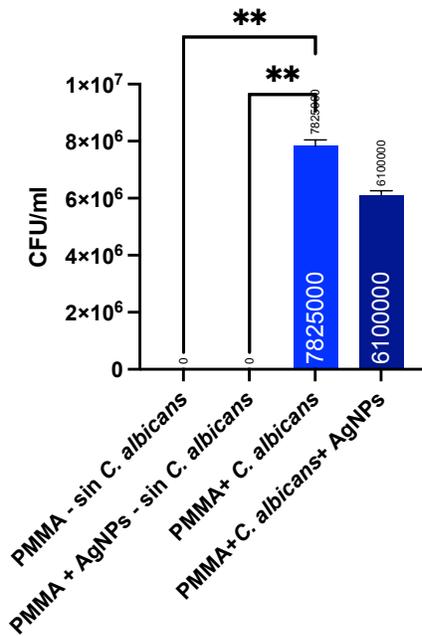
## Formación de biopelícula en modelo tisular

Los resultados muestran que los diferentes grupos probados que fueron inoculados con *Candida albicans* ATCC 90028 fueron exitosamente colonizados, creando biopelículas; las cuales fueron tratadas con AgNPs a una concentración de 50 µg/ml, mostrando reducción en el crecimiento de *Candida albicans*. Las gráficas muestran mayor número de colonias cuando están en contacto con el tejido 3D lo cual simula condiciones muy cercanas a lo que encontramos en un paciente que presenta este tipo de infecciones micóticas, demostrando que cuando el PMMA fue modificado con AgNPs tuvo menor colonización a diferencia de cuando el material no fue modificado con las mismas como se muestra en la figura 19.



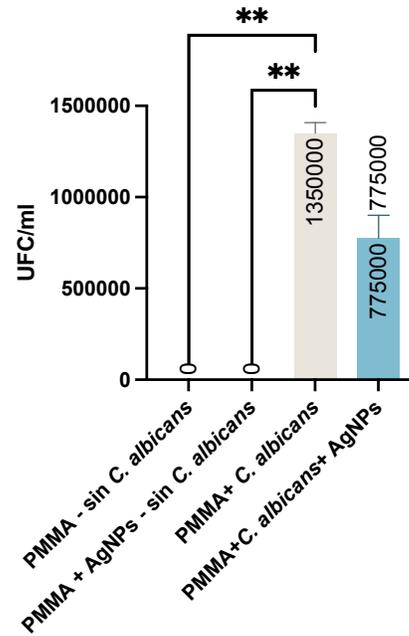
**Figura 19.** Conteo de colonias mediante el método de Miles y Misra De las biopelículas de *Candida albicans* ante la respuesta al tratamiento con AgNPs.

#### Disco PMMA en contacto con tejido EpiOral



ANOVA de una vía y tukey test p<0.05

#### Disco PMMA sin contacto en tejido EpiOral



ANOVA de una vía y tukey test p<0.05

#### Grafica 4 y 5. Conteo de unidades formadoras de colonias.

La gráfica 2 muestra los resultados de los diferentes grupos cuando no están en contacto con el tejido 3D. La gráfica 3 muestra los diferentes grupos en contacto con el modelo.

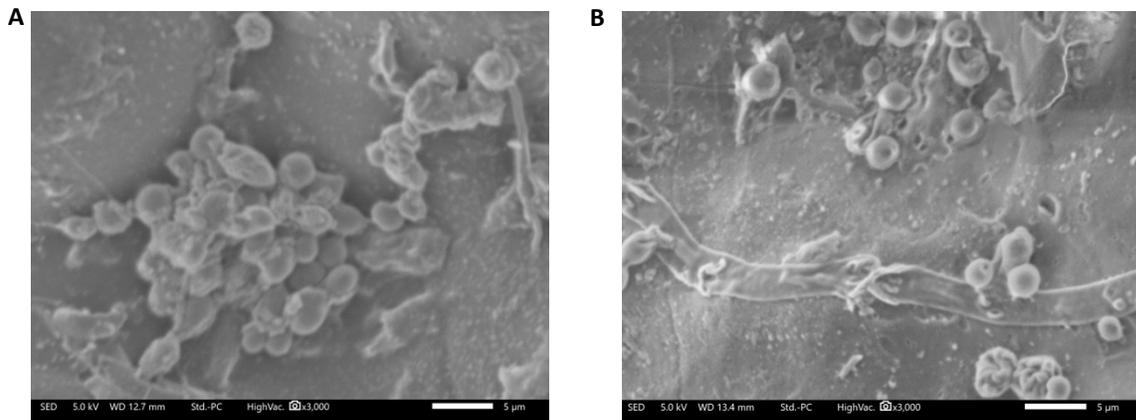
La gráfica 4 muestra el conteo de unidades formadoras de colonia de los discos de PMMA modificados y sin modificar con AgNPs cuando estuvieron en contacto con los modelos 3D respectivamente. El grupo 1 y 2 pertenece a los grupos control donde no se inoculó *Candida albicans*, demostrando que no hubo contaminación. El grupo 3 muestra el crecimiento sobre el disco sin adicionar AgNPs y grupo 4 PMMA modificado con AgNPs, ambos en contacto con *Candida albicans*. Los resultados muestran que hubo menor crecimiento en el grupo donde se adicionaron las AgNPs en comparación del grupo que PMMA sin modificar. Demostrando diferencia estadísticamente significativa entre grupo de PMMA sin adicionar AgNPs vs los grupos donde no se inoculó *Candida albicans*.

La gráfica 5 muestra el conteo de unidades formadoras de colonia de los discos de PMMA modificados y sin modificar con AgNPs. El grupo 1 y 2 pertenece a los grupos

control donde no se inoculó *Candida albicans*, demostrando que no hubo contaminación. El grupo 3 muestra el crecimiento sobre el disco sin adicionar AgNPs y grupo 4 PMMA modificado con AgNPs, ambos en contacto con *Candida albicans*. Los resultados muestran que hubo menor crecimiento en el grupo donde se adicionaron las AgNPs en comparación del grupo que PMMA sin modificar. Demostrando diferencia estadísticamente significativa entre grupo de PMMA sin adicionar AgNPs vs los grupos donde no se inoculó *Candida albicans*.

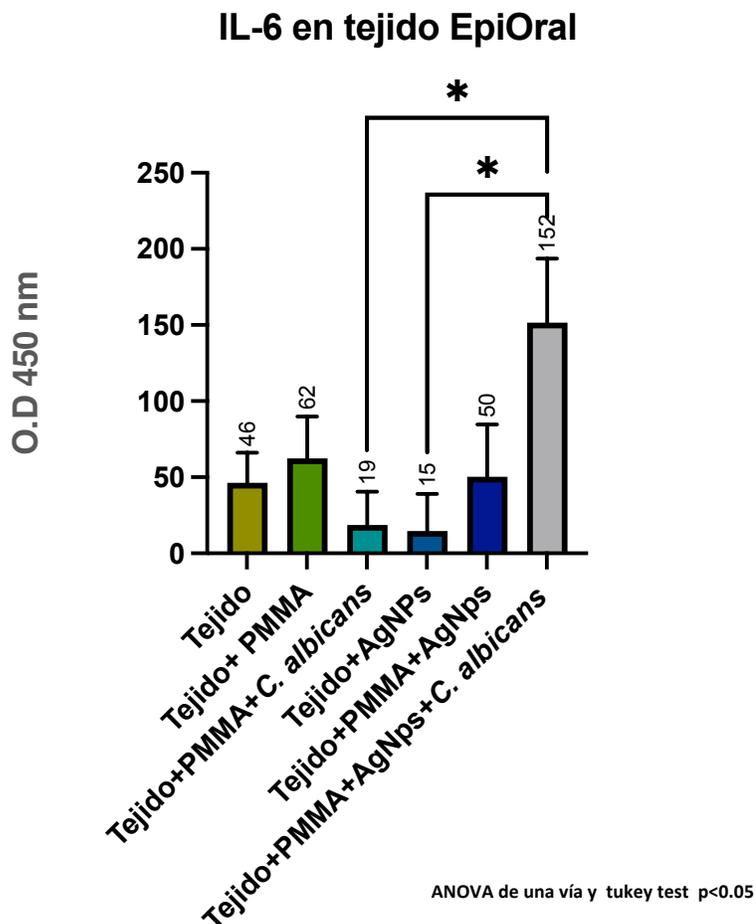
### 3.3 Observación mediante Microscopía electrónica de Barrido (SEM) de discos de PMMA.

La figura 20 muestra los resultados de las observaciones de los discos de PMMA utilizados para el estudio del efecto de las AgNPs sobre los modelos celulares 3D mediante microscopía SEM. La imagen A muestra la superficie del disco de PMMA del grupo control donde creció biopelícula de *Candida albicans* por 72 hrs. La imagen B muestra la superficie del disco de PMMA modificada con AgNPs donde muestra crecimiento de menor manera a diferencia de la superficie de la imagen A, así como una pared celular de *Candida albicans* con pérdida de la continuidad.



**Figura 20 . Microfotografías SEM. A** muestra la superficie de los discos de PMMA sin modificación con AgNPs en donde previamente creció la biopelícula de *Candida albicans*. **B** muestra la superficie del disco modificado con AgNPs, en donde además, se muestra la biopelícula de *Candida albicans*.

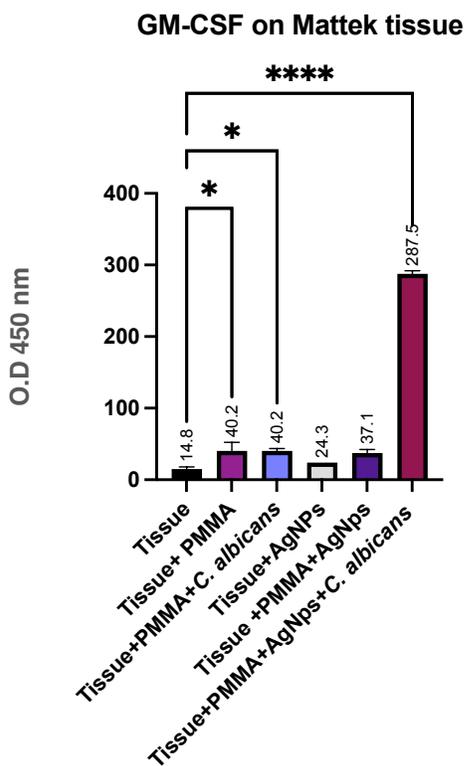
## Cuantificación de las citocina IL-6 y GMCSF secretada mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)



**Gráfica 6. Ensayo inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA) Indirecto para IL-6 en Tejido Mattek.** La gráfica muestra la absorbancia a 450 nm indicativa de la concentración de IL-6, en los diferentes grupos experimentales.

Se llevó a cabo un análisis de la expresión de IL-6 de los seis grupos experimentales, cada uno representativo de diferentes condiciones de exposición, como se observa en la gráfica 6. La expresión de IL-6 se evaluó y se registró en términos de absorbancia a 450 nm, proporcionando una medida de la concentración de IL-6 en cada grupo.

Se observó diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de tejido+ AgNPs y tejido+PMMA+ *Candida albicans* vs grupo de tejido+ PMMA+ AgNPs +*Candida albicans* mostrando mayor nivel de la expresión de IL-6 al ser un grupo con mayor número de elementos. Mostrando que el grupo de tejido+ AgNPs mostró menor expresión de IL-6.



ANOVA de una vía y tukey test  $p < 0.05$

**Gráfica 7: Expresión de GM-GSF en Tejido MATTEK.** La gráfica muestra la absorbancia a 450 nm, que refleja la expresión de Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-GSF), en seis grupos experimentales distintos. Los grupos evaluados incluyen tejido sin tratamiento adicional, tejido en contacto con PMMA, tejido con PMMA y *Candida albicans*, tejido con AgNPs, tejido expuesto a PMMA, AgNPs y AgNPs, y tejido expuesto a una combinación de PMMA, AgNPs y *C. albicans*.

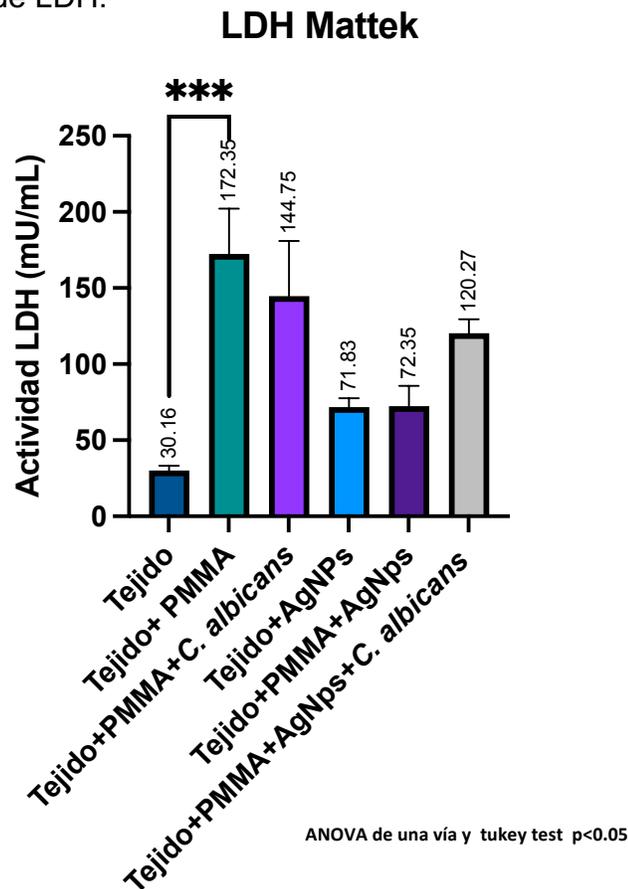
La gráfica 7 muestra el análisis de nivel de GM-CSF. El primer grupo, compuesto por tejido sin tratamiento adicional, mostró una expresión basal de GM-CSF en condiciones estándar. Por otro lado, el grupo de tejido en contacto con PMMA presentó una absorbancia de 40.2.

El grupo tratado con PMMA y *Candida albicans* mostró una absorbancia similar de 40.2, lo que sugiere que la presencia de *Candida albicans* junto con PMMA no tuvo un efecto adicional en la expresión de GM-GSF en comparación con el grupo con PMMA solo. Por otro lado, el tejido expuesto a AgNPs presentó una absorbancia de 24.3, indicando una expresión moderada de GM-GSF.

El análisis estadístico mostró que se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de tejido+ PMMA+ AgNPs +*Candida albicans* y grupo de tejido+ PMMA+ AgNPs +*Candida albicans* vs el grupo solo del tejido. Encontrando mayor expresión de este factor estimulante en grupos con mayor número de elementos.

## Cuantificación del daño tisular mediante ensayo de Lactato deshidrogenasa.

Los resultados de la cuantificación de la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) se muestran en la gráfica 8. Se observa que el grupo con la menor liberación de esta enzima, asociada con daño tisular, fue aquel en el que únicamente hubo contacto directo con las nanopartículas de plata (AgNPs), el grupo que mayor liberación de esta enzima fue cuando solo estaba en contacto el tejido con los discos de PMMA, siendo este el grupo donde se encontró diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo control. Cabe destacar que es relevante mencionar que del grupo donde se adicionó el PMMA con AgNPs fue el segundo con menor liberación de LDH.



**Grafica 8. Ensayo de cuantificación de actividad de LDH.** La gráfica muestra los valores de la actividad de la lactato deshidrogenasa, en los diferentes grupos experimentales.

## Aislamiento y crecimiento de Células Orales Epiteliales y Fibroblastos Gingivales Humanos

Los resultados mostraron que al momento de aislar las células mediante la técnica de explante tuvo éxito en la propagación de las células de ambas líneas celulares (CEH y FGH). En la figura 21 en la imagen A, a los 3 días se observaba adherencia cerca del explante. La imagen B muestra a los 15 días la densidad celular y por último la imagen C muestra los cultivos a los 21 días. Una vez que se alcanzó confluencia celular del 80% en el plato, se desprendieron las células del plato y se realizaron diferentes pases celulares.

37°C, 5%CO<sub>2</sub>

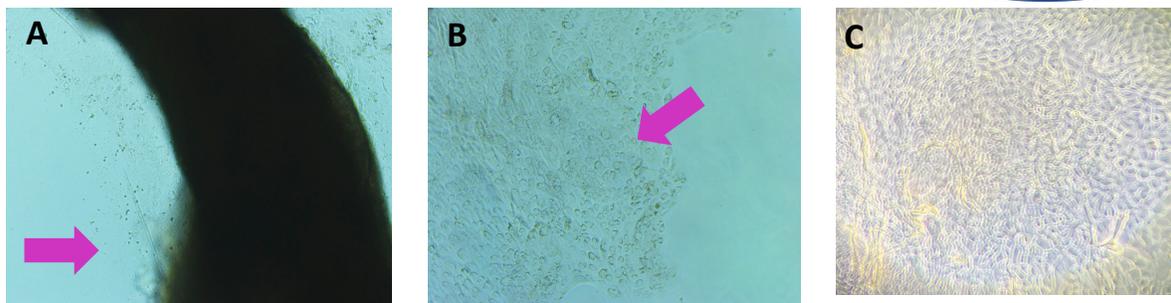


Figura 21. Se utilizó medio DMEM+HAM F12 proporción 3:1. Se suplementó con SFB 10%, antibiótico 1%, hidrocortisona e Insulina. Se observa en la imagen A el explante a los 3 días de haberse cultivado. La imagen B muestra crecimiento celular de células epiteliales a los 15 días.

## Formación de biopelículas en bioreactor

Se obtuvieron biopelículas de *Candida albicans* sobre los discos de *PMMA*, donde se obtuvo conteo de  $2.89 \pm 0.080$  unidades formadoras de colonias (UFCs) en discos mantenidos en el biorreactor por 24 h (figura A y C) y para los de 48 h (figura B y D) un conteo de  $3.38 \pm 0.064$  (UFCs). Al aplicar el análisis estadístico se encontró diferencia significativa ( $p < 0.008$ ) entre los grupos (Figura 22).

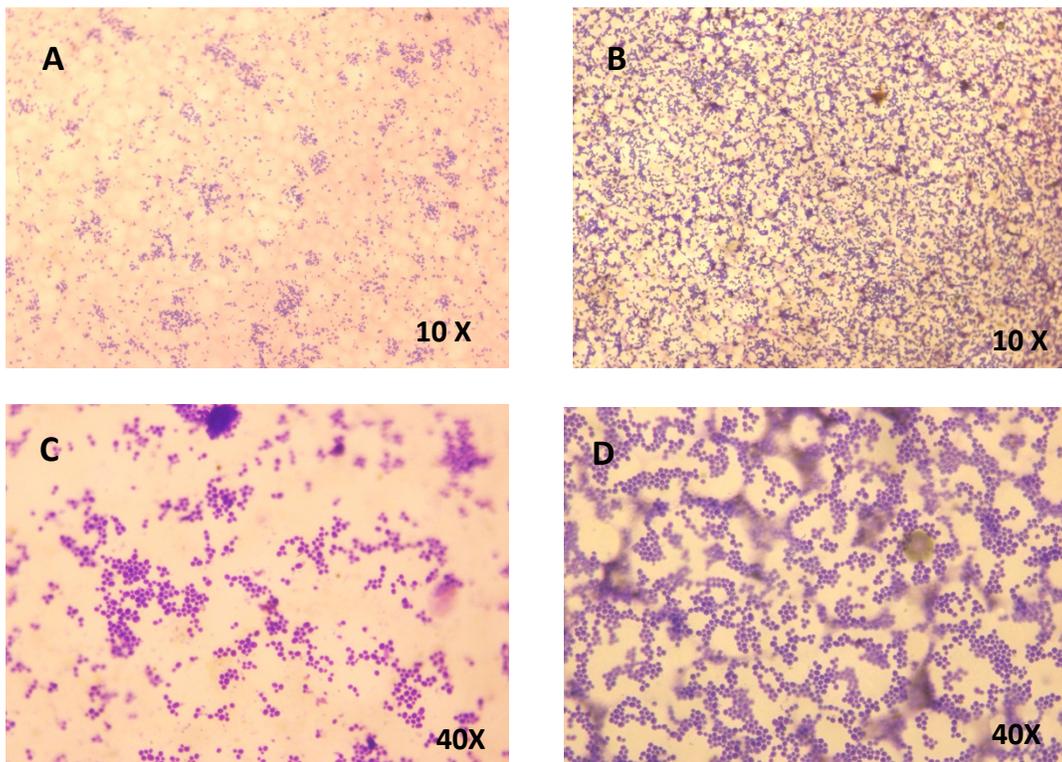
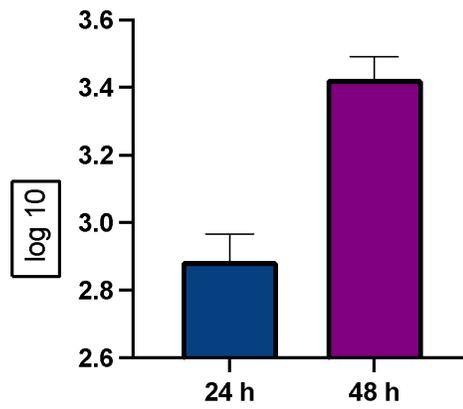


Figura 22. Microfotografías de biopelículas de *Candida albicans* sobre discos de *PMMA* a las 24 (A y C) y 48 h (B y D).

Crecimiento *C. albicans* en bioreactor



Gráfica 9. Crecimiento a las 24 y 48 h de *Candida albicans* sobre PMMA en bioreactor

## 12. DISCUSIÓN

En la actualidad la ciencia se enfrenta a problemáticas como la resistencia a los agentes antimicrobianos y antifúngicos (Gulati *et al.*, 2016), sin embargo nuevas líneas de investigación incluyen la búsqueda de alternativas seguras para su aplicación clínica.

Desde hace décadas, la nanotecnología, ha sido un área que tiene aplicaciones en el campo biomédico debido a sus conocidos efectos antimicrobianos probados en varios microorganismos (Lara *et al.*, 2015). Se ha estudiado la citotoxicidad sobre varios tipos celulares y la susceptibilidad de varios microorganismos ante estas de manera aislada.

En el presente proyecto, se obtuvieron nanopartículas con morfología esférica y un tamaño aproximado de entre 15-50 *nm* indicando una síntesis polidispersa; como se observa en la microfotografía de microscopía electrónica de transmisión (figura ). La técnica de espectroscopía de *UV*-visible (figura ) indicó el pico máximo de absorbancia en 420 *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). Se ha reportado en la literatura síntesis verde de nanopartículas asistidas con diferentes extractos. Estos 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 morfología, tamaño, estabilidad, propiedades ópticas y efecto antimicrobiano de la nanopartícula (Kumar *et al.*, 2012; Mukuthan *et al.*, 2012).

La caracterización mediante FTIR de AgNPs para ambas muestras, tanto de la infusión de geranio como la muestra de la síntesis de AgNPs obtenidas) mostró afluencia de bandas características de flavonoides y terpenoides presentes en la

hojas que resaltan la presencia de residuos provenientes de la infusión de geranio, que se sabe quedan en la superficie de las AgNPs (Rajh *et al.*, 2022).

Varios metabolitos secundarios y enzimas se encuentran presentes en la formación de nanopartículas metálicas. La reacción de reducción involucra principalmente biomoléculas vegetales (metabolitos secundarios) tales como proteínas, pigmentos, compuestos orgánicos y resinas vegetales. Productos naturales de las plantas participan en la reacción de reducción para sintetizar nanopartículas metálicas.

Los metabolitos secundarios son los principales factores para la biosíntesis de nanopartículas metálicas. Los extractos de plantas contienen diversos grupos tales como C-C (Alqueno), C-N (amida), OH (fenólico y alcohol), N-H (amina), C-H y COOH (grupo carboxílico)(Jha *et al.*, 2009).

Las proteínas se unen a las nanopartículas a través de grupos amino libres o residuos de cisteína en las proteínas siendo las mismas el agente reductor y estabilizador (Ballotin *et al.*, 2016).

Analizar las rutas metabólicas como respuesta al tratamiento de las AgNPs nos ayuda a comprender cómo *C. albicans* se adapta a estos cambios, lo que es de suma importancia en el desarrollo de tratamientos.

Al verse las enzimas reguladas de manera positiva, podría estar hablando de que una enzima aumenta su actividad, acelerando la conversión de sustratos en productos y permitiendo que la célula responda de manera eficaz a sus necesidades metabólicas; en este caso, en respuesta al estrés generado por las AgNPs que se ha reportado (Serrano *et al.*, 2023) debido a las especies reactivas de oxígeno (ROS) que se generan al entrar en contacto al momento de que las AgNPs están en contacto con los componentes celulares como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos de *Candida albicans* (Kahn, 2021).

Estas interconexiones son fundamentales para la regulación metabólica y la homeostasis celular y permiten a las células responder eficientemente ante los cambios en el ambiente o en la disponibilidad de nutrientes.

La arginina es un aminoácido que desempeña funciones clave en *Candida albicans*, entre ellas, está muy relacionado al dimorfismo que presenta *Candida albicans* ya que, cuando está presente, promueve la conversión a su forma de hifa, la cual está reportada como la más patógena (Schaefer et al., 2020).

El nitrógeno es importante para que se lleven a cabo los ciclos biosintéticos continuos a través de diversas rutas metabólicas. A partir del metabolismo del nitrógeno obtenemos amonio y glutamina, que son aminoácidos preferidos por la mayoría de los hongos como fuente en la obtención de nitrógeno (Krappmann & Braus, 2005)

El nitrógeno directamente tiene implicación en la regulación del fenotipo de *Candida albicans* debido a que contribuye a la virulencia; MEP1 y MEP2 son dos proteínas de la familia de transportadores de amoníaco que tienen como principal función captar el amoníaco del exterior. Dicho amoníaco, a través de su metabolismo, se convierte en nitrógeno. Si MEP1 y MEP2 no son suficientes para captar nitrógeno, se expresan las SAP, que son una superfamilia de proteínas que degradan proteínas y aminoácidos para obtener nitrógeno (Morschhäuser, 2011).

En cuanto a la ruta de la glucólisis y gluconeogénesis, es relevante destacar que la única enzima que se encontró con una regulación a la baja fue la aldosa-1-epimerasa, que como su nombre lo dice, lleva a cabo la epimerización de la alfa-D-glucosa a beta-D-glucosa, refiriéndose al mecanismo mediante el cual se cambia de la configuración dentro de una molécula. En este caso, se cambia de la forma alfa a beta, cambiando un carbono quiral de posición. De esta manera se facilita el uso de la molécula en los diversos procesos biológicos (Roy, 2011). Cabe destacar que una de las características de los enlaces alfa es que principalmente se destinan para almacenamiento de energía, ya que son menos estables, y los enlaces beta son más estables y se destinan principalmente a la estructura de *Candida albicans*,

ya que el beta-1,3-1,6-glucano es un compuesto de la pared celular, no solo por su estabilidad, sino también porque sus enlaces son menos susceptibles a la hidrólisis (Chen et al.,2020).

El proteasoma no es una ruta metabólica como tal, sin embargo, es un centro regulador muy importante ya que controla la homeostasis de proteínas, impactando en diversas rutas metabólicas, así como en funciones celulares indispensables tales como metabolismo de aminoácidos, producción de energía o la regulación del ciclo celular (Kindt et al., 2007). También regula la degradación de proteínas dañadas, evitando la acumulación de moléculas tóxicas. Otra de sus funciones principales es la degradación de proteínas para generar aminoácidos, que serán empleados en la biosíntesis de proteínas o como fuente de energía (Martínez-López, 2022)., como lo vimos en rutas metabólicas anteriormente descritas, donde los aminoácidos son precursores importantes para ello. Se observó que todas estas proteínas se encontraron reguladas al alza, lo que podría estar infiriendo que, en este caso, *Candida albicans* está sobreexpresando estas proteínas en respuesta al estímulo de las AgNPs.

El presente estudio encontró que la replicación mostró niveles sobreexpresados de las enzimas implicadas en este proceso, que es de suma vitalidad para los organismos y garantiza su crecimiento. En este caso, *Candida albicans* es bien conocido por ser un hongo dimórfico, lo que significa que puede existir tanto en forma de levadura, pseudohifa e hifa. Está reportado que la morfología de levadura es importante para la colonización de *Candida albicans*; en cambio, ante un pH alcalino, temperatura elevada así como falta de nutrientes, *Candida* preferirá la morfología de hifa y pseudohifa, que es bien conocido que es la forma más patógena de *Candida albicans* y resulta de suma importancia para la invasión de tejidos en el huésped (Henriques & Silva, 2021).

Su transición morfológica dependerá en gran parte de las condiciones del ambiente y los estímulos externos. Además, su crecimiento se puede dar principalmente mediante la fisión mitótica, que es el proceso mediante el cual, a partir de un brote,

se genera una célula nueva, todo esto mediante el proceso de mitosis. La otra manera es la reproducción sexual, en la cual el *Locus Mating Type* es el responsable de que se pueda llevar a cabo este proceso entre dos genotipos: el MAT $\alpha$  y el MAT $\alpha$ . La replicación adecuada permite que la transición morfológica se pueda llevar a cabo, propiciando también la evasión inmunológica del huésped, ya que es indispensable para que *Candida albicans* mantenga su genoma funcional en respuesta a señales del huésped (Limjindaporn, Khalaf, & Fonzi, 2003).

En cuanto a la distribución de niveles de expresión génica en los cromosomas de *Candida albicans*, se observa que la expresión diferencial de los genes no se observa solo en una zona en específico. Cabe la posibilidad de que la distribución de estos genes se ubique preferentemente en una región específica y, en este caso, lo hace de manera global en el genoma de *Candida albicans* (Ene, Bennett, & Anderson, 2019).

Los ensayos previos en el desarrollo de biopelículas de *Candida albicans* sobre discos de *PMMA* demostraron crecimiento de hasta  $3.38 \pm 0.08 \log_{10}$  a las 48 h, en el presente estudio se buscó crecimiento de 72 horas debido al crecimiento de *Candida albicans* en biopelículas como lo reportado en la literatura (Morse *et al.*, 2018; Dias *et al.*, 2018). Las microfotografías de microscopía óptica muestran crecimiento visiblemente menor a las 24h.

Este equivalente *in vitro* nos permitió profundizar en el conocimiento de cómo interactúan las AgNPs en un modelo similar a las condiciones de la cavidad oral; permitiéndonos cuantificar niveles de expresión de interleucinas y estudiar el daño tisular que presentaba cada condición experimental.

La IL-6 es una citocina que es producida por macrófagos, monocitos y células epiteliales en respuesta a *Candida albicans*. Es una citocina que interviene en la inflamación temprana que es estimulada por el Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, a su vez, IL-6 regula la diferenciación a TCD4+ $\alpha$  Th17

e IL-22 que también favorecen la respuesta inmunitaria de las células epiteliales (Engku Anis Fariha Engku Nasrullah Satiman et al., 2024).

El Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos promueve la maduración y diferenciación de granulocitos y macrófagos; cuando se libera potencializa la capacidad de fagocitosis (Kindt et al., 2007). También estimula a IL-6, citocina que debe expresarse en cantidades suficientes como para no permitir la colonización patógena de *Candida albicans* pero no tan elevadas por que esto también implicaría un ambiente desregulado que también propiciaría la colonización de *Candida albicans* (Dickenson et al., 2023) (Ho et al., 2019).

La liberación de LDH indica daño celular como resultado del daño ocasionado a al tejido por *Candida albicans*.

En este estudio, se encontró que el grupo del modelo 3D junto con el disco de PMMA modificado con AgNPs y colonizado por *Candida albicans* mostró mayores cuantificaciones de IL-6, LDH y de GMSCF, debido al estímulo que puede llegar a tener *Candida albicans* por si solo sobre el tejido aunado al estímulo de las AgNPs, que esta reportado que son ligeramente citotóxicas (Noga et al., 2023) aunado a la combinación con PMMA. Se constató que cuando el tejido se encontraba colonizado por *Candida albicans* y se colocaron directamente las AgNPs mostraron cuantificaciones por debajo de este grupo, lo cual podría estar hablando de que las AgNPs si tienen un efecto que estimula a las citocinas sin embargo no tanto como este grupo. Destacando que las AgNPs mostraron un efecto antifúngico sobre *Candida albicans* ya que al conteo de colonias se encontró una reducción en el número de las mismas, lo que es beneficioso.

### 13. CONCLUSIONES

El método químico asistido por infusión de geranio es efectivo en la obtención de AgNPs esféricas con una distribución polidispersa con efecto antifúngico. Las técnicas de caracterización permitieron conocer la morfología, tamaño y grupos funcionales tanto de la síntesis como de la infusión de *Pelargonium-hortorum* demostrando la presencia de metabolitos secundarios presentes en la infusión que intervienen en la formación de las nanopartículas. Esto demuestra que el extracto de es un agente reductor y estabilizador efectivo para la biosíntesis de nanopartículas de plata. La caracterización mediante UV-Vis y FTIR confirmó la presencia de estos flavonoides y terpenoides provenientes de la infusión de en la superficie de las AgNPs.

Las AgNPs inducen estrés oxidativo en *Candida albicans* mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que regula al alza diversas enzimas metabólicas. Esto incluye rutas metabólicas asociadas a la adaptación celular, como el metabolismo del nitrógeno y la degradación de proteínas mediante el proteasoma. Estos procesos permiten a la célula responder al estrés, aunque comprometen su homeostasis celular.

Estos resultados sugieren que el tratamiento con AgNPs induce una respuesta celular que impacta tanto en rutas metabólicas fundamentales como en procesos relacionados con la reparación y replicación del ADN. Las AgNPs causan estrés oxidativo y daño estructural, como fue reportado en la primera parte de este estudio mediante transcriptoma. Esto se debe a su capacidad de interferir con procesos clave como la replicación de ADN, así como la interacción de los iones Ag<sup>+</sup> con componentes esenciales de *Candida albicans*.

Las pruebas preliminares del desarrollo de biopelículas de *Candida albicans* sobre discos de PMMA con el uso de bioreactor son viables en el desarrollo de biopelículas a las 24 y 48 h, encontrándose diferencia significativa entre ambas

condiciones. Esto refuerza su potencial como estrategia para inhibir la formación de biopelículas y limitar la virulencia de *Candida albicans*.

Los tejidos MatTek que se usaron en el presente estudio no tienen un sistema inmunológico como tal, sin embargo son un buen modelo para evaluar la respuesta de células epiteliales orales a las AgNPs ya que tienen la capacidad de expresar receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) tales como los receptores tipo toll (TLR) o receptores tipo NOD. La producción de IL-6 y GM-CSF mostró la capacidad del epitelio de activar respuestas iniciales ante estímulos.

Se ha estudiado la citotoxicidad y la susceptibilidad antifúngica sin embargo el impacto de las AgNPs sobre cómo interaccionan el complejo tejido-AgNPs no se ha reportado antes como en el presente estudio.

## Productividad generada

### Presentación en congresos

2023; Participación exposición oral 2 Congreso Internacional de Bio Nano Materiales. Título: **Assesment of silver nanoparticles in a 3D EpiOral Model**. **Serrano-Díaz P**, Moyes-David, Luevano Guadalupe Pellon- Rodriguez Aize, Furlong Allan, Vega-Arreguin Julio , García-Contreras René, Nuñez-Anita Rosa Elvira, Arenas-Arrocena Ma Cconcepción, Acosta-Torres Laura Susana.

2023; Participación exposición oral International Association for Dental Research General Session & Exhibition2023 (IADR) Colombia .Título: **Impact of silver nanoparticles of *Candida albicans* biofilms on 3D tissue models**. International Association for Dental Research (IADR). **Serrano-Díaz P**, Moyes-David, Luevano Guadalupe Pellon-Rodriguez Aize, Furlong Allan, Vega-Arreguin Julio , García-Contreras R ené, Nuñez-Anita Rosa Elvira, Arenas-Arrocena Ma Cconcepción, Acosta-Torres Laura Susana.

2023; **3D in vitro oral tissue model for the evaluation of silver nanoparticles**. **Presentación oral**, Encuentro Académico de la División Mexicana de la International Association for Dental Research (IADR). **Serrano-Díaz P**, Moyes-David, Luevano Guadalupe Pellon-Rodriguez Aize, Furlong Allan, Vega-Arreguin Julio , García-Contreras R ené, Nuñez-Anita Rosa Elvira, Arenas-Arrocena Ma Cconcepción, Acosta-Torres Laura Susana.

2022; Participación exposición oral International Association for Dental Research General Session & Exhibition2022 (IADR).Título: Biosynthesis of silver nanoparticles and its impact on *Candida albicans* Sesión: Smart Materials/Compounds with Multi-therapeutic Properties-From Cancer to Infection Ablation25 de junio del 2022. **Paloma Netzayeli Serrano Díaz**, Julio Vega Arreguin,

René García Contreras, Ma Concepción Arenas Arrocena, Laura Susana Acosta Torres.

**8° Congreso Internacional De La Redbiot**, Sede Nodo Querétaro, Octubre 2021. Concurso de carteles: “Efecto antifúngico de nanopartículas de plata sobre especies de *Candida albicans*. **Serrano-Díaz P**, Vega-Arreguin J , García-Contreras R , Nuñez-Anita R, Arenas-Arocena MC, Acosta-Torres LS.

**2021 IADR Hatton Award Competitor**, IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition: Transcriptomic expression and antifungal profile of green silver nanoparticles against *Candida albicans* biofilms. **Serrano-Díaz P**, Vega-Arreguin J , García-Contreras R , Nuñez-Anita R, Arenas-Arocena MC, Acosta-Torres LS.

**2019**. 97<sup>th</sup> General Session & exhibition International Association for Dental Research (IADR). Presentación oral: “Nanoparticles against candidiasis infections: a biological and transcriptome profile analysis. **Serrano-Díaz Paloma Netzayeli**, Williams W David, Vega-Arreguín Julio, García-Contreras René, Arenas-Arocena Ma Concepción, Acosta-Torres Laura Susana. Vancouver, Canadá.

## Artículo original

<https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/gps-2022-8105/html>

**Paloma Serrano-Díaz**, David W. Williams, Julio Vega-Arreguin, Ravichandran Manisekaran, Joshua Twigg, Daniel Morse, René García-Contreras, Ma Concepción Arenas-Arocena, & Laura Susana Acosta-Torres, Geranium leaf-mediated synthesis of silver nanoparticles and their transcriptomic effects on *Candida albicans*, *Green Processing and Synthesis*, 12, 1-14

Doi: <https://doi.org/10.1515/gps-2022-8105>

## Artículos en colaboración

Acosta-Torres, Laura S., Flores-Arriaga, Juan C., **Serrano-Díaz, Paloma N.**, González-García, Itzel A., Viveros-García, Juan C., Villanueva-Vilchis, María del Carmen, Villanueva-Sánchez, Francisco G., García-Contreras, René, & Arenas-Arrocena, María Concepción. (2021). Biomaterial antifúngico para reducir las infecciones causadas por *Candida albicans* en pacientes edéntulos. *Gaceta médica de México*, 157(4), 437-442. Epub 13 de diciembre de 2021. <https://doi.org/10.24875/gmm.20000915>

**Serrano Díaz, P. N.**, Toscano-Torres, I. A., Olivo-Zepeda, I. B., García-Caxin, E., & Nuñez-Anita, R. E. (2020). Toxicity and antimicrobial effect of silver nanoparticles in swine sperms. *Systems biology in reproductive medicine*, 66(4), 281–289. <https://doi.org/10.1080/19396368.2020.1754962>

Julieta, P., G, G. M., David, O., **Serrano-Díaz, Netzayeli, P.** (2021). Artículo original. Recubrimiento, evaluación antimicrobiana y caracterización AFM de nanopartículas de plata sobre Brackets estudio in vitro. *Revista Táme*. 9(27), 1071-107.

Manisekaran, R., García-Contreras, R., Chettiar, A. D. R., **Serrano-Díaz, P- N.**, Lopez-Ayuso, C. A., Arenas-Arrocena, M. C., Hernández-Padrón, G., López-Marín, L. M., & Acosta-Torres, L. S. (2021). 2D Nanosheets—a New Class of Therapeutic Formulations Against Cancer. *Pharmaceutics*, 13(11), 1–27. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111803>

Chávez-Granados, PA., Durán-Gutiérrez, DP, **Serrano-Díaz PN**, Manisekaran, R., Reyes-López C.A.S. García-Contreras, R. *Efecto antifúngico del té verde tostado sobre Candida albicans: Conceptos básicos y estudio piloto*. (2022). *Revista Tequio*.



## Estancia de investigación

**Faculty of Dentistry, Oral and  
Craniofacial Sciences**

**Dr David Moyes**  
Senior Lecturer in Host-Microbiome  
Interactions

Centre for Host-Microbiome Interactions  
Floor 17, Tower Wing  
Guy's Campus  
London SE1 9RT  
Telephone +44 (0)20 7188 8094  
Email david.moyes@kcl.ac.uk



29<sup>th</sup> August 2022

**RE: Paloma Netzayeli Serrano Diaz**

To Whom It May Concern,

I am delighted to confirm that I would like to extend an offer to Paloma Netzayeli Serrano Diaz to come and spend some time in my laboratory as a visiting student learning from myself and my group. This visit will nominally commence on the 3<sup>rd</sup> October 2022 and complete by the 17<sup>th</sup> December 2022. It will involve working on the project: "Effect of silver nanoparticles against *Candida albicans* candidalysin in human oral epithelial cells."

The objectives for this stay will be to study the effect of AgNPs at non cytotoxic and antifungal concentrations in a culture of epithelial cells with candidalysin and on cell co-culture of *Candida albicans* and epithelial cells.

Please do not hesitate to contact me if you require any further information.

Yours sincerely,

A handwritten signature in black ink that reads 'David Moyes'.

David Moyes

## 14. 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>.

Abdallah, B. M., & Ali, E. M. (2022). Therapeutic effect of green synthesized silver nanoparticles using *Erodium glaucophyllum* extract against oral candidiasis: In vitro and in vivo study. *Molecules*, 27(13), 4221. <https://doi.org/10.3390/molecules27134221>

Ahamad, I., Bano, F., Anwer, R., Srivastava, P., Kumar, R., & Fatma, T. (2022). Antibiofilm activities of biogenic silver nanoparticles against *Candida albicans*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 741493. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.741493>

Ballottin, D., Fulaz, S., Souza, M. L., Corio, P., Rodrigues, A. G., Souza, A. O., Gaspari, P. M., Gomes, A. F., Gozzo, F., & Tasic, L. (2016). Elucidating Protein Involvement in the Stabilization of the Biogenic Silver Nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*, 11(1).

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>

Chen, X., Zhang, Z., Chen, Z., Li, Y., Su, S., & Sun, S. (2020). Potential antifungal targets based on glucose metabolism pathways of *Candida albicans*. *Frontiers Microbiology*, 11, 296. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00296>

Dias, K., de Sousa, D. L., Barbugli, P. A., Cerri, P. S., Salih, V. M., & Vergani, C. E. (2018). Development and characterization of a 3D oral mucosa model as a tool for host-pathogen interactions. *Journal of Microbiological Methods*, 152, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.07.004>

Dickenson, R. E., Pellon, A., Ponde, N. O., Hepworth, O., Daniels Gatward, L. F., Naglik, J. R., & Moyes, D. L. (2023). *EGR1 regulates oral epithelial cell responses to Candida albicans via the EGFR-ERK1/2 pathway*. bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2023.03.31.535186>

Ene, I. V., Bennett, R. J., & Anderson, M. Z. (2019). Mechanisms of genome evolution in *Candida albicans*. *Current Opinion in Microbiology*, 52, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.05.001>.

Engku Anis Fariha Engku Nasrullah Satiman, Ahmad, H., Ramzi, A. B., Abdul Wahab, R., Kaderi, M. A., Wan Harun, W. H. A., Dashper, S., McCullough, M., & Arzmi, M. H. (2024). The role of *Candida albicans* candidalysin ECE1 gene in oral carcinogenesis. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/jop.13014>

Franci, G., Falanga, A., Galdiero, S., Palomba, L., Rai, M., Morelli, G., & Galdiero, M. (2015). Nanopartículas de plata como potenciales agentes antibacterianos. *Moléculas*, 20 (5), 8856–8874. MDPI AG. Obtenido de <http://dx.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.

Gallegos C. Rafael, Viramontes G. Gonzalo, Peña G. Carmen, Análisis del efecto bactericida de las nanopartículas de plata por medio de métodos ópticos, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 2010:17.

González, I.(2018) Polifarmacia como factor predisponente para candidiasis oral en adultos mayores.(Tesis licenciatura)UNAM.

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

Henriques, M., & Silva, S. (2021). *Candida albicans* virulence factors and its pathogenicity. *Microorganisms*, 9(4), Article 704. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040704>

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>

Ho, J., Yang, X., Nikou, S. A., Kichik, N., Donkin, A., Ponde, N. O., Richardson, J. P., Gratacap, R. L., Archambault, L. S., Zwirner, C. P., Murciano, C., Henley-Smith, R., Thavaraj, S., Tynan, C. J., Gaffen, S. L., Hube, B., Wheeler, R. T., Moyes, D. L., & Naglik, J. R. (2019). Candidalysin activates innate epithelial immune responses via epidermal growth factor receptor. *Nature Communications*, 10(1), 2297. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10079-6>

Jha, A.K.; Prasad, K.; Kumar, V.; Prasad, K. Biosynthesis of silver nanoparticles using Eclipta leaf. *Biotechnol. Prog.* 2009, 25, 1476–1479

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.

Khan, M. R., Naz, F., & Nazim, U. (2021). Silver nanoparticles as a potential treatment option for fungal infections. *Journal of Nanobiotechnology*, 19(1), 68-75. <https://doi.org/10.1186/s12951-021007759&#8203>.

Kindt, T. J., Osborne, B. A., & Goldsby, R. A. (2007). *Kuby immunology* (6th ed.). W.H. Freeman and Company.

Kojic EM, Darouiche RO. *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev* 2004;17:255-67.

Krappmann, S., & Braus, G. H. (2005). Nitrogen metabolism of *Aspergillus* and its role in pathogenicity. *Medical Mycology*, 43(Supplement 1), S31–S40. <https://doi.org/10.1080/13693780400024271>

Lara *et al.* *J Effect of silver nanoparticles on Candida albicans* biofilms: an ultrastructural study *Nanobiotechnol* (2015) 13:91 Shankar, S.S.; Ahmad, A.; Sastry, M. Geranium leaf assisted biosynthesis of silver nanoparticles. *Biotechnol. Prog.* 2003, 19, 1627–1631

Limjindaporn, T., Khalaf, R. A., & Fonzi, W. A. (2003). Nitrogen metabolism and virulence of *Candida albicans* require the GATA-type transcriptional activator encoded by *GAT1*. *Molecular Microbiology*, 50(3), 993–1004. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03747.x>

Lobo, C. I. V., Rinaldi, T. B., Christiano, C. M. S., de Sales Leite, L., Barbugli, P. A., & Klein, M. I. (2019). Dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* exhibit more biomass and are mutually beneficial compared with single-species biofilms. *Journal of Oral Microbiology*, 11(1). <https://doi.org/10.1080/20002297.2019.1581520>

Luévano-Colmenero GH, Vargas-Mancilla J, Mendoza-Novelo B., Implantes de matriz pericárdica para reconstrucción de vejiga urinaria: desarrollo y desempeño en conejos Nueva Zelanda., tesis de maestría.,Universidad de Guanajuato.

Luo Y, Chang L, Lin P. Metal-Based Nanoparticles and the Immune System: Activation, Inflammation, and Potential Applications. *BioMed Res.*2015, 12.

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>

Marambio C, Hoek E. 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.

Martínez-López, R., Hernáez, M. L., Redondo, E., Calvo, G., Radau, S., Pardo, M., Gil, C., & Monteoliva, L. (2022). *Candida albicans* hyphal extracellular vesicles are different from yeast ones, carrying an active proteasome complex and showing a different role in host immune response. *Spectrum microbiology*, 10(3), páginas. <https://doi.org/DOI3 10.1128/spectrum.00698-22>

Mallya, S., & Mallya, S. (2019). *Candida* and oral candidosis—A review. *Journal of Health and Allied Sciences NU*, 9(2), 39–44. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1695651>

Mendoza-Novelo B, Avila EE, Cauich-Rodríguez J V., Jorge-Herrero E, Rojo FJ, Guinea G V., et al. Decellularization of pericardial tissue and its impact on tensile viscoelasticity and glycosaminoglycan content. *Acta Biomater.* 2011;7(3):1241–8.

Miles, A. A., & Misra, S. S. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *Journal of Hygiene*, 38(6), 732–749. <https://doi.org/10.1017/S002217240001158X>

Monteiro, D. R., Takamiya, A. S., Feresin, L. P., Gorup, L. F., de Camargo, E. R., Delbem, A. C., Henriques, M., & Barbosa, D. B. (2015). Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms to silver nanoparticles in intermediate and mature development phases. *Journal of prosthodontic research*, 59(1), 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.jpor.2014.07.004>

Morschhäuser, J. (2011). Nitrogen regulation of morphogenesis and protease secretion in *Candida albicans*. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(6), 390–394. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.04.005>

Morse, D. J., Wilson, M. J., Wei, X., Lewis, M. A. O., Bradshaw, D. J., Murdoch, C., & Williams, D. W. (2018). Denture-associated biofilm infection in three-dimensional oral mucosal tissue models. *Journal of Medical Microbiology*, 67(3), 364–375. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000677>

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

Nailis, H., Coenye, T., van Nieuwerburgh, F., Deforce, D., & Nelis, H. J. (2006). Development and evaluation of different normalization strategies for gene expression studies in *Candida albicans* biofilms by real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-25>

Noga, M., Milan, J., Frydrych, A., & Jurowski, K. (2023). Toxicological Aspects, Safety Assessment, and Green Toxicology of Silver Nanoparticles (AgNPs)—Critical Review: State of the Art. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5133. DOI: [10.3390/ijms24065133](https://doi.org/10.3390/ijms24065133)

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>

Raj, S., Trivedi, R., & Soni, V. (2021). Biogenic Synthesis of Silver Nanoparticles, Characterization and Their Applications—A Review. *Surfaces*, 5(1), 67–90. <https://doi.org/10.3390/surfaces5010003>

- Roy, J. (2011). *The stability of medicines*. Woodhead Publishing Limited.
- Salata, O. V. (2004). Journal of Nanobiotechnology. *Journal of Nanobiotechnology*, 6(3), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-2-12>.
- Schaefer, K., Wagener, J., Ames, R. M., Christou, S., MacCallum, D. M., Bates, S., & Gow, N. A. R. (2020). Three related enzymes in *Candida albicans* achieve arginine- and agmatine-dependent metabolism that is essential for growth and fungal virulence. *mBio*, 11(4), e01845-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.01845-20>
- 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>
- 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>
- Serrano, P.(2019) Análisis del efecto de nanopartículas de plata y dióxido de titanio en la inhibición de *Candida albicans* mediante RNA-seq (Tesis de Maestría)UNAM
- Signoretto C, Burlacchini G, Faccioni F, Zanderigo M, Bozzolo N, Canepari P. Support for the role of *Candida spp.* in extensive caries lesions of children. *New Microbiol.* 2009;32:101-107.
- 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>
- 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>

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>

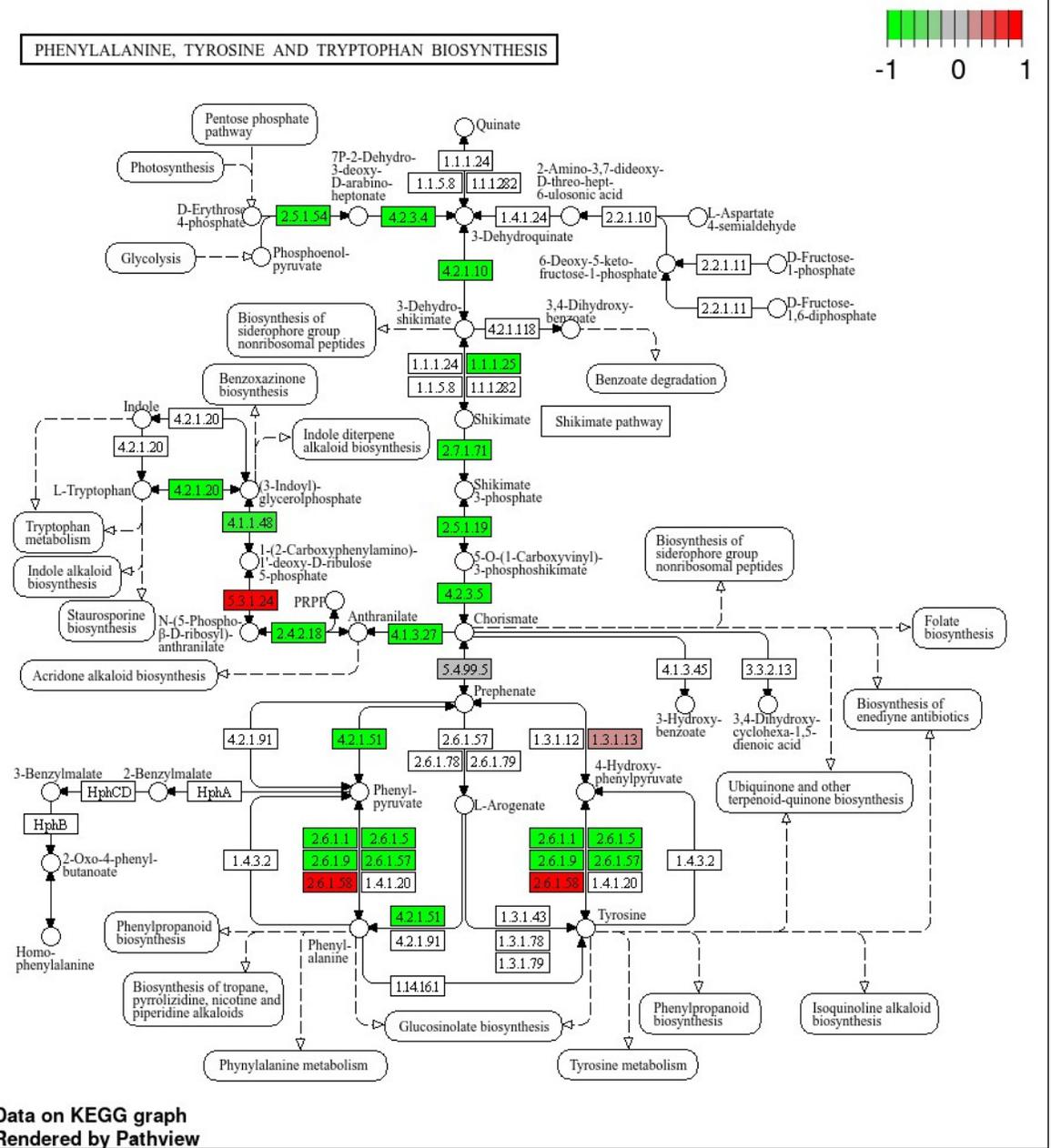
# Anexos





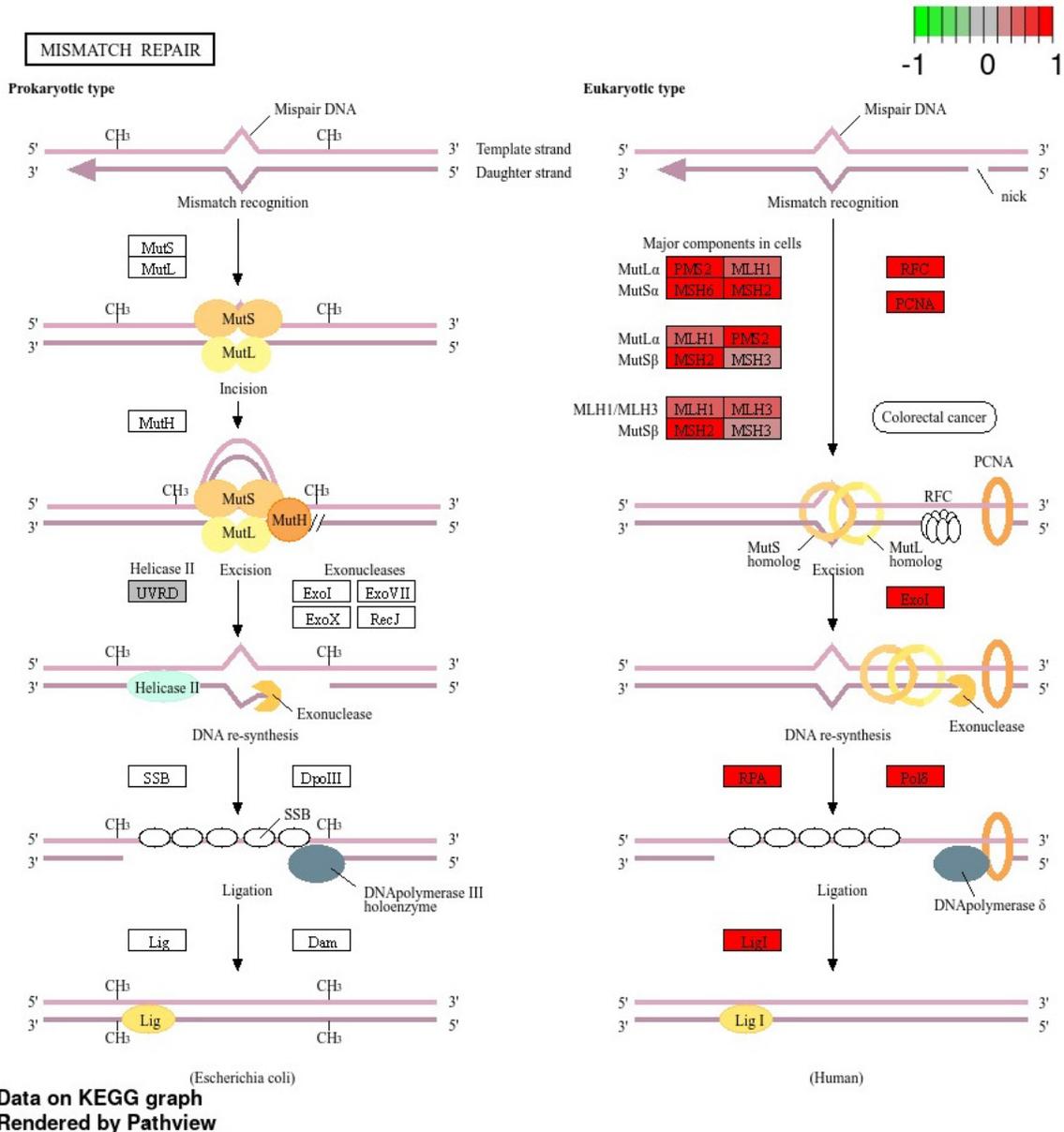


## d) Biosíntesis de fenilalanina, tirosina y triptófano

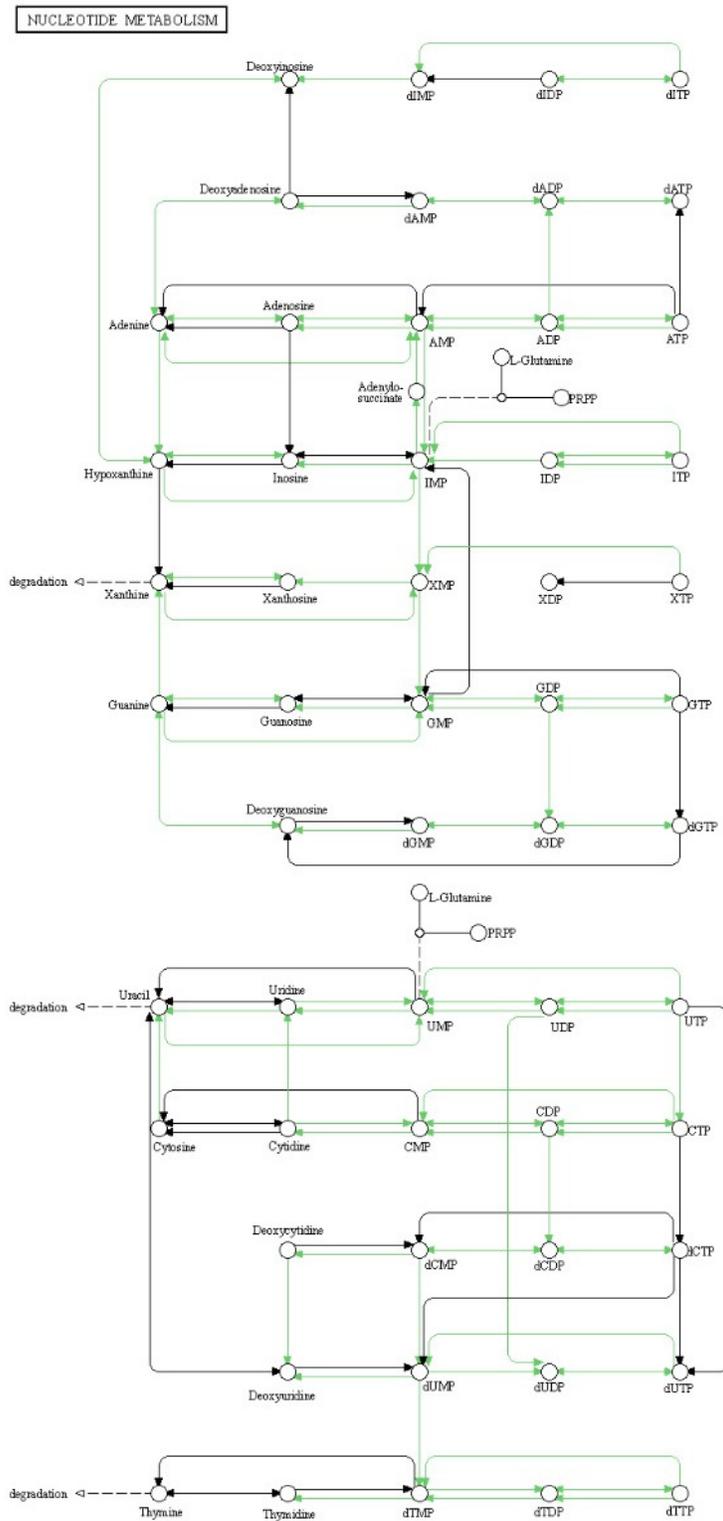


# Rutas Metabólicas a la alza

## a) Reparación de errores de emparejamiento (Mismatch repair)

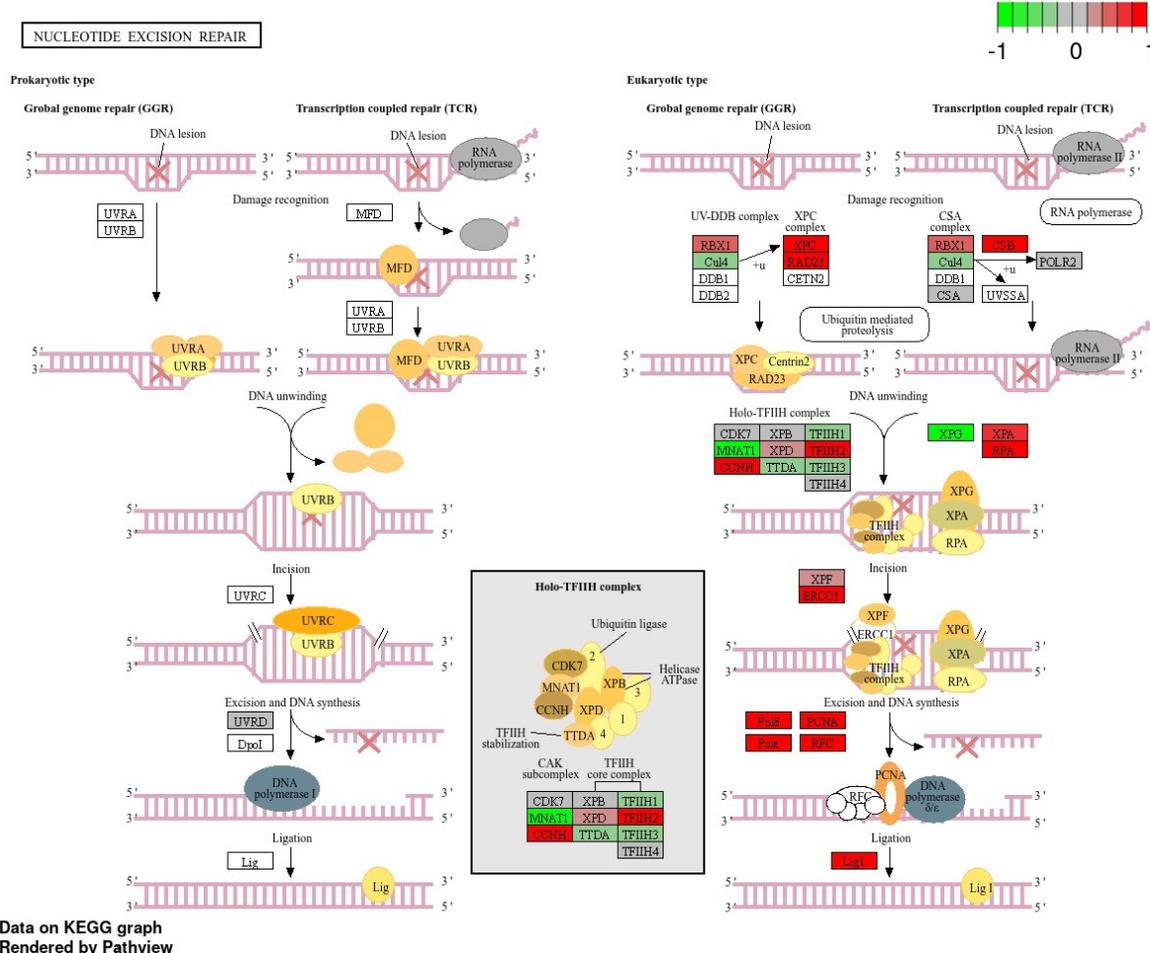


## b) Metabolismo de nucleótidos

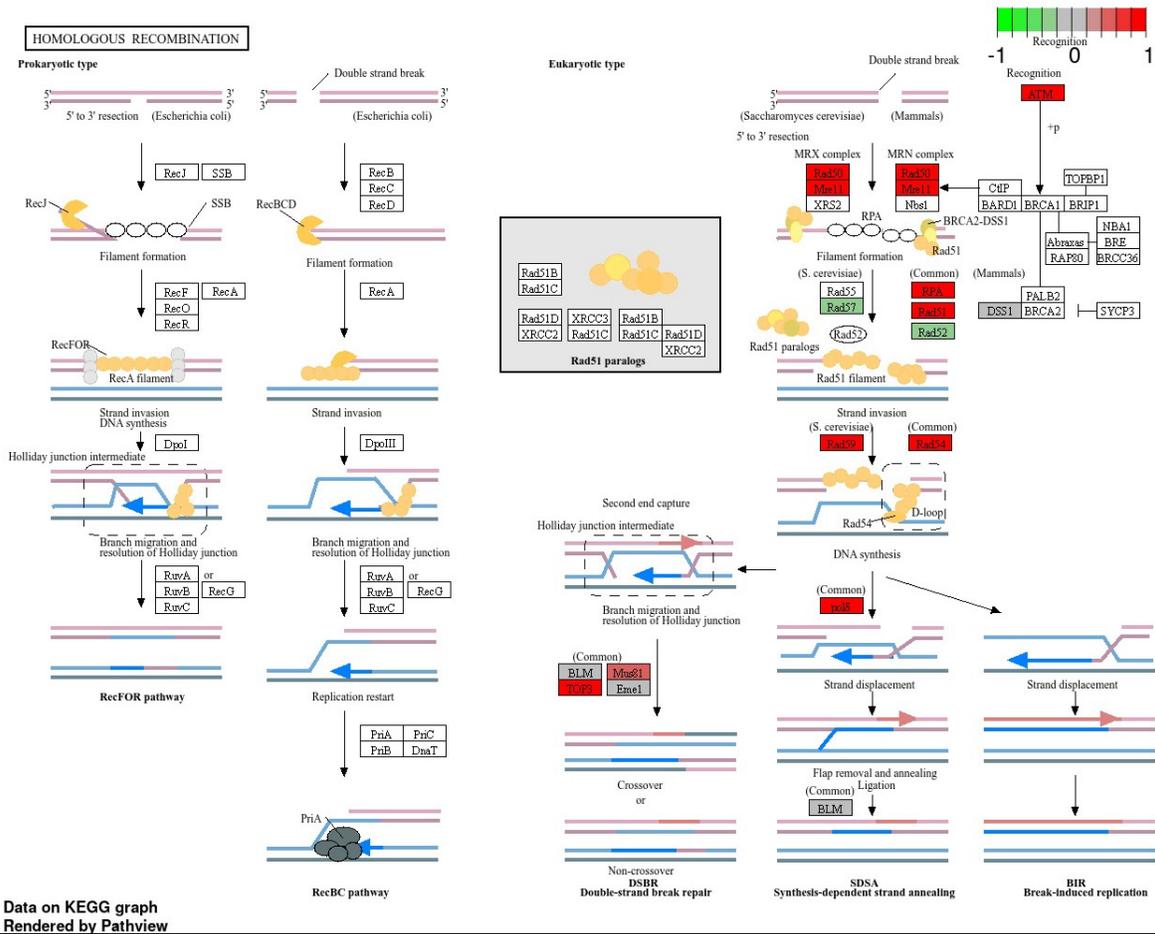


Data on KEGG graph  
Rendered by Pathview

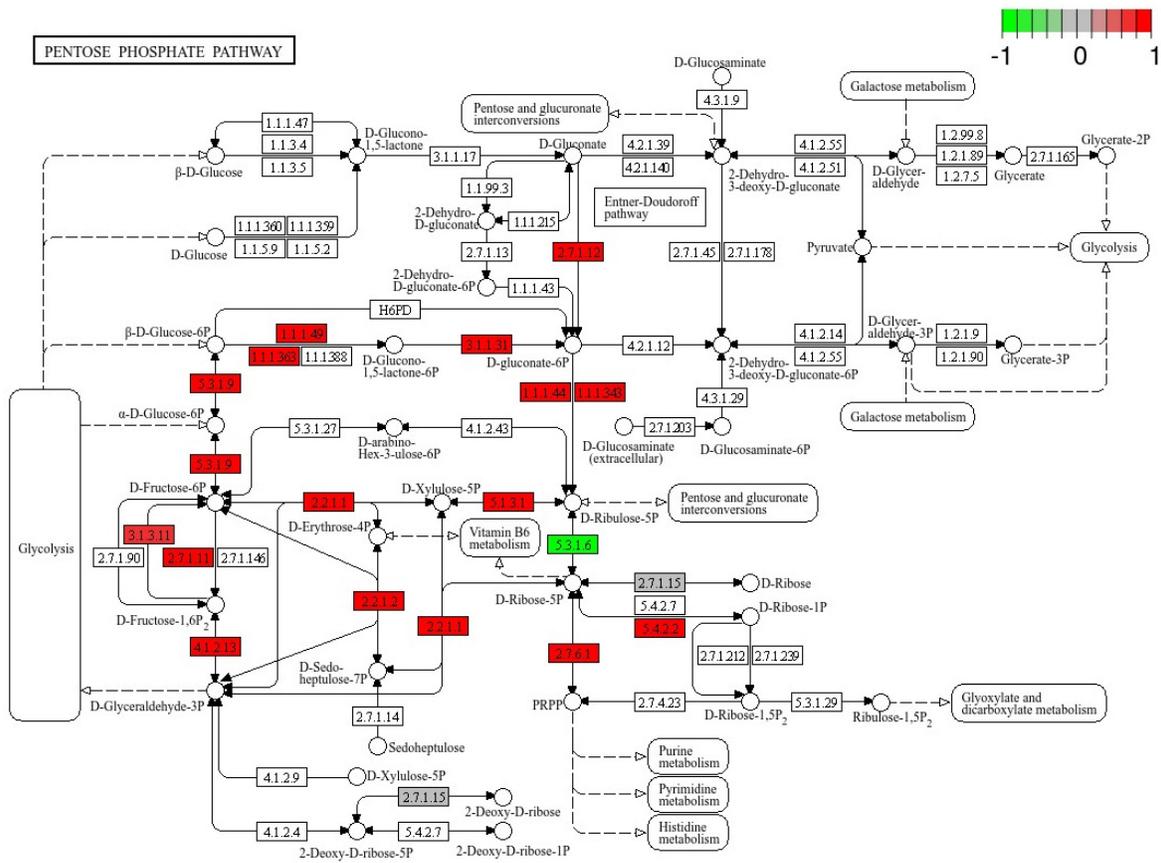
### c) Reparación por escisión de nucleótidos



## d) Recombinación homóloga

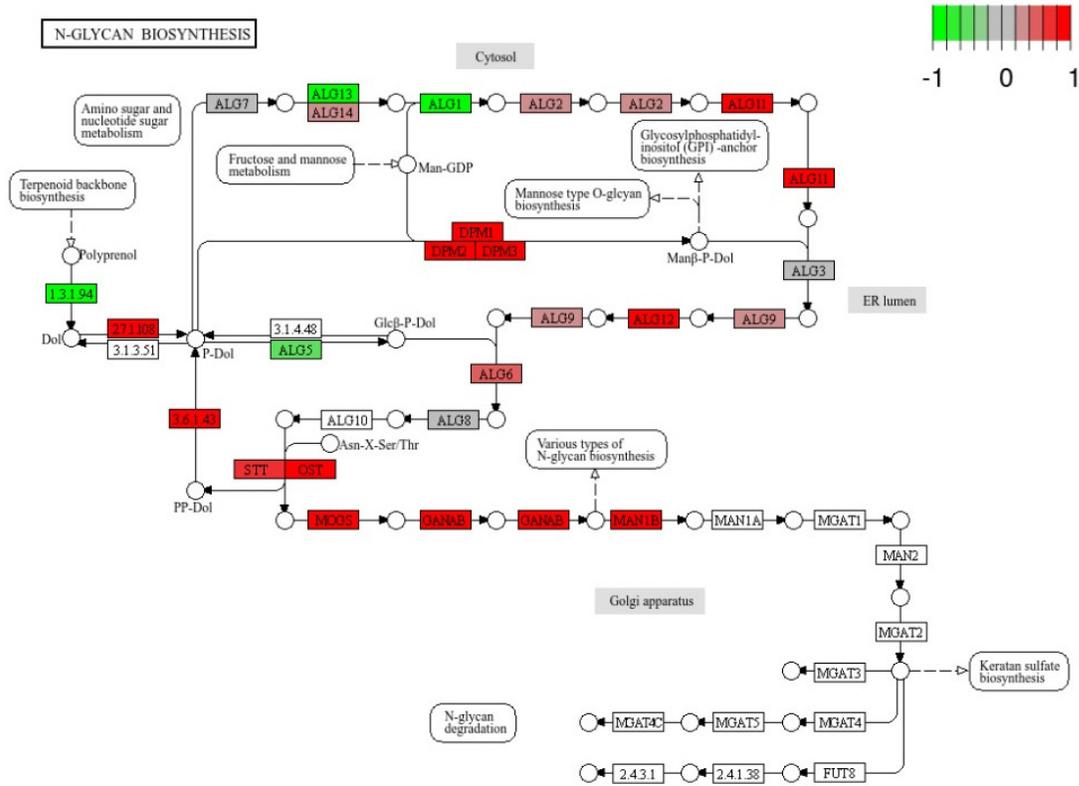


## e) Vía de la pentosa fosfato

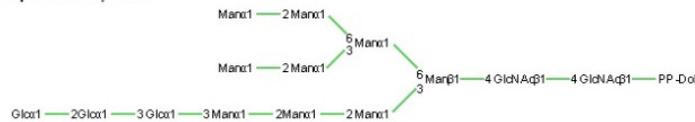


Data on KEGG graph  
Rendered by Pathview

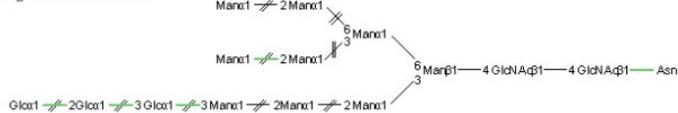
## f) Biosíntesis de N-Glicanos



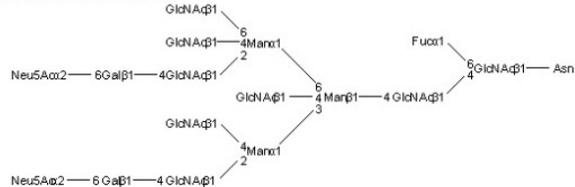
### N-glycan precursor biosynthesis



### Trimming to form core structure



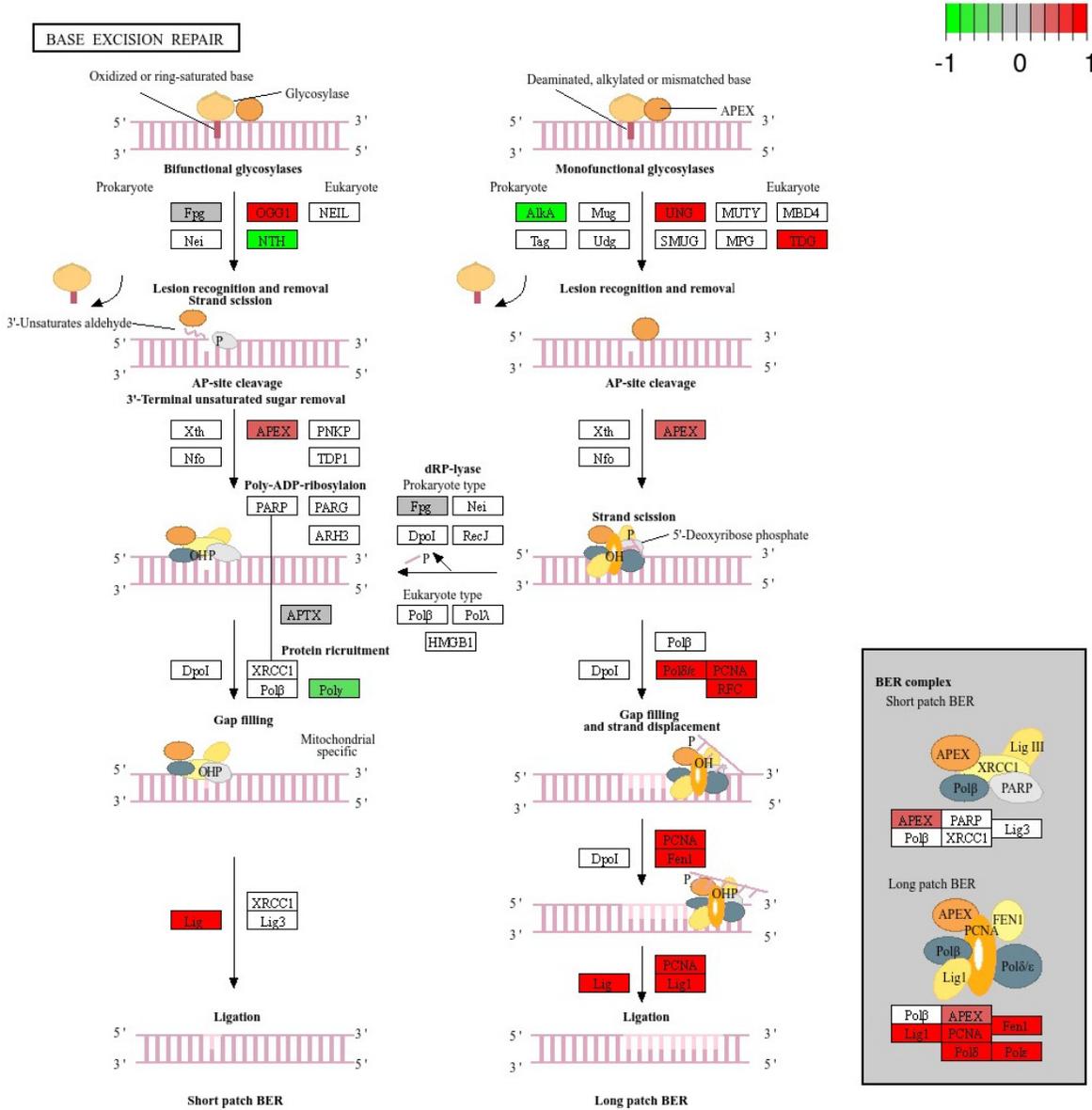
### Glycan extension from core structure



Data on KEGG graph  
Rendered by Pathview



## h) Reparación por escisión de bases



Data on KEGG graph  
Rendered by Pathview



