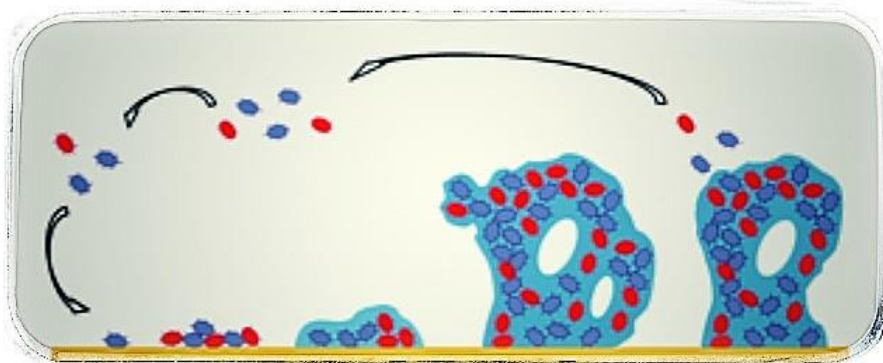


Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
Carrera de Ciencias Biológicas

***Compuestos con actividad
antifúngica: estrategias para la
erradicación del biofilm***



Tesinista: Veas, Vanina Paola

Firma:

Directora: Prof. Dra. Paraje, Ma. Gabriela

Firma:

Co directora: Prof. Dra. Peralta, Mariana A.

Firma:

**Cátedra de Microbiología, Departamento de Fisiología
Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV)
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnica (CONICET)
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
Universidad Nacional de Córdoba**

Compuestos con actividad antifúngica: estrategias para la erradicación del biofilm

Tribunal Examinador

Dr. José S. Dambolena..... Firma:

Dr. Abel G. López..... Firma:

Dra. María Verónica Nolan..... Firma:

Calificación:

Fecha:

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	5
RESUMEN	6
ABREVIATURAS	9
INTRODUCCIÓN	11
<i>Candida</i> , de comensal a patógeno.....	11
Biofilm, una mirada holística.....	12
Biofilm de <i>Candida</i>	13
Formación del biofilm	14
Resistencia del biofilm de <i>Candida</i>	16
Estrategias para erradicar el biofilm de <i>Candida</i>	21
Inhibidores naturales de biofilms microbianos	21
Nanotecnología y el uso de nanopartículas metálicas como inhibidoras del biofilm	23
HIPÓTESIS	27
OBJETIVO GENERAL.....	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28
Selección de cepas	28
Conservación de cepas	28
Tipificación de cepas	28
Compuestos y elementos con potencial actividad antifúngica.....	29
Determinación de la concentración inhibitoria mínima y de la concentración fungicida mínima en células planctónicas	29
Biofilms: formación, cuantificación y determinación de la actividad de los compuestos y elementos	31
Estudios de combinación de antifúngicos	33
Técnicas microscópicas.....	33
8.1- Microscopía óptica.....	33
8.2- Microscopía de fluorescencia.....	33
8.3- Microscopía confocal de exploración láser.....	34
Análisis estadístico.....	35
RESULTADOS	36
Tipificación de cepas	36



1.1- Tinción Gram	36
1.2- Técnica agar-leche	36
1.3- CHROMagar	38
Concentración inhibitoria mínima y concentración fungicida mínima en células planctónicas	38
Determinación de la actividad antifúngica en células sésiles del biofilm.....	39
Estudios de combinación del ácido úsnico, de nanopartículas de plata obtenidas por síntesis biológica y de Anfotericina B	40
Microscopía óptica y confocal de exploración láser	43
DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	55
Efecto del ácido úsnico, de las nanopartículas de plata obtenidas por síntesis biológica y de Anfotericina B sobre células planctónicas de <i>Candida</i>	56
Concentración inhibitoria mínima del ácido úsnico.....	56
Concentración inhibitoria mínima de las nanopartículas de plata obtenidas por síntesis biológica.....	57
Concentración inhibitoria mínima de Anfotericina B	58
Actividad del ácido úsnico, las nanopartículas de plata obtenidas por síntesis biológica y Anfotericina B sobre biofilms de <i>Candida</i> : microtécnica con cristal violeta, microscopía óptica y confocal de exploración láser y análisis COMSTAT ..	58
Actividad antifúngica del ácido úsnico	58
Actividad antifúngica de las nanopartículas obtenidas por síntesis biológica	59
Actividad de Anfotericina B.....	60
Actividad de la combinación del ácido úsnico, de nanopartículas de plata y de Anfotericina B.....	61
PROYECCIONES	65
REFERENCIAS	66

AGRADECIMIENTOS

La presente Tesina es un trabajo que requirió la ayuda de varias personas, que de diversas maneras, aportaron a la realización de la misma.

En primer lugar agradezco al apoyo incondicional de mis padres Orlando y Graciela, que confiaron en mí para lograr este gran paso en mi vida, el cual constituyó un gran esfuerzo tanto para mí, como para ellos, que me dieron ánimos, consejos, que estuvieron siempre presentes y me dieron mucho amor para alcanzar este objetivo. Y en particular, a mi hermano, el Ing. Agr. Rodolfo Veas que supo darme su apoyo y entendimiento en momentos de dudas y crisis, gracias a vos por compartir tantas charlas de hermanos y charlas de profesionales.

Agradezco a mis directoras la Dra. Ma. Gabriela Paraje y la Dra. Mariana A. Peralta, las cuales confiaron en mí y me otorgaron el espacio necesario para poder realizar mi último trabajo de la carrera, gracias por todo el aprendizaje y el acompañamiento, por las experiencias y dedicación, gracias por la dirección de esta tesina.

Gracias a todas mis amigas, amigos, compañeras y compañeros, que a lo largo de toda la carrera han estado compartiendo este hermoso camino, y también a mis amigas que han formado parte de mi vida fuera del ámbito universitario, a ellas gracias por escucharme, alentarme y sobre todo gracias por el amor que me brindan.

Le agradezco también a todo el equipo de los laboratorios de Microbiología de la FCEfyN y FCQ, que me enseñaron y resolvieron dudas durante la realización de la tesina. Gracias a la Dra. Silvana Alborés del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Química de la Universidad de la República, Montevideo, Uruguay por brindar parte del material evaluado en esta tesina de grado.

Por último, agradezco a la Universidad Nacional de Córdoba y Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, a sus profesionales y profesores de la Licenciatura en Ciencias Biológicas, por ofrecernos una educación gratuita y de calidad, y por las oportunidades a las que accedemos más allá del ámbito académico.

A todos ¡Muchas gracias!

RESUMEN

Las infecciones fúngicas invasivas son causadas predominantemente por el género *Candida*, siendo algunas especies patógenas oportunistas en humanos. *Candida* posee capacidad de adherirse a superficies tanto bióticas como abióticas y formar biofilm. Las células sésiles del biofilm pueden ser hasta 1000 veces más resistentes a los fármacos antimicrobianos que las células planctónicas. La resistencia que presenta el biofilm hace que se requieran dosis muy altas de fármacos en el tratamiento de infecciones fúngicas. Anfotericina B (AmB) es un antifúngico (ATF) de referencia, sin embargo, presenta alta nefrotoxicidad, entre otros efectos secundarios.

El compuesto natural ácido úsnico (AU) es un metabolito secundario presente en líquenes que posee actividad antimicrobiana en células planctónicas o de vida libre. Una estrategia contra patógenos resistentes, podría ser la combinación de fármacos utilizados en la clínica con compuestos de origen natural que permitan mejorar la actividad contra el biofilm.

Por otro lado, se están estudiando nanopartículas (NP) con propiedades contra microorganismos patógenos. Las NP obtenidas por síntesis biológica tienen especial interés por ser amigables con el ambiente. Una estrategia emergente es combinar NP, como las de plata (NP Ag), en busca de sinergia y así potenciar la actividad antimicrobiana.

El objetivo de esta tesina fue realizar estudios con el principio activo natural AU y con NP Ag biosintetizadas que exhiban un perfil antifúngico frente al biofilm maduro de *Candida albicans* y *Candida no albicans*, combinados con un ATF de referencia como AmB para erradicar este factor de virulencia microbiano.

Se utilizaron las cepas de *C. albicans* SC5314 y de *Candida tropicalis* NCPF 3111, ambas cepas de colección. Se evaluó el efecto del AU, extraído de *Usnea amblyoclada*, de NP Ag biosintetizadas a partir de *Penicillium expansum* y de AmB. Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) del AU, de las NP Ag biosintetizadas y de AmB en células planctónicas de ambos géneros fúngicos. Se formaron los biofilms maduros (48 h a 37 °C) de cada una de las cepas en microplaca de 96 pocillos. Se evaluó la actividad de AU, de las NP Ag biosintetizadas, de AmB, y las

combinaciones entre AU+AmB; NP Ag+AmB y AU+NP Ag sobre los biofilms maduros. Se cuantificó mediante la tinción con cristal violeta y se midió por espectrofotometría a 595 nm. La densidad óptica (DO) se expresó como unidades de biomasa del biofilm (UBB), 0,1 DO_{595nm} equivale a 1 UBB. A partir de los resultados de UBB, se calculó el porcentaje de crecimiento (%C) y el de reducción (%R) del biofilm sin tratar (control de crecimiento) y de los tratados. Además, tanto el biofilm control y como el tratado se observaron por microscopía óptica de campo brillante, de fluorescencia y confocal de exploración láser (MCEL). Todas las imágenes de microscopía se procesaron con ImageJ y se analizó la topografía y la arquitectura del biofilm mediante el software COMSTAT. Los datos fueron analizados mediante el análisis de la varianza (ANOVA) y se realizó el test de comparaciones múltiples Tukey. Fueron considerados significativos los resultados si *p<0,05, y para el test de Tukey si #p<0,05.

La CIM del AU se determinó en 125 µg/ml para *C. albicans*, siendo la misma para *C. tropicalis*. La CIM de las NP Ag fue de 0,84 nM sólo para *C. albicans*. Por último, la CIM de AmB se determinó en 0,25 µg/ml en ambas cepas de *Candida*.

En *C. albicans*, la UBB fue de 15 ± 0,14. Se determinó, para cada tratamiento, la concentración inhibitoria mínima que reduce el 50% del biofilm maduro (CIM₅₀), comparado con el biofilm no tratado. Las NP Ag a la concentración de 13,5 nM (16 veces más alta que en células planctónicas) mostraron una reducción del biofilm del 49% y AmB a 50 µg/ml (200 veces más alta que la CIM) redujo un 58% el biofilm (*p<0,05). Las combinaciones ensayadas con el AU (2,5 µg/ml), con las NP Ag (13,5 nM) y con AmB (50 µg/ml) erradicaron hasta el 56% del biofilm maduro con respecto al biofilm control (*p<0,05).

En *C. tropicalis*, la UBB fue de 35 ± 0,34. AmB a 50 µg/ml redujo un 54% el biofilm (*p<0,05). La combinación AU+NP presentó una reducción similar (55%, *p<0,05) del biofilm, mientras que, las combinaciones AU+AmB y NP Ag+AmB alcanzaron una erradicación del 80% del biofilm maduro, resultando más efectivos que los tratamientos de los compuestos evaluados por separado (*p < 0,05; # p < 0,05).

A través del análisis de las imágenes obtenidas por microscopías (campo brillante y MCEL) se observó que los tratamientos produjeron la reducción del espesor

promedio y de la superficie adherida del biofilm de ambas cepas de *Candida*. El análisis COMSTAT mostró que en *C. albicans* los tratamientos produjeron disminuciones significativas de biomasa y espesor promedio. La combinación de NP Ag+AmB disminuyó la biomasa de $16,77 \pm 5,45 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ (biofilm control) a $3,80 \pm 0,27 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ (* $p < 0,05$), respectivamente. De manera similar, el espesor promedio también disminuyó, mientras que el coeficiente de rugosidad (Ra*) aumentó (* $p < 0,05$). En *C. tropicalis*, la biomasa del biofilm no tratado fue de $22,42 \pm 5,78 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ y con el tratamiento de NP Ag+AmB se redujo a $1,44 \pm 0,41 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ (* $p < 0,05$; # $p < 0,05$). El espesor promedio mostró reducciones significativas y el Ra* aumentó (* $p < 0,05$). Por lo tanto, la topografía y la arquitectura del biofilm se modificaron con respecto al biofilm no tratado de ambas cepas.

Se concluye que, en biofilms maduros de *C. albicans*, las NP Ag biosintetizadas, solas y combinadas, presentaron actividad antibiofilm. No obstante, en biofilms maduros de *C. tropicalis* el compuesto natural AU y las NP Ag biosintetizadas potenciaron la actividad del ATF de referencia mediante su uso combinado. Estos resultados pueden ser alentadores para continuar su estudio como posible estrategia para el tratamiento de infecciones fúngicas resistentes por la formación del biofilm.



ABREVIATURAS

%C: Porcentaje de crecimiento

%R: Porcentaje de reducción

AmB: Anfotericina B

ANOVA: Análisis de la varianza

ASG: Agar Sabouraud glucosado

ATF: Antifúngico

AU: Ácido úsnico

CC: Control de crecimiento

CDC (en inglés): *Centers for Disease Control and Prevention*

CFM: Concentración fungicida mínima

CIM: Concentración inhibitoria mínima

CIM₅: Concentración inhibitoria mínima del biofilm

CIM₅₀: Concentración inhibitoria mínima del 50% del biofilm

CLSI: *Clinical and Laboratory Standard Institute*

CSG: Caldo Sabouraud glucosado

CV: Cristal violeta

DO: Densidad óptica

EPS: Exopolisacárido

ERO: Especies reactivas del oxígeno

IF: Intensidad de fluorescencia

MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos



MCEL: Microscopia confocal de exploración laser

MOPS: ácido 3-N-morfolino propanosulfónico

NCPF (en inglés): *National Collection of Pathogenic Fungi*

NP Ag: Nanopartículas de plata

NP: Nanopartículas

PBS (en inglés): *Phosphate-Buffered Saline*

Ra*: Coeficiente de rugosidad

RPMI (en inglés): *Roswell Park Memorial Institute*

SFB: Suero fetal bovino

UBB: Unidades de biomasa del biofilm

UFC: Unidades formadoras de colonias

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana

INTRODUCCIÓN

***Candida*, de comensal a patógeno**

Los hongos son organismos ubicuos que rara vez causan enfermedades en el hospedero. Sólo cerca de 300, de las muchas especies de hongos que se conocen, están directamente asociados a enfermedades en los humanos (Hawksworth, 2001). Las infecciones causadas por hongos se pueden subdividir en tres grupos principales: superficiales, mucosa y sistémica o invasiva. Los autores Ahmad, Bhatnagar, Ali, y Dutta (2015) señalan que la patogenicidad fúngica más común que afecta a aproximadamente 1.700 millones de personas en todo el mundo son las infecciones de tipo superficiales; éstas afectan la piel y las uñas (Ahmad, et al., 2015). A menudo se observa candidiasis superficial en pacientes con virus de inmunodeficiencia en humanos (VIH). Sin embargo, la candidiasis orofaríngea en lactantes inmunocomprometidos y la vaginitis en mujeres, se observan con mayor frecuencia (Papon, Courdavault, Clastre y Bennett, 2013). En relación a la vaginitis, se sabe que el 75% de las mujeres tuvo al menos un episodio de candidiasis vulvovaginal en su vida (Zhou, et al., 2009). Las infecciones fúngicas sistémicas o invasivas resultan de la interacción entre: la capacidad patógena que presenta el microorganismo durante la colonización, la adaptación, su propagación y/o diseminación, y la respuesta inmune del hospedero. Estas infecciones fúngicas invasivas son causadas predominantemente por el género *Candida* (Kaushik, y Kest, 2018).

Las especies de *Candida* son muy heterogéneas y presentan dimorfismo fúngico (Pardi y Cardozo 2002). Muchas de las especies de *Candida* están presentes en la naturaleza, mientras que otras conforman la microbiota humana. Especies que son capaces de adaptarse a una temperatura de 37 °C tales como *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, entre otras, pueden ocasionalmente convertirse en patógenos para el hombre. Esto indica que poseen la facultad de pasar de una fase comensal a una patógena, convirtiéndose así en un patógeno oportunista. Sin embargo, raramente esto ocurre en un hospedero sano sino que, generalmente, es consecuencia de un cambio en el estado de salud posiblemente porque se debilita su sistema inmunológico (Papon, et al., 2013; Pardi, et al., 2002).

Las infecciones causadas por *Candida* son denominadas candidiasis, cuando la infección es superficial, o candidemia cuando es sistémica (Papon, et al., 2013). La candidemia frecuentemente está asociada con la capacidad de *Candida* para adherirse y formar biopelículas o biofilm (Sherry et al., 2014).

Biofilm, una mirada holística

Los biofilms son estructuras tridimensionales compuestas por células sésiles de microorganismos que crecen y se adhieren irreversiblemente a superficies tanto vivas como inertes. Son estructuras que se encuentran envueltas en una matriz de exopolisacáridos (EPS), la cual es secretada por la población microbiana (Chandra, et al., 2001). La presencia de la matriz EPS en los biofilms permite su supervivencia en gran cantidad de entornos. Esta capacidad de desarrollarse tanto en superficies bióticas como abióticas es una característica que está directamente relacionada con la salud humana dado que le permite adherirse a diferentes tejidos del hospedero como el tracto urogenital y el gastrointestinal, como también a productos médicos como catéteres intravasculares, válvulas cardíacas e implantes articulares, entre otros (Cavalheiro y Teixeira, 2018; Sherry, et al., 2014).

Los biofilms pueden estar formados por una especie única de bacteria u hongo, o por diferentes tipos de microorganismos constituyendo así un biofilm mixto (Douglas, 2003). Hay autores que establecen que cerca del 80% de los microorganismos desarrollan esta forma de vida sésil y que de esta forma se encuentran en el medio ambiente (d'Enfert y Janbon, 2016).

El Centro de Control y Prevención de Infecciones de los Estados Unidos (CDC) estima que el 65% de las infecciones son causadas por biofilms, implicados generalmente en infecciones crónicas y resistentes a los tratamientos (CDC, 2007). El número de personas susceptibles a infecciones producidas por microorganismos formadores de biofilms aumenta debido al mayor número de individuos inmunocomprometidos y el uso de productos médicos permanentes, que pueden servir como un sustrato para la colonización y posterior desarrollo de biofilms. La afección que generan este tipo de infecciones en la salud del hospedero es importante (De Cremer et al., 2015a).

Biofilm de *Candida*

La virulencia de los microorganismos es su capacidad para causar enfermedades, estando determinada por varios factores. Algunas cepas pueden ser más o menos virulentas de acuerdo con su grado de patogenicidad. Lim, Rosli, Seow y Chong (2012) mencionan que en *C. albicans* varios factores de virulencia han sido los elementos claves para el éxito de este patógeno oportunista. Entre ellos se incluyen: la adherencia a las células hospedero, la secreción de enzimas degradativas, el cambio de morfología y la formación del biofilm (Lim, et al., 2012; Paraje, et al., 2008 y 2009; Renna, et al., 2006).

Dentro del género *Candida*, la especie más común asociada a las infecciones fúngicas por biofilm es *C. albicans*. Además, otras especies de *Candida* no *albicans* tales como *Candida parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *Candida glabrata* que también son formadoras de biofilms, son reconocidas como causantes de infecciones emergentes (Silva, et al., 2009).

C. albicans causa enfermedades superficiales, mucosa y sistémica, siendo el cuarto organismo más común en infecciones del torrente sanguíneo (Sherry et al., 2014). *C. tropicalis* es relevante en las infecciones del tracto urinario (Cavalheiro, et al., 2018), mientras que *C. parapsilosis* se asocia a las micosis que se desarrollan en la piel (Trofa, Gácsér y Nosanchuk, 2008). Los sitios comúnmente infectados son la cavidad oral, el tracto urogenital, el tracto gastrointestinal y la piel junto con los catéteres intravasculares y los catéteres urinarios (Íñigo y Del Pozo, 2018). Cabe destacar que *Candida* tiene la capacidad de desarrollar biofilms sobre una variedad de materiales sintéticos como, por ejemplo: metacrilato de polimetilo, silicona, elastómero, poliuretano, cloruro de polivinilo, polipropileno y poliestireno, a partir de los cuales se elaboran los productos médicos (Íñigo, et al., 2018). Teniendo en cuenta que uno de los factores principales en la formación del biofilm es la naturaleza del material al cual se adhieren, esto posee relevancia en las infecciones humanas.

Formación del biofilm

La formación del biofilm es un proceso multifacético y está mayormente estudiado para la especie *C. albicans*, por lo que es el modelo de elección para su estudio (Figura 1). El primer paso en la formación es la **adhesión**. Esta etapa consiste en la unión de las células planctónicas (levaduras/blastósporas) a un sustrato (vivo o inerte) formando una capa unicelular que servirá de anclaje para el crecimiento del biofilm. Este proceso está mediado por proteínas de la pared celular denominadas adhesinas. Estas proteínas son promotoras de la unión a otras células, que pueden ser epiteliales o también microbianas, o pueden promover la unión a superficies abióticas. Los polisacáridos, las glicoproteínas y los lípidos son moléculas de la superficie celular, que pueden funcionar para promover la unión de *C. albicans* (Lim, et al., 2012).

Seguida de la fase de adherencia, comienza la fase de **proliferación** que conduce la formación de microcolonias, conformando un biofilm temprano. En esta etapa las células se organizan y aumentan en número, a partir de ellas se producen las hifas y/o pseudohifas. También se comienza a secretar la matriz de EPS. Esta matriz forma una barrera física que protege al biofilm, la cual es clave en su persistencia y le confiere integridad estructural. Está compuesta principalmente por proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos y en conjunto, todo esto, influye en su arquitectura final.

Posteriormente sigue la fase de **maduración**; el biofilm de *C. albicans* se considera maduro después de 24 h aproximadamente, pero hay reportes de fases de maduración que duran entre 38 y 72 h (Chandra et al., 2001; Seneviratne, Jin y Samaranayake, 2008). En esta etapa el biofilm es caracterizado como una estructura mixta compuesta por células levaduriformes, hifas y pseudohifas, embebido en una gruesa matriz extracelular constituyendo una densa red, presentando canales en su interior por donde circulan sustancias como el agua, los nutrientes y desechos de origen celular.

Finalmente, la última etapa es la **dispersión**; durante esta fase algunas células levaduriformes, se desprenden para acceder a otros nichos y continuar con la colonización (Cavalheiro, et al., 2018; Lim et al., 2012; Lohse, Gulati, Johnson y Nobile, 2018).

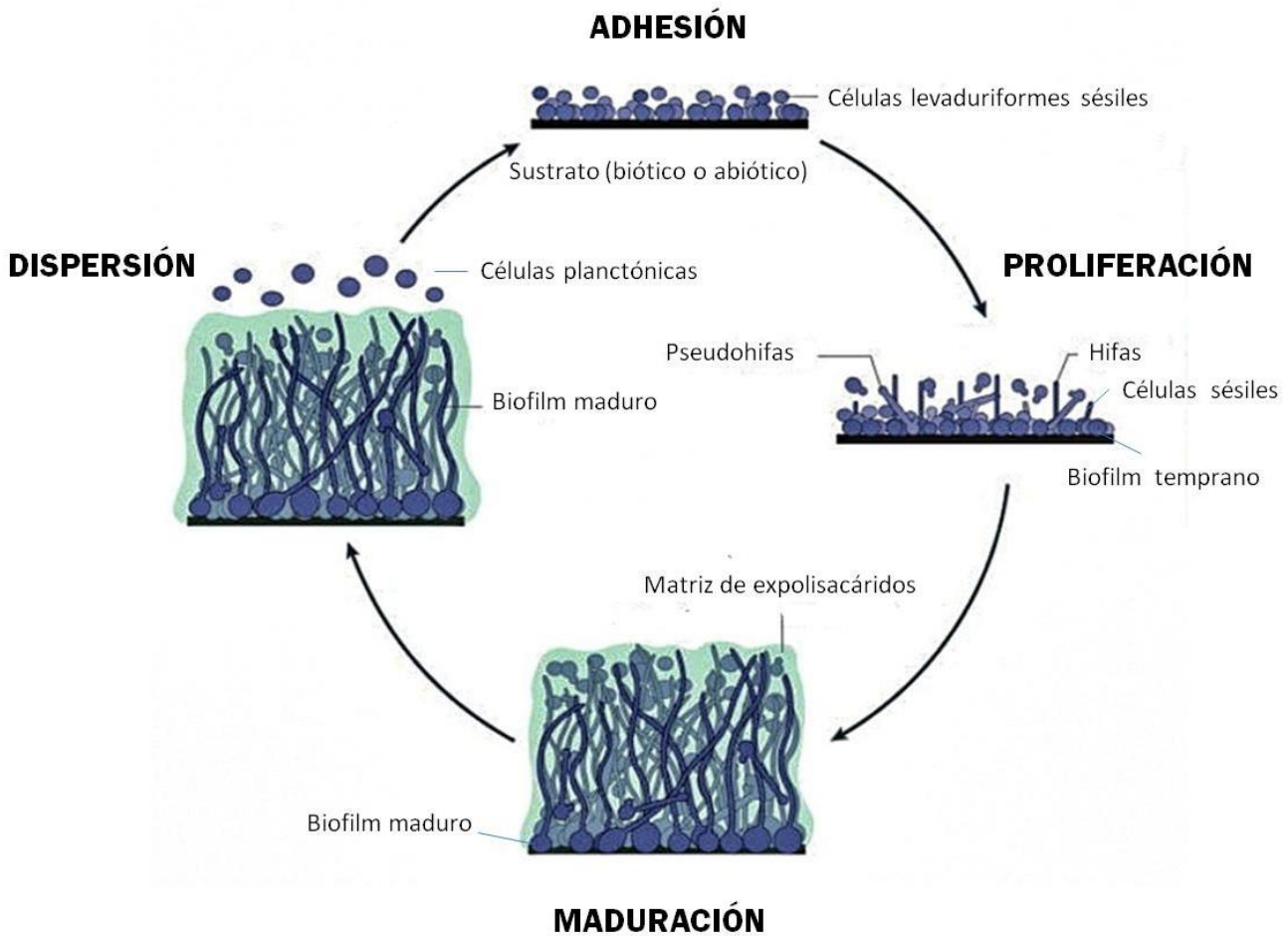


Figura 1. Etapas del desarrollo del biofilm de *C. albicans*. La formación del biofilm de *C. albicans* ocurre principalmente en cuatro fases: adhesión, proliferación, maduración y dispersión (adaptada de Loshe, et al., 2018).

Si bien la formación del biofilm es un proceso que incluye al menos las cuatro etapas mencionadas, no todas las especies del género *Candida* producen el mismo tipo de biofilm. El biofilm de *C. albicans* está constituido por diversos tipos morfológicos que dan como resultado una estructura heterogénea; mientras que el biofilm de *C. glabrata* presentan células del tipo levaduriforme, sin la formación de hifas verdaderas, con una masa final del biofilm bastante más baja comparada con la estructura que genera *C. albicans* (Kuhn, et al., 2002a).

En los biofilms de *C. tropicalis* se encontraron células levaduriformes e hifas largas (Hirota et al., 2017). Se puede evidenciar que se encuentran varias diferencias entre las especies del género *Candida* e inclusive también hay diferencias a nivel intraespecífico. Estas desigualdades resultan de múltiples factores y dificultan el descubrimiento de una solución efectiva contra estas infecciones invasivas.



Figura 2. Etapas del desarrollo de los biofilms de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*. Existe una variación entre las especies de *Candida* en la formación del biofilm, en la morfología celular que desarrollan y en la producción de matriz de EPS y sus componentes (adaptada de Cavalheiro, et al., 2018).

Resistencia del biofilm de *Candida*

La resistencia es la capacidad de los microorganismos de crecer en presencia de elevados niveles de un antimicrobiano. La resistencia del biofilm de *Candida* es un complejo fenómeno multifactorial y, aunque varias hipótesis han sido investigadas, el mecanismo preciso no está aún esclarecido. Se postula que los antifúngicos (ATF) podrían penetrar la estructura, pero no alcanzarían concentraciones efectivas por las características físicas y/o químicas de la matriz. La limitación de nutrientes y oxígeno

dentro del biofilm podría ser también la causa de la variación fenotípica característica de las células sésiles del biofilm, que contribuiría también a la resistencia. Análisis de esteroides han revelado que sus niveles están significativamente disminuidos en las fases intermedia y madura de crecimiento del biofilm; una mayor actividad de las bombas de eflujo también ha sido documentada. Se ha descrito la existencia de microambientes que antagonizan la acción del antimicrobiano (De Cremer, et al., 2015b). Además, el equipo de trabajo integrado por investigadores de la Cátedra de Microbiología (FCEFyN, UNC) ha descrito que el aumento en el estrés celular también está involucrado en esta resistencia (Angel Villegas, et al., 2013 y 2015; Arce Miranda, et al., 2011 y 2017).

Las infecciones por biofilms son muy resistentes al tratamiento con ATF. Las células dentro del biofilm pueden ser hasta 1000 veces más resistentes que sus contrapartes, las células planctónicas (Fux, Costerton, Stewart y Stoodley, 2005; Paraje, 2011); esto se debe a diferentes factores y mecanismos (Figura 3). Ramage, Rajendran, Sherry y Williams (2012) explican que esta resistencia del biofilm de *Candida* es debida a:

- El **estado fisiológico** general de las células del biofilm está involucrado en su resistencia por ejemplo, el estado de latencia de las células.
- La alta **densidad celular** que muestra el biofilm influye sobre un fenómeno denominado *quorum sensing*. Este es un proceso de comunicación entre las células del biofilm que les permite coordinar su comportamiento. Está mediado por moléculas señalizadoras que responden a la población celular y que influyen en la expresión de genes relacionados con la resistencia antifúngica. El farnesol es una de las primeras moléculas señalizadoras que fue identificada en células eucariotas y está involucrada, también, en el proceso de morfogénesis de *Candida*.
- La **sobreexpresión de sitios blanco**, esto implica la regulación positiva de ciertos genes o proteínas en condiciones de estrés, como la exposición a ATF, confiriéndole mayor resistencia al biofilm. Este es el caso del ergosterol y las bombas de eflujo. La matriz extracelular, particularmente, la composición química y su regulación, juegan un papel importante en la resistencia de los biofilms.

- La **producción de matriz exopolisacárida** es una característica definitoria de los biofilms fúngicos, proporciona protección a las células sésiles de factores hostiles como la inmunidad del hospedero y los agentes ATF. La matriz actúa como una barrera física frente a los componentes del sistema inmune restringiendo su entrada y acción sobre las células sésiles. En relación a los ATF, la presencia de la matriz disminuye su penetración y efectividad. Esto se debe a que el fármaco no logra difundir y llegar a todas las células del biofilm a la concentración efectiva, o también por la inactivación de este fármaco por reaccionar a productos secretados por la matriz o sus componentes.
- Las **células persistentes** son una variación fenotípica de las células que integran el biofilm, se forman estocásticamente, entran en estado de latencia cuando comienza el proceso de formación y son altamente resistentes a los ATF. Estas células pueden representar el 1% de la población celular original, por lo tanto, constituyen una pequeña fracción de las células del biofilm (da Silva, 2018; Lewis, 2001 y 2010).
- La **mayor capacidad de respuesta al estrés** es un mecanismo que se relaciona con el estrés oxidativo ya que, los microambientes generados por el biofilm inducen que las células sésiles se adapten a las diferentes condiciones generando una respuesta mejorada al estrés (Arce Miranda, et al., 2011; Angel Villegas, et al., 2015; Kusch, et al., 2007; Marioni, et al., 2016a, 2016b y 2017; Peralta et al., 2015, 2017 y 2018).

Los hongos patógenos se encuentran con diversos estreses fisiológicos en diferentes entornos, incluidos los cambios de temperatura, el estrés iónico, los cambios en la osmolaridad y el estrés oxidativo mencionado anteriormente. La capacidad antifúngica de los biofilms está relacionada con la detección de al menos uno de los tipos de estrés de los señalados, a través de receptores que provocan una respuesta mediada por vías de señalización conservadas. Este es el caso de Mck1p que pertenece a la familia de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), la cual es propia de las células eucariotas. Mutantes nulos de Mck1p en *C. albicans* resultaron sensibles a azoles, al contrario del fenotipo salvaje y sus representantes plantónicos (Ramage, et al., 2012).

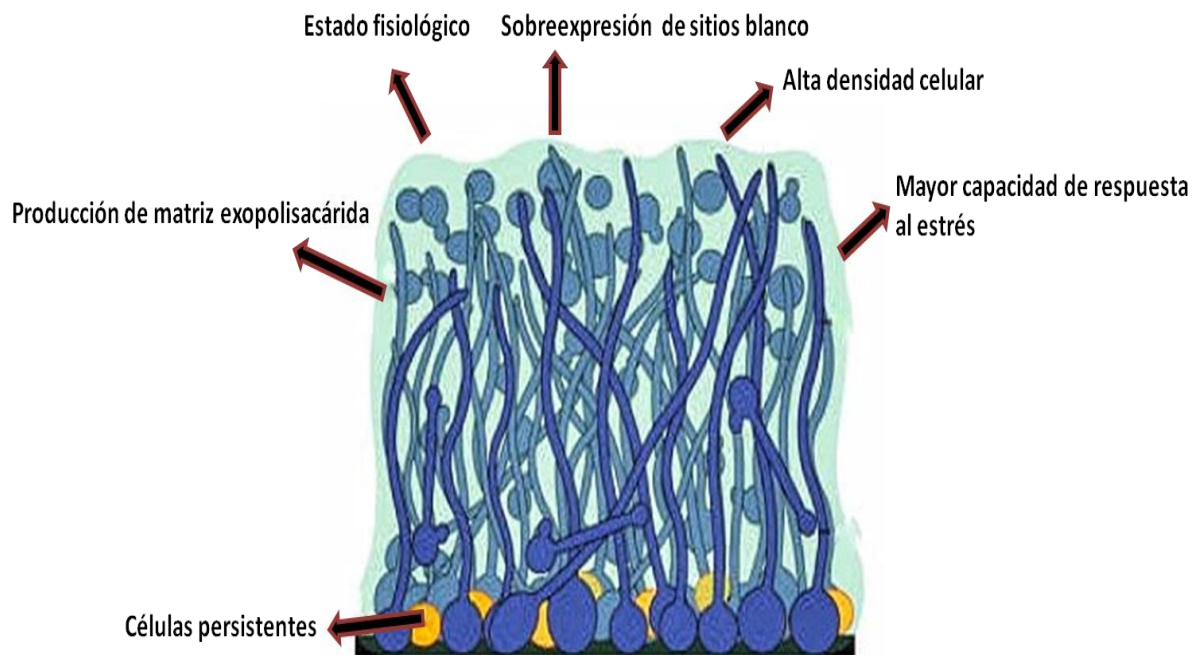


Figura 3. Mecanismos de resistencia en el biofilm de *Candida*. La mayor resistencia que presentan las células sésiles del biofilm en comparación con su contraparte planctónica se debe a un complejo fenómeno multifactorial. Entre dichos factores se mencionan: el estado fisiológico, la densidad celular, la sobreexpresión de sitios blanco, la producción de la matriz de EPS, las células persistentes y la mayor capacidad de respuesta al estrés (adaptada de Loshe, et al., 2018).

La resistencia que presenta el biofilm hace que sus células sean de 10 a 1000 veces menos sensibles que sus contrapartes, las células planctónicas, en consecuencia, se requieren dosis mucho más altas de fármacos que a menudo no son toleradas por el hospedero. En relación a esto, se informó que la formación de biofilms, como se expuso anteriormente, induce varias vías de respuesta al estrés, y Taff, Mitchell, Edward y Andes (2013) mencionan que este mecanismo perjudica la actividad de los fármacos azólicos, como la inducción de bombas de eflujo de fármacos (Taff, et al., 2013). Por lo tanto, las células en el biofilm son hasta mil veces más resistentes a antifúngicos azoles que las células libres (Marioni, et al., 2016a, 2016b y 2017; Peralta et al., 2015, 2017 y 2018).

En otro estudio Chandra et al. (2001) evaluó la susceptibilidad antifúngica del biofilm de *Candida* formado en prótesis acrílicas *in vitro*. Se mostró que los biofilms de *C. albicans* fueron más resistentes a Anfotericina B (AmB), nistatina, clorhexidina y

fluconazol, pero, por el contrario, el crecimiento planctónico de las células de *C. albicans* fueron susceptibles a estos agentes (Chandra, et al., 2001).

En relación a los agentes nombrados, la AmB es un ATF de la familia de los polienos. Estos son los antifúngicos más antiguos, productos naturales de un actinomiceto del suelo, *Streptomyces nodosus*. AmB se aisló por primera vez en 1955 (Kaushik, et al., 2018). Los polienos son compuestos lipófilos que actúan sobre la membrana celular y tienen acción fungicida. La AmB se une al ergosterol, el esteroles principal en la membrana celular del hongo, creando poros transmembrana con el consiguiente aumento de la permeabilidad de los cationes monovalentes y la muerte celular por lisis osmótica. Es decir que, el mecanismo de acción de AmB es mediante la formación de poros y la pérdida de permeabilidad selectiva a través de la fuga de iones (Guirao-Abad, et al., 2017 y Kaushik, et al., 2018).

El desoxicolato de AmB fue el primer antifúngico aprobado en 1958 y es el fármaco de elección contra infecciones sistémicas causadas por *C. albicans* o *Aspergillus fumigatus* que amenazan la vida. Debido a que las infecciones fúngicas invasivas son una causa importante de morbilidad y mortalidad en individuos inmunodeficientes, en pacientes que son receptores de trasplantes o en pacientes con tumores que deben ser sometidos a quimioterapia inmunosupresora, AmB se ha utilizado ampliamente en la práctica clínica (Torrado, J., Espada, Ballesteros, y Torrado, S., 2008).

La farmacocinética de AmB indica que este antimicótico produce la muerte dependiente de la concentración con un efecto post antifúngico prolongado. Por lo tanto, las dosis diarias grandes son las más efectivas. Sin embargo, su utilidad es limitada debido a la nefrotoxicidad grave, que puede conducir a insuficiencia renal. Los efectos adversos de la AmB incluyen, además de la nefrotoxicidad, fiebre, hipopotasemia, pérdida de magnesio y anafilaxia (Kaushik, et al., 2018). Desde los '90 se han desarrollado formulaciones de lípidos con el objetivo de disminuir los efectos adversos de la AmB convencional (Torrado, et al., 2008). De acuerdo con lo planteado anteriormente, se necesitan estrategias que permitan aumentar la eficacia, reducir la toxicidad y minimizar la posibilidad de resistencia fúngica a AmB.

Actualmente no es usual encontrar antimicrobianos novedosos para el tratamiento de los biofilms fúngicos a pesar de que el impacto de estas infecciones es considerable en la salud humana. Sin embargo, un enfoque a considerar, además de las nuevas formulaciones, es la utilización de fármacos que ya están caracterizados en relación a su perfil tóxico y se conocen las dosis de administración, como lo es la AmB, combinándolo con otro compuesto, con el objetivo de potenciar su actividad antifúngica y antibiofilm (Delattin, et al., 2013).

Estrategias para erradicar el biofilm de *Candida*

Inhibidores naturales de biofilms microbianos

Algunos productos naturales poseen excelentes propiedades químicas y biológicas, las cuales son de interés en las investigaciones farmacéuticas. Muchos metabolitos de origen natural son considerados para la erradicación de biofilms y debido a la problemática de la resistencia microbiana, la investigación de antimicrobianos de origen natural se debe abordar desde distintos enfoques. No sólo planteando la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos, sino también estudiar compuestos que sean capaces de mejorar la actividad de los fármacos antimicrobianos de uso clínico, para las cuales los microorganismos han desarrollado numerosos y variados mecanismos de resistencia (De Cremer, et al., 2015b).

La flora nativa tiene un papel importante en la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos. A partir de ella se pueden obtener productos naturales, por lo tanto es proveedora de estructuras químicas o principios activos de interés. Los productos de origen vegetal, tales como flavonoides y otros compuestos, han demostrado poseer actividad antimicrobiana y antifúngica (Karygianni, et al., 2016 y Lu, et al., 2017). Existen reportes de los efectos de compuestos de origen natural con actividad sobre el biofilm (Marioni, et al., 2016a; 2016b y 2017; Pompilio, et al., 2013). Se ha informado que metabolitos de tipo flavonoide, como baicaleína, afectan la formación del biofilm en cepas de *C. albicans* y *C. no albicans* causando la inhibición (Cao, et al., 2008; Serpa, et al., 2012 y Wang, et al., 2010), y nuevas investigaciones han indagado sobre el efecto de otros compuestos naturales en biofilms ya formados, estructuras resistentes,

muy difíciles de erradicar por los ATF (Marioni, et al., 2017, y Nithyanand, et al., 2015).

El equipo de investigación interdisciplinario del IMBIV-CONICET y la Cát. Microbiología, FCEFyN y Laboratorio de Farmacognosia de la FCQ, UNC informó que un flavonoide prenilado obtenido de raíces de *Dalea elegans* (Peralta, da Silva, Ortega, Cabrera y Paraje, 2015) inhibe el biofilm maduro de *C. albicans* e incrementa el estrés oxidativo del biofilm, siendo éstas las primeras investigaciones sobre compuestos obtenidos de la flora autóctona, en cuanto a sus efectos inhibitorios sobre los biofilms (Peralta, et al., 2015 y 2017). En un reciente estudio, se investigó la relación entre la actividad inhibitoria del biofilm y las propiedades antioxidantes de este flavonoide prenilado. Se evidenció una acción antioxidante dependiente de la concentración del compuesto que puede alterar su actividad antifúngica en el biofilm (Peralta, Ortega, Cabrera y Paraje, 2018).

El género de líquenes *Usnea* está representado en la flora autóctona de Argentina por varias especies comúnmente conocidas como “barba de piedra”. Son utilizadas en la medicina tradicional para combatir infecciones y resfriados, por sus principios antimicrobianos y expectorantes, respectivamente. El compuesto natural ácido úsnico [2,6-diacetil-7,9-dihidroxi-8,9b-dimetil-1,3(2H,9bH)-dibenzofurandiona] (AU) (Figura 4, A) es un metabolito secundario que está presente en muchos géneros de líquenes, incluido el género *Usnea*.

El AU ha sido reportado como agente natural que inhibe la formación de biofilms en la especie *Staphylococcus aureus* (Francolini, Norris, Piozzi, Donelli y Stoodley, 2004). También en biofilms de *Candida* spp. se ha encontrado que el AU tiene actividad inhibitoria y fungicida (Pires, Lucarini y Mendes-Giannini, 2012). Además, investigaciones recientes de este equipo demostraron que el AU obtenido del líquen *Usnea amblyoclada* (Figura 4, B), inhibe el biofilm maduro de una cepa de *C. albicans* resistente a azoles, provocando en su acción, un desbalance del estrés oxidativo y nitrosativo (Peralta, et al., 2017).

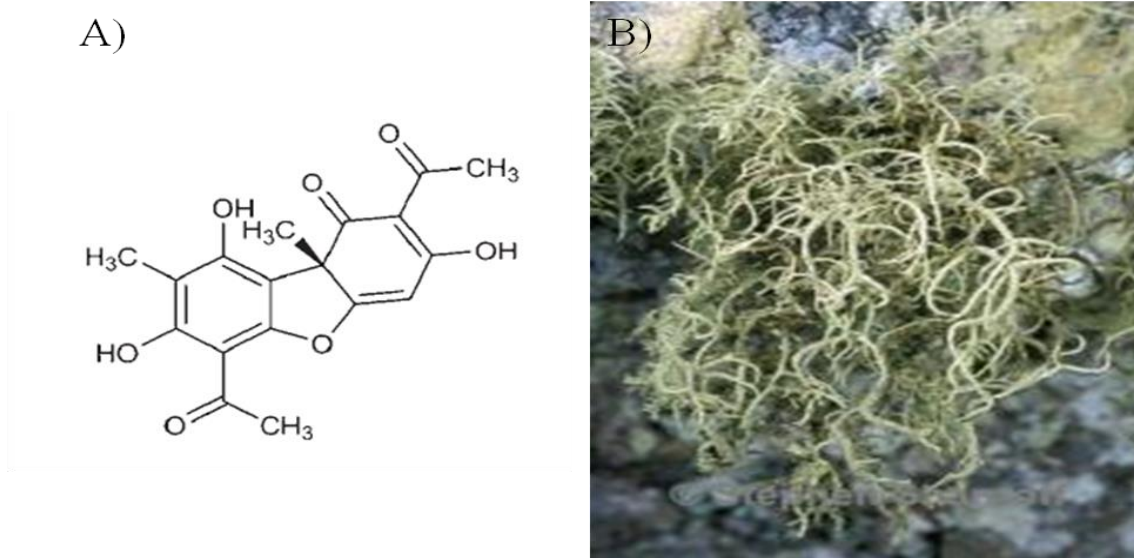


Figura 4. A) Estructura química del AU. B) Imagen del líquen *Usnea amblyoclada*.

Una de las estrategias para la quimiosensibilización de patógenos resistentes a ATF, es la combinación de los fármacos utilizados en la clínica con compuestos de origen natural que permitan la inhibición de la formación de biofilms (Niimi, et al., 2004 y Uppuluri, et al., 2008).

La terapia de combinación entre compuestos de origen natural y fármacos ha ganado interés, ya que esto puede mejorar la eficacia terapéutica y ampliar el espectro antifúngico. El entendimiento de los mecanismos sinérgicos podrían ser la base para el tratamiento de enfermedades infecciosas asociadas al biofilm, revertir la resistencia, disminuir el uso y/o la concentración de antifúngicos y, por consecuencia, los efectos adversos que ellos presentan (Mavridou, Meletiadis, Rijs, Mouton, y Verweij, 2015).

Nanotecnología y el uso de nanopartículas metálicas como inhibidoras del biofilm

La nanotecnología es un campo de la ciencia que ha sido ampliamente explorado los últimos 20 años y se presenta como otra estrategia a utilizar con el fin de resolver problemáticas como la resistencia microbiana y, por consiguiente, también es considerada una estrategia prometedora para combatir biofilms. La nanotecnología incluye la síntesis, diseño, caracterización y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales en una escala de 1-100 nanómetros en una de sus dimensiones.

Son diversos los desarrollos actuales de la nanotecnología, sin embargo, las nanopartículas (NP) son las más conocidas y estudiadas. Las NP son estructuras con dimensiones similares a muchas moléculas biológicas. Su uso condujo al desarrollo de la nanomedicina, rama de la nanotecnología que permite diagnosticar, tratar y prevenir enfermedades en pos de mejorar la salud humana (Natan y Banin, 2017; Pelgrift y Friedman, 2013 y Saratale, et al., 2018).

Las NP pueden ser obtenidas mediante síntesis química o biológica, en particular, esta última recibe especial atención debido a su bajo costo, la reducción de químicos dañinos y la facilidad en cuanto al procesamiento. La utilización de entidades biológicas para sintetizar NP también se denomina "síntesis verde" y esta ruta se considera respetuosa con el medio ambiente, económica y superior a los métodos de síntesis química tradicionales (Ahmad, et al., 2015; Quinteros, et al., 2016 y 2018).

La biosíntesis se realiza utilizando bacterias, levaduras, hongos y/o extractos de plantas, por medio de una reducción extracelular de precursores metálicos. Incluso es interesante resaltar que biofilms bacterianos pueden proporcionar condiciones controladas para la biosíntesis de NP, tales como, bajas concentraciones de precursores, una gran área de superficie, y una atmósfera inerte obtenida al resistir la difusión de agentes fuertemente cargados o altamente reactivos en las zonas más profundas de la matriz del biofilm. Además, estas propiedades del biofilm bacteriano minimizan el riesgo de contaminación y oxidación de las NP, lo cual es de gran importancia en otros procesos de síntesis (Tanzil et al., 2016).

Las NP han demostrado poseer gran capacidad antimicrobiana de amplio espectro por sí mismas y también son utilizadas para el transporte de antimicrobianos. Entre las NP que han demostrado tener propiedades microbicidas las más importantes son las de plata (Ag), óxido de zinc (ZnO), cobre (Cu) y todos los óxidos de hierro que forman NP. Existen recientes estudios realizados acerca de la acción antimicrobiana de las NP; particularmente, las metálicas han resultado efectivas como señalan Ramalingam, Parandhaman y Das (2016), quienes informaron que las NP ZnO inhiben a *S. aureus*, y NP Ag exhiben actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Ramalingam, et al., 2016). Además, Quinteros et al. (2016) encontraron que NP Ag biosintetizadas poseen actividad bactericida contra patógenos humanos Gram positivos y Gram negativos (Quinteros, et al., 2016 y 2018).

La capacidad antimicrobiana de las NP reside en alguno de estos mecanismos: inducción de estrés oxidativo, liberación de iones metálicos, o mecanismos no oxidativos. Todos estos mecanismos pueden ocurrir simultáneamente y los procesos subyacentes a los efectos de las NP son la ruptura de la membrana celular, la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO), la penetración de la membrana celular y la inducción de efectos antimicrobianos intracelulares (Quinteros, et al., 2016 y 2018; Wang, Hu y Shao, 2017).

Características como el tamaño, la forma, la superficie y el interior de las NP, son determinantes en cuanto al control de las infecciones causadas por biofilms (Liu, et al., 2019). Gómez (2018) señala que se ha estudiado acerca de la estrategia de adicionar NP a implantes, ya que esto interfiere en el desarrollo del biofilm sobre el dispositivo médico. En este caso las NP se transfieren, adhieren y penetran el biofilm (Gómez-Garzón, 2018). La nanotecnología y el uso de las NP son consideradas herramientas prometedoras para la creación de novedosos antimicrobianos y sistemas de administración, capaces de penetrar biofilms y combatir cepas resistentes.

De la misma forma que se planteó el uso combinado de productos naturales con antimicrobianos, existe una práctica de combinar NP Ag con agentes quimioterapéuticos para potenciar la actividad antimicrobiana (Natan, et al., 2017). Un ejemplo de esto es la combinación de cloranfenicol con NP Ag que demostró tener un mejor efecto antibacteriano contra *Enterococcus faecalis* (Katva, Das, Moti, Jyoti, y Kaushik, 2017). También se han investigado combinaciones sobre biofilms. En un estudio donde se combinaron NP Ag con aztreonam mostró un efecto sinérgico inhibiendo el biofilm de *P. aeruginosa* (Habash, Park, Vis, Harris, y Khursigara, 2014).

Uno de los factores de resistencia que presentan los biofilms es la producción de la matriz de EPS, esta estructura actúa como barrera limitando la penetración y dispersión de los antimicrobianos hacia las células sésiles del biofilm. Esta limitación reduce la eficacia de estos agentes aun cuando presentan actividad sobre las células planctónicas. Debido a esto, se requieren estrategias alternativas para combatir a este tipo de infecciones. Una de las planteadas en este trabajo de tesina está dada por la acción antimicrobiana de los productos de origen natural y su posible combinación con un ATF de referencia, potenciando el efecto del mismo. Se considera que esta combinación podría minimizar la toxicidad y obtenerse una actividad sinérgica.

Por otro lado, la nanotecnología representa un enfoque moderno y progresista para desarrollar nuevas formulaciones basadas en NP metálicas con propiedades antimicrobianas, por lo tanto otra opción es la provista por el uso de estas NP, las cuales presentarían características mejoradas frente a los fármacos tradicionales dadas principalmente por su alta relación superficie-volumen, lo que genera nuevas características mecánicas, químicas, eléctricas, ópticas, magnéticas, electroópticas y magnetoópticas ofreciendo una alternativa a la creciente resistencia (Hajipour, et al., 2012). También se contempla su posible combinación con fármacos usados en la terapia contra las infecciones producidas por hongos, mejorando su actividad antifúngica.

En concordancia con lo expresado antes y en busca de resultados prometedores a partir de las estrategias mencionadas para combatir biofilms de *Candida*, este trabajo analiza la combinación de productos de origen sintético (AmB), natural (AU) y nanopartículas biosintetizadas (NP Ag), en pos de mejorar el resultado de la acción contra biofilms de *C. albicans* y *C. no albicans*. Esta investigación se focalizó en el estudio del efecto del AU y de NP de Ag biosintetizadas por separado y en combinación con un ATF de referencia como lo es la AmB.

HIPÓTESIS

El AU y las NP Ag actúan como agentes antifúngicos sobre el biofilm de *Candida* potenciando la actividad del ATF poliénico de uso clínico, AmB, mediante un uso combinado.

OBJETIVO GENERAL

Realizar estudios con principios activos naturales y con NP biosintetizadas que exhiban un perfil antifúngico frente al biofilm de *C. albicans* y de *C. no albicans*, combinados con un ATF de referencia con el objeto de poder erradicar este factor de virulencia microbiano.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto antifúngico del AU, las NP Ag biosintetizadas y AmB sobre células planctónicas y células sésiles de *C. albicans* y *C. tropicalis*.
2. Efectuar estudios de actividad antifúngica y erradicación del biofilm de AmB mediante la combinación con el compuesto natural AU obtenido de líquenes del género *Usnea*.
3. Realizar estudios de acción antifúngica y erradicación del biofilm de AmB mediante la combinación con NP Ag obtenidas por síntesis biológica.
4. Combinar el AU y las NP Ag para estudiar de erradicación del biofilm.
5. Identificar y comparar las alteraciones ocasionadas por las diferentes combinaciones en el dimorfismo fúngico y en la matriz de EPS del biofilm de ambas cepas, analizando el impacto sobre su topografía y arquitectura mediante diferentes técnicas de microscopía.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de cepas

En esta tesina se trabajó con cepas de *C. albicans* y *C. no albicans*. Una de las cepas seleccionadas fue *C. albicans* SC5314. La otra fue *C. tropicalis* NCPF (*National Collection of Pathogenic Fungi*) 3111 que, continuando con estudios realizados en la tesis doctoral de da Silva (2018), donde se investigó la capacidad de formación de biofilms de diferentes especies de *Candida*, se clasifican como fuertes formadoras (da Silva, 2018). Ambas cepas escogidas son de colección.

Conservación de cepas

Para el uso periódico de las cepas, se conservaron en picos de flauta con agar Sabouraud glucosado (ASG, Britania), realizando repiques cada quince días. Antes de cada experimento se incubó la cepa por 24 h en caldo Sabouraud glucosado (CSG, Britania) a 37 °C, de ahora en adelante cultivo “overnight” (Peralta, et al, 2015).

Tipificación de cepas

Para realizar la correspondiente confirmación de la tipificación se llevaron a cabo distintas técnicas.

3.1- Coloración Gram: esta técnica permite visualizar la morfología y agrupación celular y detectar posible contaminación bacteriana. La coloración Gram es empleada para la tinción de pared de células procariotas; sin embargo, también es habitualmente usada para la tinción de levaduras que se observan como Gram positivas. Los resultados de la tinción Gram se observaron en al menos 20 campos, utilizando un microscopio óptico de campo claro Zeiss con objetivo 100x, con aceite de inmersión.

3.2- Técnica agar-leche: esta metodología permite conocer si la cepa se trata de *C. albicans* a través de la observación de tubos germinativos y filamentización (Jitsurong, Kiamsiri y Pattararangrong, 1993). Cuando es una cepa de *C. albicans* los tubos germinativos se desarrollan dentro de las 3 h de incubación, mientras que los

clamidiosporos terminales, que nacen individualmente o en racimos de la pseudohifa, se observan luego de las 48 h. También se observa el desarrollo de abundantes pseudomicelios. Para esta técnica, se tomó una ansada del cultivo “overnight” y se sembró por método de estriado en placa de agar- leche la cual se llevó a estufa de 37 °C por 3 h. Posteriormente se dejó la placa por 48 h a temperatura ambiente (25 °C). Los resultados se observaron en al menos 20 campos, a través de un microscopio óptico de campo claro utilizando objetivo de 10x para *C. albicans* y 40x para *C. tropicalis*.

3.3- Cultivo en medio cromogénico: el medio CHROMagar permite la distinción de las especies de *Candida* a través de la coloración diferencial que posee cada una y que se evidencia en el medio cromogénico (Hospenthal, Beckius, Floyd, Horvath, y Murray, 2006). Las colonias de *C. albicans* presentan un color verde claro y las colonias de *C. tropicalis*, de azul verdoso a azul metálico. Partiendo del cultivo de cada cepa de 24 h de crecimiento en agar-agar a 37 °C se sembró en la placa que contiene el medio selectivo. Esta placa se incubó en estufa a 37 °C por 48 h.

Compuestos y elementos con potencial actividad antifúngica

El compuesto AU fue obtenido y provisto por la Dra. Peralta, mediante extracción de la especie *U. amblyoclada* con benceno en aparato soxhlet durante 24 h, purificación y aislamiento por técnicas cromatográficas, e identificación a través de técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear en una y dos dimensiones (Peralta et al., 2017).

En este trabajo fueron evaluadas también, NP Ag biosintetizadas por *Penicillium expansum*. Las NP Ag fueron obtenidas y caracterizadas por el grupo de la Dra. Silvana Alborés del Laboratorio de Biotecnología, Área Microbiología de la Facultad de Química de la Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Se evaluó la actividad antifúngica de AmB (98% pureza) como ATF de referencia (Sigma-Aldrich).

Determinación de la concentración inhibitoria mínima y de la concentración fungicida mínima en células planctónicas

La concentración inhibitoria mínima (CIM) se determinó en las cepas *C. albicans* SC5314 y *C. tropicalis* NCPF 3111 para AU, NP Ag y AmB mediante el

método estandarizado de microdilución en placa de acuerdo con las normas del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008). En base a resultados preliminares se ensayaron diluciones seriadas 1:2 de AU, NP Ag y AmB cuyos rangos de concentraciones se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Concentraciones ensayadas de cada compuesto y elemento para la determinación de la CIM en células plantónicas de *Candida*.

Compuestos y elementos	Rango
AU	1,95-250 $\mu\text{g/ml}$
NP Ag	0,42-13,5 nM
AmB	0,03-16 $\mu\text{g/ml}$

Se preparó una suspensión celular de 1×10^6 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) y se diluyó 1000 veces hasta obtener un inóculo de $1-5 \times 10^3$ UFC/ml. A 100 μl de las diluciones seriadas correspondientes a cada compuesto se agregaron 100 μl del inóculo y se llevó a la estufa de cultivo por 48 h a 37 °C. Para el control de crecimiento se utilizaron 100 μl de suspensión celular más 100 μl del medio Roswell Park Memorial Institute 1960 (RPMI, Sigma Aldrich). Tanto la suspensión celular como las diluciones seriadas se realizaron en medio RPMI con glutamina, sin bicarbonato de sodio, tamponado con ácido morfolino propano sulfónico (MOPS, Sigma Aldrich) 0,164 M, con glucosa 0,2% y pH 7. Posterior a las 48 h de incubación se procedió a la determinación de la CIM a través de la observación directa de la placa.

El valor de la CIM correspondió al primer pocillo en el que no se observó un crecimiento visible de *Candida*. Para el control negativo se utilizaron las soluciones de los compuestos ensayados más medio RPMI y en el control de esterilidad se usó el RPMI (CLSI, 2008).

La concentración fungicida mínima (CFM) de los compuestos en estudio fue determinada por medio del recuento de UFC/ml. Se sembraron 30 μl de hasta tres diluciones por encima de la CIM obtenida (dependiendo el compuesto) en placas de ASG. Los valores fueron expresados en UFC/ml y la CFM correspondió a la

concentración de cada compuesto que alcanzó la eliminación del 99,9% del inóculo inicial (CLSI, 2008).

Se analizó la relación entre la CFM y la CIM para determinar, si correspondiera, el efecto fungicida ($CFM/CIM \leq 2$) o el efecto fungistático ($CFM/CIM > 2$) de los compuestos (Hafidh, et al., 2011).

Biofilms: formación, cuantificación y determinación de la actividad de los compuestos y elementos

Se formaron los biofilms de *Candida* en microplaca de 96 pocillos (Greiner Bio-one) según la metodología descrita por O'Toole y Kolter (1998) (O'Toole, et al., 1998), con modificaciones realizadas por el equipo de investigación del IMBIV-CONICET, Cát. Microbiología, FCEfyN (Arce Miranda, et al., 2017; da Silva, 2018; 2011; Marioni, et al., 2016a, 2016b y 2017; Peralta, et al., 2015, 2017 y 2018). Dicha metodología consiste en la formación del biofilm en una superficie de poliestireno. La cuantificación del biofilm se realizó a través de la tinción con cristal violeta (CV) mediante la cual se pudo cuantificar la biomasa total del biofilm, ya que colorea a las células sésiles y a la matriz EPS (Angel Villegas, et al., 2015 y Arce Miranda, et al., 2011).

Previo a cada ensayo de formación de los biofilms se realizó un cultivo "overnight" de *C. albicans* SC5314 y *C. tropicalis* NCPF 3111. Se realizó el pre tratamiento de la placa con 100 μ l en cada pocillo de una solución compuesta por 5 ml de suero fetal bovino (SFB) y 5 ml de CSG. La placa se llevó a estufa de 37 °C por 30 minutos. Este pre tratamiento favoreció la adhesión de las células sésiles ya que genera una superficie rugosa en el pocillo. Luego se retiró el sobrenadante y se lavó con 100 μ l de buffer fosfato salino (PBS) 10 mM pH 7. Se obtuvo una suspensión celular de concentración 1 en la escala de Mc Farland (equivale a $1-5 \times 10^7$ UFC/ml) ajustado por densitómetro Tecan Sunrise, TECAN (da Silva, 2018).

A aquellos pocillos utilizados como control positivo o control de crecimiento (CC), es decir biofilm no tratado, y los pocillos utilizados para los tratamientos se les agregó 200 μ l de dicha suspensión y se llevó a estufa de 37 °C por 90 minutos, mientras que al control de esterilidad sólo se le agregó 200 μ l de CSG. Transcurrido el tiempo de

incubación se descartó el sobrenadante y se procedió a lavar los pocillos con 200 µl de PBS para eliminar las células no adheridas. Seguidamente se añadieron 200 µl de CSG y se incubó por 48 h a 37 °C para el desarrollo del “biofilm maduro” (Arce Mirada, et al., 2011). Al cabo de las 48 h de incubación se eliminó el sobrenadante y se lavó con 200 µl de PBS. Seguidamente se adicionaron 200 µl de una solución compuesta por 100 µl de CSG más 100 µl de cada concentración del compuesto y elemento a ensayar (AU, NP Ag y AmB). Se incubó por otras 48 h a 37 °C, cada tratamiento se realizó por triplicado como así también el biofilm control. Posteriormente, cada sobrenadante fue descartado y se lavó con 200 µl de agua destilada y se dejó secar la placa en estufa de 37 °C por 24 h (Marioni, et al., 2016; Peralta, et al., 2015, 2017 y 2018).

Una vez secada la placa se añadieron 200 µl de CV (Anedra) 1% p/v y después de tres minutos se descartó el colorante, se lavó con 200 µl de PBS y se eluyó con 200 µl de una solución de alcohol:acetona 70:30 (Porta/Merck). Por último, se leyó la absorbancia a 595 nm en lector de microplaca TECAN. La densidad óptica (DO) se expresó como unidades de biomasa del biofilm (UBB), 0,1 DO_{595nm} equivale a 1 UBB (Angel Villegas, et al., 2015 y Arce Miranda, et al., 2011).

Las cepas fueron clasificadas en función de su capacidad para formar biofilm como se indica en la **Tabla 2** (Arce Miranda, et al., 2011; da Silva, 2018 y Stepanovic, et al., 2000).

Tabla 2: Clasificación de cepas de *Candida* según su capacidad para formar biofilm.

Valor de DO	Clasificación
DO=DO _b	No formadora
DO _b < DO ≤ (2 x DO _b)	Débil formadora
(2 x DO _b) < DO ≤ (4 x DO _b)	Moderada formadora
(4 x DO _b) < DO	Fuerte formadora

DO_b: Densidad del blanco

Además, se calcularon los porcentajes de crecimiento (%C) y los porcentajes de reducción (%R) según las siguientes ecuaciones:

$$\%C = \frac{\text{UBB tratado} \times 100}{\text{UBB control crecimiento}}$$

$$\%R = 100 - \%C.$$

El CC se consideró el 100% de crecimiento.

Estudios de combinación de antifúngicos

Se trabajó utilizando concentraciones fraccionarias de CIM de AmB, realizando combinaciones con AU y NP Ag a fin de evaluar posibles sinergismos utilizando placas de 96 pocillos. Se formó el biofilm como se explicó en el ítem 6 y una vez obtenido el biofilm maduro se agregaron diferentes concentraciones de los compuestos en distintas combinaciones. Como control de esterilidad se utilizó CSG, el biofilm se cuantificó por tinción con CV y se midió por espectrofotometría. Se realizó el cálculo de %C y %R como se describió en el ítem 6 (Uppuluri, et al., 2008). De acuerdo con los %R se determinó la concentración inhibitoria mínima de células sésiles del biofilm (CIM_S), para los ensayos de los compuestos por separado (da Silva, 2018).

Técnicas microscópicas

8.1- Microscopía óptica: A partir de esta metodología se pudo visualizar la morfología de las células levaduriformes planctónicas y de las células sésiles que conforman el biofilm. Mediante la microscopía óptica de campo claro, donde la luz pasa a través de la muestra o es reflejada por el microorganismo. Se observaron a través del microscopio óptico Carl Zeiss, objetivo 40x. Para el caso de la observación de las células sésiles del biofilm, se trabajó con microscopía óptica de campo brillante donde la luz pasa directamente y se aprecian detalles que estén naturalmente coloreados, el microscopio utilizado fue el de Epifluorescencia Axioplan Zeiss, objetivo 60x oil. Se observaron en al menos 20 campos (Arce Miranda, et al., 2017; da Silva, 2018; 2011; Marioni, et al., 2016a, 2016b y 2017; Peralta, et al., 2015, 2017 y 2018).

8.2- Microscopía de fluorescencia: Permitió observar cambios en el dimorfismo de las células en el biofilm con los diferentes tratamientos y sus combinaciones. La

formación de biofilm se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en el ítem 6, pero esta vez se formaron sobre portaobjetos de vidrio (12mm). Se tiñó el biofilm con 30 μ l Calcofluor White (Calcofluor White M2R and Evans Blue 0.5 g/L, Sigma-Aldrich) más 10 μ l de KOH 10% (v/v). Posterior a los 5 minutos se lavó cada soporte con 100 μ l de PBS y, después de un secado por 30 minutos, se montaron los soportes de forma invertida en un portaobjetos de vidrio. Por último, para adherir cada soporte al portaobjetos, se colocaron unas gotas de líquido de montaje. El microscopio utilizado fue el de Epifluorescencia Axioplan Zeiss, objetivo 60x oil. Se observaron al menos 50 campos (Arce Miranda, et al., 2017; da Silva, 2018).

Esta tinción (Calcofluor White) es particularmente útil en *Candida*, ya que se une a la quitina y betaglucanos presentes en la pared del hongo y en la matriz del biofilm (Paraje, 2010, Marioni, et al., 2016a, 2016b y 2017; Peralta, et al., 2016 y 2018).

8.3- Microscopía confocal de exploración láser: La microscopía confocal de exploración láser (MCEL) permite el estudio no destructivo del biofilm realizando un recorrido por todo su espesor, obteniendo planos a diferentes profundidades con los que se construye una estructura tridimensional (Douglas, 2003). Los *stacks* o imágenes de cada plano se obtuvieron a través de un microscopio confocal invertido espectral Fluoview FV 300 (Olympus), objetivo 60x oil, a una longitud de onda de 405 nm, realizando cortes ópticos cada 0,4 μ m (*slices*) sobre el eje Z. La intensidad del láser, ganancia, zoom óptico, resolución y tamaño de la imagen fueron fijados para analizar cuantitativamente las imágenes (da Silva, 2018; Peralta, et al., 2016 y 2018).

El conjunto de imágenes obtenidas se procesó con el programa ImageJ (Schneider, Rasband y Eliceiri, 2012), y por medio de este programa se cuantificó la intensidad de fluorescencia (IF).

Para el estudio de cuantificación del biofilm se utilizó el software COMSTAT, a través del cual se midieron los siguientes parámetros: biomasa, rugosidad de la superficie, espesor promedio y distancia de difusión promedio (Heydorn, 2000 y Vorregaard, 2008). La biomasa es el bio-volumen dividido el área de sustrato. La rugosidad de la superficie es medida por el coeficiente de rugosidad (Ra^*), este coeficiente es adimensional y define topográficamente el biofilm porque permite medir la variación del espesor en cada punto. El espesor promedio mide, en el eje Z, la

distribución de la altura en cada punto del biofilm; mientras que la distancia de difusión promedio es calculada como la distancia más corta desde cada pixel ocupado por la biomasa a un pixel vacío. Este último parámetro da conocimiento de cuánto debe difundir un nutriente o un compuesto como es el ejemplo de los ATF, entre un espacio vacío y las células que se encuentran en una micro o macro colonia dentro del biofilm (Heydorn, 2000 y Vorregaard, 2008).

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó con el programa Infostat (Di Rienzo, et al. 2016) mediante el análisis de la varianza (ANOVA), seguido del test Tukey para comparaciones múltiples. Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar y fueron considerados significativos si $*p < 0,05$. Las comparaciones del test de Tukey son significativas si $^{\#}p < 0,05$.



Figura 6. Técnica Agar-Leche *C. albicans*. Después de 48 h de incubación a 25 °C. Las flechas rojas indican los clamidosporos terminales y los círculos negros indican la formación de pseudomicelio. Imagen vista en microscopio óptico de campo claro con aumento de 10x. Imagen representativa de 20 campos.

Por otra parte, la cepa *C. tropicalis* presentó filamentización en el medio agar-leche, sin la presencia de clamidosporos (Figura 7).

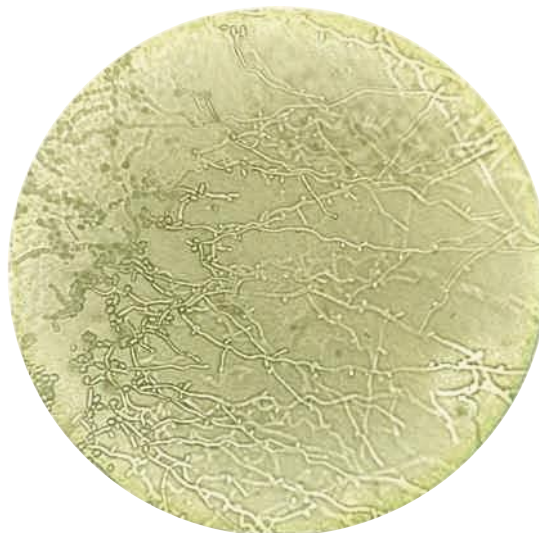


Figura 7. Técnica Agar-Leche *C. tropicalis*. Después de 48 h de incubación a 25 °C. Imagen vista en microscopio óptico de campo claro con aumento de 40x. Imagen representativa de 20 campos.

1.3- CHROMagar

En la Figura 8 se observan las colonias de *C. albicans* y *C. tropicalis* sembradas en el medio cromogénico CHROMagar. Las colonias de *C. albicans* desarrollaron el característico color verde, mientras que las colonias de *C. tropicalis* presentaron color azul.

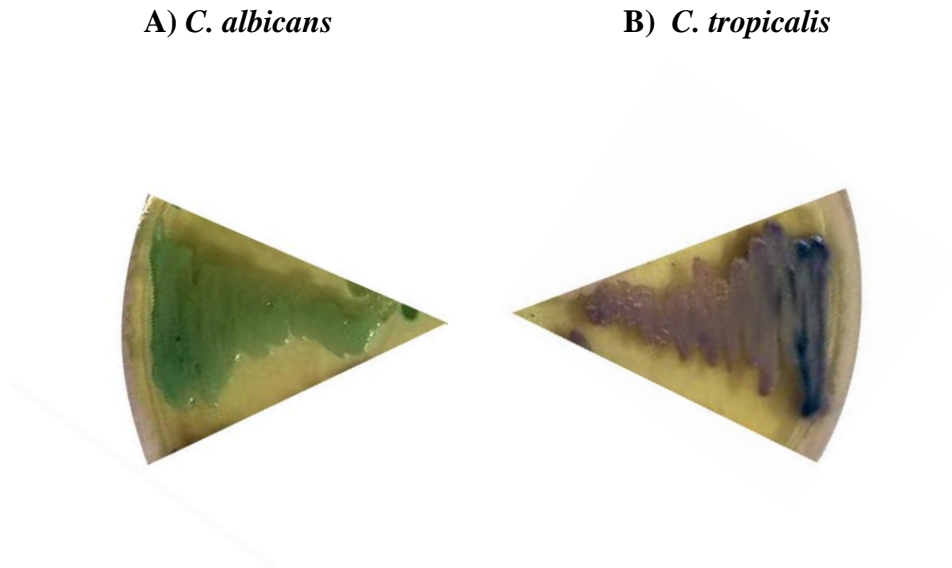


Figura 8. Medio CHROMagar. A) *C. albicans* de color verde y B) *C. tropicalis* de color azul.

Concentración inhibitoria mínima y concentración fungicida mínima en células planctónicas

En la **Tabla 3** se muestran los resultados obtenidos de CIM y CFM de AU, NP Ag y AmB para ambas cepas de *Candida* y se determinó la relación CFM/CIM según el protocolo del CLSI. Para la cepa *C. albicans* la CIM del AU se determinó en 125 $\mu\text{g/ml}$ y la CFM en 250 $\mu\text{g/ml}$. Para la cepa *C. tropicalis* la CIM fue el mismo valor y la CFM fue de 125 $\mu\text{g/ml}$. El cálculo de la relación CFM/CIM para *C. albicans* (250 $\mu\text{g/ml}$ / 125 $\mu\text{g/ml}$) fue de 2 y para *C. tropicalis* (125 $\mu\text{g/ml}$ / 125 $\mu\text{g/ml}$) fue de 1. Esto indicó que el AU tiene acción fungicida para ambas cepas.

En la cepa de *C. albicans* la CIM y la CFM de las NP Ag no pudo ser determinada en el rango de concentraciones ensayado (>13,5 nM) por lo tanto, no se

pudo determinar la relación CFM/CIM. En la cepa de *C. tropicalis* el valor de la CIM y la CFM fue de 0,84 nM, la relación CFM/CIM (0,84 nM/ 0,84 nM) fue de 1 indicando que las NP Ag tuvieron acción fungicida para esta cepa.

En cuanto a la AmB, tanto la CIM como la CFM se estableció en 0,25 µg/ml en ambas cepas. Mediante el resultado de la relación CFM/CIM (0,25 µg/ml/ 0,25 µg/ml= 1) se corroboró su acción fungicida.

Tabla 3. CIM, CFM y relación CFM/CIM de *C. albicans* y *C. tropicalis* para AU, NP Ag y AmB.

	<i>C. albicans</i>			<i>C. tropicalis</i>		
	CIM	CFM	CFM/CIM	CIM	CFM	CFM/CIM
AU	125 µg/ml equivale a $3,6 \times 10^5$ nM	250 µg/ml equivale a $7,6 \times 10^5$ nM	2 fungicida	125 µg/ml equivale a $3,6 \times 10^5$ nM	125 µg/ml equivale a $3,6 \times 10^5$ nM	1 fungicida
NP Ag	>13,5 nM	>13,5 nM	-	0,84 nM	0,84 nM	1 fungicida
AmB	0,25 µg/ml equivale a $2,7 \times 10^5$ nM	0,25 µg/ml equivale a $2,7 \times 10^5$ nM	1 fungicida	0,25 µg/ml equivale a $2,7 \times 10^5$ nM	0,25 µg/ml equivale a $2,7 \times 10^5$ nM	1 fungicida

>: La CIM y CFM se determina a concentraciones mayores a 13,5 nM.

-: No se determinó la relación CFM/CIM

Determinación de la actividad antifúngica en células sésiles del biofilm

Ambas cepas de *Candida* fueron formadoras de biofilm. De acuerdo con la escala presentada en la **Tabla 1** en la sección de Materiales y Métodos tanto la cepa *C. albicans* (BBU= $15 \pm 0,14$), como la cepa *C. tropicalis* (BBU= $35 \pm 0,34$), fueron fuertes formadoras de biofilm. Esto concuerda con estudios previos (da Silva, 2018).

A partir de los biofilms maduros se ensayaron las siguientes concentraciones: diluciones 1:2 para AU y el rango fue de 2,5 µg/ml a 2,5 mg/ml. Para AmB 0,5-25-50-100 y 200 µg/ml. Para las NP Ag la concentración fue 13,5 nM. Las concentraciones experimentadas se basaron en resultados obtenidos de la CIM de cada compuesto y de AmB y AU, particularmente, en datos publicados por el equipo de investigación de la Cátedra de Microbiología, FCEfyN, UNC (da Silva, 2018; Peralta, et al., 2016).

Se determinó la concentración inhibitoria mínima en células sésiles, CIMs₅₀ que reduce el 50% la biomasa del biofilm, a partir de las concentraciones mencionadas. Esta medida permitió comparar el efecto ATF de diferentes compuestos en biofilms. Las CIMs₅₀ de los compuestos se presentan en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Determinación de la CIMs₅₀ en *C. albicans* y *C. tropicalis* para AU, NP Ag y AmB.

	CIMs ₅₀		
	AU	NP Ag	AmB
<i>C. albicans</i>	N/D	13,5 nM	50 µg/ml equivale a 5,4x10 ⁴ nM
<i>C. tropicalis</i>	N/D	N/D	50 µg/ml equivale a 5,4x10 ⁴ nM

N/D: No determinado dentro de los rangos ensayados

No se encontró CIMs₅₀ dentro del rango ensayado de AU para ninguna de las cepas. Para NP Ag se determinó la CIMs₅₀ en 13,5 nM en la cepa *C. albicans*. En cuanto a AmB la CIMs₅₀ fue de 50 µg/ml tanto para *C. albicans* como para *C. tropicalis*. Para la cepa *C. albicans* las concentraciones iguales o mayores a 50 µg/ml mostraron reducciones similares entre sí, para 100 µg/ml, fue del 61% y para 200 µg/ml fue del 66%. Estas mismas concentraciones para la cepa *C. tropicalis* presentaron reducciones del biofilm mayores al 50%: para 100 µg/ml la reducción fue del 79% y para 200 µg/ml fue del 97%.

Estudios de combinación del ácido úsnico, de nanopartículas de plata obtenidas por síntesis biológica y de Anfotericina B

De acuerdo con el ítem anterior, se ensayaron combinaciones de las concentraciones de los compuestos y elementos en las que se obtuvo una disminución del 50% del biofilm maduro. Estas combinaciones se realizaron para estudiar una posible actividad sinérgica entre los compuestos y elementos en comparación con el resultado del efecto sobre el biofilm de los compuestos y elementos por separado.

Particularmente, el compuesto AU se ensayó a una concentración de 2,5 $\mu\text{g/ml}$ (equivale a $7,26 \times 10^6$ nM) que se corresponde con resultados obtenidos en el estudio realizado por Peralta et al. (2017). En relación a AmB, como la concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ de AmB redujo a la mitad el biofilm de las dos cepas de *Candida*, esta concentración fue seleccionada para el estudio de las combinaciones. Debido a que no se alcanzó la CIMs₅₀ para AU y NP Ag en la cepa de *C. tropicalis*, se decidió utilizar las mismas concentraciones que las evaluadas en *C. albicans* para los estudios de combinación con AmB. La acción sobre el biofilm maduro de cada compuesto por separado y en combinación, se presenta en la Figura 9.

En *C. albicans* se encontró que el AU a la concentración de 2,5 $\mu\text{g/ml}$ no presentó una reducción significativa (* $p > 0,05$). Para las NP Ag, con una concentración de 13,5 nM se encontró una reducción del 50% de biofilm formado, comparando ambos resultados mencionados con el biofilm no tratado (CC=100%) (* $p < 0,05$). En relación al ATF de referencia AmB, a la concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ redujo un 58% el biofilm maduro comparado con el biofilm control (* $p < 0,05$). De manera similar al efecto de AmB, la combinación entre AU+NP Ag produjo una reducción del 47% del biofilm, AU+AmB redujo un 56% y NP Ag+AmB redujo el 54% del biofilm con respecto al control del biofilm no tratado (* $p < 0,05$). Cuando se realizó el test estadístico Tukey, los tratamientos NP Ag (13,5 nM), AmB (50 $\mu\text{g/ml}$) y todas las combinaciones (AU+NP Ag, AU+AmB y NP Ag+AmB) no fueron significativamente diferentes entre sí. En consecuencia, las combinaciones no ejercieron un efecto mayor al logrado por AmB y NP Ag por separado (Figura 9, A).

En *C. tropicalis* tanto el AU (2,5 $\mu\text{g/ml}$) como las NP Ag (13,5 nM), no lograron una reducción significativa del biofilm (* $p > 0,05$). Se encontró la reducción del 50% de biofilm formado únicamente con el ATF de referencia AmB a la concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ comparado con el biofilm control (* $p < 0,05$). Con respecto a las combinaciones, todas lograron mayores reducciones comparadas con las reducciones de los compuestos y elementos ensayados por separado. La combinación AU+NP Ag redujo el biofilm en un 55% con respecto al biofilm control (* $p < 0,05$), mejorando el efecto de cada compuesto cuando fue evaluado solo a la misma concentración. Las mayores reducciones se lograron combinando el AU con AmB y las NP Ag con AmB,

con 79% y 81% de reducción del biofilm comparado con el biofilm control de *C. tropicalis*, respectivamente (* $p < 0,05$, # $p < 0,05$) (Figura 9, B).

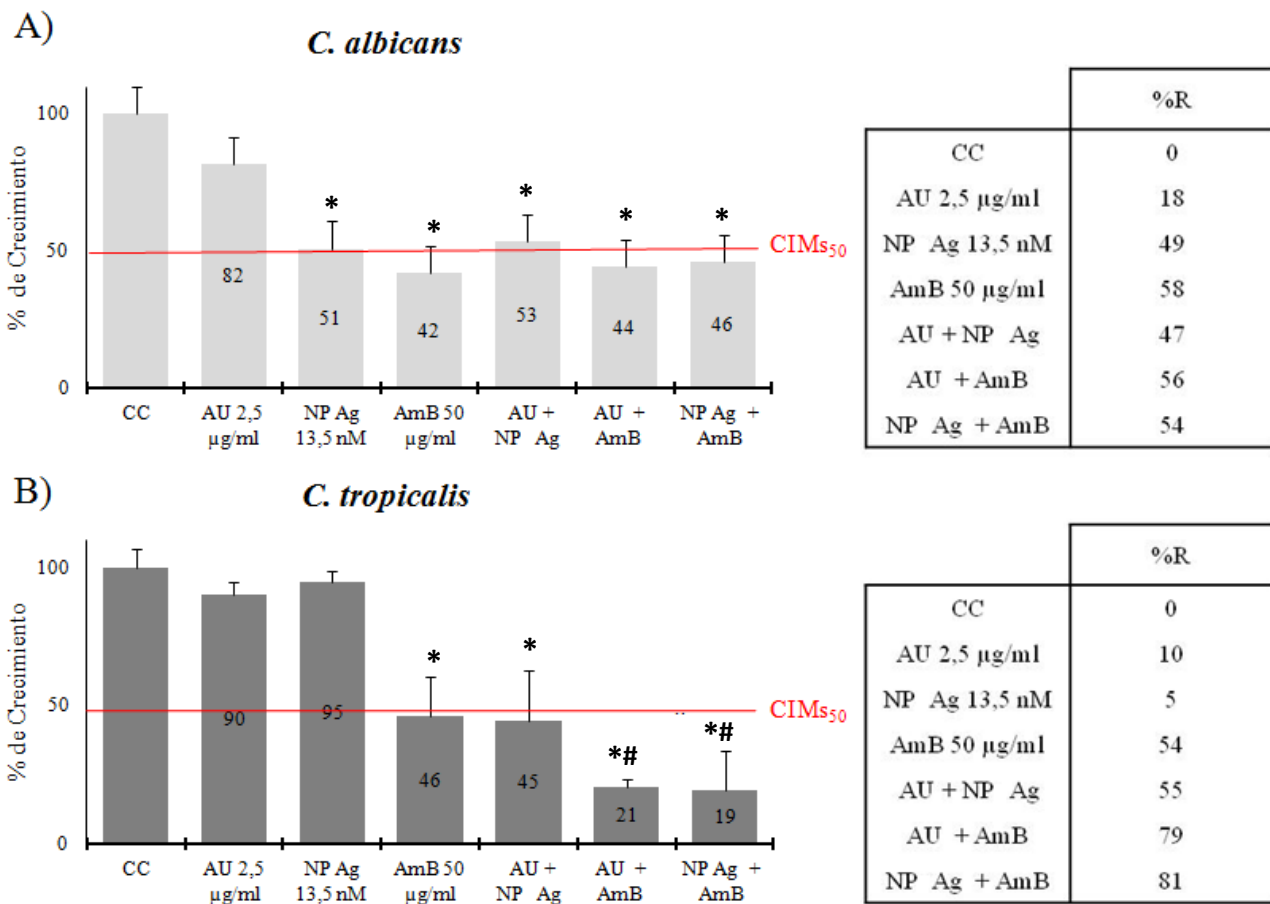


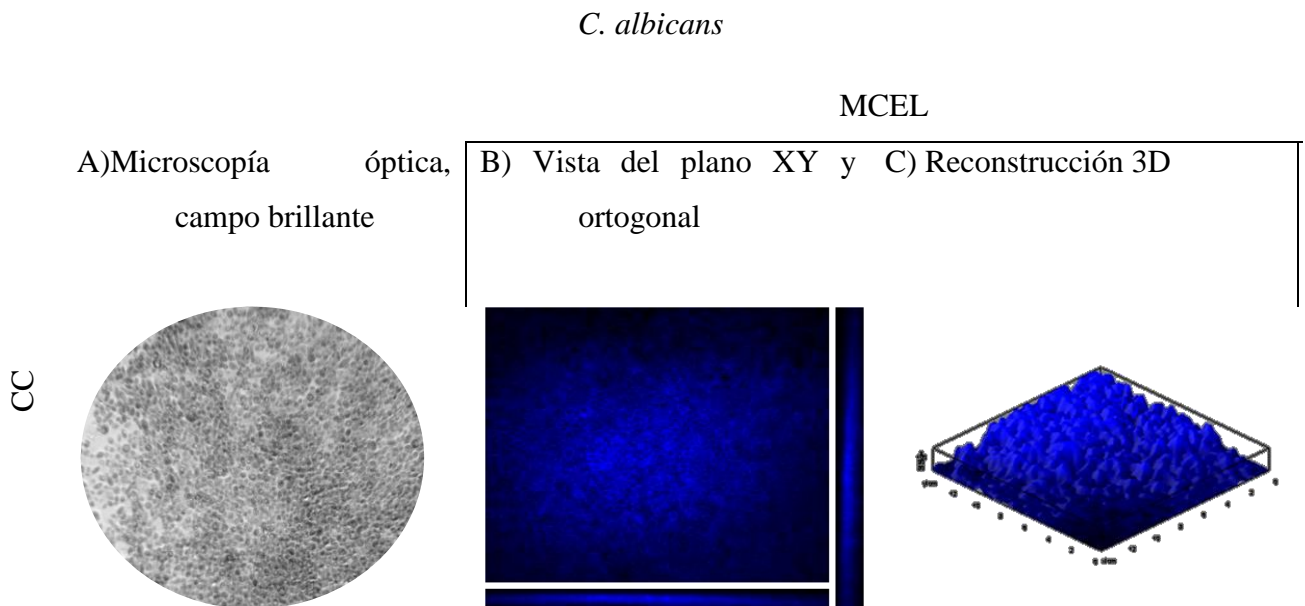
Figura 9. Efecto de AU, NP Ag, AmB y sus combinaciones en biofilms maduros de *C. albicans* (A) y *C. tropicalis* (B). CC, control de crecimiento; %C, porcentaje de crecimiento y %R, porcentaje de reducción del biofilm maduro. La barra roja indica la CIM_{S50}. Las barras de error representan el desvío estándar. * corresponde al $p < 0,05$ entre los tratamientos y el CC, y # corresponde al $p < 0,05$ entre los tratamientos.

En resumen, en la cepa *C. tropicalis*, el AU aumentó la reducción del biofilm maduro y mejoró el efecto encontrado para AmB cuando fueron ensayados en combinación, aunque, cuando fue ensayado solo, AU no mostró un resultado efectivo en

las dos cepas de estudiadas. En cuanto al efecto de las NP Ag, en la cepa *C. albicans* se logró la disminución del 50% del biofilm, pero en la cepa *C. tropicalis* no se obtuvo reducción. No obstante, cuando se combinaron las NP Ag con AmB se logró una reducción aún mayor (81%) que la encontrada para el ATF solo.

Microscopía óptica y confocal de exploración láser

Las Figuras 10 y 11 muestran los resultados obtenidos de las microscopías óptica y MCEL, y de la reconstrucción en 3D del biofilm de *C. albicans* y *C. tropicalis*, bajo las condiciones ensayadas, respectivamente. De acuerdo con los resultados obtenidos en el experimento de microtécnica con CV para la cepa *C. albicans* se evaluó el biofilm no tratado (CC), las NP Ag (13,5 nM), AmB (50 µg/ml) y la combinación de las NP Ag con AmB.



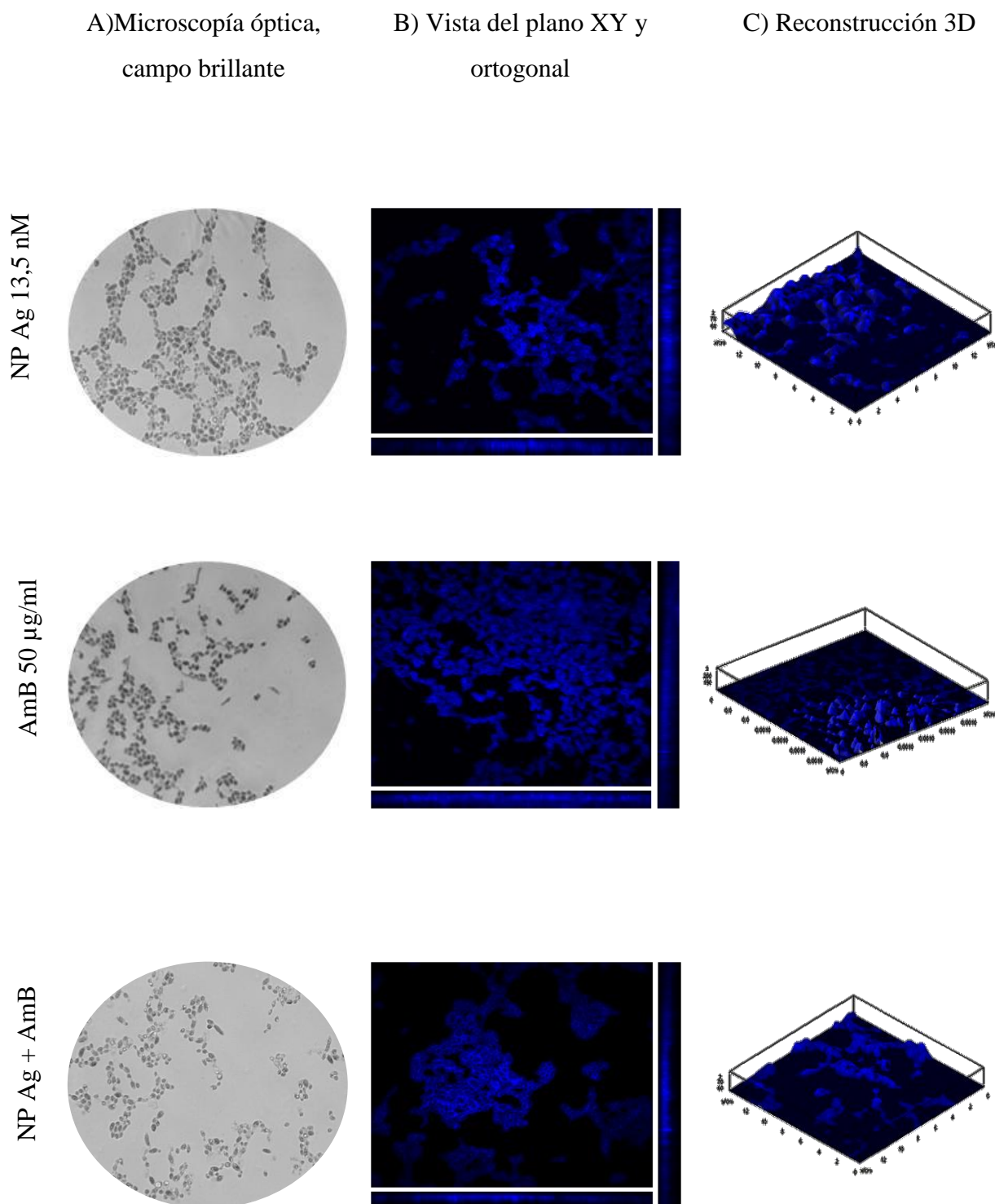


Figura 10. Estructura de los biofilms de *C. albicans* SC5314 teñidos con Calcofluor White visto en campo brillante y MCEL. A) corresponde a las imágenes obtenidas por microscopía óptica de campo brillante (60x). B) muestra imágenes obtenidas por MCEL que corresponden con la proyección sobre el eje Z del plano XY y la vista

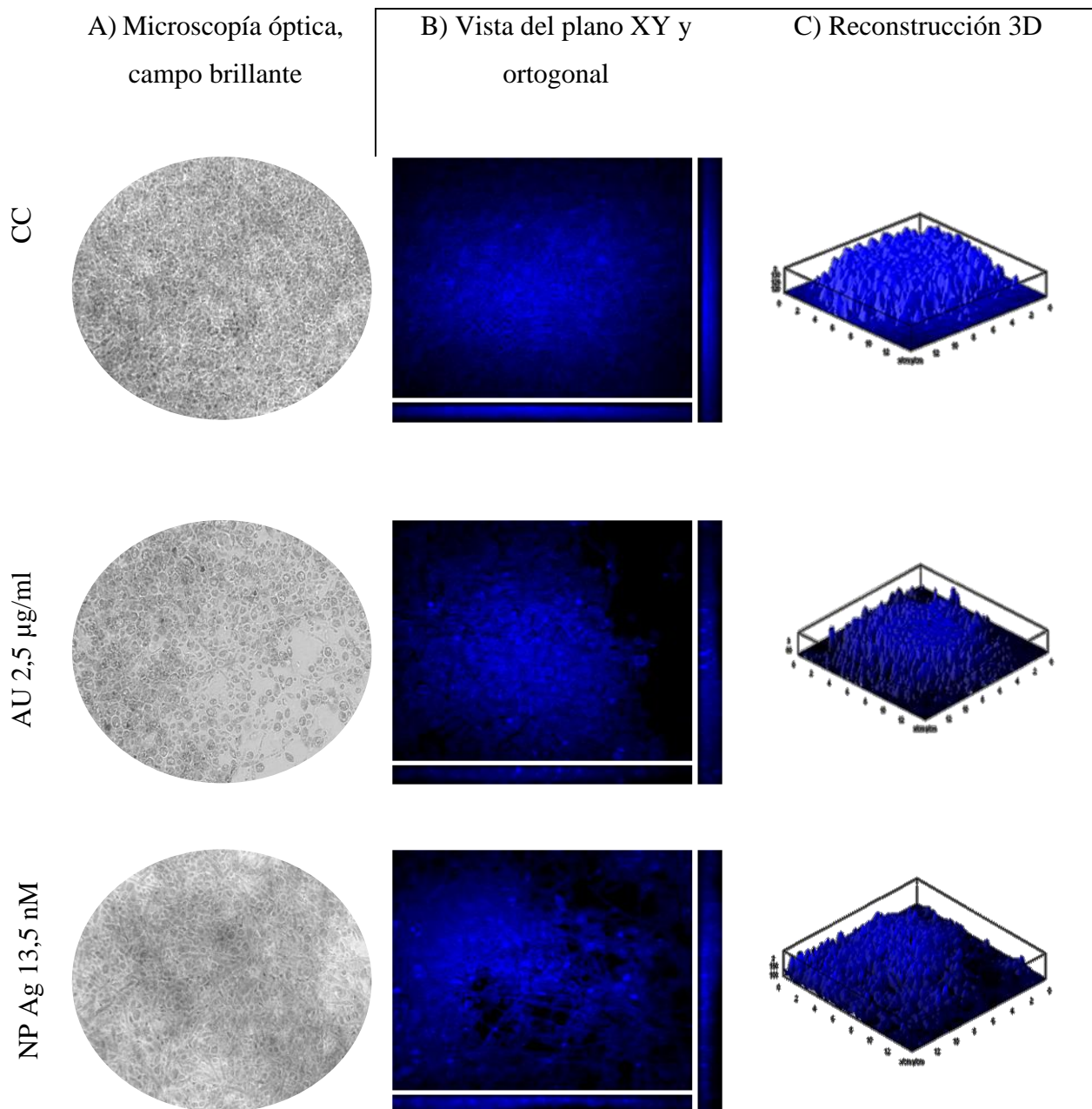
ortogonal. C) se presentan las reconstrucciones en 3D, de cada condición: CC, NP Ag 13,5 nM, AmB 50 µg/ml y NP Ag + AmB.

La condición CC mostró que la biomasa del biofilm cubrió toda la superficie. Se pudo visualizar un biofilm denso, con presencia de abundante matriz de EPS, donde el espesor fue característico del biofilm. Por otro lado, cuando se analizaron los biofilms tratados con AmB, NP Ag y la combinación, se observaron una disminución tanto de la biomasa como también del espesor del biofilm y ausencia de EPS. También se encontró una gran diferencia en la superficie cubierta y en agrupación celular que presentó el biofilm no tratado con respecto a los tratados. Sin embargo, cuando se focalizó en la comparación de los efectos de las tres condiciones de los tratamientos en la combinación se observó ausencia de macrocolonias.

Para la cepa *C. tropicalis* se evaluó el biofilm no tratado (CC), el compuesto AU (2,5 µg/ml), las NP Ag (13,5 nM), AmB (50 µg/ml) y las combinaciones AU+NP Ag y NP+AmB (Figura 11).

C. tropicalis

MCEL



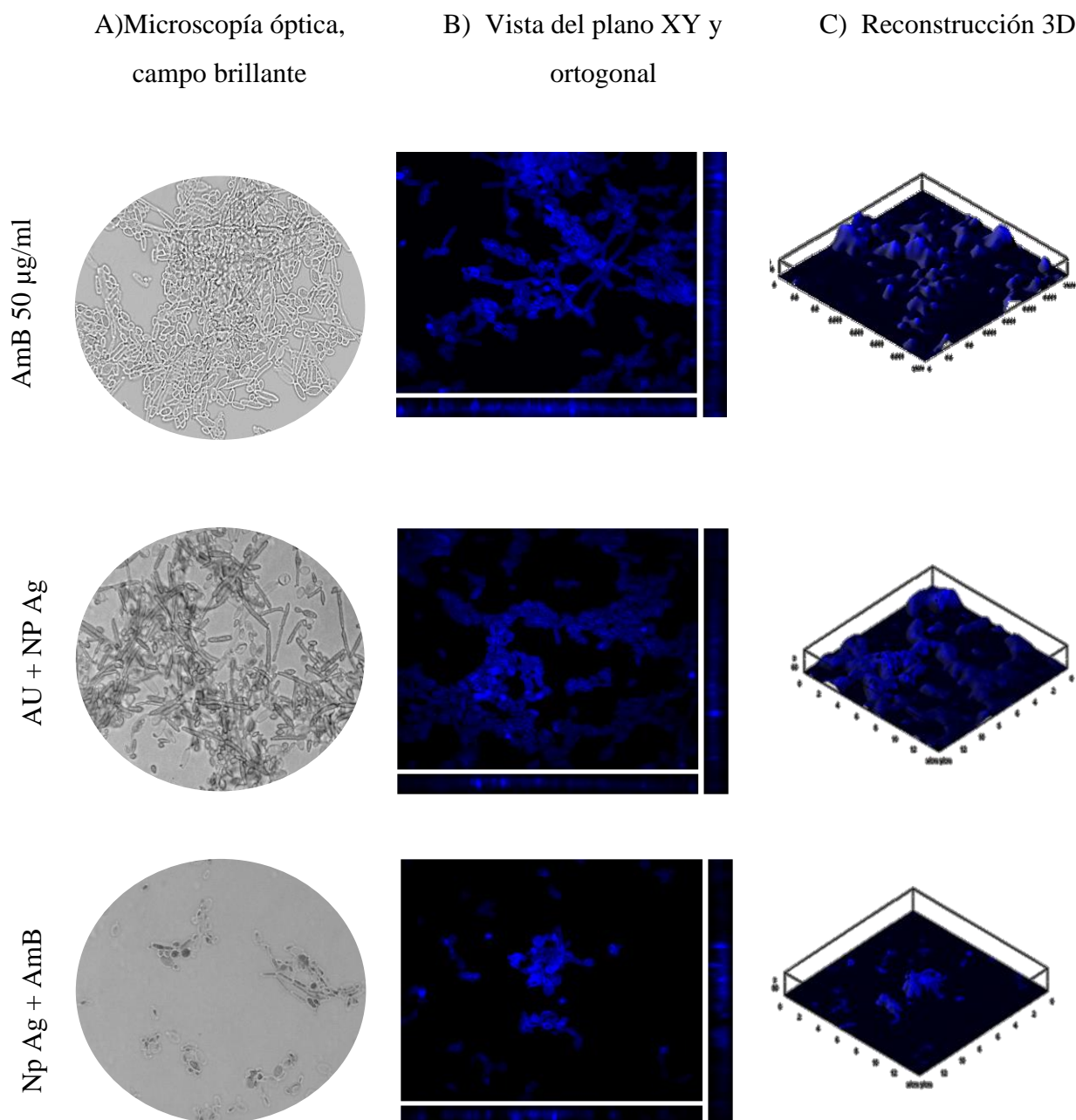


Figura 11. Estructura de los biofilms de *C. tropicalis* SC5314 teñidos con Calcofluor White visto en campo brillante y MCEL. A) corresponde a las imágenes obtenidas por microscopía óptica (60x), campo brillante; B) muestra imágenes obtenidas por MCEL que corresponden con la proyección sobre el eje Z del plano XY y la vista ortogonal, C) se presentan las reconstrucciones en 3D, de cada condición: CC, AU 2,5 $\mu\text{g/ml}$, NP Ag 13,5 nM, AmB 50 $\mu\text{g/ml}$, AU+NP Ag y NP Ag+AmB.

En las imágenes de la Figura 11, la reconstrucción en 3D permitió visualizar que para la condición CC la biomasa del biofilm formado ocupó toda la superficie y el espesor constituyó varias capas de células. En las condiciones AU (2,5 $\mu\text{g/ml}$) y NP Ag (13,5 nM) la superficie que ocupó la biomasa del biofilm fue similar y también lo fue si comparamos estas condiciones con el CC; sin embargo, el espesor disminuyó marcadamente. En la condición AmB (50 $\mu\text{g/ml}$) se observó una disminución marcada de la biomasa y del espesor. El efecto de las combinaciones de los compuestos (AU+NP Ag y NP Ag+AmB) tuvo una acentuada disminución en la biomasa y el espesor del biofilm, que se denotó aún más en la combinación NP Ag+AmB. En las condiciones en las que están implicadas las NP Ag se observó, a través de las diferentes microscopías, una gran producción de hifas. Nuevamente se correspondieron las imágenes obtenidas por las diferentes técnicas microscópicas con la reconstrucción 3D en las condiciones experimentadas.

Posterior al procesamiento de imágenes y la reconstrucción en 3D del biofilm se cuantificó IF dada por Calcofluor White de cada una de las condiciones experimentadas. Las condiciones ensayadas mostraron las siguientes IF: para las NP Ag fue de $24,30 \pm 3,34$, para AmB fue de $28,88 \pm 0,59$ y para la combinación NP Ag+AmB fue de $85,45 \pm 12,23$. Estos resultados fueron significativamente diferentes comparados con el biofilm no tratado (* $p < 0,05$). Esto mostró que la IF se correspondió con los resultados obtenidos en el ensayo de combinaciones de ATF medidos por microtécnica con CV, es decir, se observó la misma tendencia de reducción. La Figura 12 muestra los resultados de IF obtenidos para *C. albicans*.

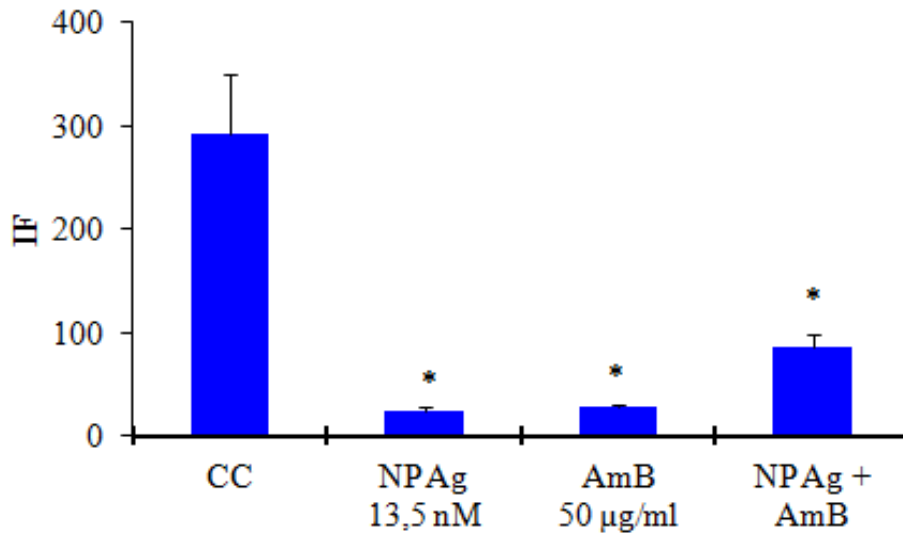


Figura 12. Cuantificación de IF en los biofilms de *C. albicans* SC5314. Condiciones CC, NP Ag 13,5 nM, AmB 50 µg/ml y, la combinación de NP Ag y AmB. CC: control crecimiento. Las barras de error representan el desvío estándar, * corresponde al $p < 0,05$ de las condiciones experimentadas comparadas con el CC.

Para la cepa *C. tropicalis* se encontró que AU mostró una IF de $135,25 \pm 50,24$ y para las NP Ag fue de $201,80 \pm 31,27$, ambos resultados fueron significativamente diferentes comparados con el biofilm no tratado ($*p < 0,05$). En este caso, los colorantes utilizados para la formación del biofilm por microtécnica CV y el utilizado en la MCEL (Calcofluor White) para la evaluación de la arquitectura del biofilm, no mostraron correspondencia, probablemente debido a la naturaleza de la matriz de EPS de *C. tropicalis* y por la característica de ser una cepa altamente formadora de biofilm. La IF producida por la acción antibiofilm de AmB fue de $65,71 \pm 2,94$, el de la combinación AU+NP Ag fue de $61,06 \pm 0,54$ y el de la combinación NP Ag+AmB fue de $20,08 \pm 2,35$. Estos resultados fueron diferentes significativamente con respecto a los demás tratamientos ($*p < 0,05$, $^{\#}p < 0,05$). La figura 13 muestra la IF que se obtuvo para la cepa *C. tropicalis*.

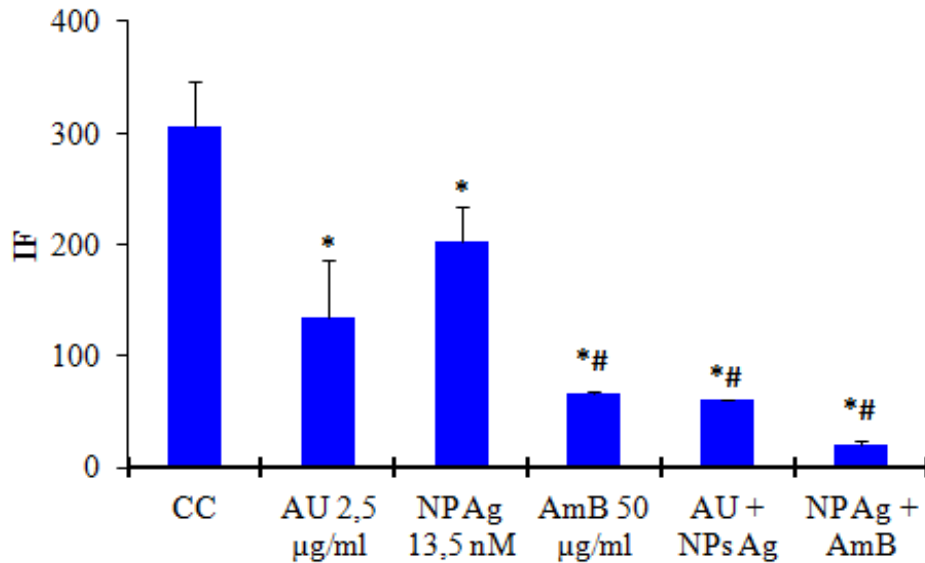


Figura 13. Cuantificación de IF en los biofilms de *C. tropicalis* NCPF 3111 de las condiciones CC; AU 2,5 µg/ml; NP Ag 13,5 nM; AmB 50 µg/ml y; las combinaciones de AU y NP Ag y; NP Ag y AmB. CC: control crecimiento. Las barras de error representan el desvío estándar, * corresponde al $p < 0,05$ entre los tratamientos y el CC, y # corresponde al $p < 0,05$ entre los tratamientos.

Para el análisis de resultados obtenidos en la cuantificación de IF, se considera que se obtuvo un efecto similar en cuanto a la reducción del biofilm, comparado con el efecto obtenido en la microtécnica con CV. Es decir que, se observó el mismo comportamiento de erradicación dadas por las combinaciones ensayadas para la microtécnica con CV e IF.

A partir de las imágenes de MCEL y a través del software COMSTAT, se obtuvieron los parámetros cuantitativos de: biomasa ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$), espesor promedio (μm), Ra^* y distancia de difusión (μm). El CC (biofilm no tratado) de *C. albicans* mostró los siguientes resultados de biomasa: $16,77 \pm 5,45 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$; el espesor promedio: $18,16 \pm 5,33 \mu\text{m}$; el Ra^* : $0,09 \pm 0,04$ y la distancia de difusión: $1,21 \pm 0,96 \mu\text{m}$.

Las NP Ag presentaron una biomasa de $5,45 \pm 1,97 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$, el espesor promedio fue de $5,72 \pm 2,10$ y el Ra^* fue de $1,21 \pm 0,15$, estos resultados fueron diferentes estadísticamente con respecto al biofilm no tratado ($*p < 0,05$). Para el tratamiento con AmB se obtuvo una biomasa de $4,51 \pm 2,21 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$, el espesor promedio fue de $4,97 \pm 2,53 \mu\text{m}$ y el Ra^* fue de $1,17 \pm 0,26$, resultando

significativamente diferentes comparados con el biofilm no tratado (* $p < 0,05$). En relación al tratamiento de combinación NP Ag+AmB se obtuvo una biomasa de $3,80 \pm 0,27 \mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$, el espesor promedio fue de $3,82 \pm 0,40 \mu\text{m}$ y el Ra^* fue de $1,35 \pm 0,09$, y se encontraron diferencias significativas (* $p < 0,05$). En cuanto al parámetro distancia de difusión no se mostraron diferencias estadísticas. Estos resultados dados por el análisis COMSTAT se muestran en la figura 14.

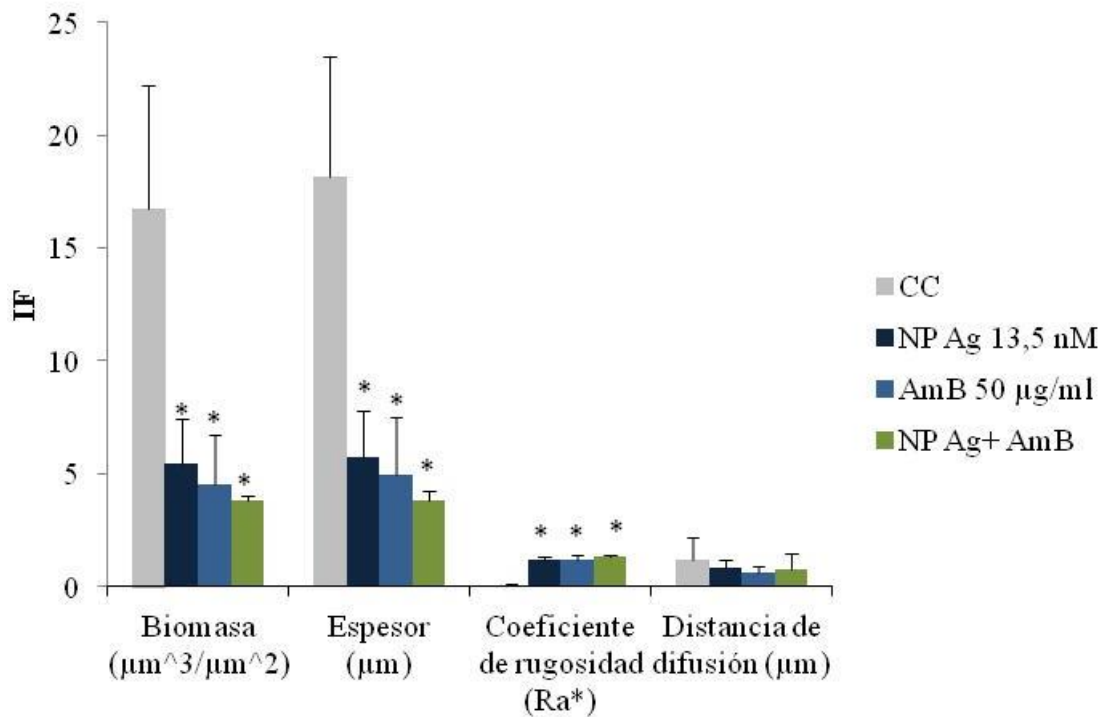


Figura 14. Estudio del efecto ATF de los compuestos NP Ag 13,5 nM, AmB 50 µg/ml y de la combinación de NP Ag y AmB en los biofilms de *C. albicans* SC5314 por análisis COMSTAT. CC: Control de crecimiento. Las barras de error representan el desvío estándar, * indica diferencias significativas con respecto al CC con un $p < 0,05$.

Analizando el parámetro de biomasa y en comparación con el CC, se determinó una reducción 67%, 73% y 77% en las condiciones NP Ag, AmB y NP Ag+AmB, respectivamente. El espesor promedio del biofilm disminuyó un 68% para AmB y las NP Ag, y un 79% para la combinación. En cuanto al Ra^* , presenta un aumento significativo con respecto al CC en las tres condiciones ensayadas. Esto se debe a la acción de los compuestos sobre el espesor promedio de los biofilms, porque al disminuir este parámetro resultó en un aumento de la rugosidad y por lo tanto en un

aumento en el Ra*. En el parámetro distancia de difusión, se observó una disminución en los tratamientos comparados con el CC. Sin embargo, no mostró diferencias significativas. Mediante el análisis de los parámetros cuantitativos se muestra que el tratamiento con AmB, NP Ag y NP Ag+AmB afecta la arquitectura del biofilm de *C. albicans*. Además, estos resultados concuerdan con lo encontrado en el experimento de microtécnica con CV, así como con los resultados arrojados por la cuantificación de la IF.

Por otra parte, el CC de la cepa *C. tropicalis* mostró una biomasa de $22,42 \pm 5,78 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$, el espesor promedio fue de $23,08 \pm 5,23 \mu\text{m}$, el Ra* fue de $0,08 \pm 0,01$ y la distancia de difusión fue de $1,91 \pm 0,09 \mu\text{m}$. El tratamiento con AmB presentó una biomasa de $5,32 \pm 1,30 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$, el espesor promedio fue de $6,58 \pm 0,75 \mu\text{m}$ y el Ra* fue de $1,25 \pm 0,15$; estos resultados fueron significativos (* $p < 0,05$). Para la combinación AU+NP Ag se obtuvo una biomasa de $3,50 \pm 1,32 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$, el espesor promedio fue de $3,64 \pm 1,49 \mu\text{m}$ y el Ra* fue de $1,43 \pm 0,52$, siendo diferentes estadísticamente con respecto al CC (* $p < 0,05$). En el tratamiento de combinación NP Ag+AmB la biomasa fue de $1,44 \pm 0,41 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$, se obtuvo un espesor promedio de $1,50 \pm 0,46 \mu\text{m}$ y el Ra* fue de $1,76 \pm 0,06$, resultando significativamente diferentes con respecto al control y los demás tratamientos (* $p < 0,05$, # $p < 0,05$). En relación al parámetro distancia de difusión se observó una disminución con respecto al CC; no obstante, no se encontraron diferencias estadísticas. En la Figura 15 se muestra los parámetros cuantitativos del biofilm de *C. tropicalis*.

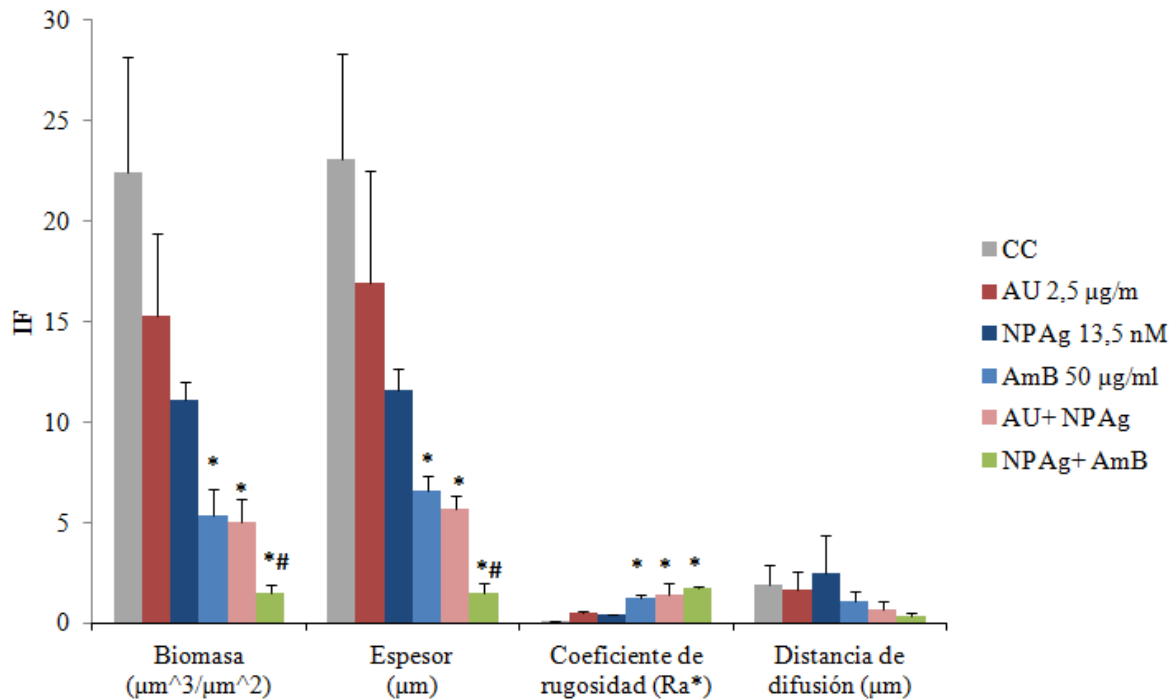


Figura 15. Estudio del efecto ATF de los compuestos AU 2,5 µg/ml, NP Ag 13,5 nM, AmB 50 µg/ml y de las combinaciones de AU y NP Ag y, NP Ag y AmB en los biofilms de *C. tropicalis* NCPF 3111 por análisis COMSTAT. CC: Control de crecimiento, las barras de error representan el desvío estándar, *indica diferencias significativas con respecto al CC $p < 0,05$ y # corresponde al $p < 0,05$ entre los tratamientos.

Las reducciones calculadas dadas por las condiciones ensayadas que se muestran en los parámetros biomasa y espesor fueron similares, para AmB 76% y 72%, respectivamente, AU+NP Ag 84% tanto en biomasa como en espesor y para la combinación NP Ag+AmB se obtuvo una reducción del 94% en los dos parámetros, siendo el tratamiento más efectivo. El Ra* aumentó significativamente en las condiciones ensayadas con respecto al control. Esto ocurre dado que el Ra* se relacionó inversamente con el espesor mostrado por el biofilm, como se explicó para la cepa *C. albicans*. En este caso de cuantificación de los parámetros por COMSTAT se considera que las tendencias de reducción fueron similares con respecto a los ensayos de microtécnica con CV e IF.

Por último, los datos arrojados por este programa permitieron comparar la arquitectura de los biofilms no tratados entre las cepas de este estudio. *C. tropicalis* presentó mayor biomasa que la cepa *C. albicans*. En relación al espesor promedio de



cada biofilm, fue mayor en *C. tropicalis*. Por otro lado, *C. albicans* presentó mayor Ra^* que *C. tropicalis* y con respecto la distancia de difusión que se obtuvo en *C. tropicalis* fue mayor a la obtenida con *C. albicans*.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Muchas especies del género *Candida* son comensales habituales en los humanos. Estos microorganismos que son capaces de convivir como la microbiota del hospedero no provocan ningún daño, hasta que, por alguna razón, el equilibrio del cuerpo es alterado y es entonces cuando se convierten en patógenos. Este cambio es potenciado por factores de virulencia, como lo es la formación del biofilm que presenta una mayor resistencia a los agentes ATF. *Candida* es capaz de colonizar distintas partes del cuerpo humano, entre ellos la piel, tracto respiratorio, gastrointestinal y genitourinario. También los materiales que son de uso clínico para fabricar productos médicos ofrecen una superficie adecuada para la colonización y posterior formación del biofilm (Bujdáková, 2016). *C. albicans* es un patógeno oportunista relevante debido a que las infecciones ocasionadas por biofilms de esta especie presentan alta resistencia a los agentes ATF utilizados en la clínica. También especies de *C. no albicans* han sido reportadas como causantes de infecciones crónicas. Ejemplo de esto es la especie *C. tropicalis* que se ha convertido en un patógeno oportunista emergente (Zuza-Alves, Silva-Rocha y Chaves, 2017).

Existe consenso internacional acerca de la necesidad de generar nuevas moléculas bioactivas de origen natural por parte de la industria farmacéutica, representando una alternativa ventajosa frente al consumo de fármacos convencionales. Hay reportes que presentarían mayor eficacia por su modo de acción complejo, menor probabilidad de generar resistencia y no causar tantos efectos secundarios adversos. Además, en el caso de los fitomedicamentos, son moléculas biodegradables. Por otra parte, el consenso actual es que la resistencia de los biofilms es un fenómeno complejo debido a todos los factores que involucran tanto los mecanismos convencionales y otros correspondientes a la tolerancia a los ATF (Mathé y Van Dijck, 2013; Paraje, 2011; Ramage, et al., 2012). Debido a esta creciente problemática es que se hace urgente la búsqueda de diferentes estrategias que logren una terapia eficaz contra estas estructuras virulentas.

El objetivo general de esta tesina de grado fue aportar conocimientos sobre la utilización de compuestos de origen vegetal y NP obtenidas por síntesis biológica, solos

y combinados con AmB sobre biofilms de *C. albicans* y *C. no albicans* para lograr la erradicación del biofilm. Primero se estudió la actividad ATF del producto natural AU y de las NP Ag, así como también la actividad de AmB sobre células planctónicas de *C. albicans* y *C. tropicalis*, determinando la CIM y la CFM. En segundo lugar, se investigó la actividad antifúngica de AU, NP Ag y AmB sobre la capacidad de erradicación de biofilms maduros de *C. albicans* y *C. tropicalis*. Además, se evaluaron combinaciones de AU, NP Ag y AmB sobre los biofilms maduros. Por último, se analizaron los efectos de los compuestos sobre la morfología, topografía y arquitectura de los biofilms maduros y se compararon los parámetros cuantitativos con respecto al biofilm no tratado y entre las cepas.

Efecto del ácido úsnico, de las nanopartículas de plata obtenidas por síntesis biológica y de Anfotericina B sobre células planctónicas de *Candida*

Concentración inhibitoria mínima del ácido úsnico

En primer lugar, al evaluar la actividad antifúngica del AU se determinó el mismo valor de CIM tanto para *C. albicans* como para *C. tropicalis* y su efecto fue fungicida para ambas cepas de acuerdo con la relación entre CFM y CIM, demostrando una potente actividad inhibitoria en células planctónicas. Otros autores reportan el poder antimicrobiano (Molnár, 2010; Paudel, 2010 y Yilmaz, 2004), incluida la acción antifúngica de este producto de origen vegetal en células planctónicas, encontrando incluso el mismo valor de CIM, como ocurre en Ranković (2012) donde se estudió la actividad antimicótica del AU en una cepa de referencia de *C. albicans*, entre otros microorganismos. Adicionalmente, en células planctónicas de otras especies de *Candida* se reportaron valores similares de CFM para este compuesto (Pires, 2012). Sin embargo, otros estudios observaron que distintas concentraciones de AU no presentaron actividad antifúngica. Este es el caso en el cual se evaluó la susceptibilidad del AU en una cepa de referencia de *C. albicans* a concentraciones entre 50 y 100 µg/ml (Nithyanand, et al., 2015). En otras cepas de *Candida* a las que se le ensayó la actividad de este compuesto

natural tampoco mostraron inhibición, incluso a concentraciones más elevadas que en el estudio antes mencionado (Kvasnickova, Matatkova, Cejkova y Masak, 2015).

Concentración inhibitoria mínima de las nanopartículas de plata obtenidas por síntesis biológica

Hay muchos estudios sobre la actividad antimicrobiana que presentan las NP Ag. Particularmente son de interés aquellos trabajos en los que se estudia NP Ag obtenidas por síntesis biológica debido a su característica de ser respetuosas con el ambiente. En una revisión sobre la actividad de nanoelementos de Ag obtenidas por síntesis biológica, incluidas las NP Ag, se reporta que los nanomateriales que son obtenidos por este tipo de síntesis y que están basados en Ag presentan actividad antimicrobiana. Sin embargo, la mayoría de los estudios utilizan una técnica cualitativa para determinar el efecto antimicrobiano, midiendo la zona de inhibición, y en muchos casos, la concentración del nanomaterial a base de Ag no se informa (Durán, Nakazato y Seabra, 2016). En consecuencia, las comparaciones de la actividad de las NP Ag de síntesis biológica resultan dificultosas.

Con respecto a la actividad de las NP Ag obtenidas por síntesis biológica a partir de *P. expansum* analizadas en este trabajo, la CIM se estableció para la cepa *C. tropicalis* en el orden nM, teniendo un efecto fungicida. En contraste, para la cepa *C. albicans* no se pudo determinar la actividad antifúngica dentro del rango de concentraciones experimentado, demostrando la variabilidad entre especies que ha sido muchas veces reportada (Zuza-Alves, et al., 2017). En estudios similares de susceptibilidad a NP Ag obtenidas por síntesis biológica en cepas de referencia de *Candida* se encontró actividad antifúngica en células planctónicas. Sanguineto, Estevez, Faccio y Alborés (2019) determinaron valores de CIM de NP Ag a partir del hongo *Punctularia atropurpurascens* en el orden pM para una cepa de referencia de *C. albicans* en estado planctónico (Sanguineto, et al., 2019). En otro estudio se encontró que NP Ag sintetizadas a partir de *Fusarium oxysporum* tuvieron actividad antifúngica en células planctónicas de otra cepa de referencia de *C. albicans* (Longhi, et al., 2016).

Concentración inhibitoria mínima de Anfotericina B

En este trabajo se evaluó la actividad antifúngica de AmB, obteniendo un efecto fungicida tanto para la cepa *C. albicans* como para la cepa *C. tropicalis*. Esta acción fungicida es un resultado que confirma la actividad de AmB dado que es un antifúngico de referencia y diferentes formulaciones a partir de AmB, son utilizadas frecuentemente para tratar infecciones fúngicas.

En relación al resultado de CIM obtenido para la cepa *C. tropicalis* NCPF 3111, este coincide con los valores determinados en diferentes cepas de *C. tropicalis* en el estudio realizado por da Silva, 2018. En cuanto a la CIM determinada para AmB en la cepa *C. albicans* SC5314, este mismo valor también fue informado en otra cepa de referencia de *Candida* en una investigación que estudió la actividad intracelular de AmB (Guirao-Abad, et al., 2017). Además, en esa investigación la CIM de AmB para la misma cepa de *C. albicans*, se determinó en una dilución posterior estando dentro del error de la técnica.

Actividad del ácido úsnico, las nanopartículas de plata obtenidas por síntesis biológica y Anfotericina B sobre biofilms de *Candida*: microtécnica con cristal violeta, microscopía óptica y confocal de exploración láser y análisis COMSTAT

En esta tesina se probó la actividad de los compuestos sobre biofilms maduros (48 h) de *C. albicans* y *C. tropicalis* a través de la metodología de microtécnica con CV, y posteriormente, las concentraciones con mayor actividad fueron analizados por microscopía y con el software COMSTAT.

Actividad antifúngica del ácido úsnico

Algunos estudios informan sobre la capacidad antibiofilm del AU contra una variedad de patógenos, tales como *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa* y *C. albicans* (Francolini, 2004; Nithyanand, 2015 y Pompilio, 2013). En esta investigación, el AU no produjo una reducción significativa del biofilm maduro en ninguna de las dos cepas de *Candida* estudiadas, por lo tanto, no se pudo determinar una actividad antibiofilm. Cabe destacar que en los estudios anteriormente referenciados se utilizaron cepas bacterianas

o en el caso de utilizar cepas fúngicas el AU fue testado en biofilms de 24 h, es decir en biofilms tempranos. En cambio, la metodología que se utilizó en el presente estudio requirió que el compuesto actúe sobre estructuras fúngicas maduras (48 h), referenciados como las mayores estructuras de resistencia de comunidades microbianas.

En estudios donde se encontró actividad antibiofilm por parte del AU en biofilms de 48 h como en el caso de Pires (2012) y Peralta (2017), el efecto fue evaluado sobre otras especies de *Candida*. Es importante resaltar que la concentración de AU utilizada en esta tesina es menor comparada con las que se probaron en aquellos estudios, lo que podría explicar el hecho de que el AU no pudiera contrarrestar la resistencia del biofilm. Se ha reportado que, tanto el tiempo de incubación con el ATF, la concentración como la especie evaluada son factores determinantes en cuanto a los resultados que se obtienen (Gomes, da Silva, Pousa, Narvaes y Cury, 2011).

Actividad antifúngica de las nanopartículas obtenidas por síntesis biológica

La evaluación de las NP Ag biosintetizadas contra el biofilm de *C. albicans* mostró un importante porcentaje de erradicación, llegando a reducir la mitad del biofilm. Sin embargo, no se había encontrado un efecto antifúngico en relación a las células planctónicas de esta cepa, lo que podría indicar que estas NP Ag actuarían sobre algún mecanismo propio del biofilm. A su vez, el impacto que tuvieron las NP Ag sobre el biofilm de *C. albicans* fue evidenciado a través del análisis cualitativo de las imágenes obtenidas por la microscopía y el análisis de parámetros arrojados por el software COMSTAT, en donde se muestra un efecto significativo de estas NP Ag. No obstante, las NP Ag no tuvieron el mismo efecto para la otra cepa de *Candida* evaluada, ya que no se encontró una erradicación significativa. Estas NP Ag sintetizadas biológicamente a partir de *P. expansum* no habían sido evaluadas hasta el momento, es decir, no se había explorado su actividad ni en células libres (planctónicas) ni en células sésiles de biofilms, por lo que este trabajo de tesina aporta novedosos y prometedores resultados para continuar su estudio.

Varios estudios informan sobre la actividad contra biofilms iniciales (biofilms a tiempo cero) de NP Ag biosintetizadas (Kamble, et al., 2018; Srinivasan, et al., 2018, Zia, et al., 2018), pero son menos los estudios donde se reportan resultados en relación a

la reducción de biofilms de 48 h. De acuerdo con lo mencionado, en un estudio donde se reportó la inhibición de biofilms maduros bacterianos por parte de NP Ag, estos biofilms fueron tratados a las 24 h de crecimiento (Singh, et al., 2016). En adición, una investigación reciente demostró la actividad antibiofilm de NP Ag biosintetizadas en diferentes cepas de *Candida*, indicando que actúan sobre la matriz de EPS del biofilm. En dicha investigación se encontró el mismo comportamiento que tuvieron las NP Ag en este estudio para la cepa de *C. albicans*, las cuales presentaron un efecto sobre el biofilm, pero no sobre las células planctónicas (Muthamil, Devi, Balasubramaniam, Balamurugan y Pandian, 2018).

Esta tesina aporta resultados relevantes sobre la acción de las NP Ag obtenidas por síntesis biológica contra biofilms maduros de *Candida* (48 h) y debido a la creciente amenaza de la resistencia y la escasez de nuevos agentes antifúngicos, hay gran interés en usar NP metálicas en lugar de, o además de, el fármaco de primera o segunda línea como una nueva estrategia contra el biofilm.

Actividad de Anfotericina B

AmB es un polieno macrocíclico que se usa como el fármaco de elección para tratar muchas infecciones fúngicas invasivas. Sin embargo, debido a que posee una toxicidad renal significativa, en otras, condujo a un uso más limitado (Kaushik, et al., 2018). Esto destaca la importancia que tiene la concentración de AmB cuando se evalúa *in vitro* contra biofilms fúngicos.

Con respecto a lo mencionado anteriormente, AmB a una baja concentración, comparada con las demás concentraciones experimentadas, (100 $\mu\text{g/ml}$ y 200 $\mu\text{g/ml}$), mostró importantes valores de erradicación del biofilm tanto de la cepa *C. albicans* como *C. tropicalis*. Particularmente, la reducción del biofilm de *C. albicans* dada por AmB se comprueba, además, en la microscopía y en los parámetros cuantitativos analizados. En especial, la MCEL permitió visualizar el efecto de AmB sobre las células del biofilm que, comparadas con las células del biofilm no tratado, mostraron tener un menor tamaño lo cual ya ha sido reportado en la literatura. Kuhn, George, Chandra, Mukherjee y Ghannoum (2002) demostraron que formulaciones liposomales de AmB producían biofilms de *C. albicans* con células más pequeñas en comparación con las

células del biofilm no tratado, señalando que presentaban un citoplasma difuso lo que indicaba, de acuerdo con la tinción utilizada en esa investigación, falta de viabilidad y además estas células tenían vacuolas predominantes (Kuhn et al., 2002b).

Además, los parámetros analizados por COMSTAT mostraron una diferencia significativa entre la estructura del biofilm tratado con AmB, respecto del biofilm no tratado. De manera similar, un estudio demuestra que biofilms tratados con fluconazol muestran diferencias en la arquitectura del biofilm de *C. albicans* (Gomes, et al., 2011). Los valores de reducción son similares con los hallados en la tesis doctoral de da Silva (2018) para la misma cepa de referencia de *C. tropicalis* en donde la concentración de 25 µg/ml de AmB redujo a la mitad el biofilm.

Actividad de la combinación del ácido úsnico, de nanopartículas de plata y de Anfotericina B

En la cepa *C. albicans* las combinaciones de los ATF mostraron reducciones del biofilm, pero estos valores no fueron mayores a los encontrados por los compuestos evaluados por separado. Dado que los valores de reducción de las combinaciones de ATF se mantuvieron similares a los encontrados en los compuestos cuando se evaluaron por separado, no se pudo determinar una actividad sinérgica de los compuestos. Es decir que, la combinación no mejoró la erradicación del biofilm de *C. albicans*. Esto se demuestra en las imágenes obtenidas por la microscopía en donde la combinación de NP Ag y AmB no muestra una reducción mayor a la hallada por parte de los compuestos solos. En dichas imágenes los biofilms muestran similitud en su arquitectura, además esto se confirma cuando se comparan los parámetros cuantitativos de las condiciones mencionadas.

Por el contrario, en la cepa *C. tropicalis*, todas las combinaciones (AU+AmB, NP Ag+AmB y AU+NP Ag) mostraron mayor actividad contra el biofilm. Con respecto a esta diferencia de la actividad de los compuestos ensayados en las cepas de *Candida* evaluadas aquí, Seneviratne et al. (2008) señala que las distintas especies de *Candida* difieren desde su capacidad para formar biofilm, su morfología, la producción y composición de la matriz de EPS hasta la resistencia antifúngica. Por lo tanto, la disímil acción antibiofilm encontrada de los compuestos, tanto separados como en

combinación, puede ser entendida por esa característica de pertenecer a especies diferentes (Seneviratne, et al., 2008).

La combinación del compuesto natural AU con las NP Ag sintetizadas biológicamente logró la erradicación del 50% del biofilm, demostrando que estos compuestos juntos mejoran su actividad antibiofilm. Este efecto encontrado tiene especial relevancia dado que los compuestos involucrados provienen de procedimientos amigables con el ambiente, los cuales son cada vez más populares y necesarios. Esta disminución coincide con lo que se muestra en las imágenes obtenidas por microscopía, ya que los compuestos ensayados por separado exponen un biofilm muy parecido al biofilm del control (no tratado), mientras que el AU junto con las NP revelan un biofilm discontinuo y menos denso. En paralelo, se han realizado estudios de combinación entre NP Ag (síntesis química o biológica) y productos naturales contra microorganismos resistentes. Un trabajo que investigó la actividad de NP Ag de síntesis química combinadas con extractos de *Drosera binata* demostró una interacción sinérgica entre las NP Ag y metabolitos secundarios proveniente de la planta carnívora en células planctónicas y en el biofilm de *S. aureus* (Krychowiak, et al., 2014). Otra investigación que indagó sobre la acción de la combinación NP Ag biosintetizadas y aceite esencial de orégano comprobó el efecto sinérgico y aditivo de la combinación frente a cepas bacterianas resistentes a múltiples fármacos (Scandorieiro, et al., 2016).

La combinación entre el AU y AmB mostró una reducción que resultó mayor que la erradicación dada por AmB por separado. En cuanto a esto, se puede evidenciar que el AU mejoró la actividad antifúngica de AmB, logrando una reducción comparable con el efecto de 200 µg/ml (da Silva, 2018), es decir cuatro veces más alta que la concentración utilizada en este estudio. Combinaciones entre ciertos ATF y productos naturales resultan en sinergia según la literatura. Khan y Ahmad (2011) demostraron que compuestos de origen vegetal (fitocompuestos) combinados con fluconazol resultaron en una mayor actividad contra biofilms de *Candida* (Khan, et al., 2011).

La combinación de las NP Ag y AmB resultó en la mayor erradicación encontrada en esta investigación (81%). Esto se evidencia en el impacto que tuvo en la estructura del biofilm analizado por microscopía, el cual pasó de ser un continuo de células compactas (biofilm control) a microcolonias y células aisladas. Dado que AmB por separado no logró una elevada reducción, la combinación con las NP Ag mejoró su

actividad antibiofilm. Diferentes autores observaron resultados similares. En la investigación realizada por Monteiro et al. (2013) se demostró que las NP Ag, obtenidas por síntesis química, junto con nistatina o clorhexidina lograron una mayor disminución en la biomasa del biofilm de *C. albicans* y de *C. glabrata* (Monteiro, et al., 2013). Otro estudio reportó un resultado análogo para NP Ag biosintetizadas y fluconazol, contra biofilms de *C. albicans* resistentes a fluconazol (Longhi et al., 2016).

Se considera que los resultados de combinación con AmB tienen gran relevancia, debido al problema clínico de la resistencia fúngica del biofilm a los fármacos. En los últimos años se ha registrado un importante aumento que, junto con el limitado arsenal de compuestos fungicidas disponibles y su baja toxicidad selectiva, más el aumento de morbi-mortalidad de candidiasis, complica la eficacia de los antifúngicos. Esta estrategia sería una posible alternativa a abordar (Perlin, Rautemaa-Richardson y Alastruey-Izquierdo, 2017). Una mejora de la actividad de los agentes antifúngicos existentes contra los biofilms permitirá reducir su dosis efectiva y, por lo tanto, reducir los posibles efectos secundarios.

Si bien las NP Ag no tuvieron un efecto significativo en el biofilm de *C. tropicalis* cuando se evaluaron por separado, al igual que como se indicó en el estudio de Muthamil et al. (2018), las NP podrían actuar a nivel de la matriz EPS; sin embargo, este efecto no pudo ser reflejado en términos de biomasa del biofilm por lo que no se observó una reducción importante. Contrariamente, cuando se evaluaron en las combinaciones (AU+NP Ag y NP Ag+AmB) las erradicaciones obtenidas fueron significativas; esto se podría entender a través de lo que se ha estudiado previamente sobre la capacidad de retención de antifúngicos que tiene la matriz de EPS (Mohamed, et al., 2014, y Wall, Montelongo-Jauregui, et al., 2019) y dado que las NP Ag estarían afectando dicha matriz, cuando el biofilm fue expuesto a las NP Ag junto con AU y AmB potenciaron la actividad antibiofilm de estos compuestos por diferentes mecanismos de acción. No obstante, son necesarios más estudios para comprender este efecto.

En conclusión, el AU tuvo actividad fungicida en células planctónicas, pero no tuvo efectos significativos sobre los biofilms en ambas cepas de *Candida*. Las NP Ag biosintetizadas presentaron acción fungicida en el estado planctónico de *C. tropicalis* y se obtuvieron erradicaciones significativas en el biofilm de *C. albicans*. Por otro lado,

AmB produjo reducciones importantes en ambos biofilms de *Candida* en relación a la concentración utilizada.

El ensayo de combinación entre el AU y AmB, mostró reducciones del biofilm de la cepa *C. tropicalis* mayores a las encontradas cuando se ensayó el ATF poliénico por separado. Por lo tanto, el AU potenció la actividad antifúngica de AmB.

La combinación entre las NP Ag biosintetizadas y AmB, logró valores de erradicación del biofilm de *C. tropicalis* mayores a los encontrados cuando se evaluó AmB por separado. Consecuentemente las NP Ag biosintetizadas potenciaron la acción del ATF de uso clínico.

La acción antibiofilm que tuvieron el AU, las NP Ag obtenidas por síntesis biológica, AmB y las combinaciones ensayadas en los biofilms de *C. albicans* y *C. tropicalis*, se comprobó mediante el análisis de la estructura del biofilm dada por MCEL y por el análisis COMSTAT. Los compuestos y elementos evaluados afectaron tanto la topografía como la arquitectura del biofilm de *C. albicans* y de *C. tropicalis*.

Por último, tanto el compuesto natural AU como las NP Ag biosintetizadas actúan como agentes antifúngicos, potenciando la actividad antibiofilm de AmB mediante el uso combinado en biofilms maduros de *C. tropicalis*, pudiendo ser una estrategia para el tratamiento de infecciones fúngicas resistentes por la formación de biofilm.



PROYECCIONES

- Estudiar la combinación de AU y AmB en biofilms tempranos (24 h) de ambas especies de *Candida*.
- Investigar el mecanismo de acción de esta combinación a nivel celular en el biofilm de *Candida*.
- Evaluar las NP Ag en biofilms tempranos (24) de ambas especies de *Candida* y la combinación con AmB.
- Determinar el mecanismo de acción de las NP Ag biosintetizadas en biofilms de *Candida*.
- Evaluar el mecanismo por el cual actúa la combinación de NP Ag y AmB.
- Estudiar combinaciones con otros ATF.
- Evaluar el efecto sobre otras especies de *Candida*.
- Realizar estudios de citotoxicidad en células humanas.

REFERENCIAS

Ahmad, N., Bhatnagar, S., Ali, S. S., & Dutta, R. (2015). Phytofabrication of bioinduced silver nanoparticles for biomedical applications. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 7019-7030.

Angel Villegas, N., Baronetti, J., Albesa, I., Etcheverría, A., Becerra, M. C., Padola, N. L., & Paraje, M. G. (2015). Effect of antibiotics on cellular stress generated in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 and non-O157 biofilms. *Toxicology in Vitro*, 29(7), 1692-1700.

Angel Villegas, N., Baronetti, J., Albesa, I., Polifroni, R., Parma, A., Etcheverría, A., ... & Paraje, M. (2013). Relevance of biofilms in the pathogenesis of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* infection. *The Scientific World Journal*, 2013:607258.

Arce Miranda, J. E., Baronetti, J. L., Sotomayor, C. E., & Paraje, M. G. (2017). Oxidative and nitrosative stress responses during macrophage–*Candida albicans* biofilm interaction. *Medical Mycology*, 57(1), 101-113.

Arce Miranda, J., Sotomayor, C., Albesa, I., & Paraje, M. (2011). Oxidative and nitrosative stress in *Staphylococcus aureus* biofilm. *FEMS Microbiology Letters*, 315(1), 23-29.

Bujdáková, H. (2016). Management of *Candida* biofilms: state of knowledge and new options for prevention and eradication. *Future Microbiology*, 11(2), 235-251.

Cao, Y., Dai, B., Wang, Y., Huang, S., Xu, Y., ... & Jiang, Y. (2008). *In vitro* activity of baicalein against *Candida albicans* biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32(1), 73-77.

Cavalheiro, M., & Teixeira, M. C. (2018). *Candida* biofilms: threats, challenges, and promising strategies. *Frontiers in Medicine*, 5: 28.

Centers for Disease Control and Prevention. Preliminary data on the incidence of infection with pathogens. 2007; 56: 336-9

Clinical and Laboratory Standards Institute (2008). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts (M-27A).

Cos, P., Vlietinck, A. J., Berghe, D. V., & Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger *in vitro* 'proof of concept'. *Journal of Ethnopharmacology*, 106(3), 290-302.

Chandra, J., Kuhn, D. M., Mukherjee, P. K., Hoyer, L. L., McCormick, T., & Ghannoum, M. A. (2001). Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *Journal of Bacteriology*, 183(18), 5385-5394.

da Silva, M. A. (2018). Influencia del estrés oxidativo en células sésiles y persistentes de biofilms de *Candida tropicalis* (Tesis doctoral). Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

De Cremer, K., Lanckacker, E., Cools, T. L., Bax, M., De Brucker, K., Cos, P., ... & Thevissen, K. (2015a). Artemisinins, new miconazole potentiators resulting in increased activity against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(1), 421-426.

De Cremer, K., Staes, I., Delattin, N., Cammue, B. P., Thevissen, K., & De Brucker, K. (2015b). Combinatorial drug approaches to tackle *Candida albicans* biofilms. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 13(8), 973-984.

Delattin, N., De Brucker, K., Vandamme, K., Meert, E., Marchand, A., Chaltin, P., ... & Thevissen, K. (2013). Repurposing as a means to increase the activity of amphotericin B and caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(4), 1035-1044.

d'Enfert, C., & Janbon, G. (2016). Biofilm formation in *Candida glabrata*: What have we learnt from functional genomics approaches?. *FEMS Yeast Research*, 2016(1):fov111.

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>

Douglas, L. J. (2003). *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology*, 11(1), 30-36.

Durán, N., Nakazato, G., & Seabra, A. B. (2016). Antimicrobial activity of biogenic silver nanoparticles, and silver chloride nanoparticles: an overview and comments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(15), 6555-6570.

Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623.

Francolini, I., Norris, P., Piozzi, A., Donelli, G., & Stoodley, P. (2004). Usnic acid, a natural antimicrobial agent able to inhibit bacterial biofilm formation on polymer surfaces. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(11), 4360-4365.

Fux, C. A., Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Stoodley, P. (2005). Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in Microbiology*, 13(1), 34-40.

Gomes, P. N., da Silva, W. J., Pousa, C. C., Narvaes, E. A. O., & Cury, A. A. D. B. (2011). Bioactivity and cellular structure of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms grown in the presence of fluconazole. *Archives of Oral Biology*, 56(11), 1274-1281.

Gómez-Garzón, M. (2018). Nanomateriales, nanopartículas y síntesis verde. *Revista Repertorio de Medicina y Cirugía*, 27(2), 75-80.

Guirao-Abad, J. P., Sánchez-Fresneda, R., Albuquerque, B., Hernández, J. A., & Argüelles, J. C. (2017). ROS formation is a differential contributory factor to the fungicidal action of amphotericin B and micafungin in *Candida albicans*. *International Journal of Medical Microbiology*, 307(4-5), 241-248.

Habash, M. B., Park, A. J., Vis, E. C., Harris, R. J., & Khursigara, C. M. (2014). Synergy of silver nanoparticles and aztreonam against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(10), 5818-5830.

Hafidh, R. R., Abdulmir, A. S., Vern, L. S., Bakar, F. A., Abas, F., Jahanshiri, F., & Sekawi, Z. (2011). Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. *The Open Microbiology Journal*, 5, 96-106.

Hajipour, M. J., Fromm, K. M., Ashkarran, A. A., de Aberasturi, D. J., de Larramendi, I. R., Rojo, T., ... & Mahmoudi, M. (2012). Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, 30(10), 499-511.

Hawksworth, D. L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1· 5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, 105(12), 1422-1432.

Heydorn, A., Nielsen, A. T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersbøll, B. K., & Molin, S. (2000). Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology*, 146(10), 2395-2407.

Hirota, K., Yumoto, H., Sapaar, B., Matsuo, T., Ichikawa, T., & Miyake, Y. (2017). Pathogenic factors in *Candida* biofilm-related infectious diseases. *Journal of Applied Microbiology*, 122(2), 321-330.

Hospenthal, D. R., Beckius, M. L., Floyd, K. L., Horvath, L. L., & Murray, C. K. (2006). Presumptive identification of *Candida* species other than *C. albicans*, *C. krusei*, and *C. tropicalis* with the chromogenic medium CHROMagar *Candida*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 5(1), 1.

Íñigo, M., & Del Pozo, J. L. (2018). Fungal biofilms: from bench to bedside. *Sociedad Española de Quimioterapia*, 31, 35-38.

Jitsurong, S., Kiamsiri, S., & Pattararangrong, N. (1993). New milk medium for germ tube and chlamydoconidia production by *Candida albicans*. *Mycopathologia*, 123(2), 95-98.

Kamble, S. P., & Shinde, K. D. (2018). Anti-biofilm activity against gram-positive bacteria by biologically synthesized silver nanoparticles using *Curcuma longa*. *Pharmaceutical Nanotechnology*, 6(3), 165-170.

Karygianni, L., Al-Ahmad, A., Argyropoulou, A., Hellwig, E., Anderson, A. C., & Skaltsounis, A. L. (2016). Natural antimicrobials and oral microorganisms: a systematic review on herbal interventions for the eradication of multispecies oral biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 6:1529.

Katva, S., Das, S., Moti, H. S., Jyoti, A., & Kaushik, S. (2017). Antibacterial synergy of silver nanoparticles with gentamicin and chloramphenicol against *Enterococcus faecalis*. *Pharmacognosy Magazine*, 13(4), 828-833.

Kaushik, A., & Kest, H. (2018). The role of antifungals in pediatric critical care invasive fungal infections. *Critical Care Research and Practice*, 2018; 8469585.

Khan, M. S. A., & Ahmad, I. (2011). Antibiofilm activity of certain phytocompounds and their synergy with fluconazole against *Candida albicans* biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(3), 618-621.

Krychowiak, M., Grinholc, M., Banasiuk, R., Krauze-Baranowska, M., Glód, D., Kawiak, A., & Królicka, A. (2014). Combination of silver nanoparticles and *Drosera binata* extract as a possible alternative for antibiotic treatment of burn wound infections caused by resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*, 9(12), e115727.

Kuhn, D. M., Chandra, J., Mukherjee, P. K., & Ghannoum, M. A. (2002a). Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infection and Immunity*, 70(2), 878-888.

Kuhn, D. M., George, T., Chandra, J., Mukherjee, P. K., & Ghannoum, M. A. (2002b). Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(6), 1773-1780.

Kusch, H., Engelmann, S., Albrecht, D., Morschhäuser, J., & Hecker, M. (2007). Proteomic analysis of the oxidative stress response in *Candida albicans*. *Proteomics*, 7(5), 686-697.

Kvasnickova, E., Matatkova, O., Cejkova, A., & Masak, J. (2015). Evaluation of baicalein, chitosan and usnic acid effect on *Candida parapsilosis* and *Candida krusei* biofilm using a Cellavista device. *Journal of Microbiological Methods*, 118, 106-112.

Lewis, K. (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(4), 999-1007.

Lewis, K. (2010). Persister cells. *Annual Review of Microbiology*, 64, 357-372.

Lim, C. Y., Rosli, R., Seow, H. F., & Chong, P. P. (2012). *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31(1), 21-31.

Liu, Y., Shi, L., Su, L., van der Mei, H. C., Jutte, P. C., Ren, Y., & Busscher, H. J. (2019). Nanotechnology-based antimicrobials and delivery systems for biofilm-infection control. *Chemical Society Reviews*, 48(2), 428-446.

Lohse, M. B., Gulati, M., Johnson, A. D., & Nobile, C. J. (2018). Development and regulation of single-and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 16(1), 19-31.

Longhi, C., Santos, J. P., Morey, A. T., Marcato, P. D., Durán, N., Pinge-Filho, P., ... & Yamauchi, L. M. (2016). Combination of fluconazole with silver nanoparticles produced by *Fusarium oxysporum* improves antifungal effect against planktonic cells and biofilm of drug-resistant *Candida albicans*. *Sabouraudia*, 54(4), 428-432.

Lu, M., Li, T., Wan, J., Li, X., Yuan, L., & Sun, S. (2017). Antifungal effects of phytocompounds on *Candida* species alone and in combination with fluconazole. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49(2), 125-136.

Marioni, J., Arce, J. E., Cabrera, J. L., Paraje, M. G., & Núñez Montoya, S. C. (2016a). Reduction of *Candida tropicalis* biofilm by photoactivation of a *Heterophyllaea pustulata* extract. *Pharmaceutical Biology*, 54(12), 2791-2801.

Marioni, J., Bresolí-Obach, R., Agut, M., Comini, L. R., Cabrera, J. L., Paraje, M. G., & ... Montoya, S. C. N. (2017). On the mechanism of *Candida tropicalis* biofilm reduction by the combined action of naturally-occurring anthraquinones and blue light. *PloS One*, 12(7) e0181517.

Marioni, J., da Silva, M., Cabrera, J., Montoya, S., & Paraje, M. (2016b). The anthraquinones rubiadin and its 1-methyl ether isolated from *Heterophyllaea pustulata* reduces *Candida tropicalis* biofilms formation. *Phytomedicine*, 23(12), 1321-1328.

Mathé, L., & Van Dijck, P. (2013). Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. *Current Genetics*, 59(4), 251-264.

Mavridou, E., Meletiadiis, J., Rijs, A., Mouton, J. W., & Verweij, P. E. (2015). The strength of synergistic interaction between posaconazole and caspofungin depends on the underlying azole resistance mechanism of *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(3), 1738-1744.

Mohamed, B. S. R., Subramanian, M., & Shunmugiah, K. P. (2014). Inhibition of *Candida albicans* virulence factors by novel levofloxacin derivatives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(15), 6775-6785.

Molnár, K., & Farkas, E. (2010). Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 65(3-4), 157-173.

Monteiro, D. R., Silva, S., Negri, M., Gorup, L. F., de Camargo, E. R., Oliveira, R., ... & Henriques, M. (2013). Antifungal activity of silver nanoparticles in combination with nystatin and chlorhexidine digluconate against *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Mycoses*, 56(6), 672-680.

Muthamil, S., Devi, V. A., Balasubramaniam, B., Balamurugan, K., & Pandian, S. K. (2018). Green synthesized silver nanoparticles demonstrating enhanced in vitro and in vivo antibiofilm activity against *Candida spp.* *Journal of Basic Microbiology*, 58(4), 343-357.

Natan, M., & Banin, E. (2017). From Nano to Micro: using nanotechnology to combat microorganisms and their multidrug resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 302-322.

Niimi, K., Harding, D. R. K., Parshot, R., King, A., Lun, D. J., Decottignies, A., ... & Monk, B. C. (2004). Chemosensitization of fluconazole resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and pathogenic fungi by a D-octapeptide derivative. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(4), 1256-1271.

Nithyanand, P., Shafreen, R. M. B., Muthamil, S., & Pandian, S. K. (2015). Usnic acid inhibits biofilm formation and virulent morphological traits of *Candida albicans*. *Microbiological Research*, 179, 20-28.

Odds, F. C. (2003). Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(1), 1-1.

O'Toole, G., & Kolter, R. (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology*, 28(3), 449-461.

Papon, N., Courdavault, V., Clastre, M., & Bennett, R. J. (2013). Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. *PLoS Pathogens*, 9(9), e1003550.

Paraje, M. G. (2010). Confocal scanning laser microscopy in the study of biofilm formation in tissues of the upper airway in otolaryngologic diseases. Microscopy: Science, Technology, Applications and Education. Editors: A. Méndez-Vilas and J. Díaz. *Formatex Research Center*, 1, 590-596.

Paraje, M. G. (2011). Antimicrobial resistance in biofilms. *Science Against Microbial Pathogens: communicating current research and technological advances*, 2, 736-734.

Paraje, M. G., Correa, S. G., Albesa, I., & Sotomayor, C. E. (2009). Lipase of *Candida albicans* induces activation of NADPH oxidase and L-arginine pathways on resting and activated macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 390(2), 263-268.

Paraje, M. G., Correa, S. G., Renna, M. S., Theumer, M., & Sotomayor, C. E. (2008). *Candida albicans*-secreted lipase induces injury and steatosis in immune and parenchymal cells. *Canadian Journal of Microbiology*, 54(8), 647-659.

Pardi, G., & Cardozo, E. I. (2002). Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal. *Acta Odontológica Venezolana*, 40(1), 9-17.

Paudel, B., Bhattarai, H. D., Lee, H. K., Oh, H., Shin, H. W., & Yim, J. H. (2010). Antibacterial activities of *Ramalin*, usnic acid and its three derivatives isolated from the Antarctic lichen *Ramalina terebrata*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 65(12), 34-38.

Pelgrift, R. Y., & Friedman, A. J. (2013). Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(13-14), 1803-1815.

Peralta, M. A., da Silva, M. A., Ortega, M. G., Cabrera, J. L., & Paraje, M. G. (2015). Antifungal activity of a prenylated flavonoid from *Dalea elegans* against *Candida albicans* biofilms. *Phytomedicine*, 22(11), 975-980.

Peralta, M. A., Da Silva, M. A., Ortega, M. G., Cabrera, J. L., & Paraje, M. G. (2017). Usnic acid activity on oxidative and nitrosative stress of azole-resistant *Candida albicans* biofilm. *Planta Medica*, 83(03/04), 326-333.

Peralta, M. A., Ortega, M. G., Cabrera, J. L., & Paraje, M. G. (2018). The antioxidant activity of a prenyl flavonoid alters its antifungal toxicity on *Candida albicans* biofilms. *Food and Chemical Toxicology*, (114) 285-291.

Perlin, D. S., Rautemaa-Richardson, R., & Alastruey-Izquierdo, A. (2017). The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(12), e383-e392.

Pires, R. H., Lucarini, R., & Mendes-Giannini, M. J. S. (2012). Effect of usnic acid on *Candida orthopsilosis* and *C. parapsilosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(1), 595-597.

Pompilio, A., Pomponio, S., Di Vincenzo, V., Crocetta, V., Nicoletti, M., Piovano, M., ... & Di Bonaventura, G. (2013). Antimicrobial and antibiofilm activity of secondary metabolites of lichens against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from cystic fibrosis patients. *Future Microbiology*, 8(2), 281-292.

Quinteros, M. A., Aiassa Martínez, I. M., Dalmasso, P. R., & Páez, P. L. (2016). Silver nanoparticles: biosynthesis using an ATCC reference strain of *Pseudomonas aeruginosa* and activity as broad spectrum clinical antibacterial agents. *International Journal of Biomaterials*, 2016: 5971047.

Quinteros, M. A., Viviana, C. A., Onnainty, R., Mary, V. S., Theumer, M. G., Granero, G. E., ... & Páez, P. L. (2018). Biosynthesized silver nanoparticles: Decoding their mechanism of action in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 104, 87-93.

Ramage, G., Rajendran, R., Sherry, L., & Williams, C. (2012). Fungal biofilm resistance. *International Journal of Microbiology*, 2012:528521.

Ramalingam, B., Parandhaman, T., & Das, S. K. (2016). Antibacterial effects of biosynthesized silver nanoparticles on surface ultrastructure and nanomechanical properties of gram-negative bacteria viz. *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(7), 4963-4976.

Ranković, B., Kosanić, M., Stanojković, T., Vasiljević, P., & Manojlović, N. (2012). Biological activities of *Toninia candida* and *Usnea barbata* together with their norstictic acid and usnic acid constituents. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11), 14707-14722.

Renna, M. S., Correa, S. G., Porporatto, C., Figueredo, C. M., Aoki, M. P., Paraje, M. G., & Sotomayor, C. E. (2006). Hepatocellular apoptosis during *Candida albicans* colonization: involvement of TNF- α and infiltrating Fas-L positive lymphocytes. *International Immunology*, 18(12), 1719-1728.

Sanguiñedo, P., Estevez, M. B., Faccio, R., & Alborés, S. (2019). Nanopartículas de plata biogénicas a partir del hongo *Punctularia atropurpurascens* para el control de microorganismos. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología*, 12(22), 1e-10e.

Saratale, R. G., Karuppusamy, I., Saratale, G. D., Pugazhendhi, A., Kumar, G., Park, Y., ... & Shin, H. S. (2018). A comprehensive review on green nanomaterials using biological systems: Recent perception and their future applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 170, 20-35.

Scandorieiro, S., de Camargo, L. C., Lancheros, C. A., Yamada-Ogatta, S. F., Nakamura, C. V., de Oliveira, A. G., ... & Kobayashi, R. K. (2016). Synergistic and additive effect of oregano essential oil and biological silver nanoparticles against multidrug-resistant bacterial strains. *Frontiers in Microbiology*, 7, 760.

Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671-675.

Seneviratne, C. J., Jin, L., & Samaranyake, L. P. (2008). Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral Diseases*, 14(7), 582-590.

Serpa, R., França, E. J., Furlaneto-Maia, L., Andrade, C. G., Diniz, A., & Furlaneto, M. C. (2012). In vitro antifungal activity of the flavonoid baicalein against *Candida* species. *Journal of Medical Microbiology*, 61(12), 1704-1708.

Sherry, L., Rajendran, R., Lappin, D. F., Borghi, E., Perdoni, F., Falleni, M., ... & Nile, C. J. (2014). Biofilms formed by *Candida albicans* bloodstream isolates display phenotypic and transcriptional heterogeneity that are associated with resistance and pathogenicity. *BMC Microbiology*, 14:182.

Silva, S., Henriques, M., Martins, A., Oliveira, R., Williams, D., & Azeredo, J. (2009). Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Sabouraudia*, 47(7), 681-689.

Singh, P., Kim, Y. J., Wang, C., Mathiyalagan, R., El-Agamy Farh, M., & Yang, D. C. (2016). Biogenic silver and gold nanoparticles synthesized using red ginseng root extract, and their applications. *Artificial cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44(3), 811-816.

Srinivasan, R., Vigneshwari, L., Rajavel, T., Durgadevi, R., Kannappan, A., Balamurugan, K., ... & Ravi, A. V. (2018). Biogenic synthesis of silver nanoparticles using *Piper betle* aqueous extract and evaluation of its anti-quorum sensing and antibiofilm potential against uropathogens with cytotoxic effects: an *in vitro* and *in vivo* approach. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(11), 10538-10554.

Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., & Svabic-Vlahovic, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175-179.

Stewart, P. S. (2012). Mini-review: convection around biofilms. *Biofouling*, 28(2), 187-198.

Taff, H. T., Mitchell, K. F., Edward, J. A., & Andes, D. R. (2013). Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiology*, 8(10), 1325-1337.

Tanzil, A. H., Sultana, S. T., Saunders, S. R., Shi, L., Marsili, E., & Beyenal, H. (2016). Biological synthesis of nanoparticles in biofilms. *Enzyme and Microbial Technology*, 95, 4-12.

Torrado, J. J., Espada, R., Ballesteros, M. P., & Torrado-Santiago, S. (2008). Amphotericin B formulations and drug targeting. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(7), 2405-2425.

Trofa, D., Gácsér, A., & Nosanchuk, J. D. (2008). *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(4), 606-625.

Uppuluri, P., Nett, J., Heitman, J., & Andes, D. (2008). Synergistic effect of calcineurin inhibitors and fluconazole against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(3), 1127-1132.

Vorregaard, M. (2008). Comstat2-a modern 3D image analysis environment for biofilms (Master's thesis, Technical University of Denmark, DTU, DK-2800 Kgs. Lyngby, Denmark). www.comstat.dk

Wang, C., Cheng, H., Zhang, X., Xu, S., Guan, Y., Yu, L., & Yun, Y. (2010). In vitro activity of baicalin against non-*albicans Candida* biofilms. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 35(5), 639-641.

Wang, L., Hu, C., & Shao, L. (2017). The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 1227–1249.

Wall, G., Montelongo-Jauregui, D., Bonifacio, B. V., Lopez-Ribot, J. L., & Uppuluri, P. (2019). *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, 52, 1-6.

Yılmaz, M., Türk, A. Ö., Tay, T., & Kıvanç, M. (2004). The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cladonia foliacea* and its (–)-usnic acid, atranorin, and fumarprotocetraric acid constituents. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 59(3-4), 249-254.

Zhou, X., Westman, R., Hickey, R., Hansmann, M. A., Kennedy, C., Osborn, T. W., & Forney, L. J. (2009). Vaginal microbiota of women with frequent vulvovaginal candidiasis. *Infection and Immunity*, 77(9), 4130-4135.

Zia, G., Sadia, H., Nazir, S., Ejaz, K., Ali, S., Iqbal, T., ... & Andleeb, S. (2018). In vitro studies on cytotoxic, DNA protecting, antibiofilm and antibacterial effects of

biogenic silver nanoparticles prepared with *Bergenia ciliata* rhizome extract. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 19(1), 68-78.

Zuza-Alves, D. L., Silva-Rocha, W. P., & Chaves, G. M. (2017). An update on *Candida tropicalis* based on basic and clinical approaches. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1927.

PRESENTACIONES A CONGRESOS

**NANOPARTÍCULAS DE PLATA BIOSINTETIZADAS CON
ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA SOBRE BIOFILM DE *CANDIDA
TROPICALIS***

Autores: Vanina Veas, Ivana L.D. Galera, M. Belén Estevez Vidal, Silvana Alborés, Paulina L. Páez y María G. Paraje.

**CUANTIFICACIÓN POR MICROSCOPIA CONFOCAL DE
EXPLORACIÓN LASER DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA
PRODUCIDA POR NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOBRE BIOFILM
FÚNGICO**

Autores: Vanina Veas, Melisa de los A. Quinteros, M. Belén Estévez Vidal, Silvana Alborés, Paulina L. Páez y María G. Paraje.

Aceptados para su presentación en el XV Congreso Argentino de Microbiología (CAM) junto con: XIV Congreso Sociedad Argentina de Microbiología General (SAMIGE); V Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos (CAMA); V Congreso Latinoamericano de Microbiología de Medicamentos y Cosméticos (CLAMME) a realizarse los días miércoles 25 al viernes 27 de septiembre de 2019, en Golden Center Eventos, Int. Cantilo y Int. Güiraldes s/n, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.