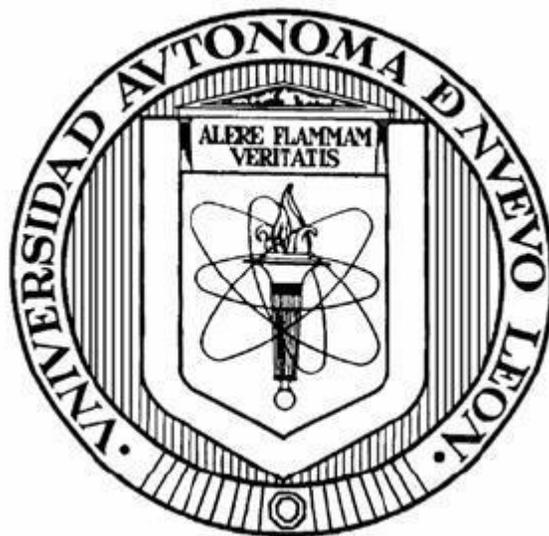


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**EVALUACIÓN BIOLÓGICA *in vitro* DE COMPUESTOS DERIVADOS DE
AZOL SOBRE AGENTES FUNGICOS**

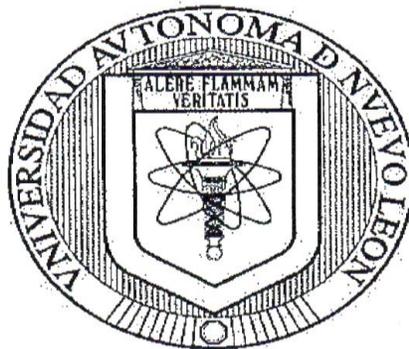
POR

MVZ. PEDRO FÉLIX PIÑA

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

JULIO, 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

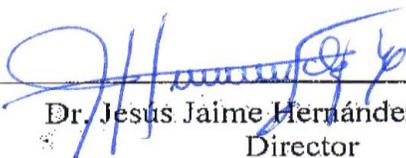


EVALUACIÓN BIOLÓGICA *in vitro* DE COMPUESTOS DERIVADOS
DE AZOL SOBRE AGENTES FUNGICOS

Aprobación de tesis por el comité particular de

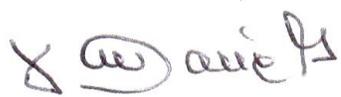
Pedro Félix Piña

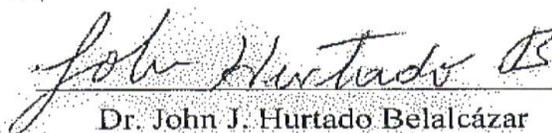
Dirección de Tesis


Dr. Jesús Jaime Hernández Escareño
Director


Dra. Karina W. Vázquez Cisneros
Co-Director


Dra. Diana Elisa Ávila Zamora
Co-Director


Dr. Alfredo Wong González
Co-Director


Dr. John J. Hurtado Belalcázar
Director externo

AGRADECIMIENTOS

A través de estas líneas me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que con su inestimable apoyo han colaborado en la realización de este proyecto de investigación.

En primer lugar, quiero agradecer a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) por abrirme sus puertas y permitirme trabajar en conjunto con todos ustedes. Sin su ayuda nada de esto hubiera sido posible.

Muy especialmente a mi director de tesis, el Dr. Jesús Jaime Hernández Escareño, que, con su gran calidad científica y humana, me acogió en su equipo de trabajo. Le agradezco sinceramente su confianza y todo el apoyo que me brindó. Logro guiarme durante todo este camino con sus consejos y ánimos y por eso siempre le estaré agradecido.

A la Dra. Karina W. Vázquez Cisneros por haberme orientado en todos los momentos que necesite de su ayuda. Gracias doctora por todo el interés mostrado en mi y su gran colaboración en cada paso de este proyecto.

Al Dr. John Hurtado Belalcázar de la Universidad de los Andes por su colaboración y aportación material. Sin ella no existiría este proyecto.

Un agradecimiento muy especial para el Departamento de Microbiología de la FMVZ-UANL por haber puesto a mi disposición todo su tiempo y material necesario para la realización de cada ensayo.

Al Departamento de Inmunología de la FMVZ-UANL, especialmente al Dr. Uziel Castillo Velázquez por su ayuda y colaboración en todos los ensayos de citotoxicidad.

Mi más sincero agradecimiento a la Pontificia Universidad Católica de Chile por permitirme realizar una estancia en sus instalaciones. Especialmente al Dr. Cristian Salas S. quien me ayudó en todo el proceso de adaptación. Gracias doctor por todos sus consejos y permitirme conocer un poco de su mundo.

Al Dr. Alberto Gómez Treviño de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL por brindarme su apoyo y conocimiento. Aunque fue breve me encanto trabajar con usted, gracias.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) por la ayuda económica brindada. Gracias por depositar su confianza en mí.

Me gustaría agradecer a mis compañeras de maestría Ana, Karina, Alicia, Lilian, Itzel, Mónica, Jessica y Helena por haberme acompañado en este proceso con su amistad, consejos e interés por mi trabajo. En especial a ti Ana, que has sido mi compañera de vida. Faltarían palabras para agradecer todo lo que has hecho por mí. Sin ti yo no estaría donde estoy.

Finalmente, agradezco a todas aquellas personas que de una manera u otra me ayudaron en la realización de este trabajo. Tal vez su nombre no aparezca, pero tienen mi más sincera gratitud.

A todos, gracias.

DEDICATORIAS

A Dios, por no dejarme caer, por darme fuerza para continuar y ayudarme a nunca perder la fe.

A mis padres, especialmente a ti mamá, que siempre has estado a mi lado, ayudándome en cada paso que doy hacia mi futuro, sosteniéndome y a la vez dejándome libre.

A mis hermanas, Dulce, Jaque y María, por ser un apoyo incondicional y causa de alegría en mí vida.

A mi pareja Ana, por darme el privilegio de sentir su amor cada día.

ÍNDICE

COMITÉ DE TESIS.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
DEDICATORIAS.....	IV
ÍNDICE.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	X
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT.....	XII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Micología médica.....	3
2.1.1 Generalidades de los hongos	4
2.1.2 Estructura de los hongos.....	6
2.1.3 Nutrición y metabolismo	9
2.1.4 Reproducción	10
2.2 Agentes antifúngicos	13
2.5.1 Clasificación	13
2.2.2 Mecanismos de acción	14
2.5.3 Azoles	14
2.5.4 Alilaminas	15
2.5.5 Lipopéptidos	16
2.5.6 Fluoropirimidas	16

2.5.7 Polienos	18
2.3 Complejos metálicos en la farmacología	18
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. HIPÓTESIS.....	21
5. OBJETIVO DEL TRABAJO	22
5.1 Objetivo general	22
5.2 Objetivos específicos	22
6. MATERIAL Y METODOS	23
6.1 Lugar de trabajo	23
6.2 Material biológico	23
6.3 Preparación de solución stock	23
6.4 Determinación actividad antifúngica	26
6.5 Medicamentos estándar de referencia	27
6.6 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	27
6.7 Viabilidad en placa para agentes fúngicos	29
6.8 Determinación de viabilidad celular	29
6.8.1 Determinación de la viabilidad celular mediante ensayo de MTT.....	29
6.8.2 Determinación de la viabilidad celular mediante ensayo rojo neutro	30
7. RESULTADOS	32
7.1 Determinación de la actividad antifúngica	32
7.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	34
7.3 Viabilidad en placa para agentes fúngicos	34
7.4 Determinación de citotoxicidad celular	36

7.4.1 Determinación de la citotoxicidad celular en macrófagos murinos J774A.1 (ATCC® TIB-67) mediante ensayo de MTT	36
7.4.2 Determinación de la citotoxicidad celular en células MDBK (NBL-1) (ATCC® CCL-22™) mediante ensayo de MTT	36
7.4.3 Determinación de la citotoxicidad celular en células VERO E6 (ATCC® CRL-1586™) mediante ensayo de MTT	37
7.4.4 Determinación de la citotoxicidad celular en hepatocitos BpRc1 (ATCC® CRL-2217™) mediante ensayo rojo neutro	38
8. DISCUSIÓN	40
9. CONCLUSIONES	42
10. BIBLIOGRAFÍA	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 01. Clasificación de agentes antifúngicos por estructura.....	13
Tabla 02. Clasificación de los antifúngicos por su sitio de acción en el hongo	14
Tabla 03. Criterios de interpretación para determinar la actividad antifúngica	27
Tabla 04. Actividad antifúngica presentada por los ligandos de azol y los complejos metálicos derivados de azol	33
Tabla 05. Actividad antifúngica presentada por los compuestos policíclicos sin núcleo metálico derivados de azol	33
Tabla 06. CMI 50 de compuestos y medicamentos de referencia.....	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Complejos metálicos derivados de ligandos azoles	24
Figura 2. Compuestos azólicos policíclicos sin núcleo metálico	25
Figura 3. Ligandos de azol	26
Figura 4. Preparación de diluciones seriadas	28
Figura 5. Preparación de placa de 96 pocillos para determinación de la concentración mínima inhibitoria	28
Figura 6. Diagrama de distribución de placa de 96 para ensayo de viabilidad celular por MTT.....	30
Figura 7. Diagrama de distribución de placa de 96 para ensayo de viabilidad celular mediante rojo neutro	31
Figura 8. Zonas de inhibición de complejos metálicos contra <i>C. albicans</i> (izquierda) y <i>M. pachydermatis</i> (derecha)	32
Figura 9. Variación a lo largo del tiempo para <i>M. pachydermatis</i> en ausencia / presencia de los compuestos probados.....	35
Figura 10. Variación a lo largo del tiempo para <i>C. tropicalis</i> en ausencia / presencia de los compuestos probados	35
Figura 11. Porcentaje de citotoxicidad en macrófagos murinos J774A.1	36
Figura 12. Porcentaje de citotoxicidad en células MDBK (NBL-1)	37
Figura 13. Porcentaje de citotoxicidad en células VERO E6	38
Figura 14. Porcentaje de citotoxicidad en hepatocitos BpRc1	39

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ADS	Agar dextrosa de Sabouraud
S	Azufre
Br	Bromo
Cl	Cloro
Co	Cobalto
Cu	Cobre
IC ₅₀	Concentración inhibitoria del 50%
CIM	Concentración mínima inhibitoria
DMSO	Dimetilsulfoxido
LD ₅₀	Dosis letal del 50%
SD	Fármaco estándar
FLZ	Fluconazol
F	Flúor
H	Hidrogeno
ITZ	Itraconazol
KTZ	Ketoconazol
MDBK	Células de riñón bovino Madin Darby
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µm	Micromolar
Ni	Níquel
N	Nitrógeno
Pm	Peso molecular
PBS	Solución amortiguadora fosfato salino
UFC	Unidades formadoras de colonias
VCZ	Voriconazol
Zn	Zinc

RESUMEN

Actualmente, tanto el incremento de micosis oportunistas como la resistencia a los antimicóticos convencionales han fomentado la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas que logren minimizar la problemática actual. En este contexto, fungicidas derivados del grupo azol, han sido pieza clave desde su aparición para el estudio de nuevos compuestos. Por ello, el presente estudio evaluó el efecto antifúngico *in vitro* de compuestos derivados de azol mediante técnicas de difusión en pocillos de agar frente a nueve cepas fúngicas; así como también, se determinó la posible toxicidad de estos compuestos mediante los ensayos MTT y rojo neutro. En su mayoría, las especies fúngicas presentaron resistencia a los tratamientos con estos compuestos. Sin embargo, el complejo PF-6 mostró una buena actividad frente a levaduras. En lo que respecta a los ensayos de citotoxicidad, los resultados mostraron una tendencia lineal en cuanto a concentración/dosis, siendo así que, a menor concentración, menor grado de mortalidad celular.

Palabras Claves: Azol, complejos metálicos, micosis, antifúngico, actividad biológica.

ABSTRACT

Currently, both the increase in opportunistic mycoses and resistance to conventional antifungals have encouraged the search for new therapeutic alternatives that minimize the current problem. In this context, fungicides derived from the azol group have been a key piece since its inception for the study of new compounds. Therefore, the present study evaluated the *in vitro* antifungal effect of compounds derived from azol by diffusion techniques in agar wells against nine fungal strains; as well as, the possible toxicity of these compounds was determined by the MTT and neutral red tests. For the most part, fungal species showed resistance to treatments with these compounds. However, the PF-6 complex showed a good activity against yeasts. With regard to cytotoxicity tests, the results showed a linear trend in terms of concentration / dose, thus, at a lower concentration, lower degree of cell mortality.

Keywords: Azol, metal complexes, mycosis, antifungal, biological activity.

1. INTRODUCCION

En los últimos años, las infecciones fúngicas han producido cambios llamativos en cuanto a datos epidemiológicos, diagnóstico, pronóstico y tratamiento. Un hecho particularmente favorecido por la creciente prevalencia de pacientes inmunocomprometidos y el uso irrestricto de agentes inmunosupresores (Sadeghpour *et al.*, 2017; Cabral *et al.*, 2013). A su vez, esto ha ocasionado el aumento del uso de fungicidas como un componente clave para la profilaxis y terapia de muchas infecciones fúngicas. Entre los diversos tipos de fungicidas, el grupo azol (derivados de triazol e imidazol) se introdujo por primera vez en la década de 1970 (Ma, 2005). Desde entonces, los azoles, se han utilizado ampliamente para el control de enfermedades, tanto en la medicina veterinaria como humana. Sin embargo, estudios han demostrado que estos compuestos son propensos a la resistencia en la población patogénica, especialmente sin el seguimiento de las prácticas recomendadas que tienen como objetivo prolongar la efectividad de estos fungicidas (Ribas *et al.*, 2016).

Actualmente, el número de microorganismos capaces de generar resistencia a los fármacos antifúngicos azólicos ha incrementado de manera progresiva (López *et al.*, 2016). Especies como *Candida albicans* y *Aspergillus niger*, patógenos comúnmente asociados con infecciones hospitalarias y adquiridas, han presentado un historial de resistencia cruzada y resistencia múltiple a estos compuestos (Carvalho *et al.*, 2017). De forma similar, se observó resistencia en organismos como *Malassezia pachydermatis*, causante de otitis externa en perros y cuadros dermatológicos en humanos (Marín *et al.*, 2016; López *et al.* 2008). Por otro lado, la resistencia de patógenos no es la única problemática hoy en día, sino también, el uso prolongado de estos compuestos. Entre los fármacos de mayor elección para las infecciones sistémicas es el ketoconazol e itraconazol, los cuales, en amplios periodos de aplicación, pueden generar efectos adversos como vómitos, diarrea y anorexia, además de ser hepatotóxicos (Madison, 2008). Enfermedades zoonóticas causadas por *Microsporium canis* y *Rhodotorula spp.* entre muchas otras que basan su tratamiento en el uso de este tipo de fármacos han presentado este tipo de complicaciones (Dentone *et al.*, 2017).

En las últimas décadas, el desarrollo de nuevos fármacos antifúngicos ha sido rebasado en comparación al desarrollo de fármacos antibacterianos y antivirales dentro de la industria farmacológica. Esto debido a la poca relevancia que se tiene de las enfermedades fúngicas y la dificultad que representa lograr un fármaco efectivo e inocuo para la célula huésped. En este contexto, fungicidas derivados del grupo azol, han sido una pieza clave desde su aparición para el estudio de nuevos compuestos. En la actualidad, cada día se incrementa el interés de buscar asociaciones con este compuesto heterocíclico, las cuales, logren brindar una alternativa viable para el tratamiento de enfermedades (Youbu *et al.*, 2007; Gómez *et al.*, 2011 (2007)).

Recientemente, se han presentado estudios relacionados con la síntesis de compuestos derivados de azol con actividad antifúngica, un ejemplo de ello es la investigación realizada en el año 2013 por el Departamento de Química Inorgánica de la Universidad Nacional de Tucumán, Argentina; en la que se estudió la actividad antifúngica de asociaciones estatina-azol como una alternativa viable para el manejo terapéutico de micosis, mostrando resultados positivos a dosis bajas (Cabral *et al.*, 2013). Por otro lado, un estudio más reciente realizado en 2016 por la Universidad de Los Andes, Bogotá D.C., Colombia; muestra la síntesis de complejos metálicos derivados de ligandos de azol, efectuando un estudio sobre su actividad antimicrobiana ante diversos agentes patógenos con resultados prometedores (Ponce, 2016) (Castillo *et al.*, 2016).

El carácter multifactorial de la resistencia a los fármacos antifúngicos azólicos existentes, hace necesario la adopción de nuevas estrategias para combatirla; como lo son el desarrollo de moléculas más potentes, la investigación de nuevos antifúngicos con nuevas dianas y mecanismos de acción, así como combinaciones con inhibidores de los transportadores activos de membrana. En este contexto, los compuestos derivados de azol han mostrado propiedades antifúngicas. Esta actividad está relacionada con su capacidad para unirse fácilmente a enzimas y receptores en sistemas biológicos; En los hongos, los azoles se unen al cofactor hemo que se encuentra en el sitio activo de la 14 α -desmetilasa del citocromo P450, e inhiben la vía de conversión del lanosterol al ergosterol, un paso esencial en la síntesis de la membrana celular de hongos (Manzano *et al.*, 2008). Por ello, el presente estudio pretende evaluar el efecto antifúngico de nuevos compuestos derivados de azol para el control de este tipo de microorganismos y servir de base para investigaciones futuras.

2. ANTECEDENTES

2.1 Micología médica

La historia del hombre y su asociación con los hongos, o las enfermedades que producen, se conoce desde la más remota antigüedad; civilizaciones como la griega, romana o hasta hindú son un ejemplo de ello, ya que podemos encontrar escritos donde se describen manifestaciones clínicas típicas de dermatofitosis (Espinel, 1996).

Actualmente, la micología es una de las áreas de estudio con mayor diversidad y aporte científico, sin embargo, esta surge como una necesidad ante la problemática de tratar enfermedades ocasionadas en el hombre y algunos animales a partir de su interacción y consumo (Head *et al.*, 2014). No hay que olvidar que, en otra época, los hongos fueron considerados comida de dioses para culturas como la mesoamericana prehispánica (Guzmán, 2008).

Muchos filósofos se han visto envueltos en esta fascinante ciencia. Aunque la invención del microscopio por Antoine Van Leeuwenhoek en el siglo XVII revolucionara la manera de estudiar a los hongos, grandes personajes como Hipócrates, Galeno o Celso ya habían hecho contribuciones importantes. Sin embargo, antes del microscopio solo se conocían los macromicetos, hongos capaces de desarrollar cuerpos fructíferos visibles, por lo que sus aportes no fueron más allá de las manifestaciones clínicas (Guzmán, 2008). Hoy en día, el estudio de las diferentes especies de hongos a nivel celular ha permitido entender el curso de las enfermedades que estos ocasionan, determinar el efecto de las sustancias que pueden llegar a secretar y el aporte nutricional e industrial que estos puedan poseer (Wang *et al.*, 2017)..

En micología, a las infecciones causadas por hongos microscópicos, se les llama sencillamente micosis, aunque el nombre puede cambiar dependiendo la zona del cuerpo que es invadida (por ejemplo, onicomycosis) o el tipo de agente causal (por ejemplo, coccidioidomycosis) (Murray *et al.*, 2009). A la fecha, se estipula que solo un puñado de agentes son capaces de causar una micosis, no obstante, hay micosis tan frecuentes como el

resfriado común (White *et al.*, 2014). Si bien pudiéramos hacer una clasificación rápida de los agentes capaces de producir una micosis, la más apropiada podría ser en endógenos y exógenos. Al hablar de hongos endógenos, nos referimos a todos aquellos patógenos que se encuentran en las mucosas o tegumentos del huésped, y que solo bajo circunstancias específicas (inmunosupresión, procesos cancerígenos, diabetes) pueden llegar a causar una infección. En cambio, los hongos exógenos viven fuera del huésped, ya sea como parásitos o saprobios, pero de un modo u otro se convierten en patógenos (Guzmán, 2008).

Existen cuatro grandes grupos en que las micosis son clasificadas según su localización: superficiales, subcutáneas, sistémicas y por oportunistas. Las micosis superficiales se dan generalmente cuando un individuo entra en contacto con el patógeno directamente o a través de la interacción con otro individuo infectado; colonizando la piel y sus anexos (Khadka *et al.*, 2016). Por otro lado, las micosis subcutáneas necesitan forzosamente la penetración del agente para colonizar el tejido subcutáneo, esto se da principalmente por algún traumatismo y suelen ser muy agresivas (Velegraki *et al.*, 2015). Las micosis sistémicas se deben a la inhalación de esporas en la mayoría de los casos, o debido a la difusión hematológica, la cual deriva en la invasión de varios órganos (Lohse *et al.*, 2018). Algunas micosis sistémicas pueden afectar la piel y a su vez, algunas micosis superficiales extenderse hacia órganos profundos. Finalmente, las micosis por oportunistas, como lo dice su nombre, son causadas por hongos saprobios en situaciones en las que el huésped cursa con alguna condición especial que afecta su estado inmunológico (Kenneth & C., 2011).

A pesar de todos los avances que ha tenido la micología médica y las estrategias para contrarrestar la incidencia por infecciones fúngicas, esta aumenta cada día representando una fuerte amenaza para la población (Pfaller, 2012).

2.1.1 Generalidades de los hongos

Los hongos son un grupo de organismos eucariontes de diversidad compleja, pero a la vez fascinante, entre los que podemos encontrar: mohos, levaduras y setas. Hoy en día se conocen alrededor de 200 000 especies, pero se calcula que pudiesen existir más de un millón y medio viviendo en los medios más variados y recónditos del planeta (Kenneth &

C., 2011). Su nombre se deriva del latín “*fungus = sponge = ‘algo con muchos poros’*”, esto haciendo referencia a sus características morfológicas (Arenas, 2014).

En otra época, los hongos fueron considerados por mucho tiempo parte del reino vegetal, esto debido principalmente a similitudes entre sus formas de vida, como su crecimiento en suelos, la ausencia de locomoción y su semejanza morfológica con las plantas (Wingfield *et al.*, 2012). Sin embargo, en el año de 1969, el botánico estadounidense Robert H. Whittaker postuló la clasificación de los seres vivos en cinco reinos, separándoles de las plantas (Erchiga, 2008). En su postulado, Whittaker indicaba que todos los estudios apuntaban a la idea de que los hongos derivaban de flagelados incoloros como una línea de evolución independiente de las plantas verdaderas (Whittaker, 1969) y por esta razón, era necesario un quinto reino propio de los hongos, el cual denominó reino Fungí (plural latino de *fungus*). Con el paso del tiempo y con ello, el desarrollo de técnicas moleculares cada vez más sofisticadas, como la secuenciación de nucleótidos, se determinó que los organismos comúnmente estudiados por los micólogos pertenecían a tres diferentes reinos: Fungí, Chromista y Protozoa. Entonces, Alexopoulos *et al* (1996) propusieron utilizar la palabra Hongos, escrita con mayúscula, al hacer referencia de solo aquellos organismos pertenecientes al reino Fungí y emplear la palabra hongos, escrita en minúsculas, para todos aquellos organismos pertenecientes a los tres reinos antes mencionados. Hoy en día muchos autores han optado por seguir con esta iniciativa (Cepero, 2012), por lo que es oportuno indicar que, en este texto, únicamente se hablara de los organismos correspondientes al reino Fungí, también llamados hongos verdaderos, por lo cual decidimos no seguir con esta directriz.

Al igual que el ser humano o los animales, los hongos son organismos eucariontes; de manera que, poseen un núcleo rodeado por una membrana nuclear con uno o más nucleolos pequeños, además de disponer de material genético en forma de cromosomas. Dentro de su citoplasma podemos encontrar una variedad de organelos, los cuales se ven rodeados por una membrana plasmática rica en esteroides que logra delimitar sus células y brindar una protección del medio exterior (Quinn *et al.*, 2001). Una característica fundamental de los hongos y que difiere del ser humano y los animales, es que poseen una pared celular compuesta principalmente de polisacáridos, que, a diferencia de las plantas en donde su

pared celular está compuesta por celulosa, en los hongos se compone fundamentalmente por quitina (Kenneth & C., 2011).

Aunque en un principio se creía que los hongos compartían el mismo tipo de nutrición que las plantas, esto fue un error; los hongos son incapaces de fijar carbono o realizar el proceso químico de fotosíntesis, al contrario, son organismos heterótrofos, por lo cual requieren de carbohidratos complejos como fuente de energía (Arjona, 2016). La gran mayoría de los hongos reciben sus nutrientes directamente de la absorción de materia muerta (saprofitos o saprótrofos), siendo el resultado de la degradación de compuestos por medio de exoenzimas propias de los hongos. Hoy en día, la importancia de los hongos en la conservación de la naturaleza es innegable, puesto que degradan y reciclan todos los restos orgánicos, logrando mantener un equilibrio natural (Arenas, 2014).

Todas estas características contribuyen a que los hongos sean considerados organismos ubicuos o de distribución cosmopolita, puesto que, sus propiedades les permiten invadir un amplio rango de diversos hábitats. Aunque si bien es sabido que, los hongos prefieren entornos húmedos y acuáticos, estos también pueden adaptarse a ambientes extremos como desiertos o áreas de extremada salinidad (Vaupotic, 2008).

2.1.2 Estructura de los hongos

Los hongos son organismos complejos que difieren estructural y morfológicamente con las bacterias y con las células animales y vegetales. Probablemente al escuchar la palabra “hongo” venga a nuestra mente aquella imagen del típico hongo “de sombrero” como por ejemplo el champiñón (*Agaricus bisporus*), pero este solo es uno de los tantos tipos de hongos que podemos encontrar en la naturaleza. El tamaño, los colores y la forma, es algo muy variable en los hongos y que les otorga esa gran diversidad, sin embargo, no todos los hongos poseen las mismas estructuras (Prakash *et al.*, 2017).

Comencemos por describir el talo de un hongo, ya que de este dependerá el tipo de crecimiento que pueda tener; es decir, un talo disociado producirá un crecimiento rápido de colonias de levaduras de consistencia cremosa; por otro lado, si el talo es filamentoso, dará lugar a colonias de mohos con un crecimiento centrifugo y lento (salvo los hongos

oportunistas). El talo esta constituido por dos partes: 1) talo vegetativo, el cual asegura el correcto desarrollo del hongo, brinda la nutrición y funge como base de la parte reproductora, y 2) talo reproductor, que como su nombre lo indica, es la porción donde se desarrolla la parte reproductora del hongo (Guzmán, 2008). Existen fenómenos en los cuales un hongo puede tener distintas fases de crecimiento, es decir que, bajo distintos factores como lo puede ser la temperatura, la nutrición o en su caso ambos, este puede pasar de manera reversible de una forma micelial a una de tipo levaduriforme o viceversa. A este fenómeno específicamente se le conoce como dimorfismo fúngico y es una cualidad que solo algunos tipos de hongos poseen y que les permite adaptarse de mejor manera a su entorno. No obstante, algunos hongos tienen la capacidad de producir levaduras y filamentos de manera conjunta sin la necesidad de verse influenciados por distintos factores. A estos hongos se les conoce como hongos polimorfos (Pérez *et al.*, 2014).

El talo o también llamado micelio, esta constituido por un conjunto de filamentos denominados hifas. La hifa es un contiguo de células intercomunicadas de longitud variable con forma de tubo por la cual fluye protoplasma. Posee un diámetro de 1 a 30 micrómetros con una porción final en forma de punta, misma que da lugar a la zona de extensión o también llamada región de crecimiento (Herrera *et al.*, 1990). Las hifas se clasifican de acuerdo con el tipo de segmentación que esta posea, así pues, estas pueden ser tabicadas o cenocíticas. Una hifa tabicada es aquella que presenta tabiques transversales que permiten la separación citoplasmática en regiones denominadas “septos”, no obstante, estas cuentan con pequeños poros que permiten el flujo continuo del citoplasma y el núcleo, de ahí que algunos autores consideren que las hifas estén constituidas solo por compartimentos y no precisamente de células. Por otra parte, los hongos con hifas cenocíticas o de micelio continuo, son aquellos que carecen de tabiques (aseptados), por lo cual se observan largos filamentos continuos. Ahora bien, parece importante mencionar que algunos hongos cenocíticos pueden presentar tabiques para aislar las partes viejas o las reproductoras. En cuanto al color, las hifas pueden ser hialinas (incolores) o dematiáceas (oscuras), esto debido a la presencia o no de melanina en la pared (Polonelli *et al.*, 1993).

Al igual que las plantas, los hongos poseen una pared celular. Esta estructura resistente, a veces un tanto rígida, envuelve a la célula por el exterior de su membrana plasmática

protegiendo el contenido celular. Su espesor puede variar de 200 a 300 nm en levaduras y menor a los 200 nm en los mohos. Esta constituida principalmente por polisacáridos en un 90% y en un 10% restante por proteínas estructurales y algunos otros polímeros (Biberstein & Zee, 1994). Tanto la quitina como los glucanos y mananos, son algunos de los polisacáridos más abundantes en su constitución, aunque podemos encontrar algunos otros como la celulosa y el quitosán. La forma de un hongo dependerá en gran medida de su pared celular, ya que esta le permite adquirir variadas formas, un ejemplo de esto podría verse durante la formación de propágulos, estructuras de penetración o ramificaciones (Hopke *et al.*, 2018).

Situada justo por debajo de la pared celular y envolviendo la totalidad de la célula encontramos la membrana plasmática. Constituye la verdadera interfase entre el exterior y el interior de un hongo. Su principal función es mediar la entrada y salida de solutos, además de proteger el citoplasma y facilitar la formación de estructuras mediante la fijación de enzimas que intervienen en su síntesis (Guzmán, 2008). Esta conformada por una capa bilipídica con una región polar soluble en agua y una región no polar soluble en lípidos. Además, posee estructuras que han sido denominadas plasmalomasomas o simplemente lomasomas. Estas son invaginaciones situadas entre la pared celular y la membrana plasmática, cuya función aún no ha sido del todo esclarecida. Asimismo, la membrana plasmática en los hongos está constituida principalmente por fosfolípidos, colesterol, proteínas y glúcidos. Hoy en día, se conocen más de 200 tipos de proteínas presentes en la membrana celular de los hongos, algunas de ellas, como las glucoproteínas, son moléculas formadas por una proteína unida a uno o varios glúcidos. Su ubicación puede variar, pero en general estas se clasifican en periféricas y transmembranales. En cuanto a los lípidos, uno de sus constituyentes que, dicho sea de paso, podría ser la principal diferencia entre los hongos y otros organismos, es la presencia de ergosterol, un esteroles cuya función podría ser equiparada con la del colesterol en las células animales. Motivo por el cual, ha sido un objetivo en el desarrollo de fármacos antifúngicos desde su descubrimiento (Kenneth & C., 2011).

Los hongos del mismo modo que todos los eucariontes, poseen una serie de estructuras intracelulares conocidas como organelos. Sin embargo, estos son incapaces de realizar

procesos fotosintéticos, por lo que no presentan cloroplastos (Murray *et al.*, 2009). Su núcleo es pequeño en comparación con otros organismos, teniendo un diámetro de 1 a 3 μm . Es capaz de albergar material genético en forma de cromosomas y está envuelto por una doble membrana con pequeños poros que comunican directamente con el retículo endoplasmático. Además, poseen mitocondrias alargadas de aproximadamente 15 μm de largo, donde se lleva a cabo la respiración oxidativa y que al igual que el núcleo, estas pueden desplazarse libremente por el micelio y cruzar de un compartimento a otro a través del poro septal. Cuentan con ribosomas 80S, vacuolas, microtúbulos, vesículas y aparato de Golgi, el cual se ve relacionado con la producción de cuerpos lipídicos, inclusiones cristalinas y microcuerpos (Quinn *et al.*, 2001; Kenneth & C., 2011).

2.1.3 Nutrición y metabolismo

Los hongos son organismos que obtienen sus nutrientes mediante la absorción de compuestos orgánicos, principalmente materia en descomposición, participando en el ciclo natural del carbono y otros elementos naturales (Mcvey *et al.*, 2013). Este hecho los lleva a poseer un metabolismo quimioheterótrofo, o, dicho de otra manera, su fuente de energía procede de reacciones químicas mientras que la materia orgánica funge como fuente de carbono. Los hongos tienen la capacidad de degradar una amplia variedad de componentes, por ello cuentan con fuertes exoenzimas que pueden servir como factores de virulencia (Chanda *et al.*, 2009).

Estos organismos son capaces de generar energía a través de múltiples rutas metabólicas, como lo son: la glucólisis, la fermentación, la respiración aeróbica y la respiración anaeróbica (Wisecaver *et al.*, 2014). La glucólisis, refiere a la producción de energía mediante la conversión de azúcares. En los hongos, se puede llevar por medio de dos vías, la vía Embden-Meyenhorf-Parnas (EM o EMP) y la vía hexosa monofosfato (HMP). Por otra parte, la fermentación restaura los niveles de NAD por medio de transferencia de electrones a un aceptor orgánico. En los hongos existen tres tipos de fermentaciones: 1) la fermentación alcohólica, 2) la fermentación láctica y 3) la fermentación en la que a partir de fosfato de dihidroxiacetona se genera glicerol. La respiración aeróbica, conlleva a un proceso oxidativo cuyo aceptor final de electrones es el

oxígeno, al contrario de la respiración anaeróbica cuyo aceptor final es una molécula inorgánica diferente, en algunos hongos, una alternativa al oxígeno es el nitrato como aceptor final (Kenneth & C., 2011; Wisecaver *et al.*, 2014).

En condiciones de laboratorio, los hongos son organismos poco exigentes, capaces de crecer en la mayoría de los medios de cultivo que puedan brindarle una fuente orgánica de carbono y una fuente de nitrógeno. Además, su fácil crecimiento y la presencia de conidios en el ambiente, los convierte en contaminantes frecuentes del laboratorio (Rex *et al.*, 1993; Murray *et al.*, 2009).

En cuanto a sus necesidades fisiológicas, los hongos filamentosos son organismos que se desarrollan en condiciones aeróbicas, mientras que, por su parte los levaduriformes son anaerobios facultativos. Su exigencia a factores ambientales es mínima, pues la mayoría crece a una temperatura de 10 a 40 °C y un pH entre los 2 y 9 (Quinn *et al.*, 2001; Baron *et al.*, 2013).

2.1.4 Reproducción

La creación de nuevos individuos que conserven las características típicas de una especie es una propiedad básica en todas las formas de vida. En los hongos, existen dos tipos de reproducción: sexual y asexual (Kenneth & C., 2011). Existe un caso particular en el cual los hongos pueden obtener una variabilidad genética sin la necesidad de una reproducción sexual. A este fenómeno se le conoce como parasexualidad (Hirsh, MacLachlan & Walker, 2004).

Los estadios reproductivos, sexual y asexual, de los hongos se conocen de manera diferente. El término teleomorfo refiere a la fase sexual, en tanto que, la fase asexual se conoce como anamorfo. Por otro lado, la totalidad del hongo con todas sus fases reproductivas se conoce como holomorfo (Arenas, 2014). En general, muchos hongos poseen estructuras reproductivas en una determinada fracción del talo, teniendo funciones vegetativas y reproductivas simultáneamente. A este tipo de hongos se les conoce sencillamente como eucárpicos. En cambio, los hongos holocárpicos presentan un talo

completamente reproductivo, ocasionando que la fase vegetativa y reproductiva no puedan llevarse al mismo tiempo (Riquelme *et al.*, 2018).

La reproducción sexual es el proceso biológico en el cual se origina un descendiente genéticamente diferente. Es decir, para que la reproducción sexual se pueda llevar a cabo es necesario el aporte genético de ambos progenitores. En los hongos, existen variables que pueden influir en la ocurrencia de este tipo de reproducción, como lo son los factores ambientales, nutricionales y genéticos (Frisvad *et al.*, 2014). El proceso de reproducción y las etapas que este conlleva tienen un tiempo indeterminado, pudiendo ser corto o tomar la mayor parte del ciclo de vida de un hongo. Dependiendo el filo del hongo será el tipo de espora que este pueda originar (Kenneth & C., 2011). Los hongos del filo Ascomycota forman ascosporas como resultado de una meiosis en el interior de células con una estructura en forma de saco, las cuales son denominadas asco. Un asco puede contener alrededor de ocho ascosporas con tamaños variables, unicelulares o septadas, de pared celular lisa u ornamentada, pigmentadas o hialinas, entre otras. Los hongos del filo Basidiomycota por su parte, producen esporas de tipo basidiosporas que, a diferencia de las ascosporas, estas no son producidas en el interior de un saco sino sobre los esterigmas de un basidio. Las cigosporas son esporas sexuales originadas por los hongos del filo Zygomycota, siendo esporas de reposo contenidas dentro de un cigosporangio. Por otra parte, las esporas del filo Oomycota son las oosporas (Guzmán, 2008).

La reproducción asexual es un proceso que permite a los hongos establecer colonias de gran número para su supervivencia de manera continua. Se lleva por medio de procesos mitóticos en el cual no es necesario la unión de dos núcleos compatibles, por lo cual, este proceso puede llevarse a cabo con un solo progenitor (Ojeda *et al.*, 2018). Existen cuatro mecanismos por los cuales se puede llevar a cabo una reproducción asexual en los hongos (mohos y levaduras): 1) fisión, 2) gemación, 3) formación de esporas asexuales y 4) formación de conidios (Asthon & Dyer, 2019).

La fisión es el proceso en el cual una célula se elonga en sus extremos (uno o ambos), tomando una configuración de tipo cilíndrica en la que el núcleo se duplica por mitosis para después formar un septo en la zona media de la célula, obteniendo la división de las dos células por esquizolisis del septo (Arenas, 2014).

En general, casi todas las levaduras se reproducen asexualmente por medio del proceso de gemación. Este tipo de reproducción se basa en la aparición de prominencias sobre la superficie del individuo progenitor, normalmente conocidas como brotes o yemas, las cuales aumentarán su tamaño hasta casi alcanzar el mismo de la célula madre. Hay tres etapas que conlleva el crecimiento de un brote, en la primera, se produce un hinchamiento que ocasiona la extensión de un polo de la pared; a continuación, en la segunda etapa, se originara una expansión de la pared en forma isodiamétrica formando una esfera de manera sincrónica; finalmente, en la tercera etapa, se formara un septo que permita la separación de la célula hija. Tanto el lugar como el numero de yemas pueden variar en el proceso de gemación (Steensels *et al.*, 2014). De acuerdo con la localización del brote en la célula podemos encontrar una gemación de tipo unipolar, cuando el brote se presenta en el mismo lugar, bipolar, cuando los brotes se observan en dos puntos diferentes y multipolar, cuando el proceso de gemación se lleva cada vez en un punto diferente de la célula. En cuanto al numero de brotes, se clasifican como simple, cuando solo se puede observar una célula hija alrededor de la célula madre y múltiple, cuando se observan dos o más células hijas unidas a la célula madre (Guzmán, 2008).

Existen dos tipos de esporas asexuales en los hongos, las esporangiosporas y las zoosporas. Las esporangiosporas son unidades creadas para la propagación del hongo, las cuales son producidas en grandes cantidades por medio de la segmentación del protoplasma del esporangio, estructura multinucleada especializada. Por su parte, las zoosporas son esporas motiles provista de uno o más flagelos producidas mediante la segmentación del protoplasma de un zoosporangio (Herrera *et al.*, 1990).

La formación de conidios o también denominada conidiación es el proceso por el cual se originan los conidios, propágulos no motiles de origen asexual. A diferencia de las esporas, los conidios no se forman dentro de un saco, sino que, su desarrollo puede ser directamente desde las hifas o algún tipo de célula especializada, obteniendo un fácil desprendimiento (Hirsh, MacLachlan & Walker, 2004).

2.2 Agentes antifúngicos

Cualquier sustancia que logre la alteración estructural en un hongo, ya sea inhibiendo su crecimiento, viabilidad o la capacidad de sobrevivencia, directa o indirectamente, puede ser considerado un agente antifúngico (Murray *et al.*, 2009; Nunes *et al.*, 2013). El origen de este tipo de agentes se remonta desde comienzos del siglo XX, desde entonces se ha llevado a cabo el diseño y la fabricación de nuevas moléculas con la finalidad de brindar una alternativa a las infecciones fúngicas, las cuales han aumentado su incidencia desde la epidemia del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (Pfaller, 2012).

2.2.1 Clasificación

Existe una amplia variedad de agentes antifúngicos, los cuales poseen una gran diversidad con respecto a su estructura química y mecanismos de acción (de With *et al.*, 2005). Su clasificación puede atender al tipo de criterio seleccionado, así pues, un agente antifúngico puede ser clasificado según su estructura química en: polienos, azoles, alilaminas, lipopéptidos, entre otros (véase tabla 1); de acuerdo con el tipo de obtención, pudiendo ser una sustancia sintética o de origen natural como las producidas por otros organismos (Valdez, 2005).

Tabla 01. Clasificación de agentes antifúngicos por estructura (Valdez, 2005)

Estructura	Agente
Polienos	Nistatina, natamicina, anfotericina B
Azoles	Imidazol: miconazol, clotrimazol Triazoles: fluconazol, itraconazol. Ketoconazol Triazoles de segunda generación: voriconazol, ravuconazol. posaconazol
Alilaminas	Terbinafina, naftifina
Lipopéptidos	Papulacandinas Triterpenos glicosilados Equinocandinas: caspofungina, anidulofungina, micafungina
Pirimidinas Fluoradas	Flucitosina
Otros	Yoduro de potasio, ciclopirox, tolnaftato, griseofulvin

Tabla 2. Clasificación de los antifúngicos por su sitio de acción en el hongo (Valdez, 2005)

Sitio de Acción	Agente
Antifúngicos interactuando en la pared celular	Lipopéptidos
Antifúngicos interactuando en la membrana celular	Polienos, azoles, alilaminas
Antifúngicos interactuando en el núcleo	Pirimidinas fluoradas

2.5.2 Mecanismos de acción

Una de las principales barreras que ha tenido que enfrentar la humanidad al momento de diseñar nuevas moléculas con acción antifúngica es la gran similitud que existe entre una célula mamífera y una célula fúngica, de ahí que, el grado de selectividad hacia el patógeno sea limitado (Tsuchimori *et al.*, 2002). Durante años los estudios se han enfocado en encontrar un sitio de acción específico en el hongo que logre aumentar la selectividad y con ello reducir las reacciones adversas en el paciente. En la actualidad, los principales sitios de acción son el núcleo, la membrana celular y la pared celular (Rex *et al.*, 1993; Fontenelle *et al.*, 2011).

Existen diferentes mecanismos por los cuales la estabilidad estructural de un hongo puede verse comprometida frente a un fármaco. La griseofulvina, por ejemplo, incapacita la acción de los microtúbulos por medio del bloqueo de la tubulina, desencadenando la incapacidad del hongo para llevar a cabo la división nuclear y por ende la mitosis; por su parte, la fluorocitosina, interfiere en la síntesis de ADN fúngico al bloquear la incorporación de nucleósidos, impidiendo así la replicación celular. Como puede observarse, tanto la griseofulvina como la fluorocitosina, son fármacos que actúan sobre el núcleo de la célula fúngica, cada uno con un mecanismo de acción propio. De tal forma que, distintos fármacos pueden actuar en el mismo sitio de acción y poseer mecanismos de acción completamente diferentes (Kenneth & C., 2011).

2.5.3 Azoles

Los azoles como agentes antifúngicos fueron introducidos a finales de la década de 1960-1969, siendo uno de los avances médicos más importantes en el tratamiento de las micosis

sistémicas. Se caracterizan por la presencia de un anillo azólico central y se dividen en dos grandes familias: imidazoles y triazoles (Méndez et al., 2001).

La familia de imidazoles esta compuesta por antifúngicos de amplio espectro; con acción en mohos y levaduras, además, poseen una actividad antibacteriana y antiprotozoaria, y un efecto inmunoestimulante. Esta familia de azoles se caracteriza por la presencia de un anillo imidazol libre unido a otros anillos aromáticos mediante un enlace N-C en la posición 1. Dentro de esta familia podemos encontrar fármacos como: clotrimazol, miconazol y ketoconazol; cabe señalar que, con el paso del tiempo se ha logrado sintetizar nuevas variantes, no obstante, sus cambios estructurales han sido muy ligeros (Lopez & Ocampo, 2006).

Los triazoles son una familia de derivados azólicos de segunda generación que, a diferencia de los imidazoles, estos cuentan con tres átomos de nitrógeno en su anillo imidazol (Méndez *et al.*, 2001). En general, se toleran de mejor manera que los imidazoles y cuentan con un espectro ligeramente mayor. Tanto el fluconazol como el itraconazol, son triazoles de primera generación, en tanto que, el ravuconazol, voriconazol y posaconazol, son triazoles de segunda generación (Gregorí *et al.*, 2005).

En general, tanto los imidazoles como los triazoles comparten el mismo mecanismo de acción; interrumpen la biosíntesis de ergosterol por medio de la inhibición de las enzimas oxidativas del citocromo p450 [CYP 3A4 y CYP 2C9] (lanosterol 14- α desmetilasa), no permitiendo que se lleve a cabo la conversión de lanosterol a ergosterol (Thompson, 2002). Este proceso causa la disminución de ergosterol y de manera secundaria la producción de esteroides anómalos. Pronto la membrana citoplasmática se ve afectada estructural y funcionalmente, aumentando su permeabilidad. Cabe señalar que, la acumulación de esteroides anómalos provoca la desestructuración de los organelos intracelulares contribuyendo a la muerte celular (Azanza, Quetglas & Sádaba, 2007).

2.5.4 Alilaminas

Son un grupo de antifúngicos sintéticos de acción similar a los azoles, análogamente, son capaces de inhibir la síntesis de ergosterol en una etapa temprana. Se caracterizan por

poseer dos anillos bencénicos enlazados a un grupo naftilo y un grupo amino. Actúan sobre la enzima escualeno 2,3-epoxidasa bloqueando la síntesis de lanosterol y por ende la producción de ergosterol. Tanto la disminución de ergosterol como la acumulación de escualeno, afecta la permeabilidad de la membrana citoplasmática, ocasionando un desequilibrio en el funcionamiento interno de la célula fúngica, y eventualmente, la muerte celular.

2.5.5 Lipopéptidos

Son fármacos de acción fungicida que actúan sobre la pared celular del hongo inhibiendo la síntesis de glucano. Su mecanismo de acción radica en la inactivación de la enzima 1,3- β -glucano sintetasa, enzima responsable de la formación de polímeros de glucano, componente esencial de la pared celular en los hongos. Este mecanismo origina una inestabilidad osmótica en la célula fúngica que posteriormente conlleva a la muerte. Dado que, las células mamíferas carecen de pared celular, este parece ser un perfecto blanco farmacológico.

Dentro de los lipopéptidos naturales podemos encontrar a las equinocandinas como los fármacos más representativos de esta familia, posteriormente aparecerían la aculeacina, mulundocandina, esporiofungina y FR-901279. Por otro lado, la cilofungina, caspofungina y anidulafungina, son consideradas lipopéptidos semisintéticos y en general su grado de nefrotoxicidad y hepatotoxicidad es mínimo.

2.5.6 Fluoropirimidinas

Las fluoropirimidinas o también llamadas pirimidinas fluoradas son antimetabolitos competitivos utilizados en el tratamiento de micosis sistémicas, principalmente las ocasionadas por patógenos oportunistas. Actúan sobre el núcleo de la célula fúngica interrumpiendo el proceso de replicación celular. Su estructura molecular consta de un átomo de flúor que actúa inhibiendo la síntesis de ADN y ARN fúngico.

Dentro de las fluoropirimidinas encontramos la fluocitosina o 5-fluorocitosina (5-FC), fármaco altamente selectivo para hongos cuyo mecanismo de acción lo obliga a ser transportado al citoplasma de la célula fúngica por medio de la citosina permeasa, proteína específica para la citosina que se ubica en la membrana citoplasmática de los hongos y de la cual las células mamíferas carecen. En este punto se lleva a cabo la conversión de 5-FC a 5-fluorouracil (5-FU) por acción de una desaminasa. Tan pronto como la 5-FU es fosforilada, está es incorporada en el ARN fúngico, donde impide la síntesis de proteínas. Adicionalmente, puede inhibir la timidilato sintetasa, enzima fundamental en la formación de desoxitimidina 5'-trifosfato (dTTP), metabolito esencial para la síntesis de ADN.

2.5.7 Polienos

Son antimicóticos obtenidos en la década de 1950-1959 a partir de la fermentación de actinobacterias del género *Streptomyces*. Estructuralmente están formados por una lactona de 26 a 38 átomos de carbono con dobles enlaces. Entre los medicamentos que se encuentran en este grupo, podríamos decir que, tanto la nistatina como la anfotericina B, son los fármacos más representativos y utilizados frente a terapias antifúngicas.

Su mecanismo de acción se basa en la unión a esteroides membranales, específicamente el ergosterol, ocasionando la formación de poros que alteran la permeabilidad de la membrana. Tanto el daño estructural como funcional, permite la fuga de proteínas, glúcidos y cationes del interior de la célula, logrando su posterior muerte.

2.3 Complejos metálicos en la farmacología

Actualmente, es bien sabido que los metales forman parte esencial para el correcto funcionamiento de los seres vivos, siendo participes en muchos procesos metabólicos y fisiológicos. De ahí que, muchas formas de vida a lo largo del tiempo evolucionaran en busca de aprovechar los beneficios brindados de la mejor manera. En general, cualquier metal puede ser considerado tóxico para la salud, siempre que sus niveles sean elevados (Ishida et al., 2014). Por este motivo, los avances científicos en el campo de la Química Bioinorgánica se han centrado en buscar maneras que logren su correcta distribución y

eliminación. En cambio, cuando existe una deficiencia de un metal esencial, se busca la manera adecuada de su suplementación. En ese contexto, los complejos metálicos han mostrado cualidades biológicas y farmacológicas interesantes que los ha posicionado de buena manera en el tratamiento de diversas enfermedades y desordenes (Baran, 2014).

Los compuestos llamados complejos metálicos, compuestos de coordinación o sencillamente complejos, son compuestos cuyo átomo o ion central es un metal unido a otros átomos o moléculas. Químicamente, estos compuestos tienden a mantener su estabilidad estructural, incluso en solución, no obstante, pudiesen presentar una disociación parcial. Su carga eléctrica depende totalmente de los átomos, iones y moléculas que le rodean pudiendo comportarse como catión, anión o no iónico (Helsel et al., 2017).

A lo largo de la historia, el hombre ha empleado todo tipo de elemento químico en su búsqueda por sobrevivir, no siendo los metales una excepción. Se dice que los antiguos egipcios aprovechaban las propiedades del cobre para esterilizar el agua, mientras que, en la medicina oriental, se hacía uso del oro (Basolo & Johnson, 1980).

En el siglo XVI, Paracelso, famoso médico de gusto extraordinario por la alquimia, empleo compuestos metálicos en el tratamiento de enfermedades. Sería él, quien años después recalcaría la importancia de la dosis en el tratamiento (“la dosis correcta diferencia un veneno de un remedio”) (Baran, 2014).

A pesar de todos los registros antiguos que demuestran el uso de los metales en la farmacología, parece que su utilización con bases científicas recién arranca en el año de 1890, cuando Robert Koch expone los beneficios del complejo $K[Au(CN)_2]$ en la eliminación *in vitro* del bacilo de la tuberculosis (De Barros et al., 2017).

No solo Robert Koch es la única gran figura que creía en los beneficios de los complejos metálicos, si no que, años después, el alemán Paul Ehrlich, considerado el padre de la quimioterapia, utilizó el compuesto arsenical arsfenamina en tratamientos efectivos contra sífilis, introduciendo así, nuevos conceptos e ideas fundamentales para el desarrollo de nuevos fármacos (Basolo & Johnson, 1980).

Hoy en día podemos decir, sin miedo a equivocarnos, que el descubrimiento más importante y definitivo, en el empleo de complejos metálicos dentro de la Química

Inorgánica Medicinal (De Barros et al., 2017), ha sido el descubrimiento de la actividad antitumoral del complejo *cis*-diclorodiamino-platino (II) descrito en el año de 1969, por el químico estadounidense Barnett Rosenberg (Baran, 2014).

3. JUSTIFICACIÓN

Estudios han demostrado que los azoles son propensos a la resistencia en la población patogénica, especialmente sin el seguimiento de las prácticas recomendadas que tienen como objetivo prolongar la efectividad de estos fungicidas. Actualmente, el número de microorganismos capaces de generar resistencia a los fármacos antifúngicos azólicos ha incrementado de manera progresiva. Este carácter multifactorial de resistencia hace necesario la adopción de nuevas estrategias para combatirla; como lo son el desarrollo de moléculas más potentes, la investigación de nuevos antifúngicos con nuevas dianas y mecanismos de acción.

En este contexto, compuestos como los complejos metálicos derivados de ligandos azol han mostrado propiedades antimicrobianas; actividad que está relacionada con su capacidad para unirse fácilmente a enzimas y receptores en sistemas biológicos. De manera que, estos nuevos compuestos puedan brindar una alternativa a la problemática reciente.

4. HIPÓTESIS

Los ligandos de azol al estar coordinados a un centro metálico presentan mayor actividad antifúngica que los ligandos libres, superando compuestos azólicos policíclicos sin núcleo metálico y en algunos casos fármacos de referencia.

5. OBJETIVO DEL TRABAJO

5.1 Objetivo General

Evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de compuestos derivados de azol sobre *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Malassezia pachydermatis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* y *Microsporum canis*.

5.1 Objetivos específicos

1. Determinar cuál compuesto presenta una mayor actividad antifúngica
2. Estimar la concentración mínima inhibitoria para cada compuesto que presente actividad antifúngica.
3. Comparar los efectos antifúngicos entre distintos compuestos derivados de azol en contraste con medicamentos comúnmente utilizados.
4. Determinar la actividad citotóxica en diferentes líneas celulares de los compuestos que presenten mayor actividad antifúngica.

6. MATERIAL Y METODOS

6.1 Lugar de trabajo

La conducción de los experimentos se llevó a cabo en los laboratorios de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), México; con la participación del laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas (FCQ), UANL, México. De manera análoga se trabajó en conjunto con el Departamento de Química, de la Universidad de Los Andes, Bogotá DC, Colombia; institución que proporcionó los ligandos y complejos metálicos derivados de azol (Figuras 1 y 3); y el Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional (IPN), Tamaulipas, México; sitio donde se efectuó la síntesis y caracterización de compuestos azólicos policíclicos sin núcleo metálico (Figura 2).

6.2 Material biológico

La obtención y posterior identificación de los microorganismos para el presente estudio se realizó por medio de aislamientos clínicos llevados a cabo por el laboratorio de Microbiología de la FMVZ-UANL, con la excepción de las cepas de referencia, las cuales fueron proporcionadas por el Centro de Biotecnología Genómica IPN; entre los cuales se obtuvieron: *Candida albicans* CDBB 1003, *Candida glabrata* CDBB 1536, *Candida parapsilosis* CDBB 1442, *Candida tropicalis* CDBB 1941, *Malassezia pachydermatis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Aspergillus niger*, *Microsporum canis* y *Fusarium oxysporum*; todos ellos cultivados en agar dextrosa de Sabouraud (SDA) e incubados a 32 °C durante 2 (levaduras) y 7 días (hongos filamentosos).

6.3 Preparación de solución stock

La preparación de soluciones stock se realizó mediante la utilización de 8 diferentes complejos metálicos derivados de ligandos azoles y 3 ligandos de azol libres; los cuales fueron donados por el Departamento de Química de la Universidad de Los Andes, Bogotá DC, Colombia; además de la utilización de 7 compuestos policíclicos sin núcleo metálico derivados de azol, donados por el Centro de Biotecnología genómica, IPN. Cada compuesto

fue pesado y posteriormente disuelto en dimetilsulfoxido (DMSO) (Bio Basic Inc., México). Hasta lograr obtener una concentración final de 100 mM.

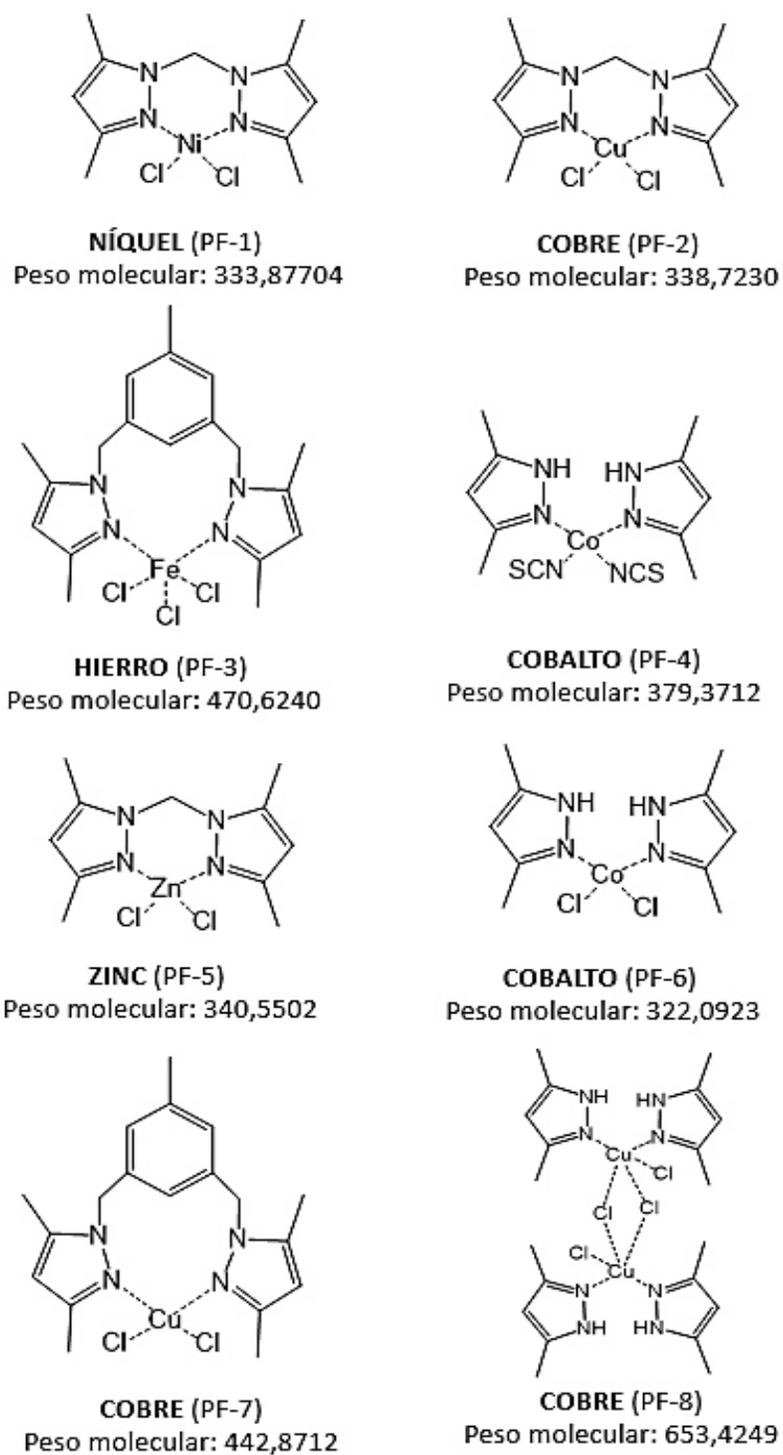
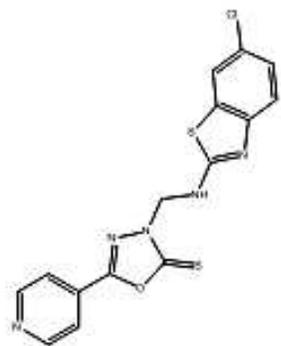
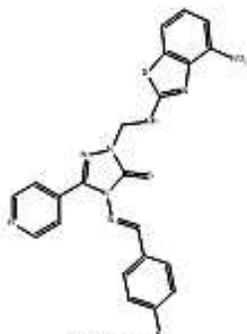


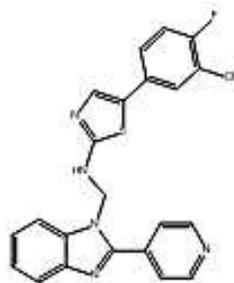
Figura 1. Complejos metálicos derivados de ligandos azoles



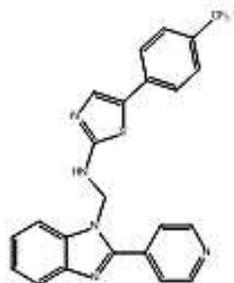
GR-9
Peso molecular: 375,86



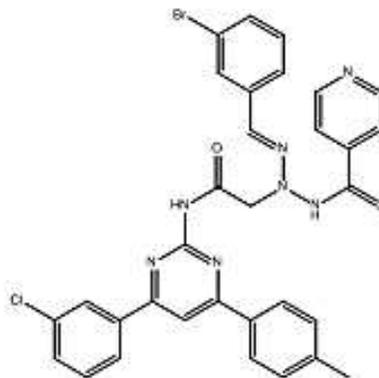
GR-10
Peso molecular: 506,54



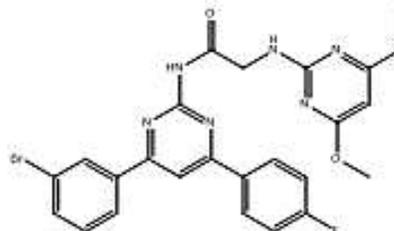
GR-11
Peso molecular: 435,90



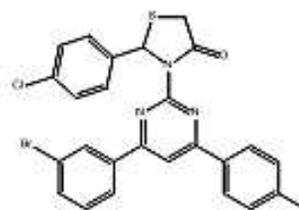
GR-12
Peso molecular: 451,47



GR-13
Peso molecular: 654,94



GR-14
Peso molecular: 539,36



GR-15
Peso molecular: 540,83

Figura 2. Compuestos azólicos policíclicos sin núcleo metálico

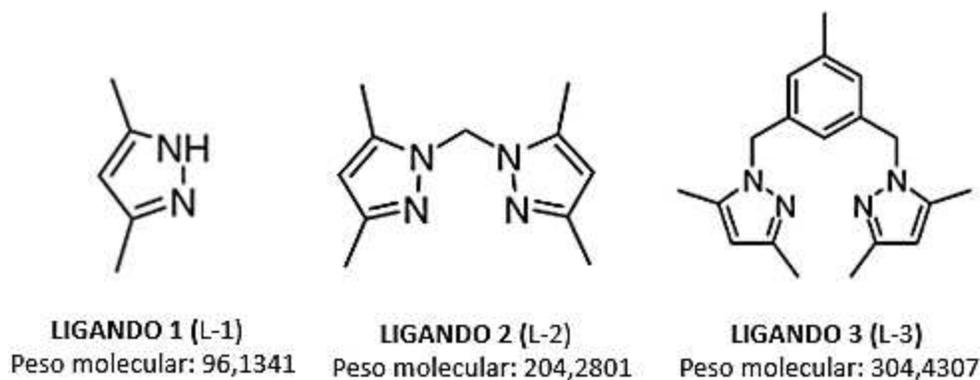


Figura 3. Ligandos

6.4 Determinación de la actividad antifúngica

Con el fin de evaluar la potencial actividad antifúngica de los nuevos compuestos derivados de azol, se clasificaron en dos grupos distintos basados en su estructura molecular; el primer grupo fue constituido por aquellos compuestos con metales de transición en su estructura y el segundo grupo, formado por compuestos libres de metales. Posteriormente, cada grupo fue evaluado con el fin de seleccionar los compuestos que presentaran mayor actividad a una concentración de 100 mM. Se determinó la actividad antifúngica mediante la realización de un inóculo a partir de la suspensión del hongo correspondiente en solución fisiológica (NaCl al 0,9%). Tomando como referencia el tubo 0.5 de la escala McFarland, equivalente a una suspensión de 1.5×10^8 UFC/ml. A continuación, se colocó 1 ml del inóculo recién preparado en 20 ml de agar de Sabouraud, el cual fue vaciado en una caja de Petri (60 x 15 mm, poliestireno) para la realización de pocillos. Por último, a cada pocillo se le añadió la solución stock correspondiente para su incubación a 32 °C. La evaluación de la actividad antifúngica de los compuestos ensayados fue determinada mediante la formación de un halo de inhibición, el cual se cuantificó a tiempo fijo, correspondiente a 24 horas posteriores a la incubación para levaduras y 7 días para hongos. Cada ensayo se realizó por triplicado con 3 repeticiones.

Tabla 3. Criterios de interpretación para determinar la actividad antifúngica

Categorías de Interpretación	Diámetro del halo (mm)
Sensible	≥ 19
Intermedio	15 - 18
Resistente	≤ 14

6.5 Medicamentos estándar de referencia

Para el presente estudio se utilizaron como medicamentos de referencia estándar fluconazol (FLZ), ketoconazol (KLZ), voriconazol (VCZ) e itraconazol (ITZ) (Pfizer, S. A., México), medicamentos comúnmente empleados en la práctica veterinaria. Los cuáles fueron adquiridos por medio de laboratorios comerciales y empleados siguiendo las indicaciones del fabricante.

6.6 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Para este estudio fueron seleccionados previamente los compuestos que exhibieron mejor actividad antifúngica, en los cuales las concentraciones a ensayar estuvieron comprendidas entre 1,000 y 1.95 $\mu\text{g ml}^{-1}$ obtenidas a partir de las soluciones stock mediante una serie de diluciones seriadas (véase figura 4) utilizando el medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 con 2 % de glucosa (Sigma, México). En el caso de los fármacos de referencia estándar, las concentraciones estuvieron comprendidas entre 16 y 0.03 $\mu\text{g ml}^{-1}$, utilizando como diluyente DMSO con excepción del fluconazol, el cual fue diluido en agua destilada estéril.

Para el sembrado en placa fueron utilizadas microplacas estériles de 96 pocillos, con fondo plano, las cuales fueron llenadas a partir de 100 μl de solución de antifúngico por medio de diluciones seriadas comenzando por la columna 2 hasta la 11 (véase figura 5). Los pocillos de la columna 1 fueron llenados con 200 μl de RPMI como control de esterilidad. Como control de crecimiento se utilizaron los pocillos de la columna 12, llenados con 100 μl de RPMI. La inoculación de las placas se realizó a partir de un cultivo de 24 horas a 32 °C en agar dextrosa de Sabouraud (SDA) (Bioxon, México). Se preparó un

inóculo de turbidez 0,5 McFarland en solución salina (NaCl 0,85 %) correspondiente a 1.5×10^8 UCF/ml. Posteriormente se realizó una dilución 1:1000 con medio RPMI para obtener una concentración $0.5 \times 10^3 - 5 \times 10^3$ UCF/ml a partir de la cual se inocularon 100 μ l desde el pocillo 2 hasta el 12.

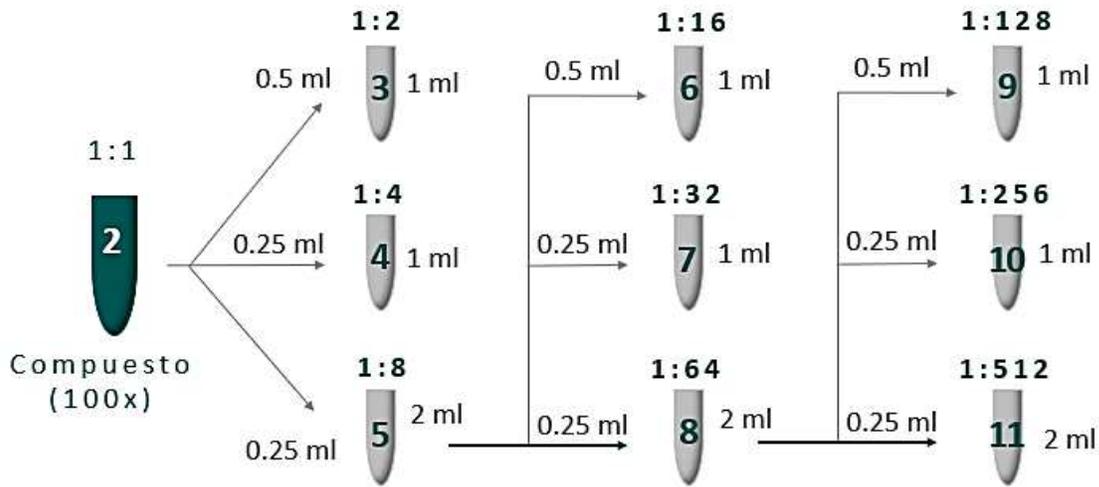


Figura 4. Preparación de diluciones seriadas

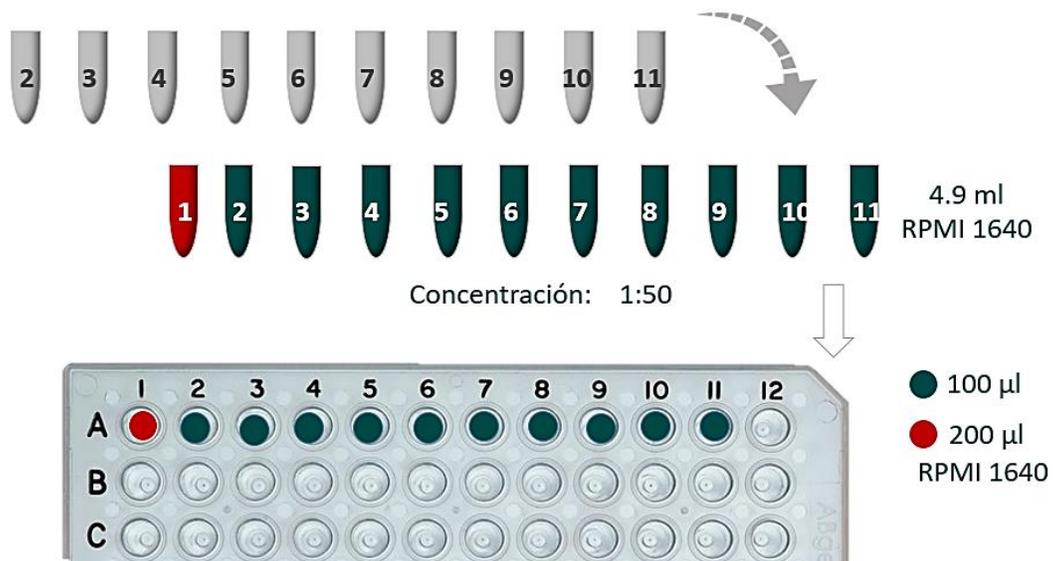


Figura 5. Preparación de placa de 96 pocillos para determinación de la concentración mínima inhibitoria

La CMI estuvo definida como la menor concentración de los compuestos a la cual los microorganismos ensayados presentaron una inhibición $\geq 50\%$ de crecimiento en comparación con el control libre de tratamiento, y fue determinada mediante lectura de absorbancias por medio del espectrofotómetro Epoch (Biotek, EE. UU) a 530 nm.

Para determinar viabilidad, pureza y densidad del cultivo se realizó la siembra de 10 μ l del pocillo control (n° 12) en ADS, realizando su identificación mediante microscopia y un conteo de las UFC.

6.7 Viabilidad en placa para agentes fúngicos

Con la finalidad de evaluar el rendimiento de crecimiento o muerte, se analizó la viabilidad celular de todos los compuestos que presentaron inhibición del crecimiento (PF-2, PF-4, PF-5, PF-6) y para los cuales se determinaron las CIM. Se preparo el inóculo mediante la escala de 0,5 McFarland (1.5×10^8 UCF/ml) en tubos estándar, en los cuales fue depositado cada uno de los compuestos para su posterior sembrado en placas de Petri con SDA. La presencia de células viables se determinó mediante la cuantificación de las UFC. Los intervalos para la medición fueron de 30 min durante 24 h. Como control positivo se utilizó únicamente el inóculo sin ningún tratamiento. Como control negativo se mantuvo la placa de SDA sin ser inoculada. Todos los resultados fueron confirmados mediante 3 repeticiones.

6.8 Determinación de citotoxicidad celular

6.8.1 Determinación de la citotoxicidad celular mediante ensayo de MTT

Se determinó mediante el ensayo de reducción de la sal bromuro de 3- (4,5- dimetiliazol – 2 - il) 2- 3- difeniltetrazolium (MTT) descrito por Mossman en 1983. Líneas celulares de referencia correspondientes a: Macrófagos J774A.1 (ATCC® TIB-67™), MDBK (NBL-1) (ATCC® CCL-22™) y VERO E6 (ATCC® CRL-1586™), se utilizaron siguiendo las indicaciones de cultivo proporcionadas por la guía ATCC. Se emplearon microplacas de 96 pocillos de poliestireno fondo plano, en la cual se sembraron 100,000 células/ml de la línea celular correspondiente en medio RPMI con 2% de suero fetal bovino. Cada microplaca se

incubo por 24 horas a 37°C con 4% de CO², hasta alcanzar una confluencia del 80%. Para este estudio las soluciones stock fueron diluidas en DMSO al 2% y solución amortiguadora fosfato Salino (PBS). Las concentraciones de los compuestos por ensayar (PF-2, PF-4, PF-5, PF-6) comprendieron entre 100 y 3.175 µM, obtenidas mediante diluciones seriadas. La concentración final fue de 100 µl en cada pocillo. Como controles positivos se utilizaron células a las cuales se les retiro el medio y células con vincristina a una concentración de 100 µM. Como control negativo fueron sembradas células con medio sin ningún tratamiento y células con DMSO al 2%.

Al paso de 24 horas de incubación se observó la morfología celular por medio del invertoscopio (Axiovert 40 CFL, ZEISS®, Alemania). En seguida se realizó el ensayo de viabilidad por MTT. Se retiró el medio de cultivo y se agregó la solución de MTT; se dejó incubar por 4 horas y se colocó DMSO. Se incubo una vez más por 30 minutos y se procedió a realizar la lectura de absorbancias por medio del espectrofotómetro Epoch (Biotek instruments, EE. UU.) a 540 nm. El porcentaje de citotoxicidad se obtuvo a través de la siguiente formula: % citotoxicidad = 100- (A/ B x 100), donde A corresponde a la absorbancia promedio de las células con tratamiento y B a la absorbancia promedio de las células que no recibieron ningún tipo de tratamiento.



Figura 6. Diagrama de distribución en placa de 96 pocillos para ensayo de viabilidad celular mediante MTT

6.8.2 Determinación de la citotoxicidad celular mediante ensayo rojo neutro

Se utilizaron microplacas de 96 pocillos de poliestireno fondo plano, en la cual se sembraron 100,000 células/ml de la línea celular murina de hepatocitos BpRc1 (ATCC® CRL-2217™). Consecutivamente, las microplacas fueron colocadas en una incubadora con atmosfera de CO₂ (Thermo Scientific) bajo condiciones específicas correspondientes a una temperatura de 37°C, humedad relativa de ≈82 % y atmosfera de 95% aire y 5 % CO₂.

Los medios de cultivo utilizados fueron seleccionados siguiendo la información proporcionada por la guía ATCC; correspondiente a medios (GIBCO®, México) suplementados con penicilina / estreptomycin (GIBCO®, México) y suero fetal bovino (SBF, GIBCO®, México).

Las concentraciones de los compuestos por ensayar (PF-2, PF-4, PF-5, PF-6) comprendieron entre 100 y 3.175 μM, obtenidas mediante diluciones seriadas. Para este estudio las soluciones stock fueron diluidas en DMSO al 2% y el mismo medio utilizado para el cultivo celular (GIBCO®, México).

El método utilizado fue la determinación de la viabilidad celular mediante ensayo de rojo neutro (Valdivieso *et al.*, 1993). Todos los experimentos se efectuaron por triplicado con tres repeticiones. La lectura se realizó mediante lectura de absorbancias a 540 nm mediante un espectrofotómetro Epoch (Biotek instruments, EE. UU.). El porcentaje de citotoxicidad se calculó por medio de la siguiente formula: % citotoxicidad = 100 - (A / B x 100), donde A corresponde a la absorbancia promedio de las células tratadas y B a la absorbancia promedio de las células control.

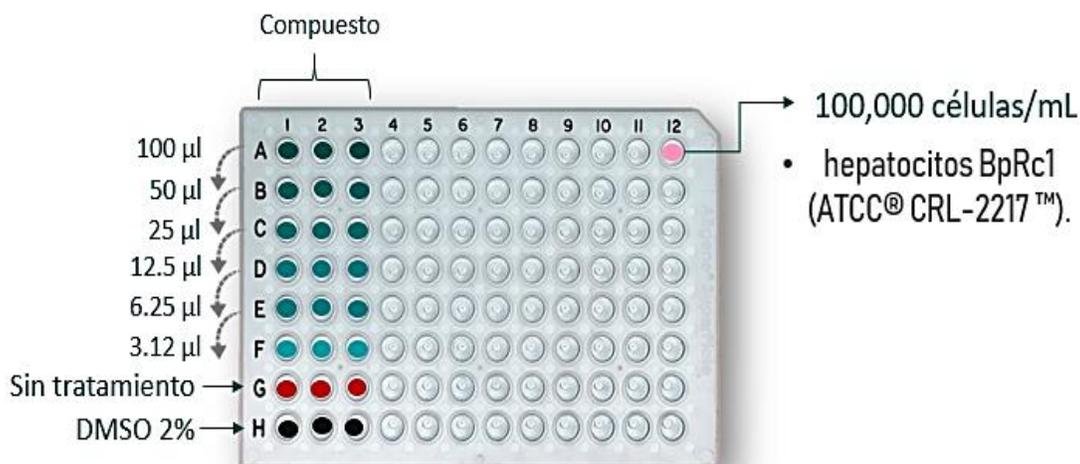


Figura 7. Diagrama de distribución en placa de 96 pocillos para ensayo de viabilidad celular mediante técnica rojo neutro

7. RESULTADOS

7.1 Determinación de la actividad antifúngica

La actividad antifúngica de los complejos metálicos derivados de azol, así como los ligandos libres correspondientes al grupo 1, fueron evaluados frente a seis levaduras y tres hongos filamentosos mediante el método de difusión en pocillos de agar con tres repeticiones. Los resultados obtenidos hasta el momento se resumen en la tabla 2. En su mayoría, las especies fúngicas presentaron resistencia a los tratamientos con estos nuevos compuestos. Sin embargo, el complejo PF-6 mostro actividad en dos de las seis levaduras ensayadas. Por otro lado, se destaca la sensibilidad presentada por *Malassezia pachydermatis* a los nuevos compuestos azolicos, los cuales superaron la respuesta obtenida por el itraconazol como medicamento estándar, el cual no genero ningún efecto visible.

En la figura 8 se muestra las zonas de inhibición presentadas por los compuestos como un ejemplo representativo. Respecto al grupo 2, se observó una menor actividad en comparación al primer grupo, donde ninguno de los compuestos fue capaz de inhibir el crecimiento en ninguna de las especies fúngicas ensayadas. Los resultados se resumen en la tabla 3.

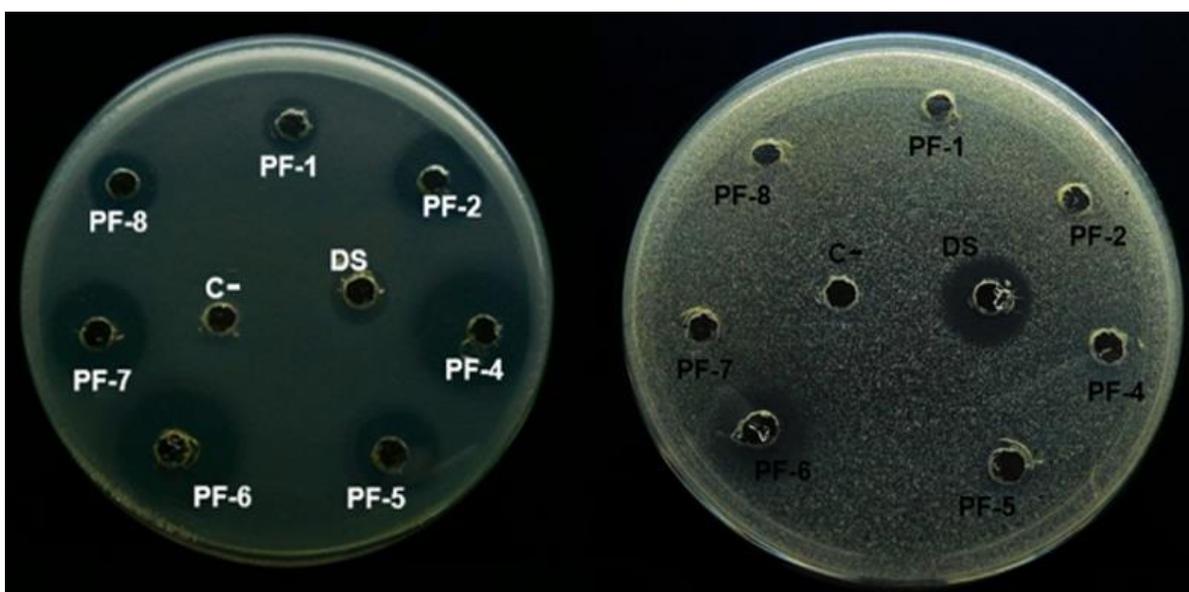


Figura 8. Zonas de inhibición de complejos metálicos contra *C. albicans* (izquierda) y *M. pachydermatis* (derecha). SD= Fármaco Estándar: itraconazol 22 mM. Concentración para cada compuesto: 100 mM.

Tabla 4. Actividad antifúngica presentada por ligandos y complejos metálicos derivados de azol

Organismo	Zona de inhibición - diámetro / mm							
	Grupo I: Complejos metálicos y ligandos							
	SD	L 1-3	PF-1	PF-2	PF-3	PF-4	PF-5	PF-6
Levaduras								
<i>C. albicans</i>	20.4 ± 0.35	-	-	-	-	-	-	6 ± 0.81
<i>C. tropicalis</i>	16.3 0.35	-	-	-	-	9± 1.21	-	16 ± 0.84
<i>C. glabrata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>R. mucilaginosa</i>	16.9 ± 1.41	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. pachydermatis</i>	8.3 ± 0.21	-	7.9 ± 0.47	17.3 ± 0.94	-	23.6 ± 1.24	16.0 ± 1.41	25.1 ± 0.81
Hongos Filamentosos								
<i>A. niger</i>	18.2 ± 2.1	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. canis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>F. oxysporum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

SD= Fármaco Estándar: itraconazol 22 mM.

Tabla 5. Actividad antifúngica presentada por los compuestos policíclicos sin núcleo metálico derivados de azol

Organismo	Zona de inhibición - diámetro / mm							
	Grupo II: Compuestos policíclicos sin núcleo metálico derivados de azol							
	SD	GR-9	GR-10	GR-11	GR-12	GR-13	GR-14	GR-15
Levaduras								
<i>C. albicans</i>	20.4 ± 0.35	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	16.3 0.35	9 ± 0.4	-	-	3 ± 1.12	-	-	-
<i>C. glabrata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>R. mucilaginosa</i>	16.9 ± 1.41	-	8 ± 0.33	-	-	-	-	-
<i>M. pachydermatis</i>	8.3 ± 0.21	-	-	-	-	14.8 ± 0.55	-	-
Hongos Filamentosos								
<i>A. niger</i>	18.2 ± 2.1	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. canis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>F. oxysporum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

SD= Fármaco Estándar: itraconazol 22 mM.

7.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Los valores de CMI sugieren que la actividad antifúngica de los complejos es dependiente de la especie. Los resultados mostraron una baja actividad antifúngica contra todas las cepas evaluadas en comparación con la de los medicamentos estándar. Los valores de MIC⁵⁰ de los complejos oscilaron entre 984-532 µg mL⁻¹ (véase tabla 5).

Tabla 6. CMI⁵⁰ de compuestos y medicamentos de referencia

Organismo	MIC50 / (µg mL ⁻¹)							
	Compuesto							
	PF-2	PF-4	PF-5	PF-6	ITZ	FLZ	VCZ	KTZ
Levaduras								
<i>M. pachydermatis</i>	1325	663	874	532	-	0.25	6	0.06
<i>C. tropicalis</i>	-	984	-	912	32	38	35	41

ITZ = itraconazol; FLZ = fluconazol; VCZ= voriconazol; KTZ= ketoconazol.

7.3 Viabilidad en placa para agentes fúngicos

Se analizó tanto la viabilidad celular como la variación de UFC entre los compuestos que presentaron una mayor actividad mediante el método de difusión en pocillos de agar (PF-2, PF-4, PF-5, PF-6) frente al agente fúngico.

En la figura 11 se muestran los resultados de la variación de UFC/ml a través del tiempo (24 horas) para *M. pachydermatis*. Los resultados indican que, en ausencia de algún compuesto, esta levadura tiende a elevar su número de UFC desde los primeros minutos. Sin embargo, al añadir cualquier compuesto el número de UFC tiende a descender. No obstante, ningún compuesto logra su completa eliminación, por lo cual, su número volverá a aumentar progresivamente con el tiempo; ejemplo de esto, lo podemos observar en el compuesto PF-4, el cual a partir de los 960 min comienza a elevar su número.

A diferencia de *M. pachydermatis*, *C. tropicalis* solo presentó una disminución en su número de UFC frente a los compuestos PF-4 y PF-6 (véase figura 10). Dado que, los compuestos PF-2 y PF-5 no presentaron una acción antifúngica frente a esta levadura, estos resultados eran de esperarse.

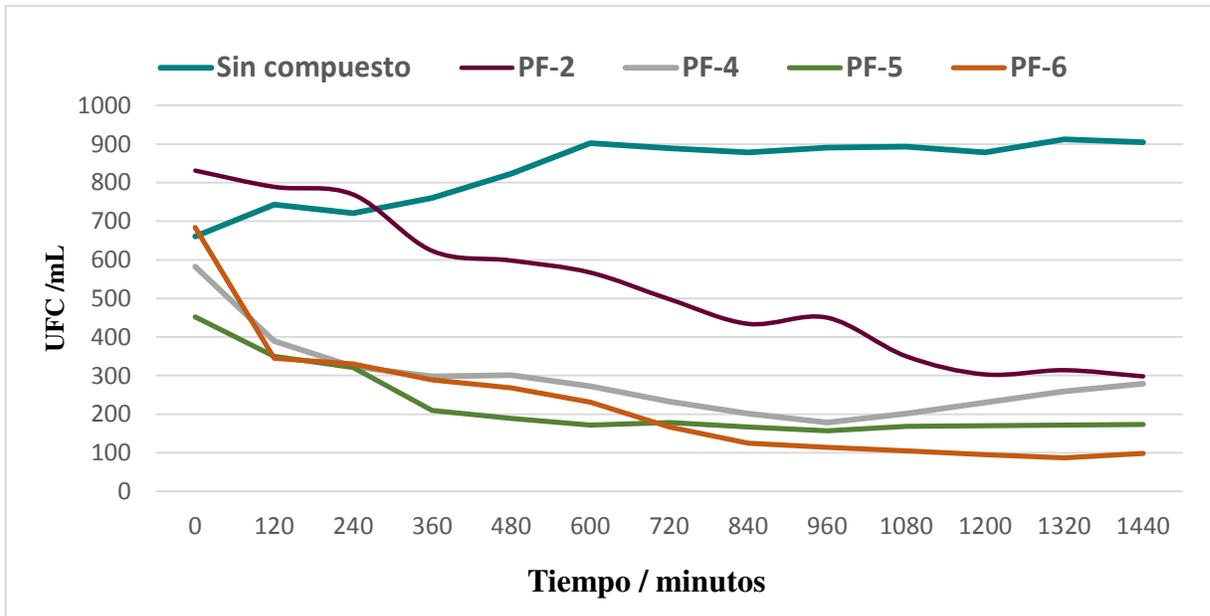


Figura 9. Variación a lo largo del tiempo para *M. pachydermatis* en ausencia / presencia de los compuestos probados.

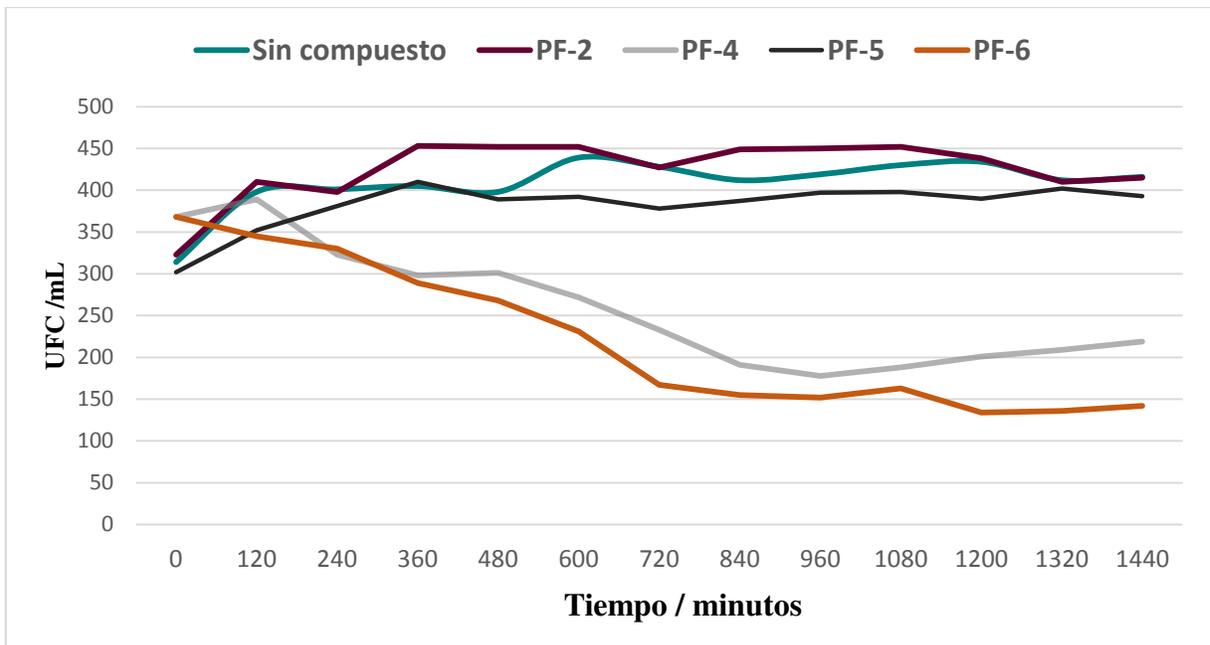


Figura 10. Variación a lo largo del tiempo para *C. tropicalis* en ausencia / presencia de los compuestos probados.

7.4 Determinación de citotoxicidad celular

7.4.1 Determinación de la citotoxicidad celular en macrófagos murinos J774A.1 (ATCC® TIB-67) mediante ensayo de MTT

Se probaron 4 compuestos (PF-2, PF-4, PF-5, PF-6) a diferentes concentraciones frente a la línea celular de macrófagos murinos J774A.1. Los cuales mostraron signos de citotoxicidad mayor al 50% para las concentraciones iguales o superiores a 25 μM . En general se observa que la citotoxicidad es dependiente de la dosis y esta aumenta en paralelo a la concentración, o dicho de igual manera, a mayor dosis, mayor grado de citotoxicidad. Esto se puede apreciar de mejor manera en la figura 11.

7.4.2 Determinación de la citotoxicidad celular en células MDBK (NBL-1) (ATCC®

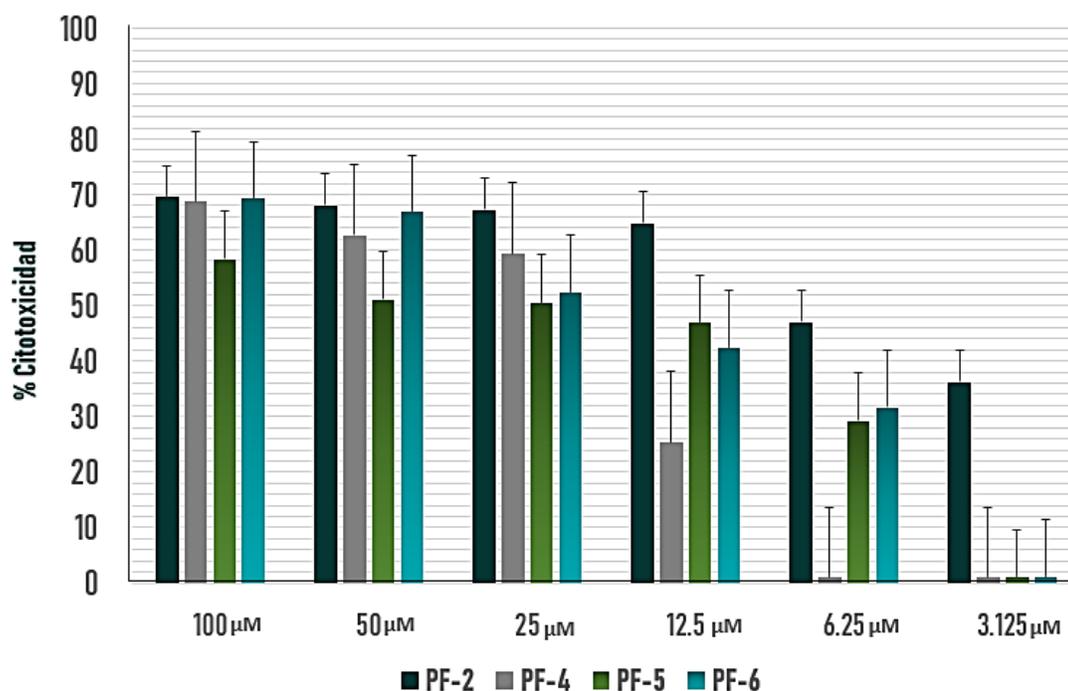


Figura 11. Porcentaje de citotoxicidad en macrófagos murinos J774A.1.

CCL-22TM) mediante ensayo de MTT

La figura 12 muestra los efectos citotóxicos de los compuestos PF-2, PF-4, PF-5 y PF-6; a seis concentraciones decrecientes, mediante el ensayo MTT. En donde se puede observar que los valores de citotoxicidad más altos se presentan a mayor concentración,

independientemente del compuesto. Por otra parte, aunque el compuesto PF-4 presento mayor grado de citotoxicidad entre los compuestos, esto solo se observó a la concentración de 100 μM , ya que, en las demás concentraciones, PF-4 causo el menor daño celular.

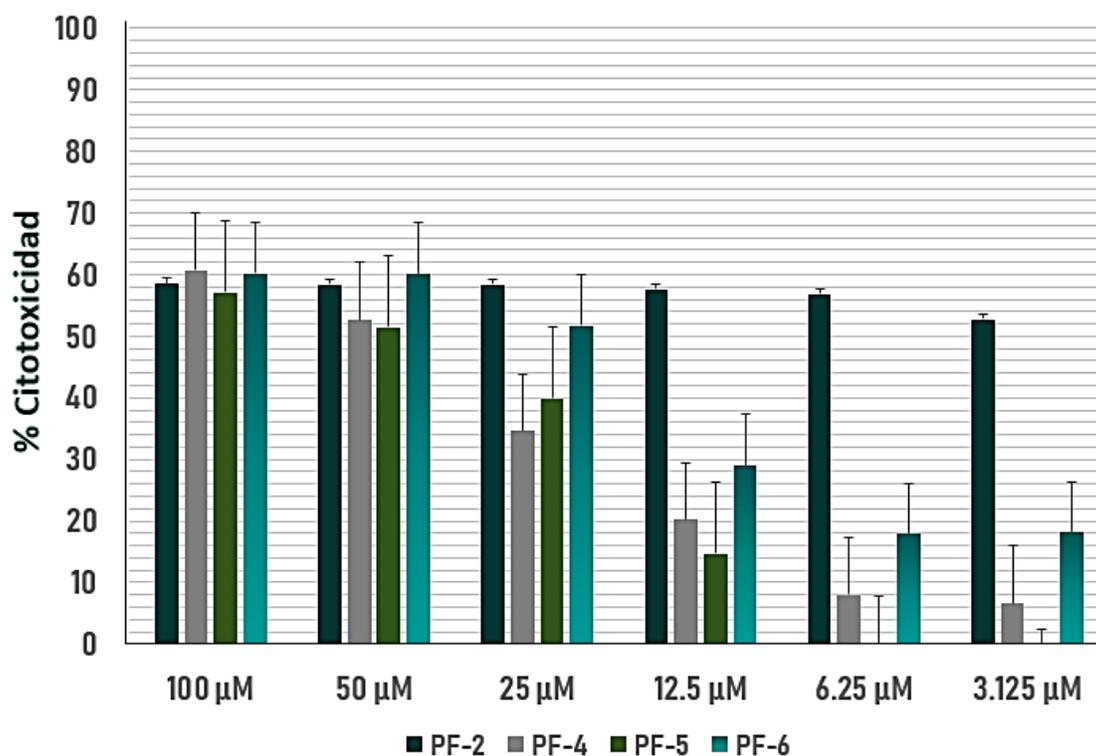


Figura 12. Porcentaje de citotoxicidad en células MDBK (NBL-1).

7.4.3 Determinación de la citotoxicidad celular en células VERO E6 (ATCC® CRL-1586™) mediante ensayo de MTT

En la figura 13 se puede observar que el compuesto PF-4 causo el mayor daño celular, seguido por los compuestos PF-6, PF-2 y PF-5. Así mismo, se puede observar que respecto al compuesto PF-2, el grado de citotoxicidad en las diferentes concentraciones, no tiene una gran variabilidad; aunque en este la mortalidad celular va descendiendo a medida que se baja la concentración, solo hay una diferencia de 5.8% entre la mayor concentración y la menor. Por su parte el compuesto que presento una mayor diferencia entre su mayor y menor concentración, fue el compuesto PF-5, con un 57.1%.

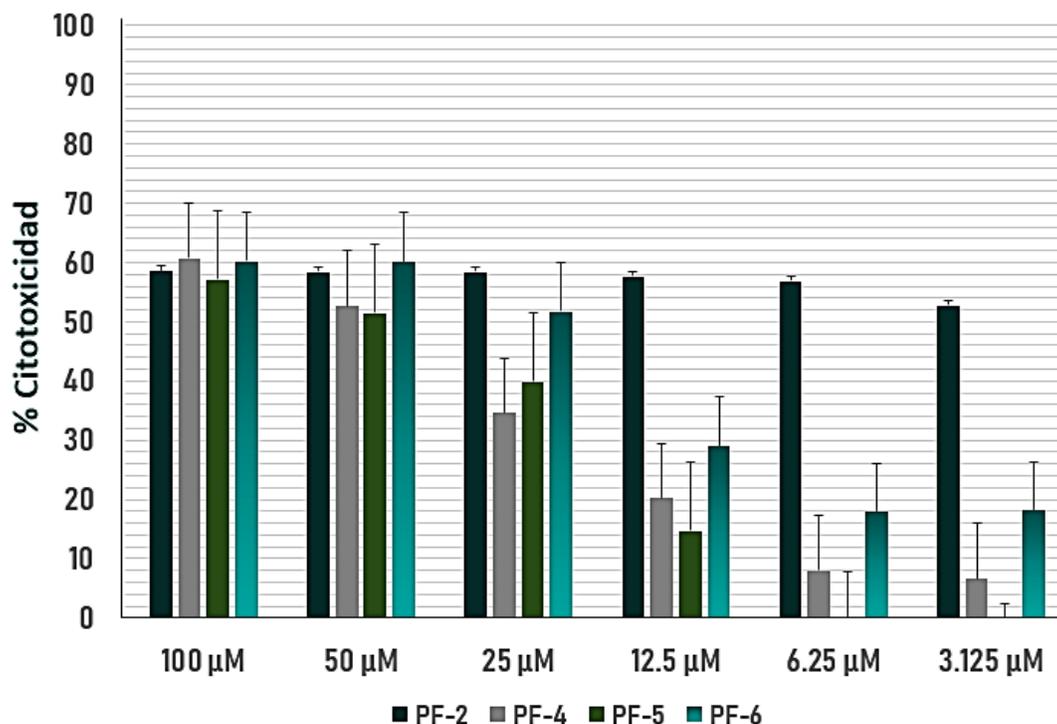


Figura 13. Porcentaje de citotoxicidad en células VERO E6.

7.4.4 Determinación de la citotoxicidad celular en hepatocitos BpRc1 (ATCC® CRL-2217™) mediante ensayo rojo neutro

La figura 14 muestra el efecto citotóxico presentado por los compuestos PF-2, PF-4, PF-5 y PF-6; a seis concentraciones decrecientes mediante la técnica de rojo neutro sobre una línea celular hepática. Se observa una tendencia lineal en cuanto a concentración/dosis, siendo así que, a menor concentración, menor grado de mortalidad celular.

PF-6 se exhibe como el compuesto con mayor grado de citotoxicidad con respecto a los demás, invariablemente de la concentración. En cambio, PF-4 es el compuesto con menor índice de mortalidad celular, de tal forma que, solo a la máxima concentración ensayada (100 μM) presenta actividad, con un valor de 9%.

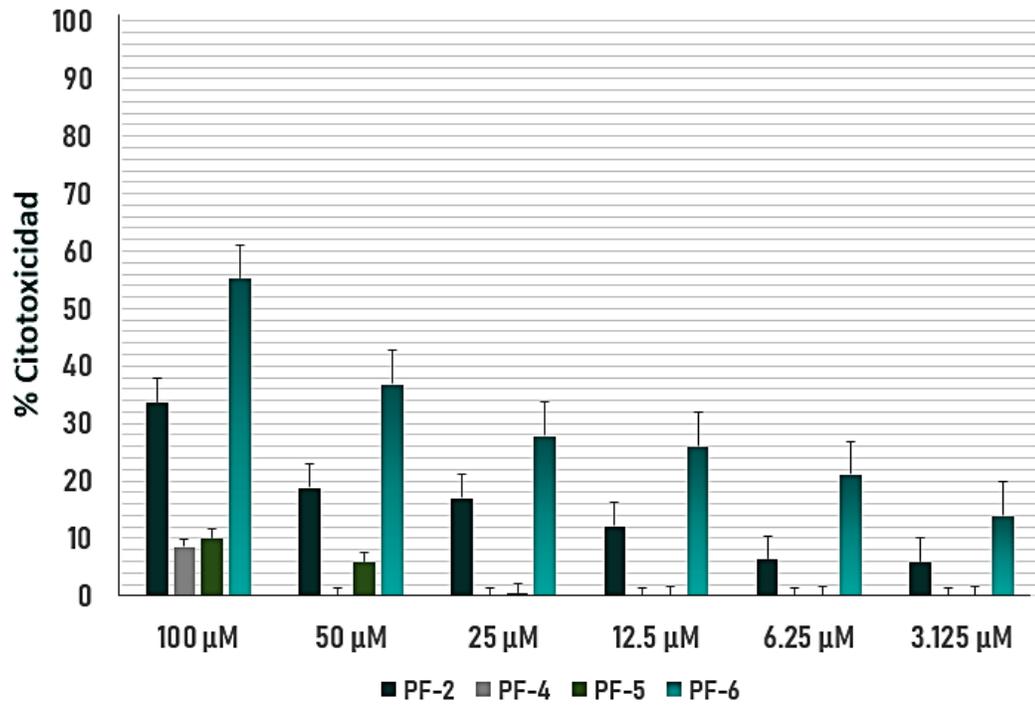


Figura 24. Porcentaje de citotoxicidad en hepatocitos BpRc1.

8. DISCUSIÓN

Esta investigación tuvo como propósito evaluar la actividad biológica *in vitro* de diferentes compuestos derivados de azol sobre agentes fúngicos. Sobre todo, se pretendió examinar aquellos hongos de importancia clínica que pudiesen lograr una infección renuente a los tratamientos convencionales. Por ello, a continuación, se discuten los principales hallazgos de esta investigación, así como todos los aspectos convergentes y divergentes reportados a lo largo de la misma.

A partir de los hallazgos encontrados, podemos establecer que los complejos que contenían cobalto y cobre mostraron mayor actividad antifúngica que los complejos de zinc, níquel y hierro. Estos resultados guardan relación con lo que sostiene Castillo (2016), Hurtado (2018) y Hernández (2018) que señalan que el pequeño tamaño de estas moléculas en relación con el de otros metales, reduce la polaridad y aumenta la lipofilicidad de la membrana fúngica, interrumpiendo los procesos celulares normales y mejorando la actividad antifúngica de los complejos. Siendo esto acorde con lo que en este estudio se describe.

En lo que respecta a los compuestos policíclicos sin núcleo metálico, los resultados obtenidos en esta investigación muestran una alta resistencia por parte de los hongos. Esto podría deberse a la estructura molecular de estos compuestos, principalmente su tamaño, ya que al ser moléculas de gran volumen se dificultaría su entrada a la célula fúngica y por ende su efecto. Otros aspectos importantes que explicarían la incapacidad de difusión a través de la membrana fúngica podría ser la liposolubilidad y el estado de ionización de la molécula. No obstante, no se descarta la posibilidad de mecanismos intracelulares capaces de inactivar el efecto de estos compuestos. Desafortunadamente se necesitarían más estudios que logren dilucidar estas incógnitas.

Por otro lado, en este estudio se evidencia el efecto mostrado en especies fúngicas de tipo filamentoso, tales como *Aspergillus niger*, *Microsporium canis* y *Fusarium oxysporum*; los cuales, no fueron inhibidos por ningún compuesto. Esto probablemente se deba a la creciente resistencia mostrada por estos agentes a variedades de antimicóticos,

especialmente los de tipo azol, tal como lo mencionan Tapia (2012) y Pérez (2002). Por otra parte, la resistencia a niveles ligeramente superiores de metales podría estar influenciada por algún mecanismo celular capaz de evitar una excesiva acumulación. En el caso particular de *Fusarium* spp. se conoce su alta capacidad de tolerancia ante metales, principalmente el del zinc (Castillo *et al.*, 2016).

En lo que respecta a los resultados de CMI_{50} mostraron una baja actividad contra todas las especies evaluadas en comparación con la de los medicamentos de referencia; oscilando entre 532 y 984 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Por su parte, Castillo *et al.* (2016) reporta resultados similares con rangos entre 847 y 13 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en estudios realizados con moléculas de tipo azol.

En lo que respecta a los ensayos de citotoxicidad, se puede determinar que la actividad biocida de los compuestos es dependiente de la línea celular utilizada. Siendo así que, Bello *et al.* (2018) reportaron complejos metálicos con valores mayores al 60% de citotoxicidad en fibroblastos primarios de prepucio humano a concentraciones de 50 μM ; Martínez *et al.* (2012) mostró resultados del 30% citotoxicidad en macrófagos murinos a concentraciones de 33 μM ; y por su parte, Hernández *et al.* (2018) reportara 20 % de citotoxicidad en una línea celular murina de hepatocitos a concentraciones de 15 μM .

9. CONCLUSIONES

Con los resultados expuestos en la presente investigación observamos que los complejos metálicos exhiben una actividad antifúngica moderada, la cual supera a la de sus respectivos ligandos. Así hemos podido constatar que la adición de metales de transición favorece en gran medida su actividad, especialmente las moléculas de cobre y cobalto; siendo así que, los compuestos PF-6 y PF-4 mostraran los mejores resultados.

Se logró determinar la concentración mínima inhibitoria 50 para cuatro nuevos complejos metálicos, siendo PF-6 el compuesto de mayor actividad presentada a menor concentración. Además, se comparó la actividad *in vitro* exhibida frente a medicamentos de referencia estándar.

Consecuentemente, establecimos el efecto citotóxico presentado por los complejos metálicos como dependiente de la dosis, así es que, a mayor concentración, mayor es el efecto negativo causado sobre la célula.

En general, esta investigación corrobora hallazgos anteriormente expuestos en diversos estudios realizados a lo largo de Sudamérica; en los cuales se expone la alta resistencia hacia moléculas antifúngicas. Por lo que, nos permite tener una idea general de las consecuencias que puede llegar a tener el uso indiscriminado de antimicóticos en tratamientos empíricos y de tipo profiláctico, ocasionando una creciente resistencia, fundamentalmente a los antimicóticos de tipo azol.

En este punto correspondería plantearse la idea de realizar nuevos estudios con moléculas ligeramente modificadas, dado que, los complejos metálicos derivados de azol han mostrado ser moléculas prometedoras en el tratamiento de enfermedades micóticas.

10. BIBLIOGRAFÍA

Alexopoulos, C.J., C.W. Mims & M. Blackwell. (1996). *Introductory Mycology*. 4th ed. John Wiley & Sons Inc. New York, E.U.

Arenas Guzman, R. (2014). *Micología médica ilustrada 5ª ed.* McGraw Hill. México.

Arjona, E. G. (2016). Los hongos y el paso del tiempo. *Revista Eubacteria*. ISSN 1697-0071

Cabral, M. E., Figueroa, L. I. C., & Fariña, J. I. (2013). Synergistic antifungal activity of statin-azole association as witnessed by *Saccharomyces cerevisiae*- and *Candida utilis*-bioassays and ergosterol quantification. *Revista Iberoamericana de Micología*, 30(1), 31–38.

Carvalho, L. I. S. De, Alvarenga, D. J., Carmo, L. C. F. Do, Oliveira, L. G. De, Silva, N. C., Dias, A. L. T.,... Carvalho, D. T. (2017). Antifungal Activity of New Eugenol-Benzoxazole Hybrids against *Candida* spp. *Journal of Chemistry*, 2017.

Castillo, K. F., Bello-Vieda, N. J., Nuñez-Dallos, N. G., Pastrana, H. F., Celis, A. M., S., Ávila, A. G. (2016). Metal Complex Derivatives of Azole: a Study on Their Synthesis, Characterization, and Antibacterial and Antifungal Activities. *Article J. Braz. Chem. Soc*, 0(0), 1-14.

Cepero de García, M. C. (2012). *Biología de hongos*. Ediciones Uniandes-Universidad de los Andes.

Dentone, S., & Cauti, S. M. (2017). Determinación in vitro de la Actividad Antimicótica del Aceite de Romero (*Rosmarinus officinalis*) sobre *Microsporum canis*, 28(1), 56–61.

Erchiga, V. C. (2008). Generalidades sobre los hongos. Dermatomicosis: saprofitias y dermatofitosis. *Piel*, 23(7), 389-396.

Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Martínez-Romero A, Jiménez N, Castell JV, O'Connor JE (2007). A human hepatocellular *in vitro* model to investigate steatosis. *Chemico-Biological Interactions*. 165:106–116.

López, R. (2008). Dermatitis canina por *Malassezia* - Canine *Malassezia* dermatitis. *REDVET: 2008, Vol. IX, No 5 Recibido: IX (5)*, 1–13.

López-Ávila, K., Dzul-Rosado, K. R., Lugo-Caballero, C., Arias-León, J. J., & Zavala-Castro, J. E. (2016). Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. Una revisión. *Mechanisms of Antifungal*

Ma Z, Michailides TJ. (2005). Avances en la comprensión de los mecanismos moleculares de la resistencia a los fungicidas y la detección molecular de genotipos resistentes en hongos fitopatógenos. *Crop Prot.* 24: 853-863.

Madison, Jill E. *et al.* (2008). Farmacología clínica en pequeños animales. Argentina: Inter-Médica. 300 p.

Marín, J. C. G., Rojas, F. B., Sc, M., Gibga, G. D. I., & De, F. D. M. U. (2016). Infecciones Zoonóticas Causadas Por Levaduras Del Género *Malassezia* Review, 381–393

Pérez, J. L., Guna, R., Orta, N., & Gimeno, C. (2003). Nuevos azoles: Voriconazol. Control calidad, Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

Resistance of Azoles in Candida Albicans. A Review. 27(3), 127–136.

Ribas e Ribas, A. D., Spolti, P., Del Ponte, E. M., Donato, K. Z., Schrekker, H., & Fuentefria, A. M. (2016). Is the emergence of fungal resistance to medical triazoles . related

to their use in the agroecosystems? A mini review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(4), 793–799.

Sadeghpour, H., Khabnadideh, S., Zomorodian, K., Pakshir, K., Hoseinpour, K., Javid, N., Rezaei, Z. (2017). Design, Synthesis, and Biological Activity of New Triazole and Nitro-Triazole Derivatives as Antifungal Agents. *Molecules*, 22(7), 1150.

Tapia, Cecilia. (2012). Antifúngicos y resistencia. *Revista chilena de infectología*, 29(3), 357. dx.doi.org/10.4067/S0716-10182012000300020

Vaupotic T, Veranic P, Jenoe P, Plemenitas A. (2008). «Mitochondrial mediation of environmental osmolytes discrimination during osmoadaptation in the extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii*». *Fungal Genetics and Biology* 45 (6): 994-1007.

Whittaker R.H. (1959). "Sobre la clasificación general de los organismos", *The Quarterly Review of Biology* 34, no. 3 :210-226.

Whittaker R.H. (1969). New concepts of kingdoms or organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms. *Science*, 163:150-160

Youbu, K. G., & Iyazawa, M. M. (2007). In Vitro. *Liver*, 30(2), 230–233.

Manzano-Gayosso, P., Méndez-Tovar L., Hernández-Hernández F., López-Martínez R. (2008). La resistencia a los antifúngicos: un problema emergente en México. *Gac Méd Méx* 144(1), 23–26.

Pfaller, M. A. (2012). *Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. The American Journal of Medicine*, 125(1), S3–S13. doi:10.1016/j.amjmed.2011.11.001

Kenneth J.R. & C. George R. (2011). Sherris Microbiología Médica. 5ta edición. McGraw-Hill: México, D.F. pp. 527-,532

Guzmán A. R., (2008). Micología Médica Ilustrada. 3ra edición. McGraw-Hill Interamericana: México, D.F. pp. 1-9, 15-16, 20-22, 23-32

Murray R.P., Rosenthal S.K. & Pfaller A.M. (2009). Microbiología Médica. Elsevier. Madrid, pp. 676-,713

López Sumano S. H. & Ocampo Cambreros L. (2006). Farmacología Veterinaria. 3ra edición. McGraw-Hill Interamericana: México, D.F. pp. 345-361

Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. (2001). Veterinary Microbiology and Microbial Disease.1st edition. Editorial Blackwell Science. UK. pp: 233-245.

Biberstein E.L, & Zee Chung Y. (1994). Tratado de microbiología veterinaria. Acribia S.A., Zaragoza, pp. 105-117, 257-262, 325-329.

McVey D.S., Kennedy M. & Chengappa M.M. (2013). Veterinary Microbiology. 3rd edition. Ed. Wiley-Blackwell. New Delhi, India. pp: 313-314, 316-317, .

Hirsh C D., MacLachlan N.J. & Walker L.R. (2004). Microbiología veterinaria. 2da edición. Editorial Blackwell,, U.S.A., pp. 265, 268-272, 273-278.

Ashton, G. D., & Dyer, P. S. (2019). Culturing and mating of *Aspergillus fumigatus*. Current Protocols in Microbiology, 54, e87. doi: 10.1002/cpmc.87

Lohse, MB, Gulati, M., Johnson, AD y Nobile, CJ (2018). Desarrollo y regulación de biopelículas de *Candida albicans* de una o varias especies. *Revisiones de la naturaleza. Microbiología* , 16 (1), 19–31. doi: 10.1038 / nrmicro.2017.107

White, T. C., Findley, K., Dawson, T. L., Jr, Scheynius, A., Boekhout, T., Cuomo, C. A., ... Saunders, C. W. (2014). Fungi on the skin: dermatophytes and Malassezia. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 4(8), a019802. doi:10.1101/cshperspect.a019802

Velegraki, A., Cafarchia, C., Gaitanis, G., Iatta, R., & Boekhout, T. (2015). Malassezia infections in humans and animals: pathophysiology, detection, and treatment. *PLoS pathogens*, 11(1), e1004523. doi:10.1371/journal.ppat.1004523

Frisvad, J. C., Petersen, L. M., Lyhne, E. K., & Larsen, T. O. (2014). Formation of sclerotia and production of indoloterpenes by *Aspergillus niger* and other species in section *Nigri*. *PloS one*, 9(4), e94857. doi:10.1371/journal.pone.0094857

Nunes, JM, Bizerra, FC, Ferreira, RC y Colombo, AL (2013). Identificación molecular, perfil de susceptibilidad antifúngica y formación de biopelículas de aislados de especies de *Rhodotorula* clínicas y ambientales. *Agentes antimicrobianos y quimioterapia* , 57 (1), 382-389. doi: 10.1128 / AAC.01647-12

Fontenelle, R. O., Morais, S. M., Brito, E. H., Brilhante, R. S., Cordeiro, R. A., Lima, Y. C., ... Rocha, M. F. (2011). Alkylphenol Activity against *Candida* spp. and *Microsporum canis*: A Focus on the Antifungal Activity of Thymol, Eugenol and O-Methyl Derivatives. *Molecules* (Basel, Switzerland), 16(8), 6422–6431. doi:10.3390/molecules16086422

Tsuchimori, N., Hayashi, R., Kitamoto, N., Asai, K., Kitazaki, T., Iizawa, Y., ... Okonogi, K. (2002). In vitro and in vivo antifungal activities of TAK-456, a novel oral triazole with a broad antifungal spectrum. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(5), 1388–1393. doi:10.1128/aac.46.5.1388-1393.2002

de With, K., Steib-Bauert, M., Knoth, H., Dörje, F., Strehl, E., Rothe, U., ... Kern, WV (2005). Uso hospitalario de medicamentos antimicóticos sistémicos. *BMC farmacología clínica* , 5 , 1. doi: 10.1186 / 1472-6904-5-1

Rex, JH, Pfaller, MA, Rinaldi, MG, Polak, A. y Galgiani, JN (1993). Pruebas de susceptibilidad antifúngica. *Revisiones clínicas de microbiología* , 6 (4), 367–381. doi: 10.1128 / cmr.6.4.367

Espinel-Ingroff A. (1996). History of medical mycology in the united states. *Clinical microbiology reviews*, 9(2), 235–272.

Head, MG, Fitchett, JR, Atun, R. y May, RC (2014). Análisis sistemático de los fondos otorgados para la investigación de micología a instituciones en el Reino Unido, 1997-2010. *BMJ abierto* , 4 (1), e004129. doi: 10.1136 / bmjopen-2013-004129

Wang, M., Tian, J., Xiang, M. y Liu, X. (2017). Estrategia viva de hongos adaptados al frío con referencia a varias especies representativas. *Micología* , 8 (3), 178-188. doi: 10.1080 / 21501203.2017.1370429

Khadka, S., Sherchand, JB, Pokharel, DB, Pokhrel, BM, Mishra, SK, Dhital, S. y Rijal, B. (2016). Caracterización clinicomicológica de micosis superficiales de un hospital de atención terciaria en Nepal. *Investigación y práctica dermatológica* , 2016 , 9509705. doi: 10.1155 / 2016/9509705

Wingfield, MJ, De Beer, ZW, Slippers, B., Wingfield, BD, Groenewald, JZ, Lombard, L. y Crous, PW (2012). Un hongo, un nombre promueve la patología progresiva de las plantas. *Molecular plant pathology* , 13 (6), 604–613. doi: 10.1111 / j.1364-3703.2011.00768.x

Prakash, PY, Irinyi, L., Halliday, C., Chen, S., Robert, V. y Meyer, W. (2017). Bases de datos en línea para taxonomía e identificación de hongos patógenos y propuesta para una

plataforma de red de datos dinámicos basada en la nube. *Revista de microbiología clínica* , 55 (4), 1011-1024. doi: 10.1128 / JCM.02084-16

Pérez-Nadales, E., Nogueira, MF, Baldin, C., Castanheira, S., El Ghalid, M., Grund, E., ... Wendland, J. (2014). Sistemas de modelos fúngicos y la aclaración de los determinantes de la patogenicidad. *Genética y biología fúngica: FG & B* , 70 (100), 42–67. doi: 10.1016 / j.fgb.2014.06.011

Herrera, T; Ulloa, M. (1990) El reino de los hongos. México: Universidad Nacional Autónoma de México. 69-339.

Polonelli, L; Ajello, L; Morace, G. (1993) Micología medica. Bologna: Esculapio. 1-10.

Hopke, A., Brown, A., Hall, RA y Wheeler, RT (2018). Arquitectura dinámica de la pared celular fúngica en la adaptación al estrés y la evasión inmune. *Tendencias en microbiología* , 26 (4), 284–295. doi: 10.1016 / j.tim.2018.01.007

Riquelme, M., Aguirre, J., Bartnicki-García, S., Braus, GH, Feldbrügge, M., Fleig, U., ... Fischer, R. (2018). Morfogénesis fúngica, desde el crecimiento polarizado de las hifas a estructuras complejas de reproducción e infección. *Revisiones de microbiología y biología molecular: MMBR* , 82 (2), e00068-17. doi: 10.1128 / MMBR.00068-17

Chanda, A., Roze, LV, Kang, S., Artymovich, KA, Hicks, GR, Raikhel, NV, ... Linz, JE (2009). Un papel clave para las vesículas en el metabolismo secundario fúngico. *Actas de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de América* , 106 (46), 19533-19538. doi: 10.1073 / pnas.0907416106

Wisecaver, JH, Slot, JC y Rokas, A. (2014). La evolución de las vías metabólicas fúngicas. *Genética PLoS* , 10 (12), e1004816. doi: 10.1371 / journal.pgen.1004816

Baron, E. J., Miller, J. M., Weinstein, M. P., Richter, S. S., Gilligan, P. H., Thomson, R. B., Jr, ... Pritt, B. S. (2013). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis

of infectious diseases: 2013 recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM)(a). *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 57(4), e22–e121. doi:10.1093/cid/cit278

Ojeda-López, M., Chen, W., Eagle, CE, Gutiérrez, G., Jia, WL, Swilaiman, SS, ... Dyer, PS (2018). Evolución de la reproducción asexual y sexual en los aspergilli. *Estudios en micología* , 91 , 37-59. doi: 10.1016 / j.simyco.2018.10.002

Steensels, J., Snoek, T., Meersman, E., Picca Nicolino, M., Voordeckers, K., & Verstrepen, K. J. (2014). Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS microbiology reviews*, 38(5), 947–995. doi:10.1111/1574-6976.12073

Gregorí Valdés, Bárbara Susana. (2005). Structure and activity of the antifungal agents. *Revista Cubana de Farmacia*, 39(2)

Méndez, Johana, & Herrera, Marco L.. (2001). Métodos de susceptibilidad antifúngica: revisión metodológica. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 36(1-2), 37-44.

THOMPSON M., LUIS. (2002). Antifúngicos. *Revista chilena de infectología*, 19(Supl. 1), S22-S25. dx.doi.org/10.4067/S0716-10182002019100003

Azanza J.R., Quetglas G. E. & Sádaba B. (2007). Farmacología de los azoles. *Revista Iberoamericana de micología*, 24: 223-227.