



Trabajo Fin de Máster

Máster en Biología Molecular y Celular. 2017-2018

Influencia de los productos del metabolismo secundario de *Aspergillus* sobre la viabilidad de hongos y bacterias de interés clínico

Tutores:

Presentado por:
Patricia Esteban Sánchez

Dra. Eva María Gálvez Buerba

Dr. Antonio Rezusta López

Ponente:

Dr. Julián Pardo Jimeno

Hospital Universitario Miguel Servet
Instituto de Carboquímica (CSIC)
Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA)



Universidad
Zaragoza

IACS Instituto Aragonés de
Ciencias de la Salud



**HOSPITAL UNIVERSITARIO
MIGUEL SERVET**

Dª. EVA GÁLVEZ BUERBA, Doctora en Ciencias y Científica Titular en el Instituto de Carboquímica (CSIC) y D. ANTONIO REZUSTA LÓPEZ, Doctor en Medicina e Investigador Asociado del Departamento de Microbiología, Salud Pública y Medicina Preventiva de la Universidad de Zaragoza

CERTIFICAN:

Que el Proyecto Máster “Influencia de los productos del metabolismo secundario de *Aspergillus* sobre la viabilidad de hongos y bacterias de interés clínico”, ha sido realizado por la Licenciada en Farmacia PATRICIA ESTEBAN SANCHEZ en el Instituto de Carboquímica (CSIC) bajo su dirección y que reúne, a su juicio, las condiciones requeridas para optar al Título de Máster en Biología Molecular y Celular.

Zaragoza, Septiembre de 2018

Fdo.: Dª. Eva Mª Galvez Buerba

D. Antonio Rezusta López

Índice

1. ABREVIATURAS.....	5
2. RESUMEN	6
3. INTRODUCCIÓN	8
3.1 <i>Aspergillus</i>	8
3.2 Metabolismo secundario	9
3.3 Gliotoxina	10
3.4 Resistencia a los antimicrobianos, un problema mundial.....	14
3.5 Microorganismos estudiados	16
3.5.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	16
3.5.2 <i>Candida albicans</i> y <i>Candida glabrata</i>	18
3.5.3 <i>Escherichia coli</i>	19
3.5.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
4. ANTECEDENTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	21
4.1 Antecedentes: Uso de gliotoxina como antimicrobiano	21
4.2 Hipótesis y objetivos	22
5. MATERIALES Y MÉTODOS	23
5.1 Cepas estudiadas	23
5.2 Preparación del inóculo.....	23
5.3 Gliotoxina	24
5.4 Antibiograma disco-placa	24
5.5 Curvas de muerte respecto al tiempo.....	26
5.6 Determinación de la sensibilidad microbiana a gliotoxina.....	28
5.6.1 Método de microdilución para determinar la concentración mínima inhibitoria, concentración mínima bactericida/fungicida e IC ₅₀ de gliotoxina frente a <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>C.</i> <i>albicans</i>	28

5.6.2	Ensayo MTT para la determinación de la concentración mínima inhibitoria de gliotoxina frente a <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>C. albicans</i>	30
5.6.3	Estudio del efecto de gliotoxina frente a <i>C. albicans</i> mediante citometría de flujo	31
6. RESULTADOS	32
6.1	Análisis del efecto de GT mediante antibiogramas disco-placa	32
6.2	Curvas de muerte respecto al tiempo.....	34
6.3	Determinación de la sensibilidad microbiana frente a gliotoxina ..	38
6.3.1	Método de microdilución para determinar concentración mínima inhibitoria, concentración mínima bactericida/fungicida e IC ₅₀ de gliotoxina.....	38
6.3.2	Ensayo MTT	40
6.3.3	Estudio del efecto de gliotoxina frente a <i>C. albicans</i> mediante citometría de flujo	44
7. DISCUSIÓN	45
8. CONCLUSIONES	51
9. PERSPECTIVAS FUTURAS	53
10. BIBLIOGRAFÍA	54

1. ABREVIATURAS

A. fumigatus: *Aspergillus fumigatus*

AI: Aspergilosis Invasiva

AM: Antimicrobiano

ATCC: cepa de referencia

bmGT: bismetilgliotoxina

C. albicans: *Candida albicans*

CAZ: ceftazidima

CMB: Concentración Mínima Bactericida

CMF: Concentración Mínima Fungicida

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

CTX: cefotaxima

Cyt c: citocromo c

DMSO: dimetilsulfóxido

E. coli: *Escherichia coli*

ETPs: epipolitiodioxopiperazinas

EUCAST: Comité Europeo de Pruebas de Sensibilidad Antimicrobiana (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)

FD: ácido fusídico

FOX: cefoxitina

GT: gliotoxina

IC₅₀: Concentración inhibitoria media

MH: Mueller-Hinton

MTT: bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio

P. aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*

ROS: especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species)

RPMI: Medio Roswell Park Memorial Institute

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

SARM: *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina

SARM-AC: *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina Adquirido en la Comunidad

sd: Desviación estándar

T: Reducción logarítmica total respecto al control

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

VRC: voriconazol

2. RESUMEN

La gliotoxina es una micotoxina producida por *Aspergillus fumigatus* y otros hongos del género *Aspergillus*. Se trata de un metabolito secundario perteneciente a la familia de las epipolitiodioxopiperazinas que se caracteriza por la presencia de un puente disulfuro interno en un anillo de piperazina, el cual parece ser necesario para la mayoría de las propiedades biológicas de este compuesto. La gliotoxina ha demostrado ser un factor de virulencia en aspergilosis, y presenta notable toxicidad en células de mamífero. Existe escasa evidencia científica acerca del uso de gliotoxina como antimicrobiano, por ello en este trabajo se pretende evaluar su eficacia antibiótica frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*; y antifúngica frente a *Candida albicans* y *Candida glabrata*. Para ello se llevaron a cabo diferentes métodos para estudiar la sensibilidad de dichos microorganismos de interés clínico frente a gliotoxina: métodos de difusión disco-placa (antibiogramas/antifungigramas), estudio de curvas de muerte respecto al tiempo, métodos de microdilución y ensayo MTT, así como su estudio mediante citometría de flujo. Los resultados sugieren una potente actividad antimicrobiana de gliotoxina frente a *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*, incluso en las cepas azol-resistentes y meticilin-resistentes, respectivamente. En el caso de *Escherichia coli* y *Candida glabrata*, la gliotoxina ejerce una acción antimicrobiana moderada. Sin embargo, *Pseudomonas aeruginosa* parece ser resistente a gliotoxina. Por todo ello, se plantea la continuar con el estudio del efecto de gliotoxina frente a estas cepas y su posible aplicación futura en terapéutica para infecciones cutáneas causadas por *Staphylococcus aureus*, teniendo en cuenta el riesgo debido a su toxicidad.

ABSTRACT

Gliotoxin is a mycotoxin produced by *Aspergillus fumigatus* and other fungi of the *Aspergillus* genus. It is a secondary metabolite belonging to the family of epipolithiodioxopiperazines, characterized by the presence of an internal disulfide bridge in a piperazine ring, which seems to be necessary for most of the biological properties of this compound. Gliotoxin has been shown to be a virulence factor in aspergillosis, and it presents remarkable toxicity in mammalian cells. There is hardly any scientific evidence about the use of gliotoxin as an antimicrobial, therefore this work aims to evaluate its antibiotic efficacy against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*,

Pseudomonas aeruginosa; and antifungal against *Candida albicans* and *Candida glabrata*. To this end, different methods have been carried out to study the sensitivity of these microorganisms of clinical interest against gliotoxin: disc-diffusion methods (antibiograms / antifungigrams), study of time-mortality curves, microdilution methods and MTT assay, as well as its study by flow cytometry. The results suggest a potent antimicrobial activity of gliotoxin against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*, even in the azole-resistant and methicillin-resistant strains, respectively. In the case of *Escherichia coli* and *Candida glabrata*, gliotoxin exerts a moderate antimicrobial action. However, *Pseudomonas aeruginosa* appears to be resistant to gliotoxin. Therefore it is proposed to continue studying the effect of gliotoxin against these strains and its possible future application in therapy for cutaneous infections caused by *Staphylococcus aureus*, taking into account the risk due to its toxicity.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 *Aspergillus*

El género *Aspergillus* contiene más de 200 especies reconocidas y pertenece a los Deuteromycetes (fungi imperfecti). Es un hongo saprófito formado por hifas hialinas septadas. Como se puede observar en la Figura 1, al final de cada hifa se encuentra una estructura llamada conidióforo, que da origen a las conidias necesarias para la reproducción asexual, aunque ciertas especies también son capaces de reproducirse de forma sexual (1).

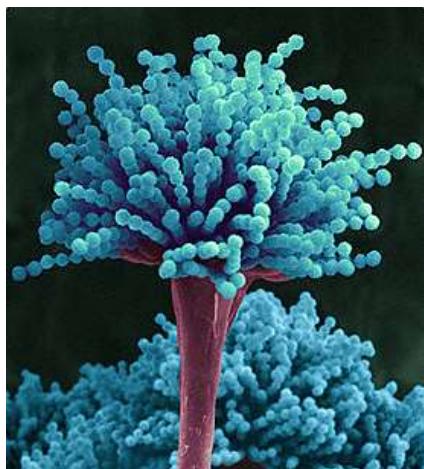


Figura 1. Se muestran las conidias del hongo *Aspergillus fumigatus* agrupadas en forma de ramo en el conidióforo, estructura que genera las esporas asexuales y de la cual éstas se pueden liberar con gran facilidad. Fotografía obtenida de Dennis Kunkel Microscopy, Inc. 2004.

Aspergillus fumigatus (*A. fumigatus*) es la especie más patógena y más frecuentemente aislada en los cuadros invasivos. Está presente en casi cualquier sustrato (suelo, aire, alimentos, plantas, materia orgánica en descomposición...), pudiéndose encontrar normalmente en el polvo y los alimentos. Sus conidias son ubicuas en el medio ambiente y comúnmente se inhalan. Su desarrollo se ve favorecido por la humedad y las temperaturas elevadas (termófilos) y no forman parte de la flora normal.

A. fumigatus es capaz de generar gran diversidad de metabolitos secundarios, entre ellos gliotoxina (GT), una micotoxina perteneciente a las epipolitiodioxopiperazinas (ETPs).

A. fumigatus es la causa predominante de la aspergilosis en todo el mundo. Esta especie a menudo causa aspergilosis invasiva (AI), que es potencialmente mortal (2). Normalmente, la AI solo afecta a pacientes inmunodeprimidos, aquellos sometidos a terapias inmunosupresoras, sujetos trasplantados, infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana, o pacientes con otras afecciones médicas como fibrosis

quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica o asma grave, ya que la ruta primaria a una infección establecida es a través de los pulmones (3). De las diferentes secciones de *Aspergillus*, solo las asociadas con aspergilosis como *A. fumigati*, *A. terrei*, *A. flavi* y *A. niger*, son productoras de GT (4, 5).

Más del 90% de los aislados en un estudio (6) de casos de AI en centros de cáncer de atención terciaria fueron productores de GT. Además, la cantidad de GT producida por *A. fumigatus* es sustancialmente mayor que la cantidad producida por otras especies menos frecuentes de *Aspergillus* patógenas, incluidos *A. terreus* y *A. flavus* (4).

A. fumigatus infecta o coloniza principalmente a pacientes hospitalizados, la misma población de pacientes colonizados por otros hongos patógenos como *Candida albicans* (*C. albicans*), *Cryptococcus neoformans*... proporcionando un ambiente propicio para las interacciones patógeno-patógeno entre estos hongos, en particular dentro del sistema pulmonar (7). Por ejemplo, puede ocurrir una coinfección/colonización simultánea de *Aspergillus* spp. y *Candida* spp. (8), y se conoce que la GT producida por *Aspergillus* tiene una potente actividad antifúngica contra *C. albicans*, *Candida neoformans* y otros hongos patógenos (9), lo cual le proporciona a *A. fumigatus* ventajas competitivas en cuanto a su supervivencia en el hospedador.

3.2 Metabolismo secundario

Los metabolitos secundarios son moléculas pequeñas, de bajo peso molecular sintetizadas por numerosos organismos. La síntesis de estos compuestos no se requiere para el crecimiento normal del microorganismo, pero pueden proporcionarle diferentes beneficios en cuanto a defensa o señalización (10). Pueden ser de naturaleza benigna, como los pigmentos o las moléculas utilizadas en la comunicación entre especies, pero también pueden ser malignos y presentar actividad antimicrobiana o tóxica con el objetivo de eliminar otros microorganismos competidores (11). Algunos de estos metabolitos secundarios microbianos han sido estudiados por científicos debido a su potencial beneficio para los humanos, y han proporcionado numerosos productos farmacéuticos, desde antibióticos hasta compuestos inmunosupresores (7).

Los hongos tienen la capacidad de producir una gran variedad de metabolitos secundarios, generalmente dependientes de la etapa de desarrollo del hongo y factores ambientales como la concentración de nutrientes, la luz o la temperatura (11). Los hongos pertenecientes al género *Aspergillus* son especialmente capaces de producir una

gran diversidad de compuestos, de hecho secretan más de 226 metabolitos secundarios, incluidos los policétidos comúnmente estudiados, como péptidos cíclicos, alcaloides y sequiterpenoides (12). Los miembros de otra clase de metabolitos secundarios producidos por *A. fumigatus* son las denominadas epipolitiodioxopiperazinas (ETPs), cuyo miembro mejor caracterizado es la GT (13).

3.3 Gliotoxina

Se trata de uno de los miembros mejor conocidos de la clase de metabolitos fúngicos llamados ETPs. La GT fue descubierta por Weindling y Emerson. En 1936 estudiaron su producción por *Trichoderma lignorum* y su eficacia antibiótica *in vitro* frente a bacterias grampositivas y gramnegativas. White publicó un trabajo en *Science* en 1940 (14) en el cual se describían las propiedades bactericidas de los filtrados de cultivos de *A. flavus*, lo cual dio origen a una verdadera fiebre de investigación en torno a esta especie (15). La GT fue descrita en 1943 (16) y su estructura elucidada en 1966 (17). La estructura de las ETPs, y concretamente de la GT (Figura 2), se caracteriza por la presencia de un puente disulfuro interno en un anillo de piperazina, que parece ser necesario para la mayoría de las propiedades biológicas de estos compuestos (18).

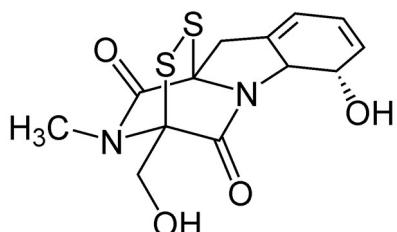


Figura 2. Estructura química de la GT, caracterizada por un anillo de piperazina que contiene un puente disulfuro. Imagen obtenida de Wikimedia Commons.

La síntesis de GT es realizada por las enzimas codificadas en un clúster de 12 genes (clúster *gli*) localizado en el cromosoma 6. El estudio de estos 12 genes ha dado a conocer la relevancia de la GT como compuesto tóxico y factor de virulencia durante AI en diversos casos comentados a continuación.

El cluster *gli* es regulado por un factor de transcripción de tipo dedo de zinc ($Zn_2\text{-Cys}_6$) codificado por *GliZ*. La ausencia o disminución de *GliZ* impide la producción de GT por parte de *A. fumigatus* debido a una completa inhibición de la transcripción de los genes del clúster (19).

A. fumigatus posee otra proteína, *LaeA*, capaz de regular la síntesis de metabolitos secundarios, entre ellos la fumagilina, el ácido hevólico o la GT. *LaeA*, presente en el núcleo del hongo tiene actividad metiltransferasa e interviene en la remodelación de la

cromatina. Un mutante deficiente en LaeA tiene menos virulencia que correlaciona con una producción muy disminuida de GT (2).

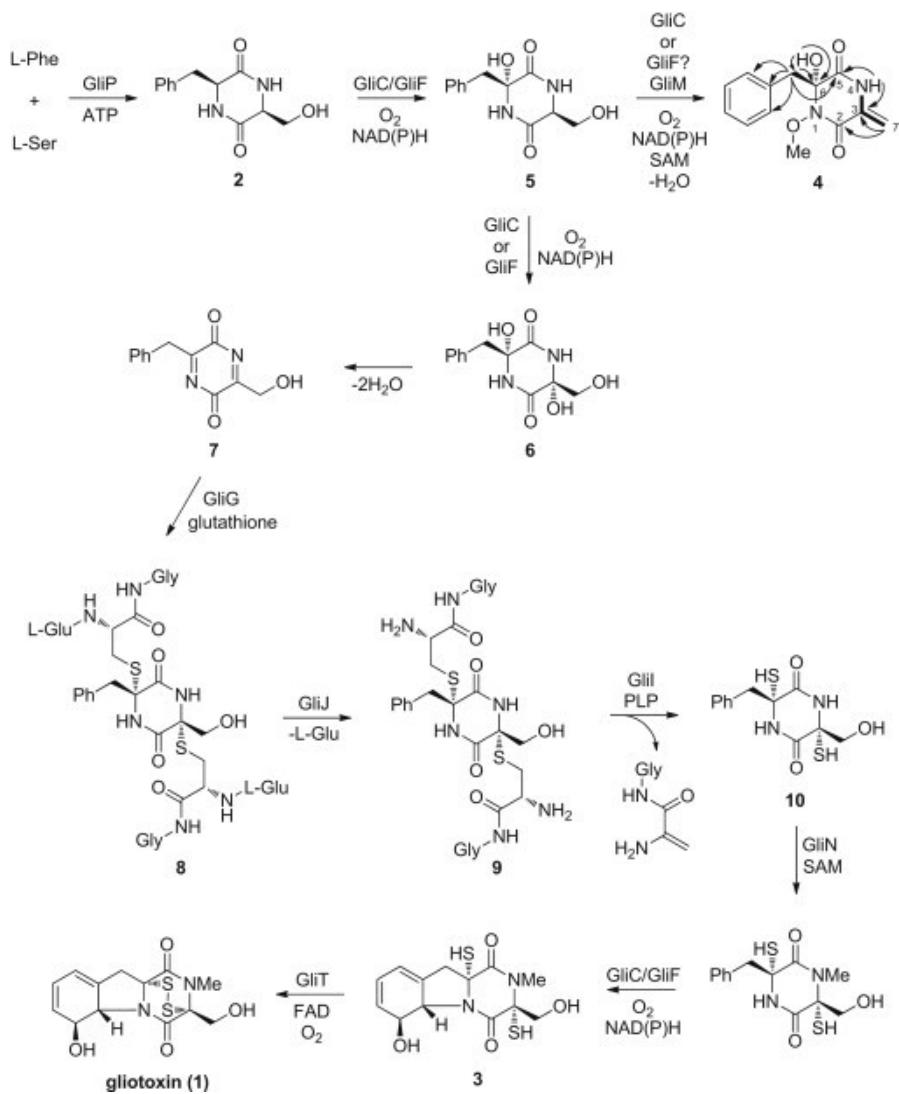


Figura 3. Ruta biosintética de la GT. Imagen obtenida de (20).

Como se puede observar en la figura 3, la ruta biosintética de la GT comienza con la unión de L-fenilalanina y L-serina gracias a la acción de la enzima GliP, una péptido sintasa no ribosomal (13). Una cepa deficiente en GliP no es capaz de producir GT al no poder catalizar la condensación de los dos aminoácidos. Además, se correlaciona con una menor virulencia del hongo debido a la deficiencia en la producción de GT, por lo que la GT ha sido identificada como factor de virulencia (2).

A continuación, tras una serie de oxidaciones y deshidrataciones del anillo de piperazina llevadas a cabo por GliC o GliF, gracias a la acción de la glutatión-S-transferasa GliG, son

añadidas dos moléculas de glutatió n a través de sus grupos sulfhidrilo sobre los átomos de carbono del anillo doblemente enlazados a los átomos de nitrógeno. Un mutante para GliG induce la acumulación de 6-bencil-6-hidroxi-1-metoxi-3-metilen-piperacín-2,5-diona (compuesto número 8 de la figura 3) en cultivo (20). Las moléculas de glutatió n son escindidas en dos pasos por medio de GliJ y GliI, manteniendo los átomos de azufre en el precursor de GT. GliC o GliF propician la formación de un nuevo heterociclo de cinco miembros en el interior de la molécula, generándose la molécula en la forma ditiol. GT puede ejercer su acción tóxica en un organismo mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Figura 4) gracias a los azufres que contiene la molécula, pudiendo alternar entre una forma ditiol completamente reducida y una forma disulfuro (21). Además, GT en su forma reducida puede reaccionar con otros grupos tiol accesibles en proteínas, inactivándolas, inhibiéndolas o desnaturalizándolas.

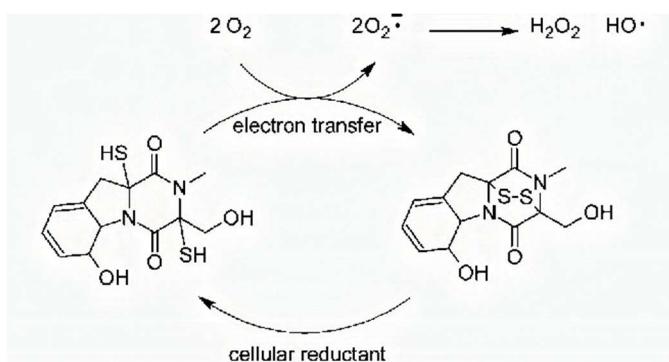


Figura 4. Ciclo redox entre la forma reducida (ditiol, izquierda) y oxidada (disulfuro, derecha) de GT. La oxidación de la GT y presumiblemente de otras ETPs genera especies reactivas de oxígeno, ya que es capaz de reducir el oxígeno molecular. Imagen obtenida de (13).

El gen GliA codifica un transportador encargado de transportar la GT al exterior del hongo (evitando así la generación de ROS en su interior). Un mutante para GliA es incapaz de transportar eficientemente la GT al exterior, acumulándose en el interior del hongo. Para evitar los efectos tóxicos de la GT en forma ditiol en el propio hongo, *Aspergillus* posee la enzima GliT, una tio-reductasa capaz de oxidar los átomos de azufre para formar un puente disulfuro en el interior celular, que transforma la GT de su forma reducida (ditiol) a la forma oxidada (disulfuro). Esta transformación, en microorganismos como *Saccharomices cerevisiae* y *Aspergillus nidulans* con GliT, les hace generar resistencia a la GT exógena, configurando así a GliT como una enzima clave en la autoprotección frente a la GT (20).

Especies como *A. fumigatus* y *A. flavus* poseen un gen (gtmA) que codifica una enzima críptica conocida como GtmA con actividad S-adenosilmetionina bis-tiometiltransferasa dependiente de GT. Este gen no se encuentra dentro del clúster de genes gli, pero codifica una enzima encargada de la metilación de los dos grupos sulfhidrilo de la GT

reducida, generándose un derivado conocido como bisdetiobis(metiltio)gliotoxina, bismetiltiogliotoxina o bismetilgliotoxina (bmGT), carente de actividad. La función de la bmGT es atenuar la síntesis de GT mediante el desvío de moléculas de GT hacia la formación de este derivado metilado. La bmGT regula la producción de GT de una manera bastante inusual (22).

El interés inicial en esta molécula se dirigió hacia la explotación de sus actividades antifúngicas; sin embargo, después de las observaciones de que la GT exhibía efectos inhibidores del crecimiento en células animales, se postuló como un supuesto agente anticanceroso o para evitar el rechazo de trasplante de órganos. Un gran número de estudios posteriores investigaron el mecanismo de acción de la GT contra diferentes tipos de células de mamífero (18, 23, 24).

GT exhibe propiedades inmunosupresoras en leucocitos inhibiendo la transcripción de NF- κ B (producción de sustancias antiinflamatorias) (25), la fagocitosis en neutrófilos y monocitos (26) y el ensamblado de la NADPH oxidasa en fagocitos (generación de ROS) (27). La NADPH oxidasa es una enzima compuesta de varias subunidades separadas en compartimentos celulares, siendo estas subunidades p67^{phox}, p47^{phox}, p40^{phox} y Rac2 en el citosol; y el flavocitocromo b558 compuesto por p91^{phox} y p22^{phox} en la membrana celular (28). Las subunidades de la NADPH oxidasa se encuentran separadas en células no activadas, pero la presencia de microorganismos o sustancias solubles que activen al fagocito induce el ensamblado de la NADPH oxidasa con la consiguiente generación de ROS gracias a la producción del ión superóxido (O_2^-). La GT producida por *Aspergillus* spp. inhibe específicamente la fosforilación de p47^{phox} y su incorporación al citoesqueleto, así como la translocación a la membrana de p67^{phox}, p47^{phox} y p40^{phox}, paso crucial para su activación (27).

Por otro lado, la GT es capaz de inducir la apoptosis en células de ratón, activando la vía mitocondrial a través de Bak (proteína pro-apoptótica). La activación de Bak podría deberse a la formación de enlaces transitorios entre el puente disulfuro de la GT y los residuos individuales de cisteína presentes en Bak. Una vez activado, Bak desencadena la generación de ROS, que es crucial para la formación eficaz de poros en la membrana mitocondrial, incluida la liberación de citocromo c (cyt c) y factor inductor de apoptosis (AIF), y finalmente la muerte celular (Figura 5). Se observó que la GT es un modulador importante de la defensa del huésped mamífero y que Bak es un factor de susceptibilidad del huésped (29).

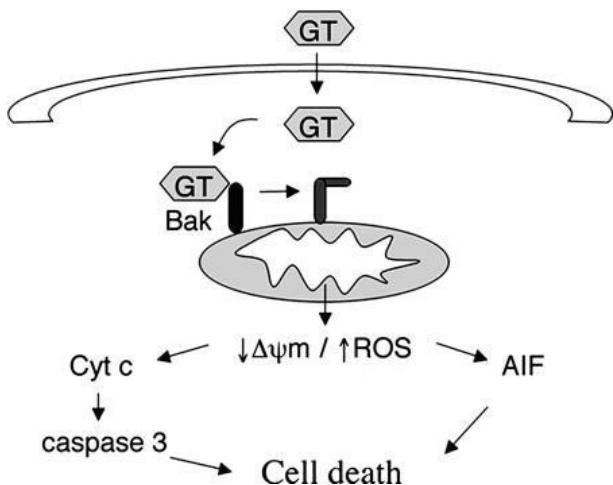


Figura 5. Mecanismo propuesto para la muerte celular inducida por GT (27).

Después de la producción de *A. fumigatus*, la GT entraría en las células por un mecanismo redox-dependiente e induciría directamente un cambio conformacional en Bak, lo que llevaría a la despolarización mitocondrial y la producción de ROS. La producción de ROS desencadenaría la liberación mitocondrial de proteínas apoptogénicas como cyt c y AIF. De esta forma, tanto los procesos dependientes de las caspasas como los independientes se activarían para inducir la muerte celular.

La apoptosis inducida por GT fue confirmada en otro estudio (30) en cáncer de cuello de útero humano (HeLa) y células del condrosarcoma humano (SW1353).

La GT inducía apoptosis a través de la activación de caspasa-3, caspasa-8, caspasa-9, la regulación negativa de Bcl-2, la regulación positiva de Bax y la liberación de cyt c. Estos hallazgos confirman que la GT aislada (en este caso de hongos marinos *Aspergillus* spp.) induce apoptosis en células HeLa y SW1353 a través de la vía mitocondrial, sugiriendo que podría ser un prometedor compuesto anticáncer.

La GT ha sido identificada como un inhibidor de NF- κ B (31), un potente inhibidor de la transactivación de NOTCH2 (32) e inhibidor de la histona metiltransferasa (33).

Además, recientemente la GT se ha identificado como inductor de apoptosis en células de leucemia linfocítica crónica (32), células de cáncer de mama (34) y en células de cáncer colorectal (35). La mayoría de los tumores son producto de múltiples mutaciones aberrantes en diversas vías de señalización. En consecuencia, la inhibición simultánea de múltiples vías de señalización podría ser más efectiva que la inhibición de una única vía en terapias contra el cáncer. Los compuestos con una especificidad de direccionamiento más amplia pueden ser más efectivos que los reactivos con una selectividad más estrecha y también pueden disminuir la probabilidad del desarrollo de resistencia a los fármacos.

3.4 Resistencia a los antimicrobianos, un problema mundial

Los antibióticos revolucionaron el mundo de la terapéutica, razón por la cual son considerados uno de los hallazgos más trascendentales en la historia de la medicina. Aunque los antibióticos se introdujeron en la práctica clínica a mediados del siglo

pasado, el uso de microorganismos para el manejo de infecciones microbianas en el antiguo Egipto, Grecia, China y otros lugares del mundo está muy bien documentado (36, 37). La era moderna de los antibióticos comenzó con el hallazgo fortuito de la penicilina por Alexander Fleming en 1928 (38), seguido por el descubrimiento clínico de las sulfonamidas en la década de 1930 (39). Dubos y Fleming, dos pioneros de la era de la terapia antimicrobiana, reconocieron que la resistencia a los antimicrobianos era una preocupación importante (39, 40). El fenómeno de la resistencia a los antimicrobianos es un aspecto de la ecología microbiana que se desarrolló casi inmediatamente después de que se utilizaran los primeros antibióticos (41). La resistencia a los antimicrobianos se desarrolla cuando un microorganismo ya no responde a uno o más de un medicamento al que originalmente era sensible. Este fenómeno representa un medio de supervivencia de la población microbiana amenazada, y se produce a través de la mutación genética, la expresión de un gen de resistencia latente o la adquisición de genes con determinantes de resistencia (42, 43). Estas tres apariciones no son mutuamente excluyentes y pueden coexistir dentro de una bacteria determinada.

La resistencia a los agentes antimicrobianos en bacterias puede estar mediada por varios mecanismos, que incluyen cambios en la permeabilidad de la envoltura celular limitando la cantidad de fármaco que tiene acceso a las dianas celulares, eflujo activo del fármaco hacia el exterior de la célula, modificación del sitio de acción del fármaco, utilización de vías enzimáticas alternativas a aquella bloqueada por acción del fármaco, o destrucción o inactivación del agente antimicrobiano (44).

La situación actual de resistencia se puede atribuir a varias causas complejas, incluyendo el comportamiento humano (45). El uso generalizado de antibióticos tanto en humanos como en animales proporciona una presión selectiva que favorece la generación, multiplicación y propagación de organismos resistentes (41). Académicos, profesionales de la salud y activistas han advertido durante décadas de que el uso indebido y la prescripción excesiva de antibióticos ha provocado un aumento de las cepas resistentes, un problema agravado por un descenso alarmante en el descubrimiento y desarrollo de nuevas clases de antibióticos (46). Esto significa que los tratamientos estándar ya no son efectivos; las infecciones son más difíciles de controlar; el riesgo de propagación de la infección aumenta; la enfermedad y la estancia en hospitales son prolongadas, con costes económicos y sociales adicionales; y el riesgo de muerte es mayor, en algunos casos, el doble que en los pacientes que tienen infecciones causadas por bacterias no

resistentes. El problema es tan serio que amenaza los logros de la medicina moderna. Una era “post-antibiótica”, en la que las infecciones comunes y las lesiones menores pueden ser causa de muerte, es una posibilidad muy real para el siglo XXI (47).

3.5 Microorganismos estudiados

En este trabajo, se pretende evaluar la actividad de GT frente a cuatro microorganismos de interés clínico por su preocupante resistencia a los tratamientos antibióticos o antifúngicos actuales: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *C. albicans*, *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*).

3.5.1 *Staphylococcus aureus*

El género *Staphylococcus* actualmente comprende más de 50 especies. Estas bacterias pequeñas y resistentes son habitantes normales de la piel y la membrana mucosa en muchas especies animales, incluidos los humanos; también son ubicuos en el medio ambiente (48). *S. aureus* tiene forma de coco y puede aparecer en parejas, cadenas o en racimos (Figura 6). Es una bacteria anaerobia facultativa, grampositiva, productora de coagulasa, catalasa, inmóvil y no esporulada, que se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo (48).

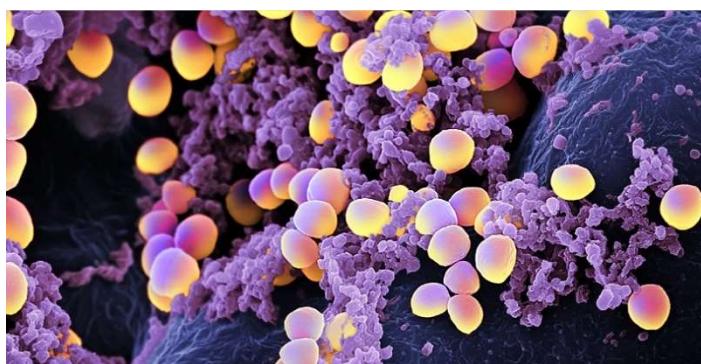


Figura 6. Agrupación de *S. aureus* formando biopelícula. Una vez adherido a la superficie, *S. aureus* produce una matriz de sustancia polimérica extracelular. La producción de esta biopelícula permite que *S. aureus* se agregue más fácilmente. Imagen obtenida de micronaut.ch.

S. aureus es un patógeno oportunista que una vez que supera la barrera cutánea, puede causar una variedad de infecciones sistémicas y piógenas, infecciones agudas y crónicas y síndromes mediados por toxinas. Además de su concepción clásica como microorganismo de acción extracelular, *S. aureus* también ha sido reconocido como patógeno intracelular. Esta propiedad contribuye potencialmente a la persistencia bacteriana, la protección contra los antibióticos y la evasión de las defensas inmunes. Su plasticidad genética permite a esta especie expresar de forma dependiente un enorme

arsenal de factores de virulencia, que incluyen adhesinas, enzimas, toxinas y proteínas de evasión inmunológica (49).

Los aislados de *S. aureus* de origen humano y animal albergan una amplia variedad de genes de resistencia. Hasta el momento, se han identificado al menos 60 genes de resistencia diferentes en *S. aureus*. Esto incluye genes que confieren resistencia a prácticamente todas las clases de agentes antimicrobianos aprobados para su uso en humanos y animales, tales como antibióticos β -lactámicos, tetraciclinas, macrólidos, lincosamidas, estreptograminas, fénicoles, aminoglucósidos, aminociclitos, pleuromutilinas, oxazolidinonas, diaminopirimidinas, sulfonamidas y glicopéptidos. Además, se han identificado mutaciones en *S. aureus* que presentan resistencia a fluoroquinolonas, ácido fusídico, mupirocina, rifampicina, sulfonamidas y oxazolidinonas (50).

S. aureus es responsable de la gran mayoría de las infecciones de la piel y tejidos blandos (51), incluidas infecciones superficiales como impétigo y abrasiones infectadas, así como infecciones más invasivas como celulitis, foliculitis, abscesos subcutáneos, úlceras y heridas infectadas (52). *S. aureus* también es un importante patógeno en animales, puede causar mastitis en los animales lecheros y lesiones óseas y articulares en aves de corral, así como infecciones de piel en el ganado (48). Los animales de compañía, como perros, gatos y caballos, pueden desempeñar un papel en la transmisión de *S. aureus*. Se ha demostrado una correlación entre el contacto cercano con humanos y un mayor riesgo de que animales de compañía sean colonizados por *S. aureus* y alberguen cepas resistentes a antibióticos (53). Varios estudios mostraron clones de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) en gatos y perros similares a los identificados en humanos (54).

La prevalencia de las infecciones asociadas a los cuidados sanitarios producidas por *S. aureus* resistente a oxacilina o SARM ha ido incrementando de forma lineal desde el comienzo de la década de 1990, tanto en España como en otros países de nuestro entorno, hasta convertirse en uno de los patógenos más relevantes en los hospitalares (55, 56).

Las infecciones por *S. aureus* representan una gran amenaza para la salud pública debido a la gran cantidad de infecciones y la aparición generalizada de cepas resistentes a los antibióticos. Por ejemplo SARM (57), incluidas las infecciones por SARM adquirido en el hospital y adquirido en la comunidad (SARM-AC). Las cepas resistentes frecuentemente aisladas y más virulentas se asocian con infecciones de la piel (58).

La resistencia a los fármacos de primera línea para el tratamiento de las infecciones por *S. aureus* (causa frecuente de infecciones graves en los centros sanitarios y en la comunidad) es generalizada. Según la OMS, se calcula que los pacientes con infecciones por *S. aureus* resistente a la meticilina tienen una probabilidad de morir un 64% mayor que los pacientes con infecciones no resistentes (<http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antimicrobianos>).

3.5.2 *Candida albicans* y *Candida glabrata*

Candida es un género de hongos unicelulares también llamados levaduras. La especie *Candida* más significativa por su importancia clínica es *C. albicans* (Figura 7), un hongo oportunista, diploide asexual y saprófito de la familia de los Sacaromicetos. Se trata de un comensal de las mucosas humanas, sobre todo de la mucosa oral, digestiva y genital. La infección invasiva debida a las especies de *Candida* es en gran medida una condición

asociada con el progreso médico, y es ampliamente reconocida como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el entorno sanitario. Hay al menos 15 especies distintas de *Candida* que causan enfermedades humanas, pero más del 90% de las enfermedades invasivas son causadas por los 5 patógenos más comunes, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*. Cada uno de estos organismos tiene un potencial de virulencia, susceptibilidad antifúngica y epidemiología únicos. Las infecciones significativas debidas a estos microorganismos se conocen generalmente como candidiasis invasiva (59).

Las equinocandinas han surgido como agentes preferidos para la mayoría de los episodios de candidemia y candidiasis invasiva, con la excepción del sistema nervioso central, los ojos y las infecciones del tracto urinario. Esta preferencia se basa en un fuerte perfil de seguridad, conveniencia, actividad fungicida temprana, una tendencia hacia mejores resultados basados en datos de estudios individuales y análisis combinados de estudios de candidemia (60, 61), y la aparición de especies de *Candida* resistentes a azol.

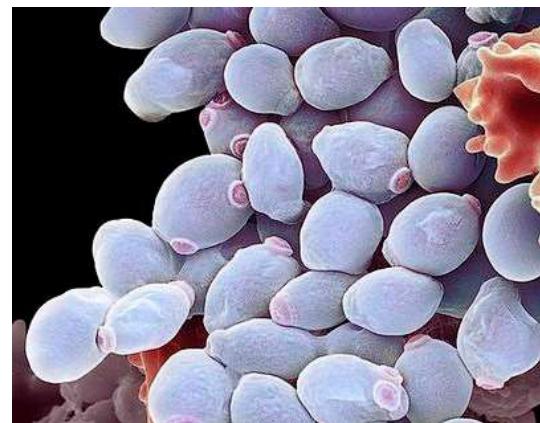


Figura 7. *C. albicans*. Imagen obtenida por microscopía electrónica de barrido, Science Photo Library.

El uso generalizado de un número limitado de agentes antifúngicos, particularmente azoles, ha llevado al desarrollo de resistencia a los fármacos en el tratamiento de infecciones por *C. albicans*, lo que supone un problema de creciente importancia (62, 63). La aparición reciente de especies de *Candida* resistentes a múltiples fármacos complica la selección de la terapia antimicótica para el futuro inmediato (64-69). Por lo tanto existe necesidad de nuevos agentes antifúngicos para el tratamiento eficaz de infecciones por *Candida* (70).

3.5.3 *Escherichia coli*

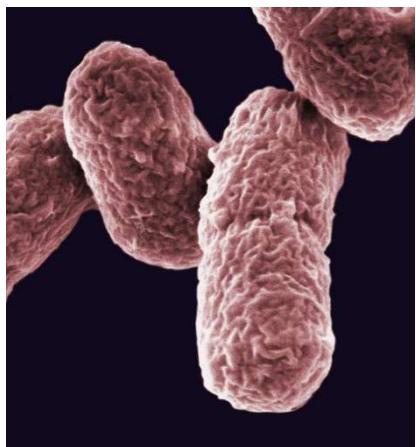


Figura 8. *E. coli*. Imagen obtenida de Visuals Unlimited.

E. coli es una bacteria gramnegativa de la familia de las enterobacterias, anaerobio facultativo, con forma de bacilo, que se encuentra en el tracto gastrointestinal de humanos y animales de sangre caliente.

La mayoría de las cepas de *E. coli* son benignas, pero algunas cepas son patógenas para humanos, causando infecciones gastrointestinales, diarrea, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico, e infecciones extraintestinales, como infección del tracto urinario y meningitis neonatal. Las infecciones

intestinales causadas por *E. coli* están vinculadas al consumo de alimentos y agua contaminados. Los genes de virulencia de *E. coli* patógena intestinal, particularmente *E. coli* enterohemorrágica, son altamente móviles, lo que podría dar como resultado la aparición de un nuevo patotipo (71).

Según los últimos datos de la red oficial europea EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network) del Centro Europeo de Control y Prevención de Enfermedades, la resistencia de *E. coli* a antibióticos está aumentando en la Unión Europea. Concretamente a las cefalosporinas de tercera generación y aminoglucósidos, así como la resistencia combinada a los tres grupos clave de antimicrobianos (fluorquinolonas, cefalosporinas de tercera generación y aminoglucósidos). Las alternativas de tratamiento para pacientes infectados con bacterias resistentes a carbapenémicos y otros grupos antimicrobianos importantes a menudo limitan la terapia a agentes antimicrobianos antiguos con menor eficacia, como colistina. Los informes de aislamientos resistentes a colistina son un indicador de la pérdida adicional

de opciones de tratamiento antimicrobiano en infecciones bacterianas gramnegativas (57).

La resistencia de *E. coli* a una de las clases de medicamentos más utilizados en el tratamiento de las infecciones urinarias (las fluoroquinolonas) está muy generalizada (72). Según la OMS, en muchas partes del mundo hay países en los que este tratamiento es ineficaz en más de la mitad de los pacientes (<http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antimicrobianos>).

3.5.4 *Pseudomonas aeruginosa*

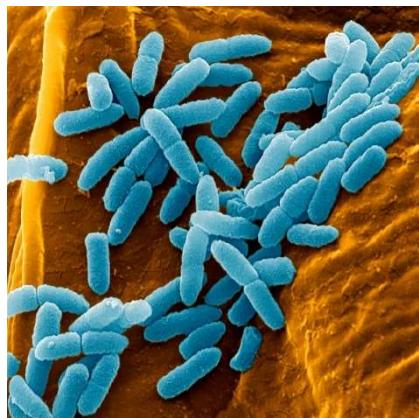


Figura 9. *P. aeruginosa*. Imagen obtenida de Pixels, Juergen Berger, 2013.

P. aeruginosa (Figura 9) es una bacteria gramnegativa no fermentadora, ubicua en ambientes acuáticos en la naturaleza. Es un patógeno oportunista y una causa principal de infección en pacientes hospitalizados con deterioro localizado o sistémico de las defensas inmunes. Comúnmente causa neumonía adquirida en el hospital (incluida la neumonía asociada a ventilación mecánica), e infecciones del tracto urinario y torrente sanguíneo (44).

P. aeruginosa es intrínsecamente resistente a la mayoría de los agentes antimicrobianos debido a su capacidad selectiva de evitar que varias moléculas de antibióticos penetren en su membrana externa o que se eliminen si entran en la célula. Los grupos antimicrobianos que permanecen activos incluyen algunas fluoroquinolonas (por ejemplo, ciprofloxacino y levofloxacino), aminoglucósidos (por ejemplo, gentamicina, tobramicina y amikacina), algunos betalactámicos y polimixinas.

La resistencia de *P. aeruginosa* a estos agentes se puede adquirir a través de uno o varios mecanismos, que incluyen permeabilidad reducida, dianas antimicrobianas modificadas, eflujo del fármaco al exterior de la bacteria y enzimas de degradación del fármaco (57).

4. ANTECEDENTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1 Antecedentes: Uso de gliotoxina como antimicrobiano

Actualmente existe una limitada evidencia científica sobre el uso de GT como antifúngico o antibiótico. Como se ha comentado, la GT posee un amplio espectro de actividades biológicas que incluyen algunos efectos antibacterianos y antivirales. También es un potente agente inmunomodulador (18) y un inductor de muerte celular apoptótica en varios tipos celulares (73).

Algunos estudios *in vitro* demuestran que las especies reactivas de oxígeno producidas por la GT son capaces de provocar daños en el ADN (24, 74, 75). En un estudio realizado por Nieminen et al. (76) se evaluó la genotoxicidad a nivel de ADN de la GT frente a *E. coli*. En el ensayo de reparación, la GT produjo zonas de inhibición de crecimiento bacteriano más amplias en la cepa deficiente en reparación de ADN que en la competente en reparación, lo que sugiere que la GT podría provocar de alguna forma daño en el ADN, tal y como se ha descrito en células eucariotas.

Aunque se conoce que es muy tóxica frente a células de mamífero, se desconoce la respuesta de otras bacterias y hongos frente a GT. Wan-Ling et al. (77) estudiaron la acción antibacteriana de GT frente a *E. coli* y *S. aureus*. Sus resultados muestran la eficacia antibacteriana del compuesto frente a ambos microorganismos, pero de manera más efectiva frente a *S. aureus*, ya que la GT muestra una potente inhibición frente a dos cepas de *S. aureus*, una de ellas resistente (ATCC29213, CMI = 12,20 µM; R3708, CMI = 1,53 µM).

También se demostró que *C. albicans* es altamente sensible a la GT (MIC = 2,0 µg/ml) (7), lo cual sugiere que *C. albicans* no es un microorganismo productor de GT (al contrario de lo que algunos autores afirmaban). Además, *C. albicans* no contiene el clúster de genes necesario para sintetizar una ETP (78).

En cuanto a *P. aeruginosa*, se ha encontrado escasa evidencia científica en referencia a su susceptibilidad a la GT. Un reciente estudio sobre la coinfección *P. aeruginosa/Aspergillus* (79) revela una fuerte actividad anti-Pseudomonal y anti-biopelícula de la GT transcurridas 48h de incubación.

4.2 Hipótesis y objetivos

Este Trabajo Fin de Máster se ha basado en la hipótesis de que la GT, producto del metabolismo secundario de *Aspergillus*, puede afectar a la viabilidad de diversos microorganismos de interés clínico: *S. aureus*, *C. albicans*, *E. coli* y *P. aeruginosa*, pudiendo utilizarse como antibiótico o antifúngico en este tipo de infecciones.

Para ello se plantean los siguientes objetivos intermedios:

1. Realizar pruebas de susceptibilidad microbiana a GT: Antibiograma/Antifungograma disco-placa.
2. Optimizar el método de obtención de curvas de muerte respecto a 24h:
 - a. En agua destilada estéril para *S. aureus*, *C. albicans*, *E. coli* y *P. aeruginosa*.
 - b. En medio Mueller-Hinton para *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*.
3. Evaluar la concentración mínima bactericida o fungicida (CMB o CMF) de GT frente a *S. aureus*, *C. albicans*, *E. coli* y *P. aeruginosa* mediante el método de microdilución.
4. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de GT frente a *S. aureus*, *C. albicans*, *E. coli* y *P. aeruginosa* mediante el método de microdilución y ensayo colorimétrico MTT.
5. Analizar el efecto de GT frente a *C. albicans*, mediante citometría de flujo.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cepas estudiadas

Las diferentes cepas estudiadas (Tabla 1) fueron proporcionadas por el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Miguel Servet. Los microorganismos resistentes se manipularon en campana de flujo laminar.

Microorganismo	ATCC	Resistencias a antibióticos/antifúngicos
<i>S. aureus</i>	29213	
<i>S. aureus</i>	700699	Meticilina Oxacilina Susceptibilidad reducida a vancomicina
<i>E. coli</i>	25922	
<i>P. aeruginosa</i>	27853	
<i>C. albicans</i>	10231	
<i>C. albicans</i>	AZN-9635	Azoles
<i>C. glabrata</i>	YFI-002-656	Fluconazol Anidulafungina Caspofungina Micafungina

Tabla 1. Cepas de referencia (ATCC) utilizadas. Los datos de resistencias a antibióticos se han obtenido de ATCC® LGC standards.

5.2 Preparación del inóculo

Para la preparación del inóculo fue necesario resembrar las cepas de referencia en placas Columbia agar sangre (MAIM) e incubarlas en estufa a 35 °C el día previo a cada experimento 18-24h.

1. De la placa resembrada, arrastrar una o más colonias e introducirlas en un tubo que contiene agua destilada estéril o medio Mueller-Hinton (MH).
2. Tras agitar el tubo mediante un “vortex”, medir su turbidez en un turbidímetro (Colorímetro D-110, Dinko Instruments®), que proporciona un valor numérico con respecto al control de agua estéril o medio MH (Thermo Scientific). Este valor es el estándar de turbidez McFarland, utilizado como referencia en suspensiones bacteriológicas para averiguar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro.

3. Es necesario alcanzar un valor 0,5 McFarland (siendo admisible 0,45 - 0,55), que corresponde a 10^8 UFC/ml en el caso de una suspensión de *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*; y 10^6 UFC/ml si es *C. albicans* (debido a su mayor tamaño).

Cada vez que se realizó un experimento, se llevó a cabo una titulación para comprobar si el inóculo fue realizado correctamente. La titulación consistió en sembrar diferentes cantidades de determinadas diluciones del inóculo para comprobar si el número de UFC/ml era el esperado.

5.3 Gliotoxina

La concentración inicial de GT elegida para realizar los antibiogramas y las curvas de muerte con respecto al tiempo fue 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, de manera que al adicionar 10 μl de esta solución a los discos la cantidad de GT fuera de 10 μg (7, 80).

Se realizó la dilución de GT pura comercial (Enzo Life Sciences, Inc.) a 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en una proporción de agua:metanol 1,2:1. Fue necesario utilizar ultrasonidos (ATM40-3LCD, OVAN Ultrasonic Cleaner) para disolver la GT por completo.

5.4 Antibiograma disco-placa

Se siguió el procedimiento de microbiología clínica recomendado por el Comité Europeo de Pruebas de Sensibilidad Antimicrobiana (EUCAST) (80) y el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) (81, 82) para realizar el método de difusión a fin de determinar la sensibilidad microbiana frente a GT. Los experimentos se realizaron por triplicado para cada cepa.

Una vez preparado el inóculo de cada microorganismo en agua destilada estéril, se procedió a la inoculación de las placas. Para los antibiogramas/antifungigramas se utilizaron placas con medio MH y se sembró el inóculo 0,5 McFarland que permitió obtener su crecimiento en tapiz o césped. La siembra se realizó mediante un hisopo estéril que se empapó en la solución de inóculo y se descargó en la placa de forma homogénea, asegurando que no quedasen espacios sin cubrir. Se dejó secar 3-5 minutos antes de depositar los discos.

Los discos de 6 mm, impregnados y no impregnados, se colocaron manualmente con pinzas estériles presionando levemente, dejando una separación suficiente para que no se superpongan entre ellos ni estén a menos de 15 mm del borde de la placa.

Para disponer de un control antimicrobiano, se eligió un antibiótico/antifúngico representativo con eficacia antimicrobiana conocida para cada cepa en particular.

Como control de calidad, se utilizaron discos comerciales (OXOID) para los antibióticos: cefoxitina (FOX), cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ) y ácido fusídico (FD) para las cepas de *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, y *S. aureus* resistente, respectivamente. Las concentraciones se indican en la Tabla 2.

Microorganismo	Compuesto	Concentración
<i>S. aureus</i>	Cefoxitina	30 µg
<i>S. aureus</i> resistente	Ácido fusídico	10 µg
	Cefoxitina	30 µg
<i>E. coli</i>	Cefotaxima	5 µg
<i>P. aeruginosa</i>	Ceftazidima	10 µg
<i>C. albicans</i> sensible y resistente, <i>C. glabrata</i>	Voriconazol	10 µg
Todos	Gliotoxina	10 µg
Todos	Solución de metanol y agua destilada estéril	1,2:1

Tabla 2. Discos comerciales de antibióticos (FOX, CTX, CAZ) utilizados para cada bacteria y sus concentraciones; y discos impregnados con antifúngico (VRC) o compuesto (GT o metanol) y sus concentraciones.

En el caso de la GT y voriconazol (VRC, antifúngico para *C. albicans*), se emplearon discos no impregnados (Suministros Clínicos Lanau). Éstos se depositaron sobre la placa y se adicionó sobre ellos 10 µl de una suspensión de antimicrobiano a 1000 µg/ml, por lo que la concentración de los discos fue de 10 µg. También se utilizaron los discos no impregnados para adicionar 10 µl de una dilución agua:metanol 1,2:1, utilizado como control para descartar el efecto del metanol sobre los microorganismos.

En cada placa sembrada con los inóculos se depositaron: un disco con GT, un disco con metanol (control), y un disco con el antibiótico específico para cada cepa (control). A excepción de *S. aureus* resistente, donde se utilizó ácido fusídico y cefoxitina para corroborar su resistencia y el correcto funcionamiento del medio.

Una vez depositados los discos, las placas se incubaron a 35 °C durante 18-24 horas. Es entonces cuando se puede evaluar el efecto de los compuestos contenidos en los discos: si se trata de un compuesto que inhibe el crecimiento o induce muerte en el microorganismo, se formará un halo de inhibición alrededor del disco. Si, por el

contrario, no se observa halo de inhibición, se deduce que, en las condiciones utilizadas, el compuesto no tiene efecto en el crecimiento del microorganismo.

5.5 Curvas de muerte respecto al tiempo

Los efectos antimicrobianos pueden ser medidos a través de la exposición de cultivos de microorganismos a diferentes concentraciones de antimicrobianos, tomando muestras a diferentes tiempos durante un periodo de 24 horas y determinando la cantidad de bacterias en cada muestra (83). En este experimento se evaluó la actividad de la GT frente a los microorganismos a diferentes tiempos.

Se realizaron los experimentos utilizando como medio agua destilada estéril para las cepas: *S. aureus* ATCC2 9213, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *C. albicans* sensible ATCC 10231 y resistente AZN-9635 y *C. glabrata* YFI-002-656; y, por otro lado, utilizando medio MH para *S. aureus* ATCC2 9213, *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853. Al utilizar MH, el experimento se realizó de la misma forma, pero preparando el inóculo y las diluciones con este medio.

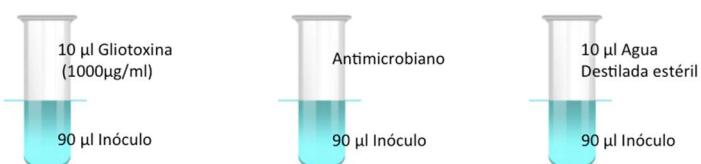
Los experimentos se realizaron al menos por triplicado para cada cepa. En este método se utiliza una batería de tubos eppendorf por cada combinación microorganismo/antimicrobiano. Se adicionaron 90 μ l a partir de los inóculos (0,5 McFarland) a tres eppendorf, añadiendo:

1. En el primer eppendorf, la solución de GT: 10 μ l se la solución preparada a 1000 μ g/ml, es decir, la concentración final en el eppendorf es 100 μ g/ml;
2. Control de antimicrobiano: añadiendo el disco comercial de antibiótico que corresponda (FOX, CTX o CAZ a las mismas concentraciones que en los antibiogramas) y 10 μ l de agua en este caso, o 10 μ l de voriconazol a 1000 μ g/ml;
3. Control con 10 μ l de agua estéril (se realiza este control para comprobar que el efecto que se espera observar en la solución que contiene GT o antimicrobiano es únicamente debido a estos compuestos, y que la presencia de agua no ejerce ninguna acción).

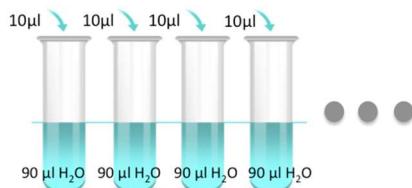
Tras vortear la dilución, se incubó en una estufa a 35 °C. Al inicio del estudio se obtuvieron resultados transcurridas 1 hora y 24 horas. Posteriormente, se decidió realizar un análisis más detallado, estudiando el efecto de GT y los controles transcurridas 1, 2, 3, 4, y 24 horas.

Una vez transcurridos los diferentes tiempos de incubación, se realizaron diluciones seriadas a partir de cada solución. En el proceso de optimización del método se averiguaron las diluciones necesarias para sembrar aquellas en las que se pudiese realizar correctamente el recuento de colonias (obtener crecimientos entre 15-200 UFC), además de determinar la cantidad que se debía sembrar de cada dilución para cada combinación de microorganismo/hora/antimicrobiano o GT en particular. Se sembraron las cantidades estudiadas en placas Columbia agar sangre, y se incubó a 35 °C durante 18-24 horas.

1. Preparación de la batería de tubos. Por cada microorganismo:



2. Incubación en estufa a 37°C durante 1, 2, 3, 4 y 24 horas



3. Diluciones seriadas



4. Siembra



5. Recuento de colonias y cálculo de UFC/ml

Figura 10. Esquema general del procedimiento para obtener las curvas de muerte. Para cada microorganismo se optimizó un protocolo específico en cuanto a las diluciones y cantidad de sembrado, de forma individual tanto para la GT como para el antimicrobiano. En el caso de realizar el experimento con medio MH, se sustituyó en todos los puntos el agua por este medio.

Se realizó el recuento de colonias con un contador automático de colonias (Flash & Go, IUL). Finalmente, conociendo la cantidad (μ l) sembrada a partir de las diluciones indicadas y el recuento de colonias obtenido de cada una de ellas, se calcularon las UFC/ml correspondientes a los diferentes tiempos de incubación para las soluciones que contenían, de forma independiente, GT y el antimicrobiano para cada microorganismo. Es decir, se genera un valor medio de UFC/ml por cada combinación de microorganismo/hora/compuesto.

El análisis estadístico en este caso se realizó con el programa Microsoft Excel® y GraphPad Prism 7®. Tomando como referencia la titulación (control de UFC/90 µl iniciales), se calculó la reducción logarítmica de cada microorganismo expuesto a GT o al antimicrobiano. Los resultados se analizaron calculando las UFC presentes en 90 µl de disolución, ya que se partía de esta cantidad de inóculo. Se calculó la media de los Log10 (UFC/90µl) de cada microorganismo a cada hora para el antimicrobiano y la GT, y de los controles (titulación), para obtener las curvas de muerte respecto al tiempo.

También se realizó el análisis one-way ANOVA de los datos correspondientes a GT respecto al control de UFC/90 µl iniciales.

5.6 Determinación de la sensibilidad microbiana a gliotoxina.

5.6.1 Método de microdilución para determinar la concentración mínima inhibitoria, concentración mínima bactericida/fungicida e IC₅₀ de gliotoxina frente a *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *C. albicans*

Se siguieron las recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (84) para realizar el estudio de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) o fungicida (CMF) por el método de microdilución en placas de 96 pocillos. El ensayo se llevó a cabo por duplicado para cada cepa con GT o el antimicrobiano correspondiente (Tabla 3). El medio utilizado para *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* fue MH; y para *C. albicans* se utilizó el medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI, 1640 Gibco, Invitrogen).

Microorganismo	Antimicrobiano	Medio de dilución
<i>S. aureus</i>	Cloxacilina	Mueller-Hinton
<i>E. coli</i>	Ceftazidima	Mueller-Hinton
<i>P. aeruginosa</i>	Ceftazidima	Mueller-Hinton
<i>C. albicans</i>	Voriconazol	RPMI

Tabla 3. Antimicrobianos y medios de dilución utilizados para cada cepa en los experimentos de determinación de la CMI y CMB.

Método de microdilución empleado:

1. Preparar los antimicrobianos y la GT a diferentes concentraciones (Tabla 4), realizando diluciones seriadas 1:2 en MH o RPMI, comenzando por una concentración de 500 µg/ml.

- El primer pocillo (P1 Tabla 4) tiene el antimicrobiano a 500 µg/ml en 100 µl.
- El resto de los pocillos tienen 50 µl de medio MH o RPMI.
- Hacer diluciones seriadas 1:2 hasta el pocillo 10.
- Pocillo 11. Control de crecimiento. MH o RPMI + inóculo (CC).
- Pocillo 12. Caldo MH o RPMI (B).

Pocillo	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	11 CC	12 B
Concentración antimicrobiano o GT (µg /ml)	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	1,95	0,98	0,49	0	0

Tabla 4. Representación gráfica de una fila de la placa de 96 pocillos. Del P1-P10 se detallan las concentraciones finales de GT o antimicrobiano en cada pocillo.

2. Preparar y adicionar el inóculo.

- Preparar el inóculo a 0,5 McFarland.
- Realizar una dilución 1:100 de la suspensión de 0.5 McFarland. La concentración bacteriana en ese momento será aproximadamente de 10^6 UFC/ml. En el caso de *C. albicans*, el inóculo 0,5 McFarland ya posee aproximadamente 10^6 UFC/ml, y se realizan diluciones pertinentes para obtener una concentración final de 5×10^5 UFC/ml.
- Adicionar 50 µl del inóculo a cada pocillo excepto al 12.
- El pocillo 12 (B) solo contiene medio MH o RPMI (sin inóculo ni GT o antimicrobiano).

3. Sellar la placa con adhesivo para evitar la evaporación del medio de cultivo

4. Incubar durante 24 horas a 35 °C

CMI: Concentración mínima de antibiótico en la que no se observa crecimiento, es decir, concentración a la cual inhibe el desarrollo microbiano al menos en un 80% (85). Según el protocolo establecido se recomienda observar a simple vista la turbidez de los pocillos, pero la interpretación de los resultados a veces resulta compleja. Por lo tanto, se decidió analizar la turbidez por absorbancia a 630 nm en un espectrofotómetro (BioTek Synergy HT).

CMB/CMF: La determinación de la CMB o CMF es la estimación más común de la actividad bactericida o fungicida. La CMB se define como la concentración más baja de agente antimicrobiano necesaria para eliminar el 99,9% del inóculo final después de la

incubación durante 24h en condiciones estandarizadas (86). CMF también se define como la concentración más baja del fármaco que produce un 98-99% de mortalidad en comparación con el inóculo inicial (86).

Se observó a simple vista la turbidez de los pocillos, y contrastando con los datos de absorbancia obtenidos, se determinó la concentración en la que no se observaba crecimiento. Se sembró el contenido total del pocillo correspondiente a esa concentración, y las 3 siguientes concentraciones más diluidas en las que tampoco se observaba turbidez. Se incubó 18-24 horas a 35 °C y se observó si había crecimiento. La concentración sembrada en la que no hay crecimiento (es decir, a la que observamos una eliminación de al menos 99,9% del inóculo inicial), es la concentración mínima bactericida o fungicida.

IC₅₀: Concentración inhibitoria media. Representa la cantidad de compuesto necesario para inhibir el 50% de una función biológica, en este caso el crecimiento celular. Mediante GraphPad Prism 7® se obtuvieron las curvas dosis-respuesta para calcular la IC₅₀.

5.6.2 Ensayo MTT para la determinación de la concentración mínima inhibitoria de gliotoxina frente a *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *C. albicans*

MTT (bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio) es un colorante de tetrazolio amarillo que se reduce por la acción de enzimas deshidrogenasas de células metabólicamente activas. La mayoría de las deshidrogenasas están localizadas en la cadena de transporte de electrones de la membrana plasmática en procariotas (en el caso de *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*) y la membrana mitocondrial en eucariotas (*C. albicans*) (87-89). El formazan púrpura intracelular, cristal resultante de dicha reacción metabólica se puede solubilizar en un disolvente orgánico y cuantificar por medios espectrofotométricos (90, 91). La producción de formazan está inversamente relacionada con la muerte celular (92, 93).

Procedimiento realizado:

1. Realizar el mismo método de microdilución explicado anteriormente (5.6.1).
2. Transcurridas las 24h de incubación (paso 4), adicionar 50 µl de MTT (sigma M2003) a cada pocillo, concentración final de 0.5 mg/ml de MTT.

3. Incubar durante 40-120min a 37°C para permitir la formación de cristales.
4. Centrifugar a 2851 xg durante 30 min y eliminar el sobrenadante.
5. Disolver los cristales en 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO).
6. Leer la densidad óptica a 540nm en un espectrofotómetro (BioTek Synergy HT).

Tanto para los datos obtenidos por absorbancia a 630nm, como para los obtenidos a 540nm en el ensayo MTT, se analizaron estadísticamente los resultados mediante el programa GraphPad Prism 7®. Se compararon los datos de absorbancia obtenidos en cada pocillo con los controles (pocillos 11 y 12). A cada valor de absorbancia se restó el valor de densidad óptica obtenido en el pocillo 12, que solamente contiene el medio, y se calculó el porcentaje de crecimiento o viabilidad respecto al control positivo de crecimiento del pocillo 11, donde no había antimicrobiano. También se realizó el análisis one-way ANOVA de los datos correspondientes a GT respecto al control positivo.

5.6.3 Estudio del efecto de gliotoxina frente a *C. albicans* mediante citometría de flujo

Se realizó el mismo procedimiento de microdilución e inoculación explicado anteriormente para el estudio de la CMI y CMB (5.6.1) hasta el paso 4. En este ensayo se estudió solamente *C. albicans*, utilizando GT y VRC en medio RPMI. Pero en este caso, la concentración de GT y antimicrobiano del pocillo 1 fue 125 µg/ml, y el control de muerte se realizó con el inóculo y etanol al 50%.

Se realizó el marcaje con yoduro de propidio (5 µl en 100 µl de PBS al 5% de suero fetal bovino) (Inmunostep), un agente intercalante fluorescente utilizado para teñir las células. El yoduro de propidio no puede atravesar la membrana de las células vivas (en el caso de *C. albicans* tampoco atraviesa la pared celular), por lo que es útil para evaluar la viabilidad celular.

Se incubó 10-15 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 3700 xg durante 10 minutos. Se realizó el análisis de las muestras mediante un citómetro de flujo (FACScalibur BD).

Con el programa Weasel®, se encontraron las regiones adecuadas para las poblaciones estudiadas en los dot plot, y se obtuvieron histogramas con los datos de los controles y de cada pocillo.

6. RESULTADOS

6.1 Análisis del efecto de gliotoxina mediante antibiogramas disco-placa

Se midieron los halos de inhibición de todos los discos impregnados y se calculó la media de los valores obtenidos (Tabla 5). Todos los antimicrobianos utilizados como control produjeron su halo de inhibición dentro del rango establecido por el Comité Europeo de Pruebas de Sensibilidad Antimicrobiana (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST 2018) específico para cada cepa.

Microorganismo	Media ± sd del halo de inhibición de gliotoxina (diámetro en mm)	Antimicrobiano	Media ± sd del halo de inhibición del antimicrobiano (diámetro en mm)	Rango establecido por EUCAST
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	24,80 ± 2,17	Cefoxitina	30	24-30
<i>S. aureus R</i> ATCC 700699	25,67 ± 1,55	Cefoxitina	0	Resistente
		Ácido fusídico	35,33 ± 1,53	NE
<i>E. coli</i> ATCC 25922	13,75 ± 0,96	Cefotaxima	31	25-31
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0	Ceftazidima	25	21-27
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	19,57 ± 3,4	Voriconazol	50*	NE
<i>C. albicans AZN</i> AZN-9635	16,25 ± 2,87	Voriconazol	50*	NE
<i>C. glabrata</i> YFI-002-656	40*	Voriconazol	29,8 ± 2,77	NE

Tabla 5. Resultados de los antibiogramas/antifungigramas. Se expone la media y su desviación estándar (sd) de los halos de inhibición del crecimiento (diámetro en mm) para cada microorganismo y el compuesto contenido en el disco impregnado. También se detallan los rangos establecidos por EUCAST para los antimicrobianos. NE = No existe halo de referencia. En los datos que tienen un asterisco* se observó un halo de inhibición de crecimiento difuminado, por lo tanto, la medida es aproximada. Cada experimento se repitió al menos 3 veces.

El halo de inhibición del disco que contenía la dilución de agua y metanol en todos los casos fue 0 mm, es decir, el metanol no ejerce ninguna acción antimicrobiana en ninguno de los microorganismos en las condiciones de este ensayo.

En la figura 11 podemos observar varios ejemplos de antibiogramas. En el caso de *P. aeruginosa* (2), en las condiciones realizadas, la GT no ejerció ningún efecto antibiótico en la bacteria, ya que no aparece halo de inhibición. Por el contrario, en los antibiogramas de *E. coli* (1) y *S. aureus* (3 y 4) se observaron halos de inhibición alrededor de los discos de GT, de mayor tamaño en el caso de *S. aureus*, lo que indica que la GT es capaz de afectar de forma negativa el crecimiento de estas bacterias.

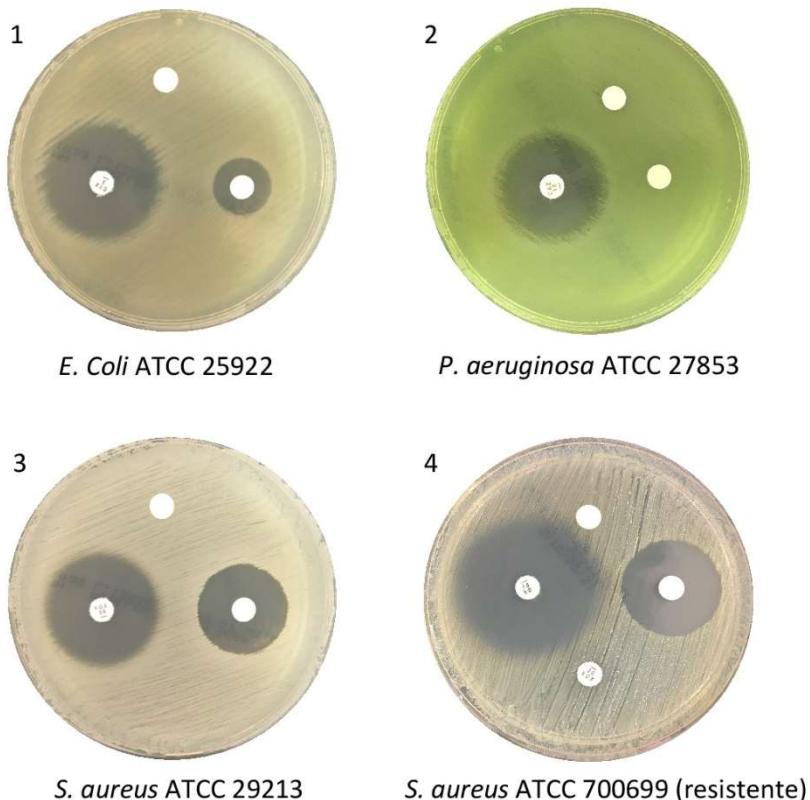


Figura 11. Fotografías de antibiogramas representativos realizados. En la parte superior de las placas se localiza el disco que contiene la solución de metanol con agua destilada estéril (1,2:1). En la parte izquierda de la placa se encuentra el disco que contiene el antibiótico control: 1 cefotaxima (5 µg), 2 ceftazidima (10 µg), 3 cefoxitina (30 µg) y 4 ácido fusídico (10 µg). En la parte derecha se observa el disco impregnado con GT (10 µg). En el caso de *S. aureus* resistente, hay un cuarto disco en la parte inferior de la placa, donde se sitúa el disco de cefoxitina (30 µg). Cada experimento se repitió al menos 3 veces.

Es importante señalar el efecto de inhibición de crecimiento de la GT sobre *S. aureus* resistente, donde se obtuvo un halo de inhibición similar al de la cepa no resistente.

Los antifungigramas se representan en la figura 12. En los casos 5 y 6 (*C. albicans* sensible y resistente, respectivamente), se pudo observar el halo de inhibición de la GT, de menor tamaño en la cepa resistente. Además, se observó un efecto de sinergia con el

voriconazol, al desplazarse el halo de inhibición hacia el lugar donde se sitúa el antifúngico. En el caso de *C. glabrata*, el halo de inhibición fue de mayor tamaño, aunque se observó un leve crecimiento en toda la extensión del halo (imagen 8 de la figura 12).

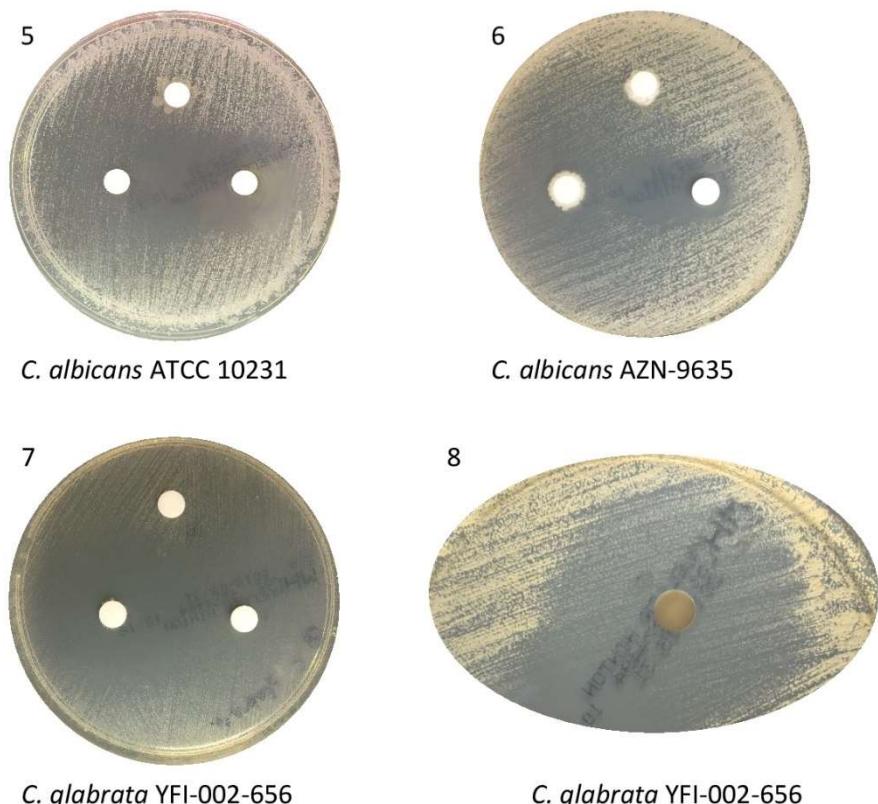


Figura 12. Fotografías de antifungigramas representativos realizados. En la parte superior de las placas se localiza el disco que contiene la solución de metanol. En la parte izquierda de la placa se encuentra el disco que contiene el antifúngico control: voriconazol (10 µg) en todos los casos. En la parte derecha se observa el disco impregnado con GT (10 µg). En la imagen 8, se puede ver ampliado uno de los casos en los que el halo de inhibición de la GT se ve difuminado. Cada experimento se repitió al menos 3 veces.

Los halos de inhibición de VRC en ambas cepas de *C. albicans* fueron de gran tamaño y con efecto “difuminado”, característico de los antimicrobianos fungistáticos.

6.2 Curvas de muerte respecto al tiempo

Los resultados de los experimentos realizados con agua destilada estéril se expresan en los gráficos de la figura 13. Se despreció el efecto del agua sobre los microorganismos debido a la leve variación en el número de UFC/ml respecto al control (datos no mostrados).

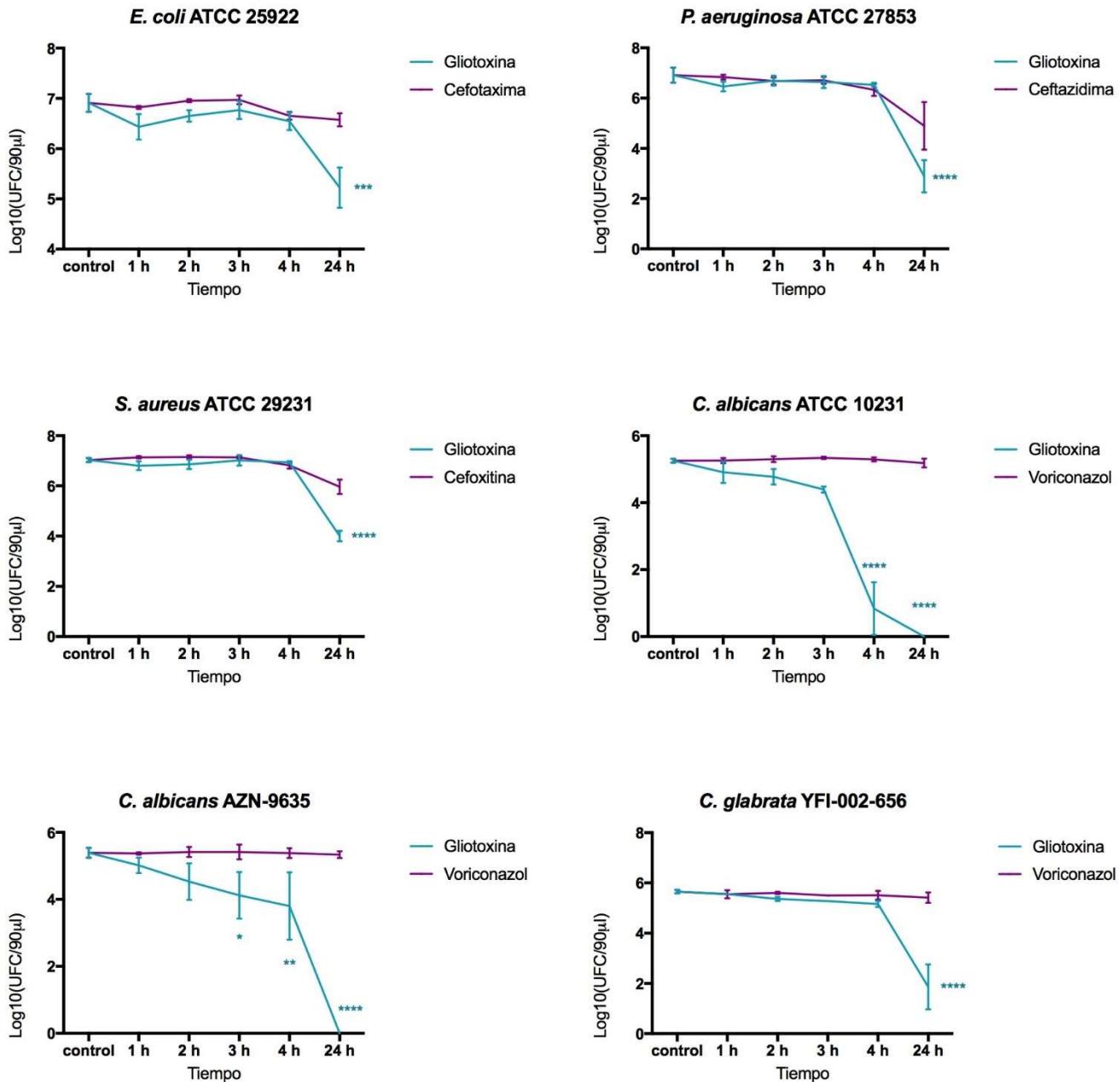


Figura 13. Curvas de muerte respecto al tiempo. Las diferentes cepas se incubaron con GT (100 µg/ml), así como los antibióticos/antifúngicos asignados utilizados a diferentes tiempos tal y como se indica en materiales y métodos. Los resultados se representan como la media de los log10 de las UFC/90µl respecto al tiempo, así como las barras de error, que corresponden a la desviación estándar en cada punto. Los niveles de significancia estadística (análisis one-way ANOVA) correspondiente a GT se expresan en cada punto con respecto al control con *, **, ***, o ****, que corresponden a una $p < 0.05$, 0.01, 0.001 y 0.0001, respectivamente. Los puntos que no tienen símbolo son no significativos. Los experimentos se realizaron al menos 3 veces con agua destilada estéril.

Los resultados se analizaron calculando las UFC presentes en 90 µl de disolución, ya que partimos de esta cantidad de inóculo, que contiene aproximadamente 10⁷ UFC/ml en el caso de las bacterias, y 10⁵-10⁶ en el caso de *Candida*.

En todas las curvas de muerte bacteriana (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*) se observó un leve descenso con diferencias significativas ($p<0,001$) del número de células expuestas a GT (100 $\mu\text{g/ml}$) transcurridas 24 horas. Presentaron reducciones logarítmicas respecto al control de 1,79, 3,06 y 3,94, respectivamente (Tabla 6).

En el caso de las curvas de muerte de los hongos, se pudo observar un descenso más pronunciado de las UFC en los inóculos expuestos a GT. Disminuyó el número de UFC de forma paulatina durante el transcurso de las horas, presentando diferencias significativas a las 4 y 24 horas ($p<0,001$), y llegando incluso a producir un 100% de muerte celular transcurridas 24 horas en *C. albicans*, tanto en la cepa sensible como en la resistente. En ambos casos se sembró por completo la dilución incubada durante 24 horas y no se observó crecimiento de colonias en ninguna de las placas. Sin embargo, para *C. glabrata* se apreció una gran reducción logarítmica, concretamente de 3,81 (Tabla 6), pero no llegó a eliminar el 100% de las levaduras.

		Reducción logarítmica respecto al control (titulación)					
		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans AZN</i>	<i>C. glabrata</i>
GT	1 h	0,33	0,45	0,18	0,43	0,37	0,10
	2 h	0,31	0,35	0,17	0,56	0,86	0,29
	3 h	0,20	0,41	0,01	0,90	1,27	0,38
	4 h	0,47	0,30	0,11	4,06	1,59	0,50
	24 h	1,79	3,94	3,06	T	T	3,81
AM	1 h	0,14	0,21	-0,10	0,14	0,02	0,21
	2 h	0,01	0,37	-0,12	0,01	-0,02	0,05
	3 h	-0,01	0,34	-0,11	-0,03	-0,03	0,15
	4 h	0,36	0,50	0,23	0,02	0,01	0,15
	24 h	0,44	1,94	1,10	0,13	0,06	0,24

Tabla 6. Media de la reducción logarítmica respecto al control (titulación) para cada hora, compuesto y microorganismo. Experimentos realizados con agua destilada estéril. “T” significa una reducción logarítmica total respecto al control. GT=gliotoxina, AM=antimicrobiano asignado.

Los antibióticos utilizados como control en el experimento realizado con agua no producen una disminución en las UFC, ya que son bactericidas parciales: para ejercer su acción, las bacterias deben estar en crecimiento. El VRC es fungistático.

En los experimentos realizados con MH (Figura 14) se observó un mayor descenso del número de UFC por acción de los antibióticos, y un menor descenso por acción de la GT.

Los resultados revelan diferencias significativas únicamente en los valores correspondientes a 24 horas de incubación.

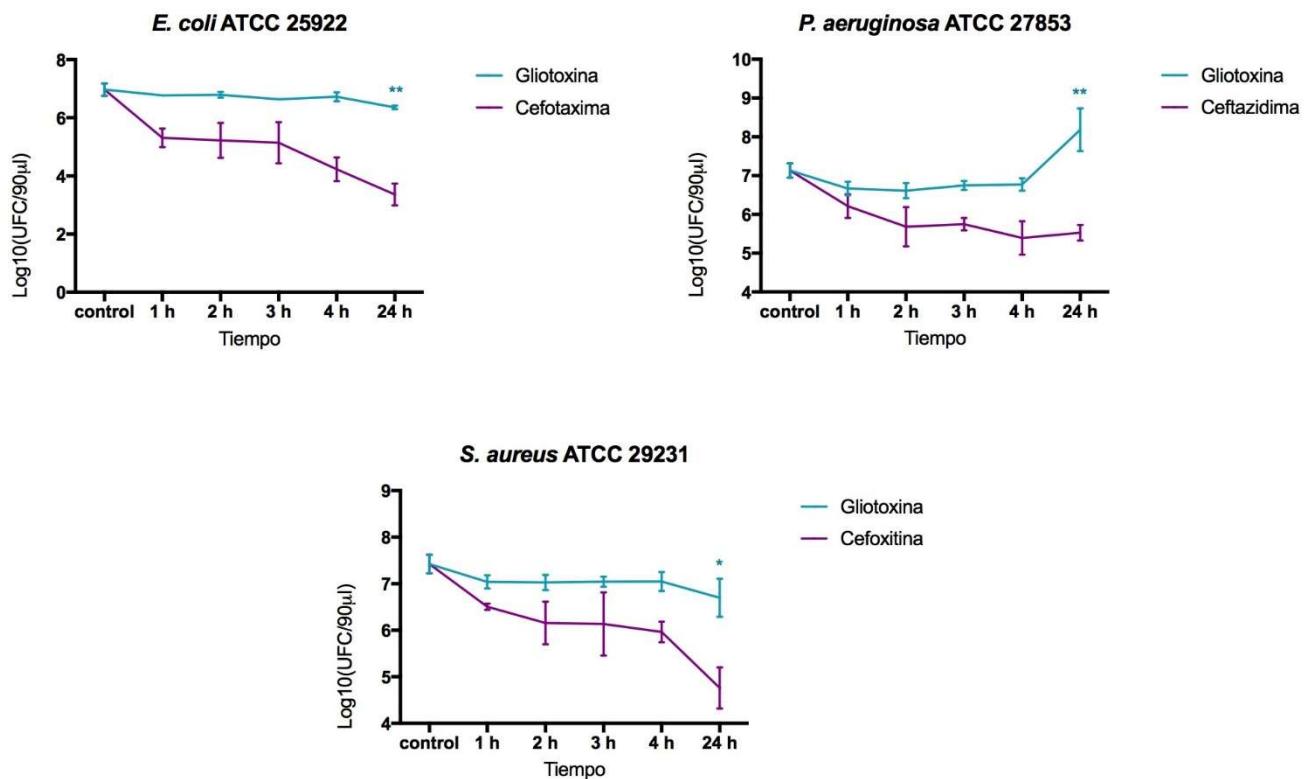


Figura 14. Curvas de muerte respecto al tiempo. Las diferentes cepas se incubaron con GT (100 μ g/ml), así como los antibióticos/antifúngicos asignados utilizados a diferentes tiempos tal y como se indica en materiales y métodos. Los resultados se representan como la media de los log10 de las UFC/90 μ l respecto al tiempo, así como las barras de error, que corresponden a la desviación estándar en cada punto. Los niveles de significancia estadística correspondiente a GT se expresan en cada punto con respecto al control con *, **, *** o ****, que corresponden a una $p < 0.05$, 0.01, 0.001 y 0.0001, respectivamente. Los puntos que no tienen símbolo son no significativos. Los experimentos se realizaron al menos 3 veces con medio MH.

También se pudo visualizar un crecimiento bacteriano elevado en las diluciones de *P. aeruginosa* con GT incubadas 24 horas, presentando una reducción logarítmica negativa de -0.99 (Tabla 7), y por lo tanto superando el número de UFC inicial.

		Reducción logarítmica respecto al control (titulación)		
		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
GT	1 h	0,20	0,46	0,38
	2 h	0,18	0,52	0,40
	3 h	0,33	0,38	0,38
	4 h	0,25	0,36	0,38
	24 h	0,62	-0,99	0,73

		Reducción logarítmica respecto al control (titulación)		
		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
AM	1 h	1,67	0,92	0,92
	2 h	1,75	1,45	1,27
	3 h	1,83	1,38	1,29
	4 h	2,74	1,74	1,46
	24 h	3,61	1,60	2,66

Tabla 7. Media de la reducción logarítmica respecto al control (titulación) para cada hora, compuesto y microorganismo. GT=gliotoxina, AM=antimicrobiano asignado. Experimentos realizados con medio MH.

6.3 Determinación de la sensibilidad microbiana frente a gliotoxina

6.3.1 Método de microdilución para determinar la concentración mínima inhibitoria, concentración mínima bactericida/fungicida e IC₅₀ de gliotoxina

Para comenzar, tras realizar el método de microdilución e incubado, se estimó el crecimiento celular en los pocillos utilizando el valor de densidad óptica a 630nm. En la figura 15 se expresa el porcentaje de crecimiento de los microorganismos a cada concentración de antimicrobiano o GT, respecto al control (0) que corresponde al pocillo que contenía el inóculo sin antimicrobiano o GT.

Para *E. coli*, se observó un descenso del crecimiento de la bacteria conforme aumenta la concentración de GT, de forma paulatina con diferencias significativas ($p<0,0001$) a partir del pocillo correspondiente a 7,82 µg/ml. La CMI de GT en la cepa ATCC 25922 fue de 62,5 µg/ml, ya que es la mínima concentración que produce un 80% de inhibición del crecimiento. En cuanto al análisis de la CMB, se obtuvo crecimiento en todos los pocillos sembrados, por lo tanto, se deduce que la concentración mínima bactericida capaz de eliminar al menos 99,9% de la muestra inoculada será mayor que la concentración más alta utilizada en este estudio (> 250 µg/ml). La IC₅₀ para *E. coli* fue de 12,05 µg/ml. La ceftazidima frente a *E. coli* presentó CMI = CMB = 0,98 µg/ml, e IC₅₀ = 0,12 µg/ml. En el caso de *P. aeruginosa* se observó un leve descenso con diferencias significativas ($p<0,0001$) en las concentraciones más altas de GT. Los datos obtenidos no permiten definir los valores de CMI ni CMB, ya que la inhibición del crecimiento es mínima. La ceftazidima frente a *P. aeruginosa*, presenta CMI = 0,98 µg/ml y CMB = 15,63 µg/ml.

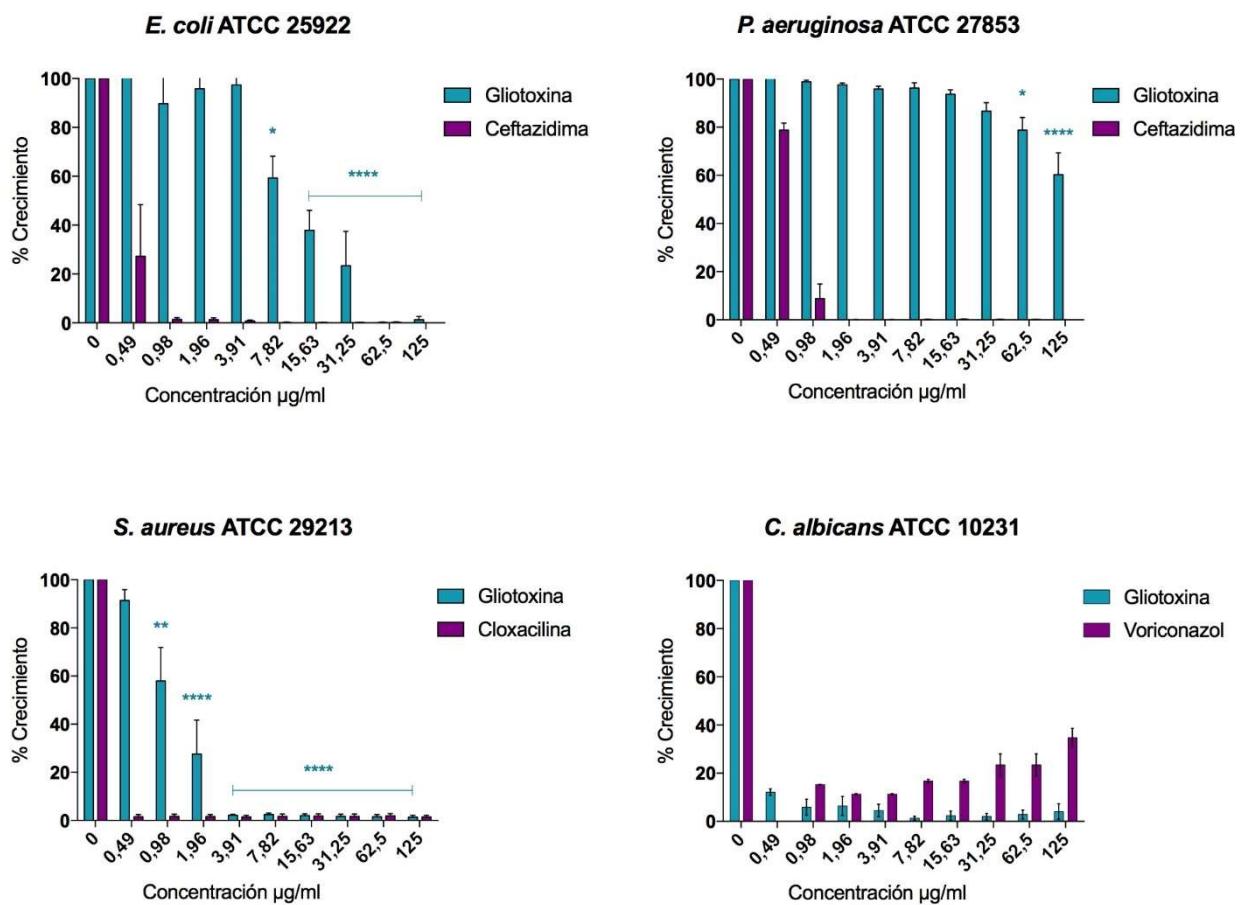


Figura 15. Estudio del efecto de GT en el crecimiento de los microorganismos. Las diferentes cepas se incubaron con GT a diferentes concentraciones, así como con los antibióticos/antifúngicos asignados utilizados durante 24h, tal y como se indica en materiales y métodos. Los resultados se representan como el porcentaje de crecimiento frente a la concentración en cada pocillo respecto al control (0), así como las barras de error, que corresponden a la desviación estándar en cada punto. Los niveles de significancia estadística (análisis one-way ANOVA) correspondiente a GT se expresan en cada punto con respecto al control con *, **, *** o ****, que corresponden a una $p < 0.05$, 0.01 , 0.001 y 0.0001 , respectivamente. Los puntos que no tienen símbolo son no significativos. Cada experimento se realizó por duplicado.

Por el contrario, en *S. aureus* se ve claramente el efecto inhibidor del crecimiento por parte de la GT, obteniendo una CMI de $3.91 \mu\text{g/ml}$, concentración a la cual se inhibe cerca del 100% del crecimiento de la bacteria. En cuanto a la CMB de GT, se observó una eliminación completa del microorganismo a una concentración de GT de $15.63 \mu\text{g/ml}$. Para el antibiótico cloxacilina, la CMI fue $0.49 \mu\text{g/ml}$ y la CMB $3.91 \mu\text{g/ml}$. La IC_{50} de GT frente a *S. aureus* fue $1.07 \mu\text{g/ml}$ y la IC_{50} de la cloxacilina, $0.012 \mu\text{g/ml}$.

Microorganismo	Compuesto	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	CMB/CMF ($\mu\text{g/ml}$)	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
<i>E. coli</i>	Gliotoxina	62,5	> 250	12,05
	Ceftazidima	0,98	0,98	0,12
<i>P. aeruginosa</i>	Gliotoxina	-	-	-
	Ceftazidima	0,98	15,63	-
<i>S. aureus</i>	Gliotoxina	3,91	15,63	1,07
	Cloxacilina	0,49	3,91	0,012
<i>C. albicans</i>	Gliotoxina	0,49	3,91	-
	Voriconazol	0,49	62,5	-

Tabla 8. Resultados del método de microdilución para el cálculo de CMI, CMB/CMF e IC_{50} para gliotoxina y el antimicrobiano de elección con cada una de las cepas estudiadas. Los recuadros que contienen un guión “-” no han podido ser calculados.

Por último, en el caso de *C. albicans* se observa un drástico descenso de la absorbancia incluso en las concentraciones más bajas de GT, proporcionando una CMI de 0,49 $\mu\text{g/ml}$. La concentración mínima fungicida de GT frente a *C. albicans* fue 3,91 $\mu\text{g/ml}$, ya que se observó crecimiento nulo tras sembrar el pocillo correspondiente a esta concentración. El voriconazol presentó una CMI = 0,49 $\mu\text{g/ml}$ y CMB = 62,5 $\mu\text{g/ml}$.

6.3.2 Ensayo MTT

En el ensayo MTT se obtuvieron resultados de absorbancia a 540 nm, longitud de onda a la que absorben los cristales de formazan formados por el metabolismo celular. A mayor absorción, se interpreta una mayor actividad celular, que se traduce en porcentaje de viabilidad con respecto al control, analizado estadísticamente de la misma forma que en el caso de la absorbancia a 630nm. Se trata de otro método para estudiar la acción de la GT frente a los mismos microorganismos, en este caso la CMI.

Tras la adición del MTT a los pocillos se pudo observar un cambio de color por la reducción de este compuesto, observable a simple vista en los ejemplos de la figura 16.

El color oscuro representa crecimiento celular.

Este experimento no se llegó a optimizar por completo, ya que se obtuvo saturación en muchos de los pocillos donde se había formado un exceso de cristales de formazan. Suele considerarse un protocolo más sensible para calcular la CMI, por lo que sus resultados se han incluido en este estudio.

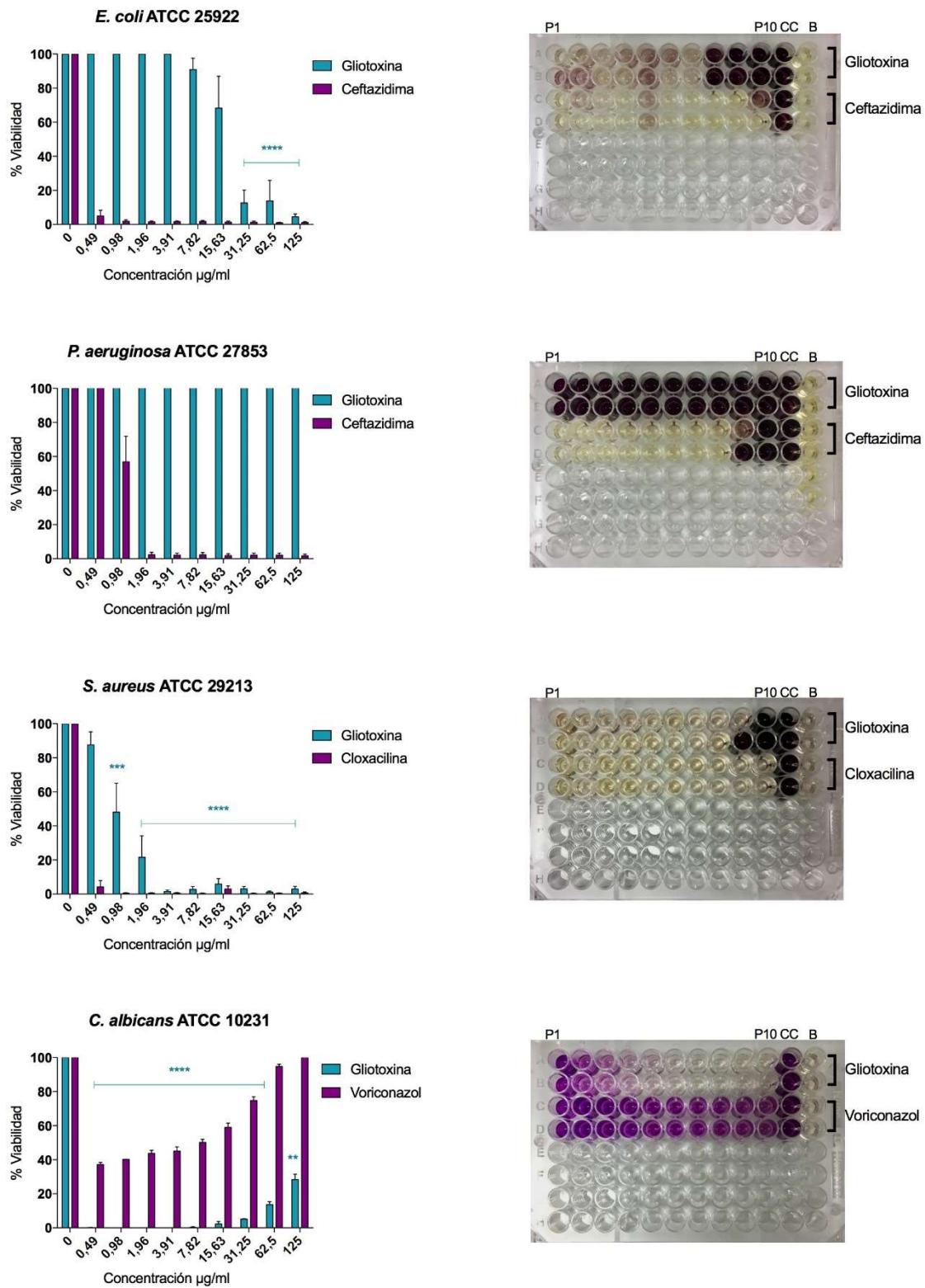


Figura 16. Estudio del efecto de GT en el crecimiento de los microorganismos. Las diferentes cepas se incubaron con GT a diferentes concentraciones, así como con los antibióticos/antifúngicos asignados utilizados durante 24h. Después se realizó el ensayo MTT, tal y como se indica en materiales y métodos. Izquierda: Representación gráfica del porcentaje de viabilidad frente a la concentración en cada pocillo respecto al control (0), así como las barras de error, que corresponden a la desviación estándar en cada punto. Los niveles de significancia estadística (análisis one-way ANOVA) correspondiente a GT se expresan en cada punto con respecto al control con *, **, ***, o ****, que

corresponden a una $p < 0.05$, 0.01, 0.001 y 0.0001, respectivamente. Los puntos que no tienen símbolo son no significativos. Derecha: Fotografías de las placas utilizadas para el experimento. Tras la adición del MTT, aquellos pocillos en los que haya crecimiento adquieren el color oscuro que se observa en las imágenes. En cada imagen se indican las columnas correspondientes a los pocillos (P1-P10) y controles (CC, B); y las filas que contienen GT o el antimicrobiano asignado. Cada experimento se realizó por duplicado.

El resultado que más se asemeja a los obtenidos en el experimento anterior, es el correspondiente a *S. aureus*. Como se puede observar, las gráficas son similares y de ellas se obtiene el mismo resultado en cuanto a la CMI de GT: 3,91 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

En el caso de *E. coli*, se observa saturación en los pocillos 8, 9, 10. El porcentaje de viabilidad disminuye drásticamente, a un 12,66% en el pocillo correspondiente a la concentración 31,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, donde el porcentaje de crecimiento fue 23,39% (Figura 15). La diferencia entre estos dos valores no es excesiva, pero según el criterio para adjudicar el valor de CMI, solamente en el caso del experimento con MTT disminuye más de un 80%. Por lo tanto, en este experimento, se obtuvo una CMI = 31,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, la mitad que en el experimento analizado por absorbancia a 630nm.

En el experimento de *P. aeruginosa* se observó saturación en todos los pocillos con GT. Por último, en *C. albicans*, al igual que en el experimento medido por absorbancia a 630nm, se observa una disminución prácticamente del 100% de la viabilidad en las concentraciones más bajas de GT. Extrañamente, se observa un aumento en la absorbancia a 540nm en las concentraciones más altas de GT, y de manera similar en el caso del voriconazol. Se realizó un ensayo para estudiar este fenómeno.

Se siguió el mismo procedimiento de microdilución en pocillos utilizado para la cepa *C. albicans*, pero en este caso sin utilizar el inóculo. Es decir, en los pocillos solamente se añadió la dilución de GT o voriconazol y medio RPMI. Se realizaron los mismos estudios: el análisis de turbidez a 630 nm y el ensayo MTT midiendo la absorbancia a 540 nm. En ambos experimentos se obtuvo un aumento de absorbancia en las concentraciones altas de GT (señalados en negrita en la Figura 17), lo que demuestra que en ausencia de *C. albicans*, se produce absorción a estas longitudes de onda y por lo tanto el efecto anómalo observado en los ensayos anteriores puede ser debido a este fenómeno. Además, tras la incubación, se observaron los pocillos al microscopio, y se encontraron cristales precipitados en los pocillos correspondientes a la concentración 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de GT (Imagen inferior derecha, Figura 17).

630nm	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	B	B
GT	0,063	0,037	0,039	0,036	0,037	0,036	0,037	0,038	0,037	0,037	0,036	0,039
GT	0,056	0,038	0,037	0,035	0,035	0,035	0,036	0,035	0,036	0,039	0,038	0,037
VRC	0,035	0,035	0,042	0,036	0,039	0,035	0,036	0,038	0,04	0,042	0,04	0,042
VRC	0,039	0,037	0,036	0,035	0,036	0,041	0,036	0,036	0,036	0,039	0,038	0,044

540nm	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	B	B
GT	1,009	0,65	0,335	0,213	0,114	0,087	0,08	0,081	0,08	0,078	0,079	0,073
GT	1,174	0,654	0,314	0,167	0,097	0,083	0,085	0,082	0,08	0,079	0,078	0,074
VRC	0,074	0,074	0,076	0,08	0,075	0,079	0,079	0,093	0,085	0,082	0,081	0,075
VRC	0,075	0,075	0,077	0,076	0,082	0,085	0,083	0,08	0,085	0,083	0,079	0,078

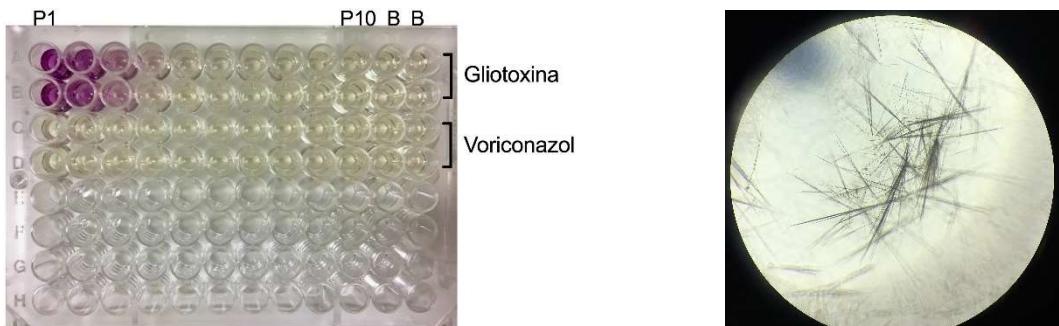


Figura 17. Estudio de absorbancia de GT y voriconazol tras ser incubados en ausencia de inóculo, en medio RPMI durante 24h. Se evaluó la absorbancia a 630nm y se realizó el ensayo MTT tal y como se indica en materiales y métodos. Parte superior: Tablas de los datos de absorbancia obtenidos a 630 nm y tras el ensayo con MTT a 540 nm. Los pocillos contienen la misma concentración de GT (GT) y voriconazol (VRC) que en el experimento original (Tabla 4). Los pocillos “B” contienen solamente medio RPMI. Ningún pocillo contiene microorganismos. Imagen izquierda: fotografía de la placa una vez añadido el MTT, el color oscuro corresponde a la formación de cristales de formazan. Imagen derecha: fotografía tomada con un microscopio (Nikon eclipse E100), donde se observan los cristales de GT. El experimento se realizó por duplicado.

Es posible que el precipitado de GT se forme a altas concentraciones en las condiciones del ensayo y por consiguiente produzca absorbancia a 630 nm. Por otro lado, dado que GT es un agente reductor, es posible que reduzca el MTT produciendo cristales de formazan (se puede observar el color morado oscuro en los pocillos de mayor concentración de GT, imagen inferior izquierda de la Figura 17) y produzca absorbancia a 540 nm. De esta manera, se explicaría este efecto aumentado cuanto mayor es la concentración de GT.

Sin embargo, este fenómeno no ocurre en los pocillos que contienen voriconazol, tal y como se observa en las tablas de la figura 17, la absorbancia obtenida en todos los

pocillos con VRC es similar a la obtenida en los pocillos que solamente contienen medio RPMI, y no se encontró precipitado alguno en los pocillos observados al microscopio.

6.3.3 Estudio del efecto de gliotoxina frente a *C. albicans* mediante citometría de flujo

En este ensayo se analizó el porcentaje de muerte de *C. albicans* producido por GT mediante citometría de flujo. Se utilizó etanol (concentración final 50%) como control de muerte, y el inóculo solo como control de células vivas. Como podemos observar en la figura 18, se obtiene un aumento en el porcentaje de células muertas conforme aumenta la concentración de GT, llegando a un máximo de 88% de células muertas en el pocillo que contenía la mayor concentración: 125 µg/ml. La mínima concentración estudiada en este ensayo fue 3,91 µg/ml, para la que se obtuvo un 27,8% de muerte celular.

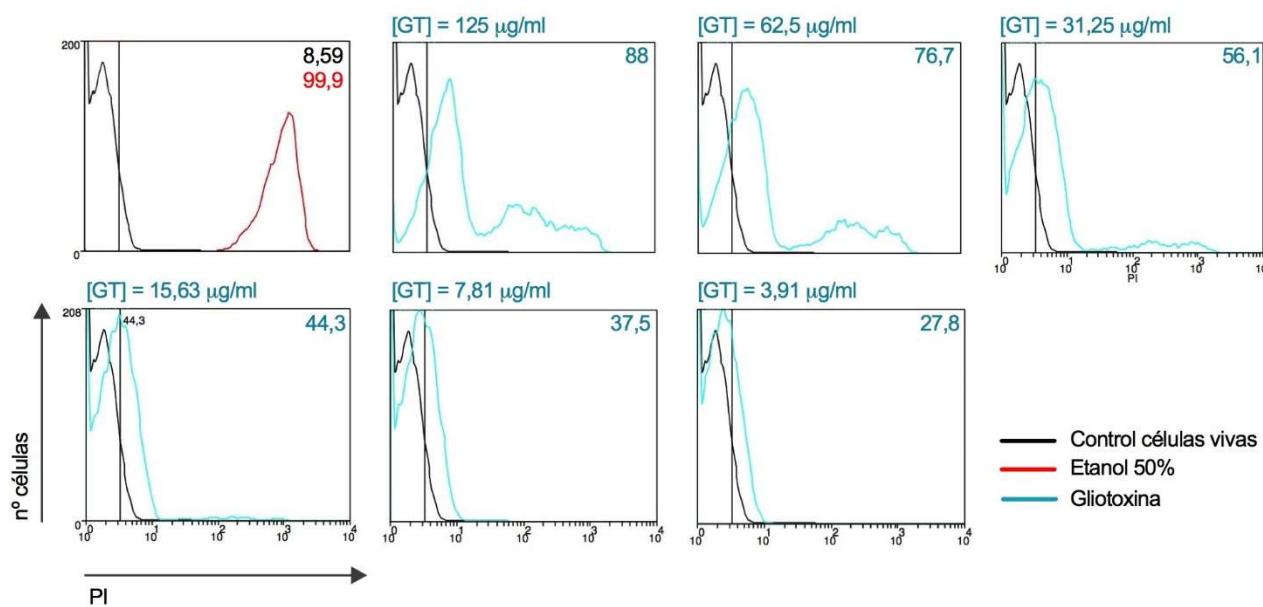


Figura 18. Estudio del efecto de GT a diferentes concentraciones frente a *C. albicans*. Se siguió el proceso de microdilución e inoculación y se incubó durante 24h. Se realizó el marcaje con yoduro de propidio y se realizó el análisis de las muestras mediante citometría de flujo (FACScalibur, BD). Los resultados se representan en los histogramas obtenidos con el programa Weasel®, relacionando el número de células con la fluorescencia emitida por el yoduro de propidio. El primer histograma presenta en negro el control de células vivas y en rojo el control de muerte. En la zona derecha de todos los histogramas aparece el porcentaje de células muertas correspondiente a cada población. Las concentraciones de GT de los pocillos analizados se expresan en la parte superior de cada histograma. El experimento se realizó una vez.

7. DISCUSIÓN

A través del estudio mediante antibiogramas/antifungigramas, se ha demostrado que la GT es capaz de inhibir el crecimiento de las cepas estudiadas: *S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 25922, *C. albicans* ATCC 10231; e incluso es capaz de inhibir el crecimiento de cepas resistentes como *S. aureus* 700699, *C. albicans* AZN-9635 y *C. glabrata* YFI-002-656. Sin embargo, no se aprecia halo de inhibición de crecimiento en *P. aeruginosa* ATCC 27853 en las condiciones de este ensayo.

En un estudio de genotoxicidad, Nieminen et al. (76) evaluaron el efecto de GT en *E. coli* WP2 *trpE*56, y se obtuvo una zona de inhibición de aproximadamente 14 mm, similar al resultado obtenido en este ensayo para la misma cantidad de GT utilizada (10 µg): 13,75 ± 0,96 mm.

Gracias a esta primera fase del estudio, se demostró el efecto antimicrobiano de GT sobre los microorganismos nombrados en las condiciones ensayadas. Aunque no se conoce el mecanismo por el cual la GT ejerce su acción antimicrobiana, estudios previos han demostrado que las especies reactivas de oxígeno producidas por la GT son capaces de provocar daños en el ADN (74, 75, 94). También se ha demostrado que la GT es genotóxica para *E. coli* en un ensayo de reparación bacteriana, y que el daño en el ADN aumenta con la dosis (76).

Se realizaron experimentos para obtener las curvas de muerte respecto al tiempo en dos tipos de medios: agua destilada estéril y MH. En el caso de los experimentos realizados con agua destilada estéril, los microorganismos incubados se encuentran en un medio sin nutrientes donde no son capaces de proliferar. De esta manera, es posible estudiar la capacidad de la GT de matar a estos microorganismos independientemente de la proliferación. Pero para analizar si la GT es capaz de matar y/o inhibir la proliferación en condiciones de crecimiento, es necesario incubar los microorganismos en un medio en el que sea posible dicha proliferación, en este caso MH para bacterias. En los experimentos realizados para obtener las curvas de muerte con agua destilada estéril se puede observar un pronunciado efecto antibacteriano de la GT (100 µg/ml) transcurridas 24 horas de incubación. Los antimicrobianos elegidos para cada cepa bacteriana en particular no ejercen acción antibiótica en este ensayo debido a que el inóculo está incubado en agua destilada estéril. Los antibióticos elegidos fueron:

cefotaxima, ceftazidima y cefoxitina para *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, respectivamente. Todos ellos son antibióticos betalactámicos, cefalosporinas de tercera y segunda generación. Su mecanismo de acción consiste en inhibir el paso final de la síntesis de la barrera de peptidoglicanos de la pared celular bacteriana (95). Son bactericidas parciales, ya que solo actúan en fase de crecimiento celular (96). Por lo tanto, las células deben estar en un medio que les permita proliferar para que el antibiótico pueda ejercer su acción, inhibiendo la formación de la pared celular durante la fase de generación de nuevas células.

Esta premisa se cumple al observar los resultados de los experimentos realizados en medio MH, donde se obtiene una reducción logarítmica pronunciada en el caso de los antibióticos control. Sin embargo, la GT no presenta el mismo efecto antibiótico que en los experimentos realizados con agua destilada estéril. Podría ser debido a que, aunque se produzca este efecto antibiótico, se vea enmascarado por el crecimiento celular, ya que están en presencia del medio óptimo para su desarrollo.

También se ha de señalar que en las curvas de muerte de *P. aeruginosa* y *S. aureus* en agua destilada estéril se puede apreciar un leve efecto antibiótico en los controles únicamente transcurridas 24 horas. Tras realizar las pruebas oportunas, se llegó a la conclusión de que se podría haber estado formando biopelícula bacteriana en los tubos eppendorf, y consecuentemente el contaje de UFC/ml podría ser erróneo. Por lo tanto, los resultados de 24 horas de estos dos microorganismos podrían estar falseados. A partir de este punto, en el siguiente ensayo con MH se intentó eliminar la biopelícula antes de realizar el contaje de colonias, mediante agitación y el uso de ultrasonidos durante 5 minutos. Por lo tanto, se considera que los resultados de los experimentos realizados con MH no se ven afectados por la formación de biopelícula.

En cuanto a la actividad fungicida de GT, cabe destacar que produjo una eliminación completa tanto de *C. albicans* sensible como de la cepa resistente una vez transcurridas 24 horas. Por otro lado, en *C. glabrata* induce un efecto antimicótico pero de menor magnitud, no obstante, supone una reducción logarítmica de 3,81 respecto al control. No se han encontrado en la bibliografía estudios que relacionen GT con *C. glabrata*.

No se ve efecto antimicótico del voriconazol en los experimentos realizados con agua destilada estéril porque es un antimicrobiano fungistático contra *Candida* spp. (97). Ocurre el mismo efecto comentado anteriormente para los antibióticos. Su mecanismo de acción consiste en inhibir el citocromo P450 dependiente de 14 lanosterol

demetilasa, la enzima requerida para la síntesis de ergosterol. Esta enzima es importante en la producción y mantenimiento de la pared celular fúngica (98).

Se obtuvieron las concentraciones mínimas inhibitorias de GT para *E. coli* ATCC 25922: 31,25 µg/ml, *S. aureus* ATCC 29213: 3,91 µg/ml y *C. albicans* ATCC 10231: 0,49 µg/ml. Así como la concentración mínima bactericida para *S. aureus*: 15,63 µg/ml; y la concentración mínima fungicida para *C. albicans* fue 3,91 µg/ml. En el caso de *E. coli*, se dedujo que la CMB es mayor que la máxima concentración utilizada en este estudio (> 250 µg/ml). Respecto a *P. aeruginosa*, la GT apenas produjo un descenso en el crecimiento o viabilidad bacteriana, y por lo tanto no se obtuvieron resultados de CMI ni CMB. También se calcularon las IC₅₀ posibles: 12,05 µg/ml en *E. coli* y 1,07 µg/ml en *S. aureus*.

Los valores de CMI obtenidos para las bacterias y los antibióticos control cumplen con los puntos de corte establecidos por EUCAST (99). La CMI obtenida para VRC frente a *C. albicans* se encuentra dentro del rango normal de susceptibilidad antimicrobiana (98). Respecto a *P. aeruginosa*, se ha apreciado un leve efecto inhibidor del crecimiento de la GT en el experimento de microdilución, aunque en el mismo experimento adicionando MTT, se observó que la disminución en la viabilidad era nula. Por otro lado, en los ensayos de las curvas de muerte en agua se observó descenso del número de células, aunque dados los resultados en los experimentos realizados con MH y en los experimentos de microdilución, es evidente plantearse que ese descenso se debiera a la formación de biopelícula bacteriana y no a un efecto antimicrobiano de la GT. Además, la concentración utilizada en los ensayos de las curvas de muerte (100 µg/ml) no supone un descenso pronunciado del porcentaje de crecimiento en los resultados obtenidos por microdilución; y en el ensayo MTT supone un 100% de viabilidad. Asimismo, en el primer ensayo realizado, el antibiograma, no se vio efecto inhibidor del crecimiento.

Un reciente estudio sobre la coinfección *P.aeruginosa/Aspergillus* (79) revela que ambos patógenos poseen efectos mutuamente antagónicos. Los sobrenadantes de *A. fumigatus* mostraron una fuerte actividad anti-Pseudomonal y anti-biopelícula transcurridas 48h de incubación. La GT fue el principal agente activo. La GT también dio como resultado niveles variables de actividad anti-biopelícula en otras bacterias que se encuentran comúnmente en las vías respiratorias en casos de fibrosis quística, entre

ellas *S. aureus*. La diferencia respecto a este trabajo podría deberse al tiempo de incubación. Es posible que tanto el efecto anti-Pseudomonal como anti-biopelícula de la GT no sea apreciable cuando solamente han transcurrido 24h de incubación.

En el caso de *E. coli*, los resultados de todos los ensayos realizados muestran efecto antimicrobiano de la GT a una concentración elevada. En las curvas de muerte se observó un descenso en el número de colonias transcurridas 24 horas (red. logarítmica 1,79 en agua y 0,62 en MH). Comparándolo con los datos del ensayo de microdilución, a esa misma concentración (100 µg/ml) los porcentajes de crecimiento y viabilidad son próximos al 0%.

En un estudio de la actividad biológica de metabolitos secundarios (77), se evaluó la CMI de GT frente a la misma cepa de *E. coli*, dando como resultado 8,01 µg/ml. Es un valor considerablemente menor al obtenido en este estudio, 31,25 µg/ml. Esta diferencia en los resultados podría deberse a la variabilidad producida por las diferencias en los ensayos, pero lo que se deduce de ambos es que la GT posee actividad antimicrobiana contra la cepa *E. coli* ATCC 25922.

Las cepas del género *Candida* son las más sensibles a la GT. Se ha demostrado un 100% de muerte celular en *C. albicans* ATCC 10231 y AZN-9635 transcurridas 24 horas con GT a 100 µg/ml. Asimismo, se ha corroborado este efecto antifúngico en los experimentos de microdilución y ensayo MTT, revelando un efecto de reducción de casi el 100% del crecimiento y viabilidad de *C. albicans* ATCC 10231 incluso en las concentraciones más bajas de GT (0,49 µg/ml). Por otro lado, se demostró el efecto antifúngico de la GT frente a *C. albicans* por otro método adicional: citometría de flujo. Se pudo observar el porcentaje de muerte celular respecto a la concentración de GT, llegando a un 88% de muerte celular en los pocillos correspondientes a 125 µg/ml de GT. Los resultados obtenidos mediante citometría de flujo no coinciden con los obtenidos mediante los otros métodos, ya que el citómetro indicó solamente un 27,8% de muerte celular en el pocillo correspondiente a 3,91 µg/ml de GT.

Esta gran desigualdad observada podría deberse a las diferencias entre los métodos. Ambos consisten en la introducción de un compuesto (yoduro de propidio o MTT) en el interior de las células. En el caso del yoduro de propidio, solo puede acceder al interior de las células cuando la membrana está dañada, por lo tanto, es un indicador de muerte celular. Por otro lado, el MTT es capaz de introducirse en la célula por los poros de la pared y la membrana celular y acceder a su interior, donde se metaboliza a formazan

por acción de las hidrolasas intracelulares de las células vivas, es un indicador de proliferación celular. En este caso en particular, la diferencia puede residir en la existencia de pared celular en *C. albicans*. Es posible que la membrana celular esté dañada porque la célula está muerta, pero la pared celular se conserve intacta. En este supuesto, el yoduro de propidio no sería capaz de entrar al interior celular y producir marcaje fluorescente. Según los resultados obtenidos y la premisa expuesta, es posible que en los resultados obtenidos por citometría de flujo, una proporción de la población de células muertas se haya interpretado como viva. Por el contrario, el MTT puede acceder al interior celular sin dificultad, por lo que consideramos este ensayo un método más sensible para evaluar la viabilidad celular frente a GT en el caso particular de *C. albicans* ATCC 10231.

Por otro lado, también hay que considerar que con el ensayo de microdilución estamos evaluando la inhibición del crecimiento celular, mientras que con el yoduro de propidio se evalúa la muerte celular. Por tanto, es posible que la GT inhiba la proliferación de algunas células de *Candida* sin llegar a matarlas y por este motivo se observarían las diferencias indicadas.

El grupo de Coleman et al. (7) estudió el efecto antifúngico de metabolitos secundarios, y obtuvieron una CMI = 2 µg/ml de la GT frente a *C. albicans* (un derivado de SC5314), valor cuatro veces superior al obtenido en este estudio (0,49 µg/ml). La desigualdad en los resultados puede deberse a las diferencias entre las cepas analizadas. Klausmeyer et al. (100) estudiaron la IC₅₀ de GT frente a una cepa de *C. albicans* azol-resistente, obteniendo un valor de 1,01 µg/ml. En este caso no se pudo calcular la IC₅₀, ya que la mínima concentración utilizada presentó casi un 100% de inhibición del crecimiento y viabilidad celular.

Por último, se dedujo que la cepa ATCC 29213 de *S. aureus* presenta sensibilidad frente a GT. Los resultados obtenidos mediante diferentes experimentos coinciden en el valor de CMI de la GT frente a *S. aureus*: 3,91 µg/ml. Se ha encontrado en la literatura el único ensayo realizado con la misma cepa (77), y da como resultado una CMI = 3,98 µg/ml, un valor prácticamente equivalente.

Se ha demostrado que la GT también es tóxica para células de mamífero (29). Se ha estudiado su efecto frente a células de cáncer colorrectal (35), células humanas como astrocitos, neuronas y células microgliales (101), células de pulmón humano (102), linfocitos y macrófagos (103, 104) en un rango de concentración nM, considerablemente

inferior a la concentración que es efectiva como antimicrobiano (según nuestros resultados). Sin embargo, un estudio de células Hela y condrosarcoma (30) revela casi un 100% de viabilidad celular, sin presentar diferencias significativas respecto al control, de 10 μ M de GT (3,26 μ g/ml). Estos datos se deben tener en cuenta a la hora de utilizar la GT como agente terapéutico en el tratamiento de infecciones causadas por *S. aureus* y *C. albicans*, ya que según la concentración podrá ejercer efectos no deseados en los pacientes.

S. aureus es una de las principales causas de infecciones en piel y tejidos blandos en todos los grupos de edad. También hay evidencia de un aumento de infecciones por *S. aureus* resistente a meticilina adquiridas en la comunidad (SAMR-AC). Las infecciones por SAMR-AC pueden ser difíciles de tratar debido a la resistencia a los antibióticos, y su tasa de infecciones está en aumento en todo el mundo (105). La GT podría ser un antimicrobiano útil en los casos en los que existe una infección cutánea por *S. aureus* resistente a los antibióticos disponibles en el mercado. En los resultados de este estudio se ha observado un efecto inhibidor del crecimiento de GT frente a la cepa resistente *S. aureus* 700699. Sería interesante evaluar la CMI y CMB, así como las curvas de muerte respecto al tiempo.

Dada la escasa información acerca de la dosis tóxica de GT, lo más coherente sería elucubrar la forma de utilizar la GT en las capas más superficiales de la piel, para que no alcance la vía sistémica. Mediante formulación farmacéutica se podría vehiculizar la GT en compuestos que no atraviesen la capa córnea (polvos) o que tengan poca capacidad de penetración (geles). En el caso de infecciones graves con lesión de las capas profundas de la piel, impedir el paso de GT a nivel sistémico se convertiría en un reto.

8. CONCLUSIONES

- La GT inhibió el crecimiento por difusión en disco-placa de las cepas *S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 25922, *C. albicans* ATCC 10231; e incluso fue capaz de inhibir el crecimiento de cepas resistentes como *S. aureus* 700699, *C. albicans* AZN-9635 y *C. glabrata* YFI-002-656.
- Se optimizó el protocolo para la obtención de las curvas de muerte respecto al tiempo.
- Transcurridas 24 horas de incubación de los inóculos con GT (100 µg/ml) en agua destilada estéril, se produjo una disminución del número de células *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213, presentando una reducción logarítmica de 1,79 y 3,06, respectivamente.
- La reducción logarítmica del número de células fue drástica en el caso de las cepas de *Candida* sensible y resistente, alcanzando un 100% de muerte celular en 24 horas de incubación de los inóculos de *C. albicans* ATCC 10231 y AZN-9635 con GT a 100 µg/ml en agua destilada estéril.
- En las curvas de muerte con medio Mueller-Hinton no se apreció el efecto antibiótico de la GT que se observaba en agua, seguramente debido a la compensación por el crecimiento bacteriano.
- La GT, a las concentraciones estudiadas en las condiciones ensayadas, no posee efecto antibiótico contra *P. aeruginosa* ATCC 27853.
- Mediante los experimentos de microdilución y ensayo MTT se obtuvieron los datos de sensibilidad frente a GT de las cepas:
 - *E. coli* ATCC 25922: CMI = 31,25 µg/ml; IC₅₀ = 12,05 µg/ml
 - *S. aureus* ATCC 29213: CMI = 3,91 µg/ml; CMB = 15,63 µg/ml; IC₅₀ = 1,07 µg/ml
 - *C. albicans* ATCC 10231: CMI = 0,49 µg/ml; CMB = 3,91 µg/ml
- Se evaluó la acción de GT frente a *C. albicans* ATCC 10231 mediante citometría de flujo, pero, debido presumiblemente a las características morfológicas del hongo, los resultados sugieren menor fiabilidad comparados con el método de microdilución y ensayo MTT.

Conclusions

- GT inhibited growth of strains *S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 25922, *C. albicans* ATCC 10231 by disc-diffusion; and was even able to inhibit the growth of resistant strains such as *S. aureus* 700699, *C. albicans* AZN-9635 and *C. glabrata* YFI-002-656.
- The protocol was optimized to obtain the time-mortality curves.
- After incubation of the inocula with GT at 100 µg/ml in water for 24 hours, there was a decrease in the number of cells *E. coli* ATCC 25922 and *S. aureus* ATCC 29213, showing a logarithmic reduction of 1.79 and 3.06, respectively.
- The logarithmic reduction in the number of cells was drastic in the case of resistant and non resistant *Candida* strains, reaching 100% cell death in 24 hours incubation of the inocula of *C. albicans* ATCC 10231 and AZN-9635 with GT (100 µg/ml) in sterile distilled water.
- In the time-mortality curves with MH medium, the antibiotic effect of GT observed in water was not appreciated, probably due to compensation for bacterial growth.
- GT, at the studied concentrations under the conditions tested, has no antibiotic effect against *P. aeruginosa* ATCC 27853.
- Through the microdilution experiments and MTT assay, GT sensitivity data were obtained against the strains were obtained:
 - *E. coli* ATCC 25922: CMI = 31.25 µg / ml, IC₅₀ = 12.05 µg / ml
 - *S. aureus* ATCC 29213: CMI = 3.91 µg / ml, CMB = 15.63 µg / ml, IC₅₀ = 1.07 µg / ml
 - *C. albicans* ATCC 10231: CMI = 0.49 µg / ml, CMB = 3.91 µg / ml
- The action of GT against *C. albicans* ATCC 10231 was evaluated by flow cytometry, but presumably due to the morphological characteristics of the fungus, the results suggest lower reliability compared with the microdilution method and MTT assay.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

Hemos comprobado que *C. albicans* y *S. aureus* son las cepas más sensibles al efecto antimicrobiano de GT, pero antes de proponer su aplicabilidad terapéutica se debe tener en cuenta la alta toxicidad que presenta en células de mamífero.

A este respecto, la GT podría ser útil en el tratamiento de infecciones tópicas por *S. aureus*, si se consigue hallar el método para que la GT no acceda a nivel sistémico. Con este fin, actualmente se están desarrollando en el laboratorio nanopartículas funcionalizadas con GT para utilizarlas como tratamiento local y selectivo.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Chang P-K, Bhatnagar D, Cleveland TE. ASPERGILLUS | Introduction. In: Robinson RK, editor. Encyclopedia of Food Microbiology. Oxford: Elsevier; 1999. p. 62-6.
2. Sugui JA, Pardo J, Chang YC, Mullbacher A, Zaremba KA, Galvez EM, et al. Role of laeA in the Regulation of alb1, gliP, Conidial Morphology, and Virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic cell*. 2007;6(9):1552-61.
3. Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*. 121999. p. 310-50.
4. Lewis RE, Wiederhold NP, Lionakis MS, Prince RA, Kontoyiannis DP. Frequency and Species Distribution of Gliotoxin-Producing *Aspergillus* Isolates Recovered from Patients at a Tertiary-Care Cancer Center. *J Clin Microbiol*. 432005. p. 6120-2.
5. Kupfahl C, Michalka A, Lass-Flörl C, Fischer G, Haase G, Ruppert T, et al. Gliotoxin production by clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* strains. *International Journal of Medical Microbiology*. 2008;298(3):319-27.
6. Kwon-Chung KJ, Sugui JA. What do we know about the role of gliotoxin in the pathobiology of *Aspergillus fumigatus*? *Medical mycology*. 2009;47(Suppl 1):S97-103.
7. Coleman JJ, Ghosh S, Okoli I, Mylonakis E. Antifungal Activity of Microbial Secondary Metabolites. *PloS one*. 62011.
8. Lehrnbecher T, Frank C, Engels K, Kriener S, Groll AH, Schwabe D. Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. *Journal of Infection*. 2010;61(3):259-65.
9. Reilly HC, Schatz A, Waksman SA. Antifungal Properties of Antibiotic Substances1. *J Bacteriol*. 1945;49(6):585-94.
10. Schoberle TJ, Nguyen-Coleman CK, Herold J, Yang A, Weirauch M, Hughes TR, et al. A Novel C2H2 Transcription Factor that Regulates gliA Expression Interdependently with GliZ in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Genet*. 102014.
11. Calvo AM, Wilson RA, Bok JW, Keller NP. Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. *Microbiol Mol Biol Rev*. 662002. p. 447-59.
12. Frisvad JC, Rank C, Nielsen KF, Larsen TO. Metabolomics of *Aspergillus fumigatus*. *Medical mycology*. 2009;47 Suppl 1:S53-71.
13. Gardiner DM, Waring P, Howlett BJ. The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis. *Microbiology*. 2005;151(Pt 4):1021-32.
14. White EC. Bactericidal filtrates from a mold culture. *Science (New York, NY)*. 1940;92(2380).
15. J. P. El regreso al futuro 10 años después. *Rev Esp Quimioterap*. 2007;20(2):241-4.
16. Johnson J. R. BWFaDJD. Gliotoxin, the antibiotic principle of *Gliocladium fimbriatum*. Production, physical and biological properties. *J Amer Chem Soc*. 1943;65:2005-9.
17. Beecham A. F. FJaMA. The structure and absolute configuration of gliotoxin and sporidesmin. *Tetrahedron Lett*. 1966:3131-8.
18. Waring P. BJ. Gliotoxin and Related Epipolythiodioxopiperazines. Elsevier. 1996;27(8):1311-6.

19. Bok JW, Chung D, Balajee SA, Marr KA, Andes D, Nielsen KF, et al. GliZ, a transcriptional regulator of gliotoxin biosynthesis, contributes to *Aspergillus fumigatus* virulence. *Infection and immunity*. 2006;74(12):6761-8.
20. Schrettl MC, Stephen; Kavanagh, Kevin; Haas Hubertus; Jones, Gary W.; O'Brien, Jennifer; Nolan, Aine; Stephens, John; Fenelon, Orla; Doyle, Sean. Self-Protection against Gliotoxin—A Component of the Gliotoxin Biosynthetic Cluster, GliT, Completely Protects *Aspergillus fumigatus* Against Exogenous Gliotoxin. *PLOS Biology*. 2010.
21. Davis CC, Stephen; Schrettl, Markus; Singh, Ishwar; Stephens, John C.; Barry, Sarah M.; Kavanagh, Kevin; Challis, Gregory L.; Brougham, Dermot; Doyle, Sean. The Role of Glutathione S-Transferase GliG in Gliotoxin Biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Chemimstry & Biology*. 2011;18(4):542-52.
22. Dolan SK, Owens RA, O'Keeffe G, Hammel S, Fitzpatrick DA, Jones GW, et al. Regulation of Nonribosomal Peptide Synthesis: bis-Thiomethylation Attenuates Gliotoxin Biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Chemistry & Biology*. 2014;21(8):999-1012.
23. Waring PHB, Nicola B, Christina LLC, Paul. A Novel Redox Mechanism for the Glutathione-dependent Reversible Uptake of a Fungal Toxin in Cells. 2003.
24. Mullbacher A, Moreland AF, Waring P, Sjaarda A, Eichner RD. Prevention of graft-versus-host disease by treatment of bone marrow with gliotoxin in fully allogeneic chimeras and their cytotoxic T cell repertoire. *Transplantation*. 1988;46(1):120-5.
25. Sakamoto H, Egashira S, Saito N, Kirisako T, Miller S, Sasaki Y, et al. Gliotoxin suppresses NF- κ B activation by selectively inhibiting linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC). *ACS chemical biology*. 2015;10(3):675-81.
26. Lin SJ, Schranz J, Teutsch SM. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2001;32(3):358-66.
27. Shimoyama ST, Lucia SY, Satoshi N, Toshihiro K, Takashi. Fungal Metabolite Gliotoxin Inhibits Assembly of the Human Respiratory Burst NADPH Oxidase. 2004.
28. Belambri SA, Rolas L, Raad H, Hurtado-Nedelec M, Dang PM, El-Benna J. NADPH oxidase activation in neutrophils: Role of the phosphorylation of its subunits. *European journal of clinical investigation*. 2018;e12951.
29. Pardo J, Urban C, Galvez EM, Ekert PG, Müller U, Kwon-Chung J, et al. The mitochondrial protein Bak is pivotal for gliotoxin-induced apoptosis and a critical host factor of *Aspergillus fumigatus* virulence in mice. *J Cell Biol*. 1742006. p. 509-19.
30. Nguyen VT, Lee JS, Qian ZJ, Li YX, Kim KN, Heo SJ, et al. Gliotoxin Isolated from Marine Fungus *Aspergillus* sp. Induces Apoptosis of Human Cervical Cancer and Chondrosarcoma Cells. *Mar Drugs*. 122014. p. 69-87.
31. Pahl HL, Krauss B, Schulze-Osthoff K, Decker T, Traenckner EB, Vogt M, et al. The immunosuppressive fungal metabolite gliotoxin specifically inhibits transcription factor NF- κ B. *The Journal of experimental medicine*. 1996;183(4):1829-40.
32. Hubmann R, Hilgarth M, Schnabl S, Ponath E, Reiter M, Demirtas D, et al. Gliotoxin is a potent NOTCH2 transactivation inhibitor and efficiently induces apoptosis in chronic lymphocytic leukaemia (CLL) cells. *British journal of haematology*. 2013;160(5):618-29.
33. Sun Y, Takada K, Takemoto Y, Yoshida M, Nogi Y, Okada S, et al. Gliotoxin analogues from a marine-derived fungus, *Penicillium* sp., and their cytotoxic and histone methyltransferase inhibitory activities. *Journal of natural products*. 2012;75(1):111-4.

34. Pan XQ, Harday J. Electromicroscopic observations on gliotoxin-induced apoptosis of cancer cells in culture and human cancer xenografts in transplanted SCID mice. *In vivo* (Athens, Greece). 2007;21(2):259-65.
35. Chen J, Wang C, Lan W, Huang C, Lin M, Wang Z, et al. Gliotoxin Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis in Colorectal Cancer Cells. *Mar Drugs*. 132015. p. 6259-73.
36. Goodman LSG, Alfred. General considerations. In: Gilman AG, editor. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*: Macmillan; 1985.
37. Sengupta S, No organization iHI, saswatis.biologics@gmail.com, Chattopadhyay MK, Centre for C, Molecular Biology HI, et al. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Frontiers in Microbiology*. 2013;4.
38. Fleming A. Classics in infectious diseases: on the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae* by Alexander Fleming, Reprinted from the *British Journal of Experimental Pathology* 10:226-236, 1929. *Reviews of infectious diseases*. 1980;2(1):129-39.
39. Fleming A. Nobel Lecture. *Nobel e-Museum* 1945 (Version current at September 14, 2004).
40. Moberg CL. Rene Dubos: a harbinger of microbial resistance to antibiotics. *Microbial drug resistance* (Larchmont, NY). 1996;2(3):287-97.
41. Conly JM. Antimicrobial resistance - Judicious use is the key. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2004;15(5):249-51.
42. Gold HS, Moellering RC, Jr. Antimicrobial-drug resistance. *The New England journal of medicine*. 1996;335(19):1445-53.
43. Davies J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* (New York, NY). 1994;264(5157):375-82.
44. Tenover, Rasheed. Murray L. 1999. p. 1578.
45. Laxminarayan R DA, Wattal C, Zaidi AKM, Wertheim HFL, Sumpradit N. Antibiotic resistance—the need for global solutions - *The Lancet Infectious Diseases*. *The Lancet*. 2013;13(12):1057-98.
46. The antibiotic alarm. *Nature News*. 2013;495(7440):141.
47. Antimicrobial Resistance. Global Report on Surveillance. World Health Organization; 2014.
48. Grace D, Fetsch A. Chapter 1 - *Staphylococcus aureus*—A Foodborne Pathogen: Epidemiology, Detection, Characterization, Prevention, and Control: An Overview. In: Fetsch A, editor. *Staphylococcus aureus*: Academic Press; 2018. p. 3-10.
49. Becker K. Chapter 2 - Pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. In: Fetsch A, editor. *Staphylococcus aureus*: Academic Press; 2018. p. 13-38.
50. Feßler AT, Li J, Kadlec K, Wang Y, Schwarz S. Chapter 4 - Antimicrobial Resistance Properties of *Staphylococcus aureus*. In: Fetsch A, editor. *Staphylococcus aureus*: Academic Press; 2018. p. 57-85.
51. Alonzo F, Torres VJ. A Lesson in Survival: *S. aureus* versus the Skin. *Cell Host & Microbe*. 2013;13(1):3-5.
52. Krishna S, Miller LS. Host-pathogen interactions between the skin and *Staphylococcus aureus*. *Current Opinion in Microbiology*. 2012;15(1):28-35.
53. Bierowiec K, Ploneczka-Janeczko K, Rypula K. Is the Colonisation of *Staphylococcus aureus* in Pets Associated with Their Close Contact with Owners? *PloS one*. 2016;11(5):e0156052.

54. Haenni M, Châtre P, Dupieux-Chabert C, Métayer V, Bes M, Madec JY, et al. Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Horses, Cats, and Dogs Over a 5-Year Period in France. *Front Microbiol.* 2017;8.
55. Asensio Á, Servicio de Medicina Preventiva. Hospital Universitario Puerta de Hierro. Madrid Ea. Eficacia de las medidas de control para evitar la transmisión de SARM en las instituciones sanitarias. Una visión actual. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 2018;147-8.
56. Oteo J, Baquero F, Vindel A, Campos J. Antibiotic resistance in 3113 blood isolates of *Staphylococcus aureus* in 40 Spanish hospitals participating in the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (2000–2002). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2018;53(6):1033-8.
57. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe. Anual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). European Centre for Disease Prevention and Control; 2017.
58. DeLeo FR, Otto M, Kreiswirth BN, Chambers HF. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet.* 2010;375(9725):1557-68.
59. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 622016. p. e1-e50.
60. Andes DR, Safdar N, Baddley JW, Playford G, Reboli AC, Rex JH, et al. Impact of treatment strategy on outcomes in patients with candidemia and other forms of invasive candidiasis: a patient-level quantitative review of randomized trials. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2012;54(8):1110-22.
61. Mora-Duarte J, Betts R, Rotstein C, Colombo AL, Thompson-Moya L, Smietana J, et al. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *The New England journal of medicine.* 2002;347(25):2020-9.
62. Perfect BDAR. Antifungal Resistance Trends Towards the Year 2000. *Drugs.* 1997;54(5657-678).
63. Rex JH, Division of Infectious Diseases DoIMCftSoE, Reemerging Pathogens UoT-HMS, Pfaller MA, Molecular E, Fungus Testing Laboratory DoP, et al. Has Antifungal Susceptibility Testing Come of Age? *Clinical Infectious Diseases.* 2018;35(8):982-9.
64. Pfaller MA, Messer SA, Moet GJ, Jones RN, Castanheira M. Candida bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). *International journal of antimicrobial agents.* 2011;38(1):65-9.
65. Pfaller MA, Moet GJ, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. Geographic variations in species distribution and echinocandin and azole antifungal resistance rates among Candida bloodstream infection isolates: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008 to 2009). *J Clin Microbiol.* 2011;49(1):396-9.
66. Alexander BD, Johnson MD, Pfeiffer CD, Jimenez-Ortigosa C, Catania J, Booker R, et al. Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations.

Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2013;56(12):1724-32.

67. Lewis JS, 2nd, Wiederhold NP, Wickes BL, Patterson TF, Jorgensen JH. Rapid emergence of echinocandin resistance in *Candida glabrata* resulting in clinical and microbiologic failure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(9):4559-61.
68. Castanheira M, Woosley LN, Messer SA, Diekema DJ, Jones RN, Pfaller MA. Frequency of fks mutations among *Candida glabrata* isolates from a 10-year global collection of bloodstream infection isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(1):577-80.
69. Lortholary O, Desnos-Ollivier M, Sitbon K, Fontanet A, Bretagne S, Dromer F. Recent exposure to caspofungin or fluconazole influences the epidemiology of candidemia: a prospective multicenter study involving 2,441 patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(2):532-8.
70. Zida A, Bamba S, Yacouba A, Ouedraogo-Traore R, Guiguemdé RT. Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: A review. *Journal de Mycologie Médicale*. 2017;27(1):1-19.
71. Yang X, Wang H. *ESCHERICHIA COLI* | Pathogenic *E. coli* (Introduction). In: Batt CA, Tortorello ML, editors. *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Edition). Oxford: Academic Press; 2014. p. 695-701.
72. Lautenbach E, Strom BL, Bilker WB, Patel JB, Edelstein PH, Fishman NO. Epidemiological investigation of fluoroquinolone resistance in infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2001;33(8):1288-94.
73. Waring P, KFJ, Mullbacher A. Apoptosis or programmed cell death. *Medicinal Research Reviews*. 1991;11(2):219-36.
74. Braithwaite AW, Eichner RD, Waring P, Müllbacher A. The immunomodulating agent gliotoxin causes genomic DNA fragmentation. *Molecular Immunology*. 1987;24(1):47-55.
75. Steinberg MC, Golden SJ, Hahm RE, Elessar S, Saksonov JJ. DNA damage by gliotoxin from *Aspergillus fumigatus*. An occupational and environmental propagule: adduct detection as measured by ³²P DNA radiolabelling and two dimensional thin layer chromatography - Golden - 1998 - *Mycoses* - Wiley Online Library. *Mycoses*. 2009;41(3-4).
76. Nieminan SM, Mäki-Paakkanen J, Hirvonen M-R, Roponen M, Wright Av. Genotoxicity of gliotoxin, a secondary metabolite of *Aspergillus fumigatus*, in a battery of short-term test systems. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2002;520(1-2):161-70.
77. Liang WL, Le X, Li HJ, Yang XL, Chen JX, Xu J, et al. Exploring the chemodiversity and biological activities of the secondary metabolites from the marine fungus *Neosartorya pseudofischeri*. *Mar Drugs*. 2014;12(11):5657-76.
78. Gardiner DM, Howlett BJ. Bioinformatic and expression analysis of the putative gliotoxin biosynthetic gene cluster of *Aspergillus fumigatus*. *FEMS microbiology letters*. 2005;248(2):241-8.
79. Reece E, Doyle S, Greally P, Renwick J, McClean S. *Aspergillus fumigatus* Inhibits *Pseudomonas aeruginosa* in Co-culture: Implications of a Mutually Antagonistic Relationship on Virulence and Inflammation in the CF Airway. *Front Microbiol*. 2018;9.

80. EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST 2018 [Version 8.0:[Available from: <http://www.eucast.org/>].
81. CLSI. Method for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Aprobed Standard, 7th ed., CLSI document M02-A11. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, WAyne, Pennsylvania 19087, USA, 2012.
82. CLSI. Method for Antifungal Disk Susceptibility Tests, Aprobed Guideline. CLSI document M44-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, WAyne, Pennsylvania 19087, USA, 2012.
83. Vogelman B, Craig WA. Kinetics of antimicrobial activity. *The Journal of pediatrics*. 1986;108(5 Pt 2):835-40.
84. Rodríguez JAG, Cantón R, Sánchez JEG, Gómez-Lus ML, Martínez LM, Rodríguez-Avial C, et al. Procedimientos de Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 11. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos [Picazo, Juan J.:[Available from: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>].
85. Taroco R, SV, Vignoli R. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. In: FEFMUR, editor. Temas de bacteriología y virología médica2008. p. 633-71.
86. Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2016;6:71-9.
87. Berridge MV, Tan AS. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1993;303(2):474-82.
88. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*. 11: Elsevier; 2005. p. 127-52.
89. Liu Y.B, PD, Kimura H, Schubert D. Mechanism of cellular 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem*. 1997;69:581-93.
90. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of immunological methods*. 1986;89(2):271-7.
91. Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Journal of immunological methods*. 1989;119(2):203-10.
92. Wang H, Cheng H, Wang F, Wei D, Wang X. An improved 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay for evaluating the viability of *Escherichia coli* cells. *Journal of Microbiological Methods*. 2010;82(3):330-3.
93. Seidl KZ, Annelies S. The MTT assay is a rapid and reliable quantitative method to assess *Staphylococcus aureus* induced endothelial cell damage. *Journal of Microbiological Methods*. 2013;92(3):307-9.
94. Eichner R, Waring P, Geue AM, Braithwaite AW, Mullbacher A. Gliotoxin causes oxidative damage to plasmid and cellular DNA. *J Biol Chem*. 1988;263(8):3772-7.
95. Suárez C, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2018;116-29.

96. Gómez J, García-Vázquez E, Hernández-Torres A. Los betalactámicos en la práctica clínica. *Rev Esp Quimioterap.* 2015;28(1):1-9.
97. Bidart H T, Clínica Santa María SC. Rol de voriconazol y caspofungina en terapia antifúngica. *Rev chil infectol.* 2004;21:13-9.
98. Saravolatz LD, Johnson LB, Division of Infectious Diseases SJH, Medical Center WSUD, Kauffman CA. Voriconazole: A New Triazole Antifungal Agent. *Clinical Infectious Diseases.* 2018;36(5):630-7.
99. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.1, 2018. <http://www.eucast.org>.
100. Klausmeyer P, McCloud TG, Tucker KD, Cardellina JH, 2nd, Shoemaker RH. Aspirochlorine class compounds from *Aspergillus flavus* inhibit azole-resistant *Candida albicans*. *Journal of natural products.* 2005;68(8):1300-2.
101. Speth C, Kupfahl C, Pfaller K, Hagleitner M, Deutinger M, Würzner R, et al. Gliotoxin as putative virulence factor and immunotherapeutic target in a cell culture model of cerebral aspergillosis. *Molecular Immunology.* 2011;48(15):2122-9.
102. Kreja L, Seidel H-J. On the cytotoxicity of some microbial volatile organic compounds as studied in the human lung cell line A549. *Chemosphere.* 2002;49(1):105-10.
103. Schlam D, Canton J, Carreno M, Kopinski H, Freeman SA, Grinstein S, et al. Gliotoxin Suppresses Macrophage Immune Function by Subverting Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate Homeostasis. *mBio.* 2016;7(2):e02242.
104. Kosalec I, Pepeljnjak S. Chemistry and biological effects of gliotoxin. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju.* 2004;55(4):313-20.
105. Sahoo KC, Sahoo S, Marrone G, Pathak A, Lundborg CS, Tamhankar AJ. Climatic Factors and Community — Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Skin and Soft-Tissue Infections — A Time-Series Analysis Study. *Int J Environ Res Public Health.* 112014. p. 8996-9007.