



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA

**“EFECTO ANTIBIOFILM DE LA ASPIRINA LIBERADORA DE ÓXIDO
NÍTRICO NCX-4040 EN PRESENCIA DE FLUCONAZOL, SOBRE *CANDIDA*
ALBICANS AISLADAS DE PACIENTES CON ESTOMATITIS PROTÉSICA”**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO
FRANCISCO ALEJANDRO MADARIAGA VENEGAS

DIRECTOR DE
MEMORIA

DR. ALFREDO MOLINA
BERRÍOS

CO-DIRECTOR DE
MEMORIA

DRA. BLANCA URZÚA
ORELLANA

PROFESOR
PATROCINANTE

MSc. MARÍA EUGENIA
LETELIER MUÑOZ

Santiago de Chile, Mayo de 2016.

A la memoria de mi madre, María Cristina, que se le acabó la vida antes de ver terminada esta tesis. A ella se lo debo todo. Siempre estarás en mi recuerdo

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi madre, sin cuyo apoyo fundamental y formación no sería la persona que soy hoy; a mis amigos y compañeros por su envidiable paciencia.

La realización de este trabajo fue posible gracias a la admirable dedicación del Profesor Alfredo Molina Berríos, la profesora Blanca Urzúa y la Profesora María Eugenia Letelier, quiénes han sido indudablemente fundamental en mi formación profesional y personal.

Debo agradecer también a mis compañeros y amigos de laboratorio.

ABREVIATURAS

NO-ASA	: ASPIRINA LIBERADORA DE ÓXIDO NÍTRICO
ASA	: ÁCIDO ACETIL SALICÍLICO
PGE 2	: PROSTAGLANDINA E2
AA	: ÁCIDO ARAQUIDÓNICO.
ATCC	: AMERICAN TYPE OF CULTURE COLLECTION.

INDICE.	PÁGINA
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
ABREVIATURAS.....	IV
ÍNDICE GENERAL.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
INDICE DE TABLAS.....	VIII
RESUMEN.....	IX
SUMMARY.....	XI
I. INTRODUCCIÓN.....	1
Hipótesis.....	15
Objetivos generales.....	15
Objetivos específicos.....	15
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
Reactivos.....	16
Obtención de las muestras	16
Identificación de Levaduras.....	17
Ensayos de susceptibilidad.....	19
Formación del túbulo germinal.....	21
Adhesión	21
Cuantificación del biofilm	22
Microscopia electrónica de barrido.....	24
Susceptibilidad a NO-ASA y ASA en presencia de PGE2.....	25
Isoblograma.....	25
Análisis estadístico.....	27
III. RESULTADOS.....	28
Identificación de <i>Candida</i> spp. en aislados clínicos	28
Identificación molecular por PCR de las distintas cepas de <i>Candida</i>	28
Caracterización de la susceptibilidad de los aislados clínicos de C.	

Albicans a fluconazol, NO-ASA y su combinación	30
Efecto de ASA y NO-ASA sobre la actividad antifúngica de fluconazol.....	33
Evaluación de la adhesión en aislados de C. albicans	34
Evaluación del cambio de morfología en cepas resistentes de C. albicans..	35
Evaluación de la susceptibilidad de aspirina, fluconazol y NO-ASA en cepas de C. albicans resistentes a fluconazol.....	37
Microscopia electrónica de barrido.....	39
Susceptibilidad de C. albicans a NO-ASA y ASA en presencia de PGe2.....	40
Isoblograma.....	41
DISCUSIÓN.....	43
CONCLUSIÓN.....	47
BIBLIOGRAFIA.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS		Página
1	Estructura química de NCX-4040	14
2	Procedimiento de dilución seriada	23
3	Identificación presuntiva de los aislados clínicos	27
4	Identificación molecular de aislados clínicos de levaduras del género Candida	28
5	Prevalencia de las distintas especies de levaduras del género Candida en pacientes con estomatitis protésica	29
6	Ensayos de disco de cepas de C. albicans	30
7	Actividad antifúngica de fluconazol en presencia de ASA y NO-ASA	32
8	NO-ASA inhibe la adhesión a superficies abióticas en cepas resistentes de C. Albicans	34
9	NO-ASA inhibe la conversión de levadura a hifa en cepas resistentes de C. Albicans	35
10	Porcentaje de células adheridas en presencia de NO-ASA y ASA	36
11	NO-ASA inhibe la viabilidad cepas de C. albicans resistentes a fluconazol en biofilms	37
12	Efecto de ASA y fluconazol en biofilms de cepas de C. albicans resistentes a fluconazol	38
13	NO-ASA afecta la morfología de C. albicans en biofilms	39
14	Prostaglandina E2 revierte el efecto de NO-ASA sobre la viabilidad de biofilms de C. albicans	40
15	Fluconazol no tiene efecto sinérgico antifúngico frente a NO-ASA.	41

ÍNDICE DE TABLAS		Página
1	Mecanismos de resistencia antifúngica	5
2	Especies reconocidas en CHROMagar y colores específicos	18
3	Fragmentos de DNA producidos por la técnica de PCR, usando partidores específicos de pared celular (WF y WR)	19
4	Fragmentos de DNA producidos por la técnica de PCR, usando los partidores ITS-1 e ITS-4	20
5	Puntos de corte de sensibilidad antifúngica contra <i>Candida</i> spp. para el método de difusión de disco	21
6	Método de tablero de ajedrez que muestra la sinergia de una combinación de NO-ASA con fluconazol	26
7	Susceptibilidad a fluconazol de aislados clínicos de <i>C. albicans</i>	31
8	Concentración inhibitoria 50 (IC50) de la viabilidad de aislados clínicos de <i>C. albicans</i> en presencia de NO-ASA	38
9	Valores de sinergia de las cepas testeadas	42

RESUMEN

La creciente resistencia a los fármacos antifúngicos es un problema de salud pública mundial. Según estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS), las infecciones por estos patógenos han aumentado por diversas causas entre las que se encuentran el aumento de pacientes inmunocomprometidos y el uso masivo de antibióticos de amplio espectro. Lo más alarmante es la alta tasa de morbilidad que exhibe este tipo de infecciones, las que se asocian con una alta tasa de resistencia a los fármacos actualmente ocupados. Uno de los mecanismos de resistencia más relevantes es la formación de biofilms, que se definen como comunidades microbianas rodeadas por una matriz de sustancias poliméricas extracelulares, la cual les otorgaría una protección mecánica frente a la acción de antimicrobianos. Una de las patologías donde la formación de biofilms está directamente asociada con el fracaso terapéutico es la estomatitis protésica, una inflamación crónica de la mucosa oral en contacto con una prótesis removible y que tiene una directa asociación con la presencia de biofilms de levaduras del género *Candida*. Por estas razones es de gran interés investigar novedosas estrategias farmacológicas para reducir o revertir los biofilms.

Debido al escaso desarrollo de nuevas moléculas antifúngicas, es que se ha buscado potenciar el efecto de los antifúngicos convencionales con fármacos “no antimicrobianos”. En este sentido, se ha descrito que los antiinflamatorios no esteroideos (AINES), que inhiben la formación de prostaglandinas, poseen efecto antibiofilm. Esto estaría relacionado con el rol de la Prostaglandina E2 en los procesos claves involucrados en la formación de biofilms; entre ellos, la morfogénesis de *Candida* y la adhesión a superficies abióticas. Entre los AINES destaca la aspirina que es la que ha presentado mejor efecto antibiofilm. Otra molécula de interés como agente antimicrobiano, es el óxido nítrico (NO), cuya acción se ha ensayado con compuestos dadores de NO como el nitroprusiato

de sodio o el isosorbide mononitrato. Estos han presentado efectos antibiofilm presumiblemente por los efectos antimicrobianos que presentan el NO y por su capacidad como inmunomodulador. Por estas razones en esta investigación se evaluó el efecto antibiofilm de la *aspirina liberadora de óxido nítrico*, cuya estructura aparece en la Figura 1; en este caso el efecto sobre los biofilms sería dual.

En este trabajo se determinó la susceptibilidad a fluconazol de los aislados clínicos de *C. albicans* y se cuantificó el efecto antibiofilm de la *aspirina liberadora de óxido nítrico*. Para este efecto, se evaluaron los siguientes parámetros: adhesión, morfogénesis, morfología de los biofilms y viabilidad de los biofilms en presencia de fluconazol y *aspirina liberadora de óxido nítrico*. Este último fármaco fue eficaz sobre los biofilms, pero su efecto no fue sinérgico en presencia de fluconazol, confirmando que fluconazol no presenta efecto antifúngico frente a los biofilms. Estos resultados son prometedores y nuevos estudios están en progreso para confirmar su posible uso en este tipo de patologías.

ABSTRACT

The growing resistance to antifungal drugs is a global public health problem. According to statistics from the World Health Organization (WHO), infections with these pathogens have increased for various reasons, among which are the increase of immunocompromised patients and the widespread use of broad-spectrum antibiotics. Most alarming is the high rate of morbidity exhibiting these infections, which are associated with a high rate of resistance to drugs currently occupied. One of the most important mechanisms of resistance is the formation of biofilms, which are defined as microbial communities surrounded by a matrix of extracellular polymeric substances, which would provide them with mechanical protection against the action of antimicrobials. One of the conditions where the formation of biofilms is directly associated with treatment failure is denture stomatitis, a chronic inflammation of the oral mucosa in contact with a removable prosthesis and has a direct association with the presence of biofilms of *Candida* yeasts. For these reasons it is of great interest to investigate novel pharmacological strategies to reduce or reverse the biofilms.

Due to the limited development of new antifungal molecules it is that they have sought to enhance the effect of conventional antifungals with "no antimicrobial" drugs. In this regard, it described those nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) which inhibit the formation of prostaglandins, have antibiofilm effect. This would be related to the role of Prostaglandin E2 in the key processes involved in the formation of biofilms; including *Candida* morphogenesis and adherence to abiotic surfaces.

Among the highlights NSAIDs aspirin presents the antibiofilm best effect. Another molecule of interest as an antimicrobial agent is nitric oxide (NO), whose action has been tested with NO donor compounds such as sodium nitroprusside or isosorbide mononitrate. These have presented antibiofilm

effects presumably by antimicrobial effects of NO and its ability as an immunomodulatory agent. For these reasons in this investigation antibiofilm effect of *aspirin releasing nitric oxide*, was evaluated; in this case the effect on biofilms would be dual. Therefore, we evaluated fluconazole susceptibility of *C. albicans* clinical isolates and quantified the antibiofilm effect of *aspirin releasing nitric oxide*. For this purpose, adhesion, morphogenesis, morphology and viability of biofilms in the presence of fluconazole biofilms and *aspirin releasing nitric oxide* were evaluated. The latter drug was effective against biofilms, but its effect was not synergistic with those of fluconazole. This confirmed that fluconazole have no effect against biofilms. These results are promising and further studies are in progress to confirm their possible use in this type of pathology.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas causadas por bacterias y hongos afectan a millones de personas en todo el mundo, y solamente en los Estados Unidos causan una carga de enfermedad mayor a 20 mil millones de dólares al año. Diversos programas concertados y sistemáticos para la búsqueda y desarrollo de nuevos antibióticos y antifúngicos, han sido impulsados en gran medida por el desarrollo de resistencia por parte de estos microorganismos a los fármacos comúnmente utilizados contra ellos. Según la Investigación Farmacéutica y Fabricantes de América (PhRMA), en 1998 hubo 27 antibióticos, 12 antifúngicos y 14 vacunas en desarrollo contra las infecciones bacterianas y fúngicas (esto excluye a más de 50 medicamentos antivirales) en todas las etapas de desarrollo clínico. Esto ilustra la seriedad de los esfuerzos para desarrollar nuevos y mejores medicamentos contra esta amplia gama de enfermedades¹.

Las enfermedades infecciosas son tan antiguas como la vida misma. Ellas ciertamente han jugado un papel importante en la historia de la humanidad, no tan solo por los efectos que diezmaron a la población a lo largo de varias plagas a través de los siglos, si no también debido a los enormes esfuerzos que se han realizado para encontrar cura contra éstas, generando un gran avance de la ciencia médica¹.

En la última década no ha habido estudios sobre la epidemiología de las infecciones fúngicas sistémicas, si no que la gran mayoría se han centrado en la década del 2000.

De acuerdo a datos aportados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), en los últimos años la incidencia de infecciones fúngicas invasivas ha crecido dramáticamente². Estas corresponden a la tercera de las 4 causas más comunes de infecciones intrahospitalarias, convirtiéndolos en patógenos de

importancia clínica³. De hecho, cada caso de candidemia se estima que resulta en 3 a 13 días de hospitalización y \$6.000 a \$29.000 dólares por costos de salud⁴. En Chile los principales grupos afectados son neonatos, niños menores de un año y adultos mayores, desde 50 a 79 años⁵. Las infecciones intrahospitalarias por hongos frecuentemente causan morbilidad y una alta mortalidad que excede el 50%⁶.

Las infecciones sistémicas por *Candida spp.* son un buen ejemplo; ellas son la cuarta causa más común de todas las infecciones sistémicas en los Estados Unidos⁷, y se encuentran entre la cuarta a séptima causa en Europa. En un estudio multicéntrico realizado en Brasil y en México, se reportó que el 4% de las infecciones intrahospitalarias del torrente sanguíneo son causadas por levaduras del género *Candida*⁸. Entre las especies de levaduras del género *Candida*, *C. albicans* es el microorganismo aislado más frecuente entre todas las levaduras en el mundo. En los Estados Unidos, *C. glabrata* es el segundo, mientras que en Latinoamérica, el segundo lugar lo ocupan *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*⁸. La tasa alrededor del mundo de mortalidad por micosis sistémicas es cercano al 40%; en reportes desde Brasil, México, Argentina, Chile, Colombia y Costa Rica, la mortalidad varía entre un 20% a 63%⁸.

Los factores de riesgo para infección por *Candida* pueden ser clasificados como factores relacionados con el paciente y factores asociados con los cuidados de salud. Los principales factores relacionados con el paciente son: inmunodepresión, neutropenia, edad y un deterioro de la condición clínica por enfermedad subyacente. Los factores asociados a cuidados de salud incluyen el uso de catéter, nutrición parenteral, intervenciones quirúrgicas y el uso de medicamentos antimicrobianos. El factor de riesgo más común asociado a cuidados de salud es la estancia en unidad de cuidados intensivos (UCI)⁹.

Las infecciones fúngicas presentan una alta tasa de mortalidad y morbilidad, las cuales están relacionadas con el limitado número de alternativas terapéuticas presentes en el mercado¹⁰. La ausencia de actividad estaría explicada por la falta de blancos farmacológicos específicos, modificaciones farmacocinéticas, la inaccesibilidad del antifúngico a su blanco farmacológico, la presencia de blancos poco relevantes o protegidos, la expulsión o inactivación del antifúngico, la producción o presencia de inhibidores competitivos del antifúngico, la sobre expresión de blancos farmacológicos en relación al número de moléculas de antifúngico¹¹.

Tabla I. Mecanismos de resistencia antifúngica

Mecanismo	Fármacos
Incremento de la expulsión de la droga	Azoles, amilaminas
Disminución de la unión al sitio activo	Azoles
Sobreexpresión de los blancos terapéuticos	Azoles
Acumulación de los distintos esteroides	Azoles
Alteración en la absorción	Azoles, fluorocitosina
Disminución del daño oxidativo	Polienos
Disminución de la intercalación del fármaco con la membrana	Polienos
Biofilms	Polienos, azoles, equinocandinas

La información de la Tabla fue obtenida de Kontoyiannis y cols, 2002¹²

Una de las patologías de mayor relevancia clínica en Odontología es la estomatitis protésica. Esta es una enfermedad de etiología multifactorial que se manifiesta por un eritema que dibuja los límites de la prótesis. Es una patología de tipo inflamatorio de la mucosa oral que se encuentra en contacto con una prótesis removible¹³. El paciente puede presentar sensación de ardor, prurito, sabor metálico y sensación de edema, los cuales son síntomas que nos pueden orientar hacia su diagnóstico clínico¹⁴. Este proceso patológico es difícil de controlar en los pacientes portadores de prótesis¹⁵. Por ejemplo, pacientes tratados con fluconazol en un estudio realizado en Brasil, presentaron buena eficacia a corto plazo, pero sufrieron recidiva en los siguientes 6 meses y aumentó la cantidad de levaduras aisladas resistentes a fluconazol¹⁶. La patología involucra diferentes factores predisponentes y el de mayor relevancia es la presencia de levaduras del género *Candida*¹⁵. Otros factores relacionados son edad, sexo, nivel socioeconómico, estado de salud, higiene oral, consumo de alcohol y dieta¹⁷. *C. albicans* es la levadura más frecuentemente aislada desde la cavidad oral, pero también se han aislado otras especies que se encuentran implicadas en la enfermedad¹⁸. La adhesión de microorganismos sobre la superficie de materiales de prótesis es necesaria para iniciar el proceso. Esto depende de múltiples factores tales como la estructura y la composición de la superficie de estos materiales y las propiedades químicas y físicas de la superficie de las células microbianas^{19,20}. Estudios epidemiológicos reportan que la prevalencia internacional de estomatitis protésica, entre los portadores de prótesis varía desde un 15 a 70%²¹. La estomatitis protésica es altamente relevante en Chile. Al respecto, un estudio descriptivo determinó que la prevalencia de una o más lesiones de la mucosa oral en adultos mayores en Santiago de Chile es de un 53%, siendo la más común (22,3%) la estomatitis protésica²². La cavidad oral usualmente no es colonizada por células aisladas, sino por comunidades microbianas rodeadas y protegidas por una matriz de sustancias poliméricas extracelulares denominadas biofilms. La estructura de

los biofilms confiere a los microbios alta resistencia a fármacos y se plantea como la principal causa de fracaso terapéutico en este tipo de pacientes¹⁵.

Relación entre biofilms de *Candida albicans* y estomatitis protésica.

Candida albicans es un hongo el cual es un miembro normal de la microbiota humana. En la mayoría de los individuos, *C. albicans* reside como un comensal de toda la vida e inofensivo; sin embargo, bajo ciertas circunstancias, *C. albicans* puede causar infecciones que pueden ser superficiales de la piel hasta infecciones sistémicas potencialmente mortales. Varios factores y actividades han sido identificados como contribuyentes al potencial patogénico de este hongo. Entre ellos se mencionan moléculas que median la adhesión y la invasión en las células del huésped, la secreción de hidrolasas, la transición de levadura a hifa (dimorfismo), sensores de contacto y tigmotropismo, la formación de biofilms y cambios fenotípicos, entre otros²³.

Las células plantónicas de *C. albicans* que son aquellas que viven en suspensión²⁴, estas producen biofilms altamente estructurados compuestos de múltiples tipos de células (Ej. redondo, incipiente forma de levadura, células ovoides pseudo-hifa y elongadas, células hifa- cilíndricas)²⁵. La formación de biofilms de *C. albicans* en superficies abióticas puede ser fácilmente observada en una superficie sólida, por ejemplo silicona. Los biofilms suelen desarrollarse en cinco etapas secuenciales: (1) adhesión de un microorganismo a una superficie, (2) formación de colonias discretas y organización de las células, (3) secreción de sustancias poliméricas extracelulares conformando una densa matriz extracelular, (4) maduración en una estructura tridimensional y (5) dispersión de las células con la posibilidad de colonizar otras superficies y/o tejidos. La formación del biofilm de *C. albicans* progresa en tres fases de desarrollo: La fase inicial (0-11h), la fase intermedia (12-30h) y la de maduración (31 a 72h)²⁶

Los biofilms de *C. albicans* pueden ser desarrollados en varios sustratos y en muchos medios de cultivo, indicando una inherente robustez del desarrollo del biofilm frente a cambios en las condiciones externas²⁵.

En 2012, se describió una compleja red transcripcional que regula el desarrollo de los biofilms de *C. albicans*. Esta red consiste de 6 reguladores transcripcionales maestros (Efg1, Tec1, Bcr1, Ndt80, Brg1, and Rob1); estos son requeridos para el desarrollo de los biofilms en modelos *in vivo* e *in vitro*. El trabajo llevado a cabo en células plantónicas y biofilm indica que varios genes diana juegan un papel importante en la formación de hifas, en la adhesión, en la resistencia a los medicamentos y en la producción de matriz, todas características relevantes del biofilm²⁵.

Se ha reportado que los biofilms son 1000 veces más resistentes a agentes antifúngicos que las células plantónicas²⁶. La resistencia a un antifúngico es un proceso complejo y multifactorial. Esta resistencia puede ser inducida por la exposición a un compuesto o a un cambio genético irreversible resultante de una exposición prolongada a un xenobiótico. Los mecanismos más característicos utilizados por los hongos para combatir los efectos de los antifúngicos incluyen alteraciones o sobreexpresión de moléculas blanco, expulsión activa a través de bombas de eflujo, difusión limitada, tolerancia, y densidad celular¹².

Sobreexpresión de blancos: Dado la importancia del ergosterol como un blanco de los azoles y la alta tasa de resistencia exhibida por los biofilms, se han analizado la composición de los esteroides. Los azoles inhiben la 14-alfa demetilasa dependiente del sistema citocromo P-450. Esta inhibición bloquea la síntesis del ergosterol provocando su agotamiento en la membrana y la acumulación de esteroides tóxicos. Los análisis han mostrado que los niveles de ergosterol en fases intermedias (12h) y fases maduras (48h) son relativamente

bajos comparados con las fases tempranas²⁷. Estas y otras alteraciones de los ergosteroles en las membranas de los biofilms podrían explicar su resistencia a azoles y polienos. Por otro lado, la exposición de biofilms maduros y tempranos a fluconazol induce sobreexpresión de genes que codifican para enzimas involucradas en la biosíntesis del ergosterol (CaERG1, CaERG3, CaERG11 y CaERG25), particularmente biofilms expuestos por largos periodos (22h), mientras que biofilms tempranos y maduros tratados con amfotericina B (AMB) resultaron en una sobreexpresión principalmente de CaSKN1, con una modesta sobreexpresión de CaKRE1, ambos genes involucrados en la síntesis de ergosterol. Además, en un modelo *in vivo* de catéter venoso central, la exposición a fluconazol provocó un incremento en la expresión de los genes de ergosterol, demostrando la importancia de esta molécula dentro del biofilm y su acción como mecanismo de resistencia a azoles²⁷.

Sobreexpresión de bombas de eflujo. Otro mecanismo clave en la resistencia es la sobreexpresión de bombas de eflujo; éste permite a los microorganismos regular su medio interno por remoción de sustancias tóxicas como son los agentes antimicrobianos. *C. albicans* posee dos tipos de bombas de eflujo de tipo ABC (ATP- binding cassette), codificadas por genes CDR y MFS (major facilitator superfamily) codificadas por genes MDR. Al respecto, la sobreexpresión de bombas de eflujo durante la formación y desarrollo del biofilm, se ha asociado con estas dos familias de genes²⁸. Los estudios han demostrado que le confiere resistencia en las primeras etapas del biofilm, pero son menos importantes en biofilms maduros²⁹.

Matriz extracelular. La matriz extracelular (ECM) es una característica propia de los biofilms de hongos y proveen a las células protección contra factores hostiles como agentes antifúngicos y el sistema inmune. Estudios recientes, han reportado que la composición química de la ECM y su regulación juegan un rol clave en la resistencia a antifúngicos. La composición de la ECM es compleja,

ya que comprende la presencia de proteínas, hexosamina, fósforo, ácido glicurónico, carbohidratos y DNA; estos componentes están relacionados con la alta resistencia a polienos y equinocandinas³⁰. El principal componente es el β -1,3 glucano, un carbohidrato el cual tiene un papel muy importante en la resistencia ya que se ha comprobado que une 4 a 5 veces más azoles que sus equivalentes, las células plantónicas³¹. El β -1,3 glucano actúa secuestrando azoles, equinocandinas y polienos, dificultando la difusión del fármaco a través de la matriz extracelular y su disponibilidad en su sitio de acción farmacológica³¹. Por lo tanto, la ECM desempeña claramente un papel crítico en la resistencia de los biofilms de hongos; es uno de los mecanismos de resistencia más significativos y regulados utilizados en el fenotipo biofilm³¹.

Células Persistentes. Este mecanismo es de especial relevancia en la resistencia a antifúngicos en infecciones crónicas. Las células persistentes son variantes latentes de células normales que se forman estocásticamente en poblaciones microbianas y que son altamente resistentes a los antimicrobianos. Las células mencionadas (latentes) al ser resembradas pierden su resistencia a los fármacos antifúngicos³². Se ha observado que estas levaduras son altamente resistentes a amfotericina B independiente de las bombas de eflujo y la ECM que ellas posean³³.

Tolerancia. La respuesta a estrés se ha convertido en un mecanismo de resistencia antifúngico. Los hongos patógenos encuentran una variedad de alteraciones fisiológicas provocadas por diferentes condiciones ambientales, que incluyen cambios de temperatura, estrés iónico, cambios en la osmolaridad, y estrés oxidativo. Estas tensiones son detectadas a través de diversos receptores que provocan respuestas a través de vías de señalización conservadas. Una de las más importantes es la red de transducción de señales que involucra la proteína quinasa (MAPK) activada por mitógeno Mck1p. Se demostró que esta proteína era activada por constante estrés, y que se

encuentra involucrada en el desarrollo del biofilm. Por otra parte se demostró que los biofilms mutantes *knock out* para *mck1p*, son sensibles a los azoles, a diferencia de las variantes *wild type* y las células planctónicas. Esto indica que *Mck1p* está implicado en la resistencia a través del estrés³⁴.

Densidad celular: La arquitectura de los biofilms es altamente ordenada capaz de permitir la perfusión de nutrientes y expulsión de productos de desecho. Los biofilms maduros están densamente poblados, exhibiendo heterogeneidad espacial con micro-colonias y canales de agua. La densidad celular es también un importante factor de resistencia dentro de poblaciones complejas de biofilms de levaduras y biofilms de hongos filamentosos, particularmente hacia azoles. Se ha visto que ha mayor densidad física de las células dentro del biofilm produce biofilms persistentes³⁵. Dentro de los biofilms con alta densidad, existe cooperación entre las células individuales a través de procesos de *quorum sensing*, los cuales proveen la habilidad a los microorganismos para comunicarse y coordinar el comportamiento a través de la secreción de moléculas en una población de manera dependiente³⁵.

Terapias antifúngicas. En el presente solamente dos estrategias son usualmente ocupadas en clínica, la terapia antifúngica de bloqueo y la administración de las dosis más altas de antifúngico sistémicos aconsejadas. La terapia antifúngica de bloqueo es usada exclusivamente para infecciones de catéter. Esta consiste en la liberación de antifúngicos, usualmente amfotericina B al lumen del catéter alcanzando concentraciones 100 a 1000 veces mayores que las alcanzadas normalmente vía sistémica³⁶. Actualmente existe evidencia en donde se cuestiona la verdadera utilidad de esta última. Por otra parte, la administración de fármacos antifúngicos intravenosos a dosis altas para el tratamiento de biofilms tiene una alta tasa de toxicidad y falla terapéutica⁷.

Aunque los antifúngicos tópicos son una buena alternativa para la estomatitis protésica asociada a *C. albicans*, en pacientes de bajo cumplimiento del tratamiento o inmunocomprometidos, la necesidad de antifúngicos de uso sistémico es necesaria, ya que los biofilms de *C. albicans* podrían actuar como foco o reservorio para la diseminación³⁷.

Como se mencionó anteriormente, los antifúngicos más comúnmente usados para tratar los biofilms de *C. albicans* pertenecen principalmente a tres familias: (1) los polienos (amfotericina B) que unen el ergosterol de membranas fúngicas y provocan la desestabilización de ellas, (2) azoles (fluconazol) que inhiben la biosíntesis del ergosterol a través de sus interacciones con la enzima 14-alfa demetilasa responsable de la conversión de lanosterol en ergosterol y (3) equinocandinas que bloquean la enzima β -1,3-glucanosintasa que afecta la producción de β -1,3-glucano componente fundamental de la pared del hongo. Sin embargo, a pesar de poseer actividad antibiofilm, diversos estudios han descrito que los biofilms de *C. albicans* son resistentes a estos fármacos³⁸. Los biofilms de *C. albicans* son altamente resistentes a los azoles, como fluconazol y a los nuevos triazoles de amplio espectro, tales como voriconazol, ravuconazol y posaconazol. Los mecanismos de resistencia a azoles de los biofilms son fase específicos, como por ejemplo, las bombas de eflujo que juegan un rol crítico en la fase media de formación del biofilm y en el biofilm maduro, alteraciones en la composición del esterol temprana, el cual es un mecanismo importante en la fase temprana, por lo que su utilidad es limitada³⁸.

Los polienos como la amfotericina B en su formulación lipídica han mostrado concentraciones inhibitorias mínimas para biofilms, similares a aquellas de las células plantónicas, por lo que es una buena alternativa de tratamiento. Sin embargo, su utilización está limitada debido a sus graves efectos adversos, entre los cuales se encuentra la disfunción renal manifestada por una disminución de la filtración glomerular y de la capacidad de concentración

tubular, además de acidosis tubular. Por estas razones, el tratamiento con amfotericina B sólo se reserva para candidiasis sistémicas o de alto riesgo como la candidiasis oral en pacientes VIH positivos u oncológicos³⁹. Una buena alternativa de tratamiento es la amfotericina B tópica, la cual ha sido de suma utilidad en el tratamiento de la estomatitis protésica asociada a levaduras del género *Candida*. Se ha reportado sin embargo, resistencia de *C. albicans* a amfotericina tópica, probablemente por mutaciones en la vía de síntesis del ergosterol, lo cual conlleva a la necesidad de evaluar cambios en la terapia⁴⁰.

Respecto de las equinocandinas, existen estudios que han sugerido que tienen un buen efecto antibiofilm⁴. Sin embargo, otros reportes han demostrado que algunas cepas de *C. albicans* presentan resistencia a estos antifúngicos de última generación. Esto podría deberse a que el β -1,3-glucano presente en la matriz extracelular secuestra a las equinocandinas reduciendo la cantidad de fármaco libre que ejercería la acción contra el patógeno²⁶. Más aún, se ha planteado que biofilms de algunas cepas de levaduras del género *Candida*, ven favorecido su desarrollo en presencia de equinocandinas en un cierto rango de concentraciones, fenómeno llamado “efecto paradójico de las equinocandinas”⁴¹.

Como los biofilms son pobremente controlados por los tratamientos convencionales, se hace necesaria la búsqueda de nuevos blancos farmacológicos y/o nuevas estrategias terapéuticas. Uno de las dificultades para conseguir este objetivo es que los hongos y las células mamíferas del huésped son muy similares metabólicamente, limitando los blancos farmacológicos que podrían ser atacados con cierta selectividad⁴². Como una estrategia alternativa a los tratamientos antifúngicos convencionales se puede evaluar el efecto antifúngico o antibiofilm de medicamentos no antimicrobianos con un perfil farmacológico conocido. Algunos autores sugieren el uso de analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). Estos fármacos inhiben la síntesis de prostaglandinas y han mostrado disminuir la formación de biofilms y potenciar

los efectos de los antifúngicos convencionales^{43,44}. Las prostaglandinas son autacoides lipídicos derivados del ácido araquidónico. Mantienen funciones homeostáticas y median mecanismos patológicos entre ellos fiebre, inflamación y modulación del sistema inmune⁴⁵. En células de mamíferos, la biosíntesis de eicosanoides se inicia generalmente por la activación de la fosfolipasa A2 y la liberación de ácido araquidónico (AA) de los fosfolípidos de la membrana. El AA es luego transformado por las enzimas ciclooxigenasas (COX) a prostaglandinas (PGs), que luego son transformadas por la prostaglandina sintetasa a prostaglandinas específicas como la prostaglandina E2 (PGE2). La vía de la COX es de particular importancia ya que es el blanco farmacológico de los AINEs que se utilizan comúnmente⁴⁶. Diversas investigaciones han mostrado que la PGE2 presente en los cultivos de *C. albicans* posee un rol activo en la infección por levaduras, actuando como un factor de virulencia, promoviendo la colonización y cronicidad, siendo esencial para el desarrollo y establecimiento del biofilm. No se sabe con exactitud cómo esta levadura genera la PGE2, ya que no cuenta con un homólogo de la ciclooxigenasa de células mamíferas⁴⁷. Los AINEs inhiben la síntesis de PGE2 afectando los procesos que describimos con anterioridad. Se han probado varios AINEs los que inhiben la adhesión, el desarrollo del túbulo germinal, la formación de biofilms y la viabilidad de éstos. Entre los AINES que se han ensayado, el ácido acetil-salicílico (ASA) presenta la mejor respuesta, ya que no sólo previene, sino que también revierte la formación del biofilm⁴³. Algunos autores han sugerido que una de las estrategias que podrían usarse para potenciar el efecto de los antifúngicos convencionales sobre los biofilms, es la combinación de estos con AINEs. En este sentido, un estudio realizado con células plantónicas y biofilms de *C. albicans*, evaluaron el efecto de ASA en combinación con AMB. Mientras que la combinación ASA-AMB tuvo un efecto discreto sobre células plantónicas, tuvo un evidente sinergismo sobre los biofilms⁴⁸. Otro estudio en un modelo de catéter de ratón demostró que diclofenaco potencia el efecto antibiofilm de

caspofungina sobre el biofilm de *C. albicans*, incrementando sus efectos antifúngicos⁴⁹.

Otros grupos de investigación han ensayado fármacos liberadores de óxido nítrico (NO), el cual es un radical libre producido endógenamente. El NO es conocido por su actividad antifúngica, modular las respuestas inmunes del hospedero y ser un potente vasodilatador, entre otras actividades⁴⁹. En presencia de un patógeno, el NO ejerce un papel importante en la inmunidad, ya que puede actuar como un agente tóxico para el patógeno o como un inmuno-regulador. Es por esta razón que muchas células del sistema inmune expresan la enzima sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS), como por ejemplo macrófagos, células presentadoras de antígeno, etc. Los macrófagos activados liberan una gran cantidad de NO y a través de un complejo mecanismo redox que involucra la generación de radicales libres y estrés oxidativo, ejercen un efecto estático o bactericida contra los agentes infecciosos de cualquier clase, incluyendo hongos⁴⁹. Estudios recientes han demostrado que el NO, independientemente de su forma de liberación, tiene efectos bactericidas y contra biofilms de *C. albicans* ya que afecta la viabilidad, la adhesión, la morfogénesis (hifas) y la formación de biofilms^{50,51}.

La *aspirina liberadora de óxido nítrico* (NCX-4040) es una nueva molécula en la cual el grupo NO está unido covalentemente a la aspirina (Figura 1).

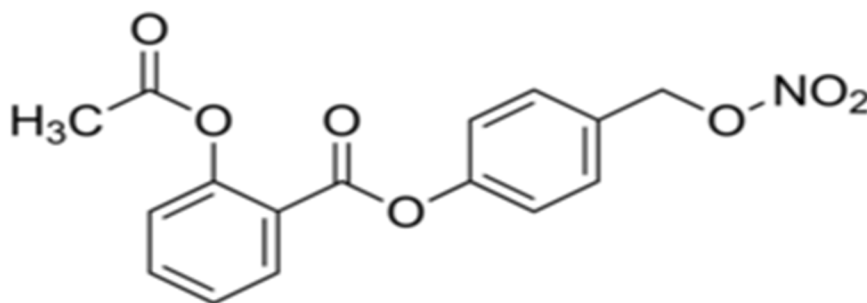


Figura 1. Estructura química de NCX-4040

Después del metabolismo enzimático (carboxil-esterasas) se liberan ambos componentes para ejercer sus efectos farmacológicos: el efecto antiinflamatorio y el antiagregante plaquetario de la aspirina y, el efecto protector de la mucosa gástrica y vasodilatadora del óxido nítrico además liberando el grupo espaciador que es una hidroxiquinona⁵². Sin embargo, a la fecha, no existen estudios que hayan evaluado el potencial efecto antifúngico de esta molécula.

De acuerdo a los antecedentes presentados, la utilización de NCX-4040, tendría como ventaja, la posibilidad de ejercer los efectos antibiofilms usando más de un mecanismo de acción.

HIPÓTESIS

La aspirina liberadora de óxido nítrico (NCX-4040) inhibe la formación de biofilms de *C. albicans* afectando la adhesión, la formación de hifas y la integridad estructural de los biofilms. Esto genera un aumento en la susceptibilidad a fármacos antifúngicos convencionales de aislados clínicos obtenidos desde pacientes con estomatitis protésica.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antifúngico y antibiofilm de la aspirina liberadora de óxido nítrico y su combinación con fluconazol en aislados clínicos de *C. albicans* obtenidos de pacientes con estomatitis protésica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Identificar y aislar las cepas de *C. albicans* obtenidas de pacientes con estomatitis protésica.
- 2) Caracterizar la susceptibilidad a fluconazol de las cepas de *C. albicans* obtenidas de pacientes con estomatitis protésica.
- 3) Estudiar el efecto antibiofilm de la *aspirina liberadora de óxido nítrico* y su combinación con fluconazol, sobre cepas clínicas seleccionadas de *C. albicans* resistentes a fluconazol y en la cepa de referencia ATCC 10231TM. Para ello se evaluarán los siguientes parámetros:
 - Viabilidad de los biofilms en presencia de los fármacos en su etapa de maduración.
 - Efecto de los fármacos sobre el proceso de adhesión y morfogénesis de *C. albicans*.

MATERIALES Y MÉTODOS

REACTIVOS. Sabouraud Dextrosa, Sabouraud Cloranfenicol Agar fueron adquiridos en biokardiognostics (Allone, France). Cristal violeta, Tetraciclina, cloruro de magnesio ($MgCl_2$), DNTP's, enzima Taq polimerasa, partidor F, partidor R, partidor ITS, agarosa, fluconazol, aspirina, *aspirina liberadora de óxido nítrico* (NO-ASA), XTT, Prostaglandina E2 (PGE2), menadiona, RPMI 1640, suero fetal bovino (FBS) fueron adquiridos en Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EEUU). Todo el resto de reactivos fueron de grado pro-análisis.

Obtención de las muestras. Los aislados de levaduras fueron obtenidos a partir de muestras guardadas a $-20^{\circ}C$, los cuales fueron donados gentilmente por la Dra. Ximena Lee (Departamento de Prótesis, Facultad de Odontología, Universidad de Chile) y la Profesora Leyla Gómez (Departamento de Patología y Medicina Oral, Facultad de Odontología, Universidad De Chile)²².

Se tomaron 100 μ L de cada muestra las que fueron crecidas en placas Agar Sabouraud Dextrosa y tetraciclina (50 mg/mL). Luego fueron sembradas en placas de CHROMagar Candida® e incubadas durante 48h a $37^{\circ}C$. La identificación por CHROMagar Candida® produce colores específicos para diferentes especies de *Candida*⁵³, debido a sustratos artificiales que son degradados por enzimas específicas y quedan colores para cada especie, como se muestra en la Tabla 1. Luego de la identificación presuntiva, se guardó cada cepa en 1,5mL de medio líquido Sabouraud-Tetraciclina, mezclados con 400 μ L de glicerol, a $-20^{\circ}C$.

**Tabla 2. Especies reconocidas en CHROMagar
y colores específicos**

ESPECIE	COLOR
<i>C. albicans</i>	Verde claro
<i>C. tropicalis</i>	Azul metálico
<i>C. krusei</i>	Rosado velloso
<i>C. dubliniensis</i>	Verde oscuro
Otrasespecies	Blanco amalva

La información de la Tabla fue obtenida de Odds y Bernaerts, 1994⁵³

Identificación de Levaduras. La identificación presuntiva a través de CHROMagar Candida®, no permite distinguir entre *C. albicans* y *C. dubliniensis*, debido a que ambas cepas crecen con un color similar (verde oscuro y verde claro, respectivamente), por lo que fue necesario además, confirmar la identificación a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con partidores específicos para detección de levaduras del género *Candida*. Para ello, se colocaron 125µL de un cultivo de levaduras sobre filtros de papel y se dejó secar a temperatura ambiente por 20min; esto, para realizar la extracción de DNA. Mediante el sistema de corte, se obtuvo un *punch* de papel filtro de cada aislado, el cual fue lavado con 200µL de NaOH 20mM por 30min y con 200µL de tampón TE por 5min, para luego secar. Para distinguir aislados de las especies *C. albicans* de *C. dubliniensis*, se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con partidores específicos de la pared celular de la hifa (HWP-1 proteína 1)⁵⁴. Esta técnica produce dos fragmentos de DNA que se diferencian en el tamaño, como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 3. Fragmentos de DNA producidos por la técnica de PCR, usando partidores específicos de pared celular (WF y WR)

ESPECIE	FRAGMENTO
<i>C. dubliniensis</i>	930 pb
<i>C. albicans</i>	1180 pb

La información de la Tabla fue obtenida de Mirhendi y cols., 2006⁵⁵

La amplificación por PCR se realizó en tubos Eppendorf con 1,5µL de tampón PCR 10X, 0,6µL de MgCl₂ 250mM, 0,3µL de dNTP's 10mM, 1,5µL de Colorante 10X, 3µL de Betaína 5µM, 0,3µL de Taq Polimerasa 5U/µL, 0,6µL de Partidor F 25µM, 0,6µL de Partidor R 25µM, 6,6µL de agua y DNAg (punch). El programa de ciclaje térmico se realizó con una desnaturalización inicial a 95°C por 3min seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1min, alineación a 50°C por 1min y extensión a 72°C por 2min, con una extensión final a 72°C por 10min. Los productos amplificados fueron separados por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,5%P/V utilizando los marcadores de tamaño molecular 50pb (Bioline®). El gel se trató con bromuro de etidio y los productos se visualizaron con transiluminador UV y se registraron fotográficamente. Las cepas *C. albicans* ATCC 90029 y *C. dubliniensis* CD36 se utilizaron como control.

Para distinguir las especies de *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. guilliermondii* se utilizó la técnica de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción acoplada a PCR (PCR-RFLP) con los partidores ITS1 e ITS4⁵⁵. Las especies se identifican porque los tamaños de los amplicones producidos por la PCR son diferentes (Ver Tabla 3).

Tabla 4. Fragmentos de DNA producidos por la técnica de PCR, usando los partidores ITS-1 e ITS-4

ESPECIE	SEGMENTO(PB)
<i>C. albicans</i>	535pb
<i>C. glabrata</i>	875pb
<i>C. parapsilosis</i>	520pb
<i>C. tropicalis</i>	524pb
<i>C. krusei</i>	510pb
<i>C. guilliermondii</i>	608pb

La información de la Tabla fue obtenida de Mirhendi y col, 2006⁵⁵

La amplificación por PCR se realizó en tubos Eppendorf con 1,5µL de Buffer PCR10X, 0,6µL de MgCl₂ 250mM, 0,3µL de dNTP's 10mM, 1,5µL de Colorante 10X, 3µL de Betaína 5M, 0,3µL de Taq Polimerasa 5U/µL, 0,6µL de Partidor ITS 125µM, 0,6µL de Partidor ITS 425µM, 6,6µL de agua y DNAg (punch).

El programa de ciclaje térmico se realizó con una desnaturalización inicial a 95°C por 5min, seguido de 34 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45seg, alineación a 50°C por 1min y extensión a 72°C por 90seg, con una extensión final a 72°C por 10min. Los productos amplificados fueron separados por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,5%P/V utilizando marcador de tamaño molecular 50 pb y 100 pb. El gel se trató con bromuro de etidio y los productos se visualizaron con transiluminador UV y se registró fotográficamente. Se utilizaron como control las cepas *C. glabrata* y *C. tropicalis* (ATCC).

Ensayos de susceptibilidad. Para realizar los ensayos de susceptibilidad, se cultivaron las cepas de *C. albicans* ya identificadas, en placas de un medio selectivo Sabouraud Cloranfenicol Agar, durante 24h a 37°C para asegurar su

viabilidad y pureza. A partir de colonias aisladas del medio se preparó una suspensión en suero fisiológico estéril con una turbidez equivalente a 0,5 de la escala de McFarland. Un hisopo de algodón estéril se sumergió en la suspensión del inóculo, se giró varias veces, y presionó firmemente contra la pared interior del tubo por encima del nivel de líquido para eliminar el exceso de éste. La superficie de agar seco se rayó uniformemente en tres direcciones diferentes, limpiando el borde de la placa como el paso final. Los discos de fluconazol de 25µg fueron depositados sobre la superficie del agar, presionando este mismo para asegurar un contacto completo con el agar. Los discos de fluconazol en combinación con NO-ASA y en combinación con aspirina fueron preparados agregando 10µL de una solución de NO-ASA (2,5µg/µL) preparada en dimetilsulfóxido (DMSO) y 10µL de aspirina (2,5µg/µL) a los discos estándar de fluconazol. Una vez adicionada la alícuota de la solución madre sobre el disco, se dejaron secar durante 30 min para luego ser depositados sobre el agar sembrado con la cepa respectiva.

Los discos se colocaron de forma equidistante en la placa y fueron incubadas dentro de los siguientes 15min. Después de 24h de incubación a 37°C, las zonas de inhibición resultantes fueron medidas con una regla de medición en mm; las micro-colonias en el borde del halo se ignoraron. Los aislados clínicos fueron categorizados como se muestra en la Tabla 5, de acuerdo a los puntos de corte estándar para fluconazol en *C. albicans*⁵⁶.

**Tabla 5. Puntos de corte de sensibilidad antifúngica
contra *Candida* spp. para el método de difusión de disco**

ANTIFÚNGICO	SUSCEPTIBLE	SUSCEPTIBLE SEGÚN DOSIS	RESISTENTE
Fluconazol	≥19	18–15	≤14

La información de la Tabla fue obtenida de NCCLS. 2004.⁵⁶

Formación del túbulo germinal. Este ensayo se realizó sólo en cepas *C. albicans* y que resultaron resistentes a fluconazol de acuerdo a los ensayos de disco. Para realizar estos ensayos se inoculó una colonia previamente crecida en un medio selectivo Sabouraud Cloranfenicol Agar de aproximadamente un mm de diámetro en 1mL de medio RPMI 1640 suplementado con 10%V/V de suero fetal bovino y se dejó crecer durante toda la noche entre 12h a 18h a una temperatura de 28°C. Luego, las células fueron centrifugadas a 6000rpm por 5min a temperatura ambiente y lavadas 3 veces con tampón fosfato salino (PBS). A continuación, las células fueron resuspendidas en el mismo medio RPMI 1640 hasta una concentración de un 1×10^6 células/mL número ajustado a través de conteo en cámara de Neubauer.

NO-ASA y Aspirina fueron ensayados a 100µM y 500µM, mientras que fluconazol se llevó a una concentración final de 256µg/mL (835µM). Los fármacos fueron agregados a los cultivos en una concentración final máxima de DMSO 1%. Las suspensiones de células fueron incubadas a 37°C durante tres h con una agitación de 100rpm. Finalmente se tomaron 10µL de cada solución y se determinó la presencia de túbulos germinales a través de microscopía óptica. Se contaron los túbulos germinales *versus* el número de células totales, medición que fue realizada tres veces, en dos muestras independientes de 10µL de cada suspensión de células⁴³.

Adhesión. Para realizar los ensayos de adhesión a una superficie abiótica se adicionaron 100µL de la suspensión de células de *C. albicans* estandarizada a 1×10^6 células/mL y se depositaron en cada pocillo de una placa de poliestireno de 96 pocillos, ajustando a concentraciones de aspirina y de NO-ASA desde 500µM hasta 125µM. El grupo control contenía solamente DMSO que fue el vehículo para disolver los fármacos. Las placas de 96 pocillos fueron incubadas sin agitación a una temperatura de 37°C por un tiempo de 4h (periodo de adhesión). Luego de este tiempo, el sobrenadante fue descartado y el

sedimento de cada pocillo se lavó 3 veces con 100µL de PBS. A continuación, se agregaron 135µL de cristal violeta 0,1%P/V preparado en agua destilada. Las placas se incubaron por 5min a temperatura ambiente. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y el sedimento se lavó nuevamente 3 veces con 100µL de PBS. Finalmente, se agregaron 200µL de ácido acético previamente diluido al 10%V/V en agua destilada. Después de adicionar el ácido acético, el volumen total de muestra en cada pocillo fue trasladado a una nueva placa de 96 pocillos, y se leyó la absorbancia a 590 nm en un lector de placas Infinite F50 (Tecan®). Los resultados fueron expresados como porcentaje del grupo control, considerando a este como 100% de adhesión.

Cuantificación del biofilm. Para realizar los ensayos de viabilidad se inoculó una colonia previamente crecida en un medio selectivo Sabouraud Cloranfenicol Agar. Luego, una colonia de aproximadamente un mm se sembró en un mL de medio RPMI 1640 suplementado con 10%V/V de suero fetal bovino y se dejó crecer durante toda la noche entre 12h a 18h a una temperatura de 28°C. Luego las células fueron centrifugadas a 6000rpm por 5min a temperatura ambiente y lavadas 3 veces con tampón fosfato salino (PBS). A continuación, fueron resuspendidas en el mismo medio RPMI 1640 hasta una concentración de un 1×10^6 células/mL ajustadas a través de conteo en una cámara de Neubauer. Luego, se tomaron 100µL de la suspensión de células de *C. albicans* y se depositaron en cada pocillo de una placa de poliestireno de 96 pocillos. Para evitar la evaporación durante el periodo de incubación, la placa fue cubierta con parafilm y se incubó durante 24h a 37°C. El proceso de adhesión provoca la separación de las células del medio de cultivo, el cual se descartó con extremo cuidado de no tocar y romper el biofilm formado en el fondo del pocillo. Se lavó tres veces con PBS estéril (100µL por pocillo) para remover las células platónicas y no adherentes.

Una vez obtenidos los biofilms se adicionaron los fármacos en las concentraciones finales siguientes: NO-ASA y Aspirina 2mM y fluconazol 512 μ g/mL. El ensayo se realizó como sigue: se añadieron 100 μ L de medio y 100 μ L de las soluciones de los fármacos a cada pocillo de la columna 1 de la placa. Luego, se diluyeron las concentraciones traspasando 100 μ L de la columna 1 a la siguiente (columna 2) y les adicionó 100 μ L de medio. Este traspaso se repitió hasta la columna 7. Las placas se cubrieron con una capa de parafilm e incubaron por 24h a 37 $^{\circ}$ C (Ver Figura 2).

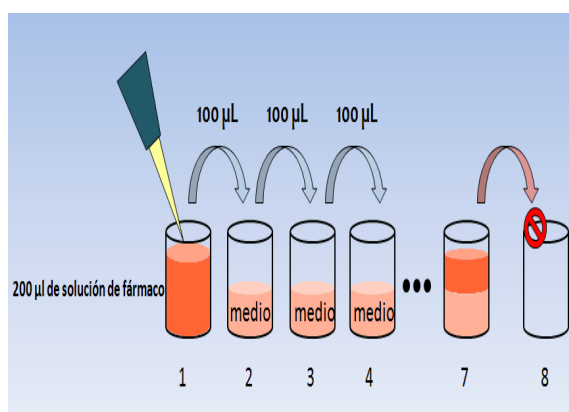


Figura 2. Procedimiento de dilución seriada. Añadir 100 μ L de medio a cada pocillo; añadir 100 μ L de fármaco a los pocillos de la columna 1; mezclar el contenido; tomar 100 μ L de la mezcla y traspasar a los pocillos de la columna 2; repetir este procedimiento hasta la columna 7.

Una vez finalizada la incubación, se descartó el sobrenadante y las células adheridas fueron lavadas tres veces con tampón fosfato salino estéril (PBS) 100 μ L por pocillo. Luego se agregaron 100 μ L de la solución XTT/menadiona a cada pocillo y las placas se cubrieron con papel aluminio e incubaron en oscuridad por 3h a 37 $^{\circ}$ C. Finalizado este periodo, se midió la absorbancia en un lector de placas a 490 nm. Los resultados fueron expresados como porcentaje del grupo control⁵⁷.

Solución XTT/menadiona. La solución de XTT fue previamente preparada en PBS estéril a una concentración de 0,5g/L y luego se agregó 1 μ L de menadiona 10mM/10mL de solución de XTT.

Microscopía electrónica de barrido. Se obtuvo un cultivo en medio RPMI 1640 estandarizado a 1×10^6 células/mL como se mencionó anteriormente. Tres mL de esta suspensión se adicionaron sobre un cubreobjetos colocado dentro de una placa de cultivo celular de 10mL. Así, la placa fue cubierta con parafilm para evitar evaporación y se incubó durante 24h a 37°C. Finalizado este tiempo se descartó el sobrenadante y se lavaron los biofilms desarrollados en el cubreobjetos, tres veces con 3mL de PBS estéril. Luego, se agregaron 3mL de NO-ASA 1mM a cada pocillo; el control contenía solo medio RPMI 1640. Ambas placas, control y tratada, fueron incubadas durante 24h a 37°C y luego se descartó el sobrenadante para el posterior procesamiento de las muestras.

Procesamiento de muestras para microscopía electrónica de barrido. El procesamiento fue realizado en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. El protocolo de fijación, deshidratación y tratamiento de la muestra fue el siguiente:

- 1) Las muestras se fijaron en glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato de sodio 0,1M por 2h. Al cabo de este periodo, las muestras se lavaron 3 veces durante 5min en tampón cacodilato de sodio 0,1M.
- 2) A continuación las muestras se post-fijaron en tetróxido de osmio durante una hora. Luego se lavaron 3 veces con tampón cacodilato de sodio 0,1M durante 5min y se deshidrataron en alcoholes ascendentes 50°, 70°, 95° y 2 veces consecutivas con alcohol 100° por 5min cada uno.
- 3) Luego, las muestras se secaron y se colocaron en el secador de punto crítico AUTOSAMDRI-815, SERIES A OVERVIEW durante 45min.
- 4) Metalizado con oro: Una vez secadas las muestras fueron montadas en el porta-muestras de aluminio y posteriormente metalizadas con oro en el METALIZADOR DENTON VACUMM DESK V.
- 5) Luego, las levaduras presentes en las muestras fueron observadas en el microscopio electrónico de barrido Jeol Modelo JSM IT 300 LVs^{58,59}.

Susceptibilidad a NO-ASA y ASA en presencia de PGE2. Se tomaron 100µL de una suspensión de células de *C. albicans* ajustada a 1×10^6 células/mL y se depositaron en cada pocillo en una placa de poliestireno de 96 pocillos. Se cubrió la placa con parafilm y se incubó durante 24h a 37°C. Luego, se descartó el sobrenadante y las células adheridas se lavaron tres veces con tampón fosfato salino (PBS) estéril (100µL por pocillo) para remover las células plantónicas y no adherentes. A continuación se adicionaron 100µL de NO-ASA y ASA en concentraciones 1mM y 250µM en presencia de 100nM o 1µM de PGE2 disuelta en DMSO o en ausencia de esta. Cada condición fue ensayada en triplicado. A continuación, la placa se incubó durante 24h a 37°C. La viabilidad de las células en las distintas condiciones fue evaluada mediante el ensayo de XTT descrito previamente.

Isoblograma. Se tomaron 100µL de una suspensión de células de *C. albicans* ajustada a 1×10^6 cel/mL y se depositaron en cada pocillo de una placa de poliestireno de 96 pocillos. La placa se cubrió con parafilm y se incubó durante 24h a 37°C. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y los biofilms formados fueron lavados tres veces con PBS estéril (100µL por pocillo) para remover las células plantónicas y no adherentes.

Se prepararon distintas diluciones de fluconazol desde 2000µg/mL hasta 31,25µg/mL y NO-ASA desde 2mM hasta 31,25 µM y se adicionaron a la placa según el esquema de tablero de ajedrez. Para ello, se adicionaron 50µL de fluconazol a lo largo de la ordenada desde la concentración más elevada hasta la más diluida, mientras que 50µL de NO-ASA fueron agregados desde la concentración más elevada hasta la más diluida en el eje de las abscisas. Todos los pocillos que no tuvieron un volumen de 100µL fueron rellenados hasta 100µL con medio RPMI 1640. En el siguiente esquema se ejemplifica el modelo que utilizamos. Se tomaron 100µL de una suspensión de células de *C. albicans* ajustada a 1×10^6 células/mL y se depositaron en cada pocillo de una

placa de poliestireno de 96 pocillos. Se cubrió la placa con una capa de parafilm y se incubó durante 24h a 37°C. Posteriormente, se descartó el sobrenadante con extremo cuidado para no tocar y romper el biofilm formado en el fondo del pocillo. Los biofilms formados fueron lavados tres veces con PBS estéril (100µL por pocillo) para remover las células platónicas y no adherentes.

Se prepararon distintas diluciones de fluconazol desde 2mg/mL hasta 31,25 µg/mL y NO-ASA desde 2mM hasta 31,25µM y se adicionaron a la placa según el esquema de tablero de ajedrez. Para ello, se adicionaron 50µL de fluconazol a lo largo de la ordenada desde la concentración más elevada hasta la más diluida, mientras que 50µL de NO-ASA fueron agregados desde la concentración más elevada hasta la más diluida en el eje de las abscisas. Todos los pocillos que no tuvieron un volumen de 100µL fueron rellenados hasta 100µL con medio RPMI 1640. En la Tabla 6 se ejemplifica el modelo utilizado. Los biofilms fueron tratados durante 24h a 37°C. La viabilidad se determinó mediante el ensayo de XTT descrito previamente^{48,60}.

Tabla 6. Método de tablero de ajedrez que muestra la sinergia de una combinación de NO-ASA con fluconazol

		NO-ASA µM							
		0	15,625	31,25	62,5	125	250	500	1000
F C O µg/ mL	15,625								
	31,25								
	62,5								
	125								
	250								
	500								
	1000								
	1000								

FCO: fluconazol. NO-ASA: aspirina liberadora de óxido nítrico

Análisis estadístico. Las curvas concentración-efecto de los diferentes tratamientos y los análisis estadísticos fueron realizados con el software Graph Pad Prism6.0 (Graph Pad Software Inc.). Todos los experimentos se realizaron al menos por triplicado. Los resultados fueron comparados mediante análisis de varianza de las diferentes muestras entre si y respecto de los controles (ANOVA). Para todos los experimentos se consideró significativo aquellos resultados con valores de $p \leq 0,05$.

III. RESULTADOS

Identificación de *Candida* spp. en aislados clínicos. En cada aislado clínico, se realizó su identificación presuntiva primero por un medio CHROMagar Candida®. La Figura 3 muestra estos resultados. En ella se observa la coloración característica que adquieren las distintas cepas al ser cultivadas en medio CHROMagar Candida®. (A) *Candida albicans* (verde); (B) *Candida tropicalis* (morado); (C) *Candida glabrata* (azul).

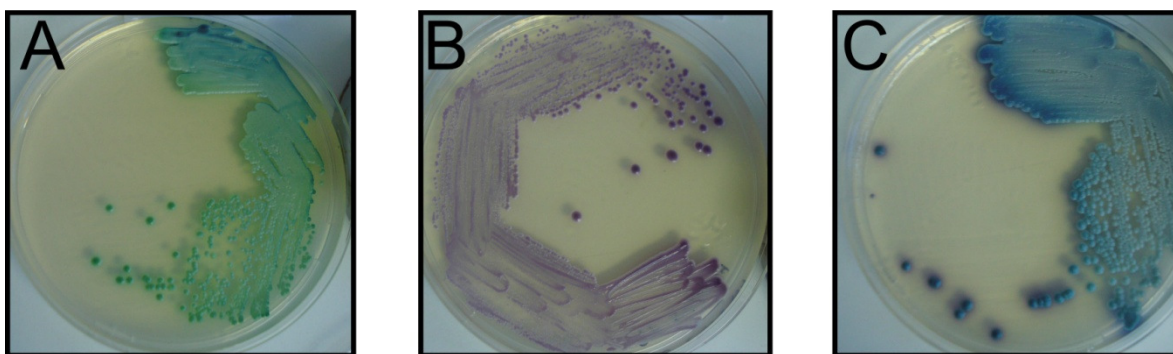


Figura 3. Identificación presuntiva de los aislados clínicos. La técnica utilizada en estos experimentos se muestra en Métodos.

Identificación molecular por PCR de las distintas cepas de *Candida*. El DNA genómico de cada cepa fue amplificado por PCR convencional y sometido a separación por electroforesis en gel de agarosa 1,5%P/V de acuerdo a lo descrito en Métodos. Estos resultados se muestran en la Figura 4 y 5; la Figura 4 muestra los cromatogramas provenientes de PCR y la Figura 5, los porcentajes de cada una de las especies de *Candida* cuantificadas en los cultivos de los aislados clínicos. De las 60 muestras analizadas por ambos métodos (PCR y chromoagar), 33 fueron identificadas como *C. albicans* lo que corresponde a un 55% de las muestras. Por otro lado, 11 fueron identificadas como *Candida glabrata* lo que corresponde al 18,33% y 16 muestras fueron

identificadas como *Candida tropicalis* lo que corresponde a un 26,67% de los aislados (Figura 5).

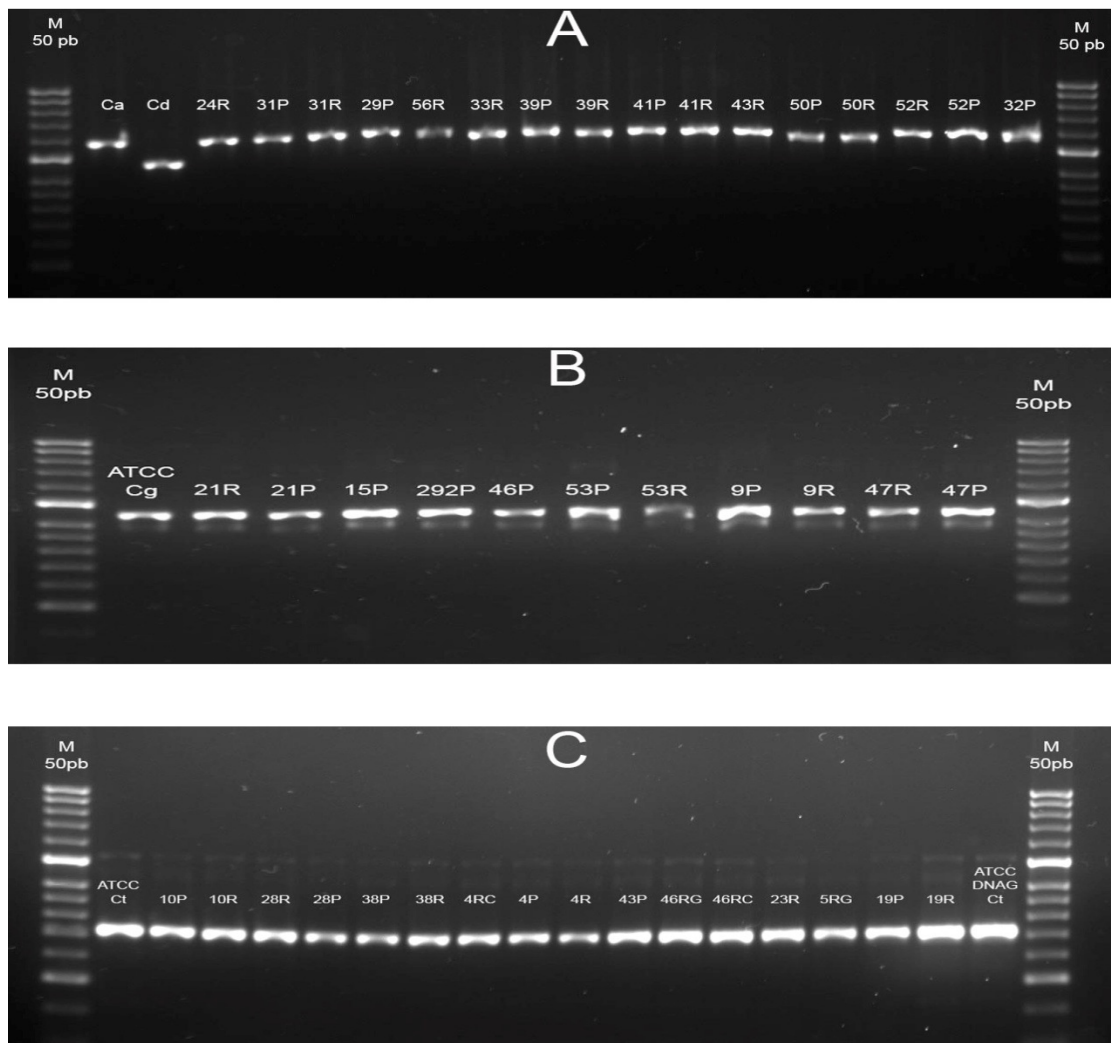


Figura 4. Identificación molecular de aislados clínicos de levaduras del género *Candida*. M corresponde al marcador de peso molecular de 50 pb. **(A):** Bandas que representan la amplificación del gen HWP-1, de acuerdo a lo descrito en Métodos; Ca: *C. Albicans* ATCC 90029 cepa control; Cd: *C. Dubliniensis* ATCC 36 cepa control. **(B):** PCR ITS de acuerdo a lo descritos en Métodos; Cg: *C. Glabrata* ATCC 2001 cepa control. **(C):** PCR ITS de acuerdo a lo descrito en Métodos; Ct: *C. Tropicalis* ATCC 750 cepa control.

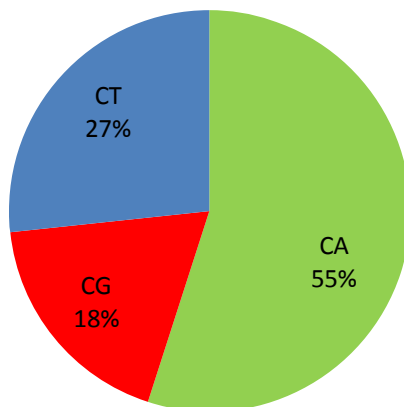


Figura 5. Prevalencia de las distintas especies de levaduras del género *Candida* en pacientes con estomatitis protésica. Los porcentajes fueron obtenidos de la identificación molecular que se realizó por PCR. CA: *Candida albicans*, CT: *Candida tropicalis* y CG: *Candida glabrata*.

Caracterización de la susceptibilidad de los aislados clínicos de *C. Albicans* a fluconazol, NO-ASA y su combinación. En cada muestra se determinó la susceptibilidad del aislado clínico a fluconazol, mediante el método de difusión de disco (25µg de fluconazol/disco), de acuerdo a lo descrito en Métodos. El efecto del antifúngico varió entre las distintas cepas aisladas (Figura 6 y Tabla 7). No existen reportes que evalúen el posible efecto antifúngico de NO-ASA. Por lo tanto se utilizaron discos conteniendo 25µg de este fármaco; esta concentración no generó halos de inhibición en ninguna de las cepas ensayadas, de manera similar a lo observado para los discos que contenían 25µg de aspirina (dato no mostrado). Para evaluar el posible efecto potenciador de NO-ASA sobre fluconazol, se combinaron en un mismo disco, 25µg de NO-ASA y 25µg de fluconazol. Pese a que NO-ASA por sí sola no generó halos de inhibición sobre las cepas ensayadas, la combinación produjo un aumento significativo de los halos de inhibición de fluconazol (Figura 6). De los 33 aislados clínicos de *C. albicans* que fueron analizados, 23 se

comportaron como susceptibles a fluconazol, ya que su diámetro de inhibición fue mayor a 19 cm; 6 fueron catalogadas como susceptibles dependiente de la dosis en que su diámetro de inhibición se encontró entre 15 y 18 cm y solamente 6 se comportaron como resistentes y la muestra ATCC 10231 también fue catalogada como resistente (Tabla 7). Cabe destacar que los valores de la Tabla 7 representan el promedio \pm DS de al menos tres experimentos independientes.

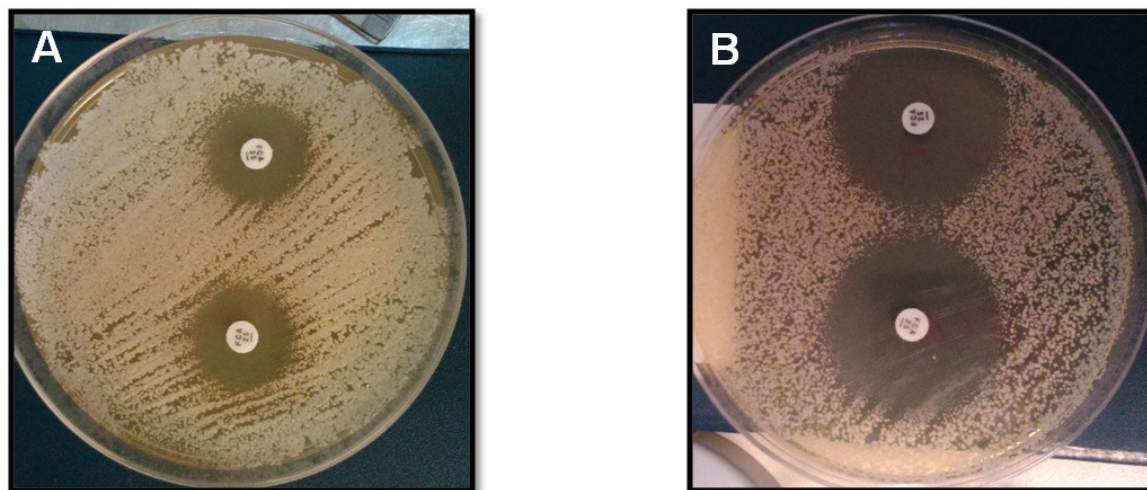


Figura 6. Ensayos de disco de cepas de *C. albicans*. (A): Ensayo de disco de una cepa resistente a fluconazol. (B): ensayo de disco de una cepa susceptible a fluconazol.

Tabla 7. Susceptibilidad a fluconazol de aislados clínicos de *C. albicans*.

Cepa	Halo de Inhibición fluconazol (mm)	Clasificación
3R	31,0±1,00	S
3P	28,7±2,31	S
7r	30,7±1,15	S
17p	13,7±3,21	R
18R	13,7±0,58	R
35R	12,3±0,58	R
36R	23,3±1,15	S
42P	13,7±3,21	R
42R	15,0±0	SDD
22P	23,3±2,89	S
22R	19,3±1,15	S
56p	27,0±1,73	S
23P	27,7±2,31	S
29R	21,5±6,5	S
29P	14±1	R
56r	22,3±3,06	S
33R	22,7±5,67	S
39P	23,3±2,08	S
39R	23,3±5,77	S
41P	19,0±1,73	S
41R	23,0±2	S
43R	27,3±0,58	S
50P	23,7±1,15	S
50R	14,0±1,73	R
52R	26,3±1,15	S
52P	33,3±1,15	S
32p	28,3±1,53	S
58R	16,3±5,51	SDD
5RCH	22,3±2,1	S
13R	18,3±2,89	SDD
24R	15,7±1,15	SDD
31P	26,0±1,73	S
31R	20,3±2,31	S
Atcc	0±0	R

Fluconazol: 25µg/disco S: susceptible; R: resistente; SDD: susceptibilidad dosis dependiente.

Efecto de ASA y NO-ASA sobre la actividad antifúngica de fluconazol.

Estos resultados se muestran en la Figura 7. En ella se observa que la inhibición del halo de crecimiento provocado por la combinación de aspirina y fluconazol fue estadísticamente significativo sólo para la cepa 35r (Figura 7). De los 7 aislados clínicos que resultaron resistentes a fluconazol por el ensayo de difusión de discos, se pudo observar que todos los halos de inhibición fueron potenciados por la combinación Fluconazol + NO-ASA. Este aumento fue estadísticamente significativo para todos los aislados a excepción de la cepa 18r ($p=0,290$). Más aún, el diámetro de los halos de inhibición en estas cepas aumentó por sobre 20mm, lo que indica que las cepas se volvieron susceptibles al antifúngico. Es importante resaltar, que a pesar de que la cepa ATCC no presentó halo de inhibición, ambas combinaciones, tanto con NO-ASA como ASA, fueron capaces de potenciar el efecto de fluconazol. Este aumento sin embargo, no fue suficiente para revertir la resistencia de la cepa.

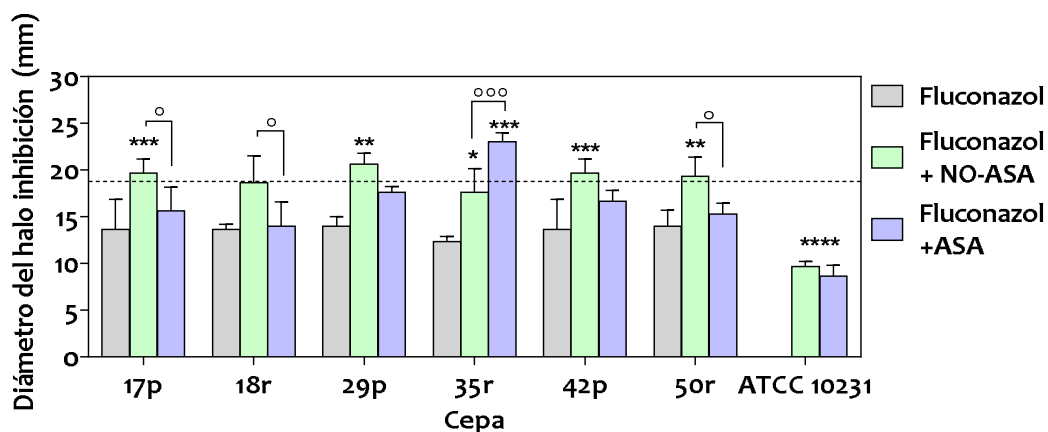


Figura 7. Actividad antifúngica de fluconazol en presencia de ASA y NO-ASA.

Fluconazol: 25 μ g; NO-ASA: 25 μ g; ASA: 25 μ g. Muestras fúngicas: aislados clínicos de *C. Albicans*. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$ respecto a fluconazol; ° $p<0,05$; °° $p<0,01$; °°° $p<0,001$ al comparar las combinaciones fluconazol-ASA y fluconazol-NO-ASA (ANOVA de dos vías). La línea punteada representa el valor a partir del cual se considera una cepa como susceptible a fluconazol. Los valores representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm DS.

Evaluación de la adhesión en aislados de *C. albicans*. El proceso de adhesión es importante tanto para la infectividad de *C. albicans* como para su habilidad de generar biofilms. Por este motivo, la búsqueda de cualquier nueva sustancia antibiofilm, es un proceso que debe estudiarse. En este caso, determinamos la capacidad de adhesión a una superficie abiótica (placas de poliestireno de 96 pocillos), como una aproximación al proceso de adhesión de *C. albicans* sobre las prótesis removibles (Figura 8). Las 7 cepas estudiadas presentaron una gran variabilidad en cuanto a su capacidad de adhesión; todas fueron sin embargo, afectadas significativamente con respecto al control sin tratamiento con NO-ASA ($p < 0,05$) de una forma dosis-dependiente. El promedio de inhibición del proceso de adhesión con NO-ASA 500 μ M fue un 60%; la cepa 17p fue la más sensible donde el efecto fue 97% de inhibición. Concordante con esto, la misma cepa presentó el mayor efecto inhibitorio (77%) con la concentración menor de NO-ASA, 125 μ M. La cepa ATCC 10231 fue resistente a la acción de NO-ASA 125 μ M y de ASA 500 μ M. Sin embargo, la exposición de estas células a la concentración mayor de NO-ASA (500 μ M), sí logró disminuir la adhesión, presentando un 87% de adhesión en relación al control sin tratamiento. Cabe resaltar que ASA 125 μ M no presentó diferencias significativas en relación al efecto de ASA 500 μ M (dato no mostrado). Fluconazol 256 μ g/mL (835 μ M) también fue ensayado, pero no se observó efecto sobre el proceso de adhesión (dato no mostrados). Por su parte, aspirina tuvo un efecto opuesto en la mayoría de las cepas ensayadas, logrando disminuir solamente la adhesividad en la cepa 17p en un 20,3% a la concentración máxima ensayada (500 μ M). En las otras cepas testeadas el porcentaje de adhesión con respecto al control sin tratamiento aumentó en forma estadísticamente significativa a excepción de la cepa 29p.

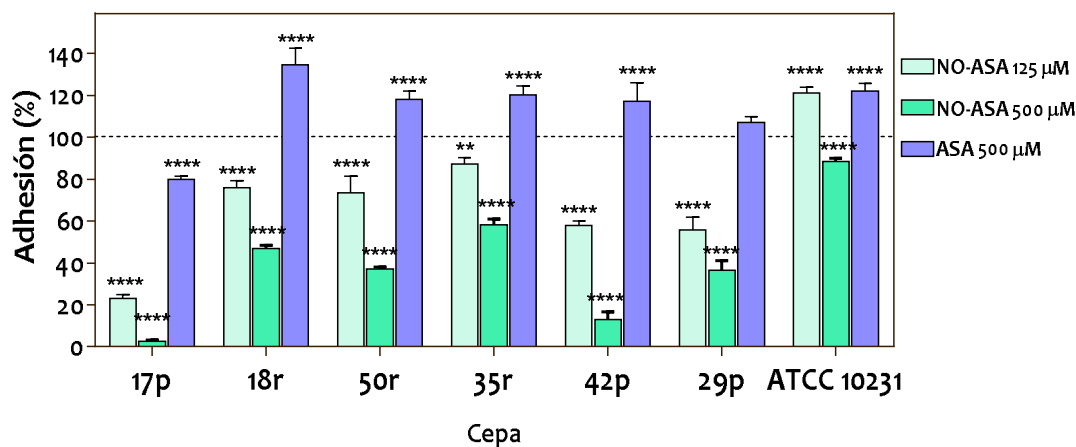


Figura 8. NO-ASA inhibe la adhesión a superficies abióticas en cepas resistentes de *C. albicans*. Las barras representan el porcentaje de células adheridas a placas de poliestireno de 96 pocillos en presencia de los fármacos, con respecto a células no tratadas ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$, respecto a células no tratadas (ANOVA de dos vías). Los valores representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm DS.

Evaluación del cambio de morfología en cepas resistentes de *C. albicans*.

El proceso de cambio de morfología de células en forma de levaduras a células filamentosas o hifas (dimorfismo) es conocido por ser un factor de virulencia del patógeno *C. albicans*. Se ha visto que mutantes incapaces de transformarse en su forma hifa son menos virulentos que los tipos normales⁶¹. Por esta razón, una vez que determinamos la capacidad de NO-ASA de disminuir el proceso de adhesión, evaluamos el efecto del fármaco sobre la morfogénesis de *C. albicans*. La Figura 9 muestra que la incubación de las muestras con NO-ASA 500 μ M es capaz de prevenir la formación de hifas (Figura 9). Al cuantificar esta respuesta, es posible observar que entre las siete cepas estudiadas, existe una variabilidad interindividual en cuanto a la respuesta a NO-ASA (Figura 10). Todos los aislados clínicos de *C. albicans* respondieron al tratamiento con NO-ASA en las distintas concentraciones probadas 500 μ M y 125 μ M de una forma estadísticamente significativa con respecto al control con una gran potencia; el

promedio de inhibición del cambio de morfología a una concentración de NO-ASA 125 μ M y 500 μ M fue de un 46% y 65%, respectivamente.

Por el contrario, fluconazol no tuvo efecto en las muestras de *C. albicans* ensayadas. De manera similar, aspirina tuvo un efecto discreto sobre el cambio de morfología en las distintas cepas testeadas. A las dos concentraciones de ASA ensayadas (500 μ M y 125 μ M) no se observaron diferencias significativas respecto a las células no tratadas. La concentración 500 μ M de ASA provocó una inhibición de un 9 %, valor no estadísticamente diferente al control.

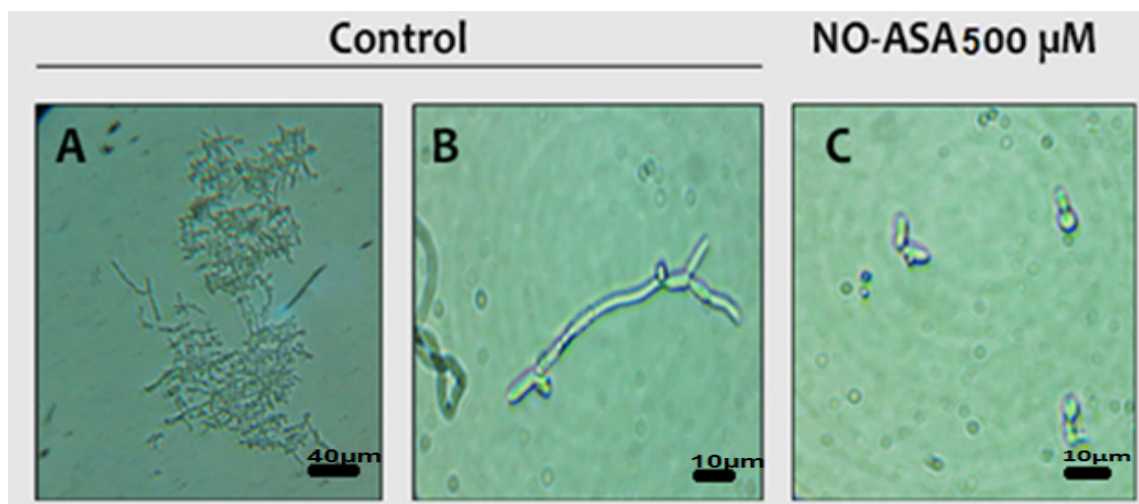


Figura 9. NO-ASA inhibe la conversión de levadura a hifa en cepas resistentes de *C. Albicans*. (A): Imagen representativa de *C. Albicans* cuando se estimula la morfogénesis en ausencia de tratamiento. (B): Imagen aumentada de una hifa presente en la muestra control. (C): Morfología de células en presencia de NO-ASA 500 μ M.

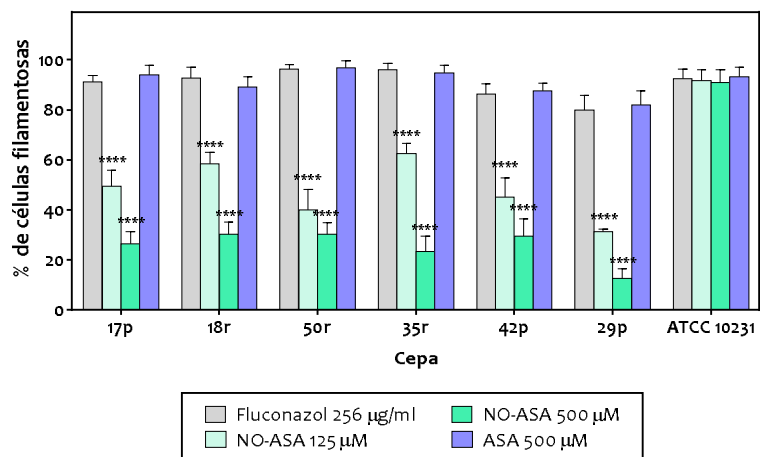


Figura 10. Porcentaje de células adheridas en presencia de NO-ASA y ASA. Las barras representan el porcentaje de células filamentosas en relación al total de células presentes de acuerdo a lo descrito en Métodos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$ respecto a células no tratadas (ANOVA de dos vías). Los valores representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm DS.

Evaluación de la susceptibilidad de aspirina, fluconazol y NO-ASA en cepas *C. albicans* resistentes a fluconazol. Una vez evaluado el efecto de NO-ASA sobre el proceso de adhesión y morfogénesis de *C. albicans*, se determinó el efecto de NO-ASA sobre su viabilidad. NO-ASA disminuyó la viabilidad de *C. albicans* en biofilm de una forma concentración-respuesta (Figura 11). Los IC_{50} obtenidos de los gráficos semilogarítmicos de las cepas estudiadas se encuentran detallados en la Tabla 8; en ella se puede observar una gran variabilidad de los valores de IC_{50} ; ellos fluctuaron $272,76 \mu M \pm 6,95$ y $758,76 \mu M \pm 5,08$.

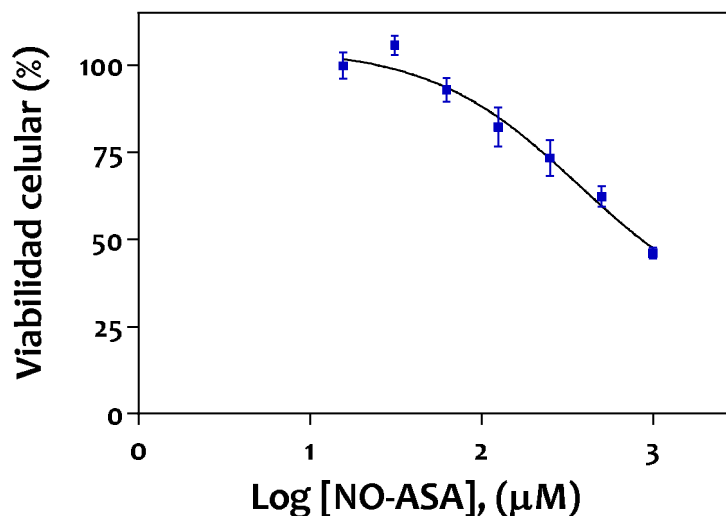


Figura 11. NO-ASA inhibe la viabilidad de cepas de *C. albicans* resistentes a fluconazol en biofilms. Los biofilms de *C. albicans* fueron desarrollados en placas de 96 pocillos de acuerdo a lo descrito en Métodos. La figura muestra los resultados obtenidos para la cepa 29p, la cual se eligió como curva representativa de todas las cepas ensayadas. Los valores en la curva corresponden al promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm DS.

Tabla 8. Concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) de la viabilidad de aislados clínicos de *C. albicans* en presencia de NO-ASA.

Cepa	IC ₅₀ (µM)
29p	300,9 \pm 2,78
17p	564,93 \pm 2,56
35r	354,83 \pm 7,58
42p	499,76 \pm 5,19
50r	758,76 \pm 5,08
ATCC 10231	272,76 \pm 6,95

Los valores corresponden el promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm DS.

La Figura 12 muestra el efecto de fluconazol y aspirina sobre la viabilidad de *C. albicans* en biofilms. A diferencia de NO-ASA y a pesar de las altas concentraciones ensayadas, ambos fármacos no inhibieron la viabilidad de las células de este hongo. Más aún, se observó un aumento estadísticamente significativo en la viabilidad celular; en la cepa 17p a concentraciones de ASA 1mM y fluconazol 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0,05$), en la cepa 35r a las concentraciones de ASA de 62,5 μM y 1mM y de fluconazol a 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0,05$) y en la cepa 42p a las concentraciones de fluconazol de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0,05$).

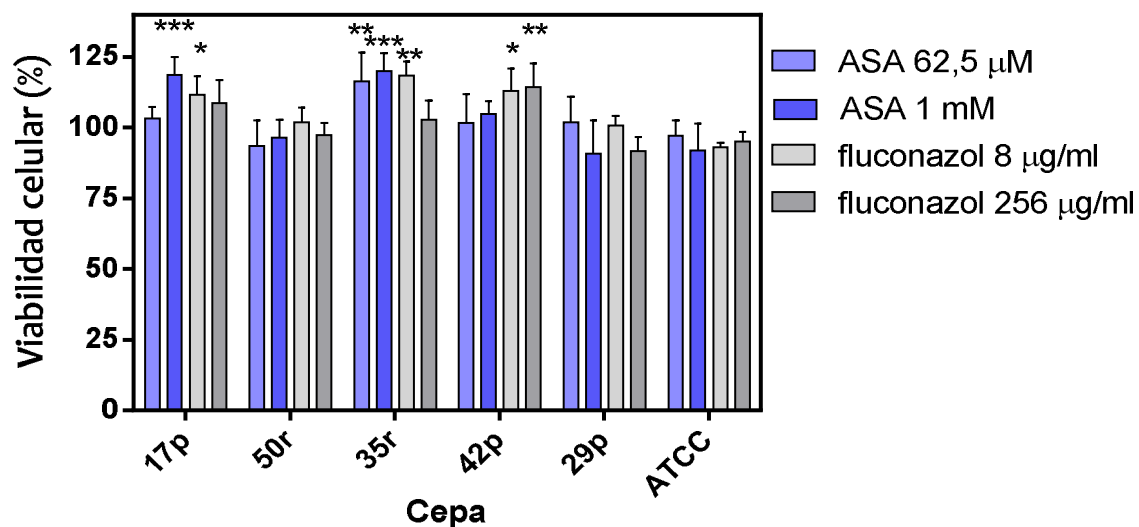


Figura 12. Efecto de ASA y fluconazol en biofilms de cepas de *C. albicans* resistentes a fluconazol: Los valores representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm DS.

Microscopía electrónica de barrido. La Figura 13 muestra el efecto del tratamiento de NO-ASA sobre la morfología celular de los biofilms, lo cual fue evaluado mediante microscopía electrónica de barrido, de acuerdo a lo descrito en Métodos. La preincubación de los biofilms con NO-ASA 1mM provocó una clara disminución en la presencia de células filamentosas y la aparición de

células muy rugosas. Estos resultados son concordantes con el efecto de NO-ASA sobre la morfología en células planctónicas (Figura 9).

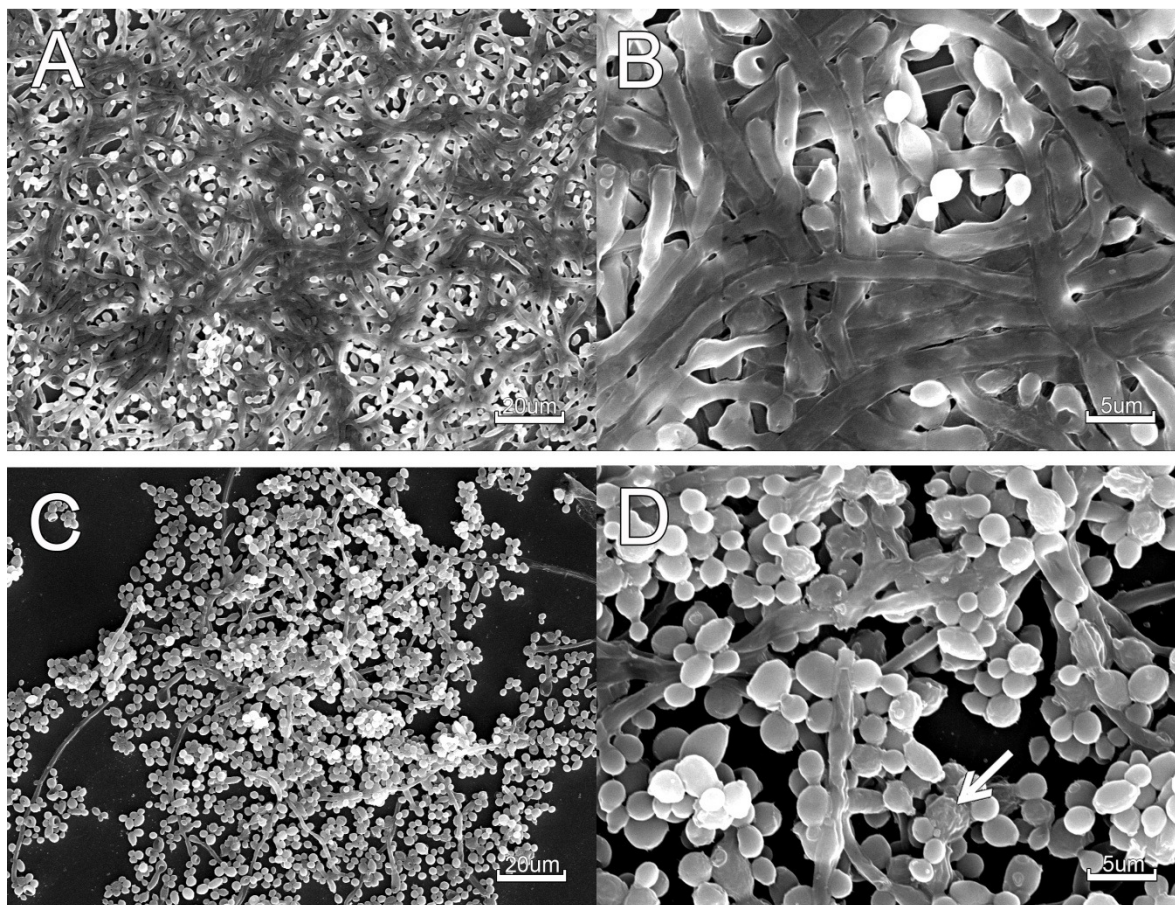


Figura 13. NO-ASA afecta la morfología de *C. albicans* en biofilms. (A): fotografía de un biofilm de *C. albicans* no tratado, (B): fotografía del mismo biofilm con un aumento mayor. (C): fotografía de un biofilm de *C. albicans* tratado con NO-ASA. (D): el mismo biofilm con un aumento mayor.

Susceptibilidad de *C. albicans* a NO-ASA y ASA en presencia de PGE₂.

Como una forma de evaluar el rol de la inhibición de la síntesis de prostaglandinas en el mecanismo antibiofilm de NO-ASA, evaluamos el efecto de PGE₂ exógena sobre la viabilidad de los biofilms tratados con NO-ASA (Figura 14). Al agregar exógenamente PGE₂ a las cepas tratadas con aspirina,

no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad celular a ninguna de las concentraciones testeadas (dato no mostrado). En el caso de las cepas tratadas con NO-ASA 1mM y 250 μ M, la presencia de PGE₂ 1 η M y 100 η M revirtió parcialmente el efecto inhibitorio de este fármaco sobre la viabilidad de *C. albicans* en biofilms ($p < 0,05$).

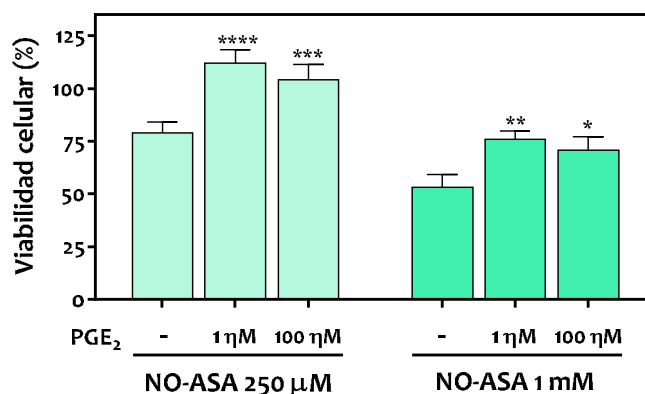


Figura 14. Prostaglandina E2 revierte el efecto de NO-ASA sobre la viabilidad de biofilms de *C. albicans*: Los biofilms fueron tratados y medida su viabilidad de acuerdo como se detalla en métodos. Los valores representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm DS. * $p < 0,05$ con respecto a biofilms no tratados con PGE₂ (ANOVA de dos vías). Los valores representan el promedio de la menos 3 experimentos independientes \pm DS.

Isobolograma. Dado que los mecanismos de acción farmacológica de NO-ASA y fluconazol sobre levaduras son diferentes, se estudió el posible sinergismo entre ellos. Para ello se midió el efecto sobre la viabilidad celular de ambos fármacos administrados en mezcla. La adición de ambos fármacos a los cultivos de las seis cepas testeadas no mostró disminución del IC₅₀ de NO-ASA, confirmando así no sólo la ausencia de sinergismo, sino además, la ausencia de acción antifúngica de fluconazol (Ver Figura 15 y Tabla 9).

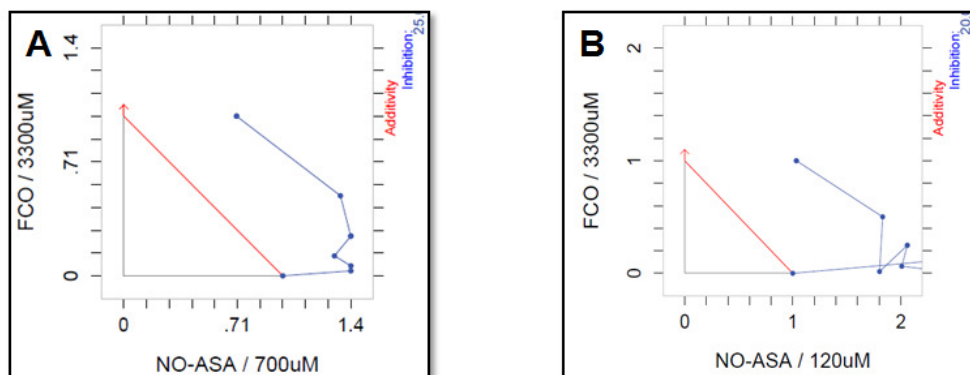


Figura 15. Fluconazol no tiene efecto sinérgico antifúngico frente a NO-ASA. (A): Isoblograma del biofilm de la cepa 35r incubada conjuntamente NO-ASA y FCO por 24h en dosis crecientes. **(B):** Isoblograma del biofilm de la cepa 42p incubada conjuntamente con NO-ASA y FCO por 24h en dosis crecientes.

Tabla 9. Valores de sinergia de las cepas testeadas.

Cepa	Valor de sinergia
17p	0,01
29p	0
35r	0,05
42p	0,02
50r	0,02
ATCC 10231	0

Los valores de sinergia fueron calculados utilizando el Software Chalice Analyzer. Valores menores que 1 indican mecanismos sinérgicos de los fármacos en estudio.

DISCUSIÓN

Diversos estudios han reportado la prevalencia de diferentes tipos de levaduras del género *Candida* spp. en pacientes con estomatitis protésica. Estos pacientes se distribuyeron de la forma siguiente: 72% eran portadores de *C. albicans*, 14% de no-*albicans* y 14% de ambos²². Estudios realizados en adultos mayores brasileños, mostraron similares hallazgos: un 49,1% de los aislados fue identificado como *C. albicans*, un 20,2% como *C. tropicalis*, un 2,9% como *C. glabrata* y un 27,8% a otras especies del género *Candida*⁶¹. Lo expuesto anteriormente se relaciona con nuestros resultados: un 55% de los aislados clínicos provenían de portadores de *C. albicans*, un 18,33% de *C. glabrata* y un 26,67% de *C. tropicalis*. Esto demuestra que solo un 45% de las especies eran no-*albicans*. Las diferencias entre nuestro estudio y los referidos de forma precedente, se deben posiblemente a la compleja identificación de especies. Los estudios precedentes al nuestro no ocuparon medios moleculares de identificación. Más aún, la alta prevalencia de las especies de *Candida* no-*albicans* en todos los estudios muestra un notable aumento de ellas en los últimos años⁶².

Algunos estudios previos han reportado el efecto de inhibidores de la COX, como ASA, en algunos modelos *in vitro* de *C. albicans*^{43-44,49}. La relevancia de este trabajo es que el representa el primer estudio sistemático con NO-ASA en el cual se evalúa su efecto sobre la viabilidad celular, la morfogénesis, la adhesión y los posibles mecanismos involucrados. NO-ASA tiene grandes efectos sobre la adhesión de las distintas cepas que fueron probadas en este estudio con un promedio de un 63%. Esto podría ser determinante y dar indicios de su utilidad terapéutica ya que se ha correlacionado la capacidad de adhesión con la habilidad de formación de biofilm en *C. albicans*⁶³, un importante mecanismo de infecciones recalcitrantes. NO-ASA también afectó el proceso de

morfogénesis en todas las cepas ensayadas con una inhibición promedio de un 65%. Esto es de importancia ya que la habilidad para cambiar de forma, de la forma de levadura a hifa, ha sido implicado en el proceso de patogénesis debido a que las mutantes que no son capaces de realizar este cambio son menos virulentas⁶⁴. El IC₅₀ de NO-ASA para biofilms de *C. albicans* varió, dependiendo del aislado clínico, desde ⁴³ 272,76 $\mu\text{M} \pm 6,95$ a 758,76 $\mu\text{M} \pm 5,08$, manteniéndose en el mismo orden de magnitud (μM). La gran variabilidad que se observa concuerda con lo descrito en la literatura en que la respuesta a distintos fármacos varía dependiendo de la cepa en estudio. Las dosis de IC₅₀ se encuentran dentro del mismo orden de magnitud que las concentraciones plasmáticas encontradas en experimentos de beneficio cardiovascular de NO-ASA en modelo murino⁶⁵. Esto es importante porque las concentraciones utilizadas indicarían un buen margen de seguridad y por tanto, la posibilidad de su aplicabilidad terapéutica.

Cabe destacar que encontramos que los biofilms de nuestros aislados clínicos no respondieron a los efectos farmacológicos esperados de fluconazol y ASA. Así, no inhibieron la viabilidad celular, los cambios morfológicos ni el proceso de adhesión. Se ha descrito que los biofilms de *C. albicans* son altamente resistentes a fluconazol y los procesos de adhesión y morfología no se ven afectados²⁶. Esto probablemente se deba a tiempos cortos de exposición a fluconazol. Respecto de los efectos de ASA, solo se encontró un estudio realizado en condiciones similares a las de este trabajo. ASA 1mM presentó una inhibición de la viabilidad celular de un 87,9% \pm 1,5, mientras que nuestros hallazgos en todas las cepas de *Candida* spp. testeadas resultaron estadísticamente no distintas al control ($p > 0,05$). Este marcado contraste se puede deber a la gran variabilidad que poseen los distintos aislados de *C. Albicans* y en parte, a que el medio que se ocupó fue a base de nitrógeno para levadura no-RPMI 1640. Este medio, según reportes anteriores parece tener influencia en el desarrollo de los biofilm⁴⁷.

Como mencionamos anteriormente, la morfogénesis es una característica importante en el desarrollo de biofilms de *C. albicans*⁶⁴. Los biofilms usualmente consisten en dos capas distintas, una capa delgada de células en forma de levadura y una capa suprayacente que está compuesta principalmente por células en forma de hifa⁶⁵. En las imágenes analizadas (Figura 13) se ve, aparte de una reducción sustancial en el tamaño de los biofilms, un número muy reducido de hifas en contraste al control no tratado. A un mayor aumento, las células de levadura que fueron expuestas al tratamiento se observan como células rugosas lo que hace pensar que NO-ASA afecta la integridad de la membrana celular. Esto nos hace suponer que el biofilm al tener una estructura tridimensional más delgada y menos densamente poblada, posiblemente tiene una menor resistencia a los fármacos antifúngicos convencionales³⁵.

La secreción de prostaglandinas por *C. albicans* es probable que represente un factor importante en la patogénesis de muchas infecciones en humanos. Estudios realizados en células de mamíferos, prostaglandina fúngica purificada, logró disminuir la producción de quimioquinas, la producción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y la producción de esplenocitos, mientras que sobrerregula la producción de interleucina10. Todas estas actividades también están descritas para prostaglandina mamífera⁶⁶. Además, se ha demostrado que las prostaglandinas aumentan la conversión de la forma de levadura de estas células a hifa y que inhibidores de la COX evitan este proceso⁴⁴. En nuestro caso, al agregar PGE2 de forma exógena en una dosis de 1 η M y 100 η M a los cultivos tratados con NO-ASA 1mM se produjo una reversión parcial de la inhibición de la viabilidad celular provocada por dicho fármaco en ausencia de PGE2. Este efecto fue mayor a la concentración de NO-ASA 250 μ M. NO-ASA a la concentración 1mM debería liberar mayor cantidad de NO que la concentración 250 μ M. Esto puede conducir a un estado de estrés oxidativo que provoca alteraciones celulares conducente a la muerte celular; este fenómeno podría explicar la menor reversión de la inhibición de la

viabilidad celular provocada a la concentración mayor de NO-ASA testeada. Esto podría explicar también la mayor concentración de células en el control tratado con NO-ASA 250 μ M en comparación con aquel tratado con NO-ASA 1mM (Figura14)

Cabe destacar que los isobogramas realizados con NO-ASA y fluconazol confirmaron el nulo efecto antifúngico de este último sobre *C. albicans* spp.; todos los valores de sinergia se encontraron cercanos a cero. Fluconazol mostró, sin embargo, una tendencia en todas las cepas a aumentar la viabilidad de los biofilms y a revertir el efecto inhibitorio de la viabilidad celular de NO-ASA. Un efecto semejante se ha descrito en estudios anteriores; ellos han mostrado el llamado efecto paradójico de las equinocandinas en el que cepas resistentes a fluconazol tratadas con distintas concentraciones de equinocandinas aumentan la viabilidad de *Candida albicans* con respecto al control no tratado⁴¹.

Nuestros resultados muestran que la *aspirina liberadora de óxido nítrico*, debido a su buen perfil de seguridad establecidos en ensayos clínicos fase I y fase II y a su buen desempeño como fármaco antibiofilm, podría ser útil en el tratamiento y/o en la prevención de enfermedades asociadas a biofilm de *C. albicans*. Nuevos experimentos están en desarrollo que permitan dilucidar su mecanismo de acción como también su comportamiento *in vivo*.

CONCLUSIONES

- 1) La aspirina liberadora de óxido nítrico:
 - Aumentó la susceptibilidad de aislados clínicos de *C. albicans* a fluconazol en ensayos de difusión de disco.
 - Inhibió los procesos de adhesión y morfogénesis en los aislados clínicos de *C. albicans* resistentes a fluconazol.
 - Inhibió la viabilidad celular de cepas de *C. albicans* resistentes a fluconazol en biofilms maduros, efecto en parte mediado por PGE2.
 - Afectó la morfología de cepas de *C. albicans* resistentes a fluconazol en biofilms maduros.
- 2) Aspirina y fluconazol no tuvieron efectos antifúngicos a las concentraciones testeadas.
- 3) Fluconazol no aumentó el efecto de la aspirina liberadora de óxido nítrico sobre la viabilidad celular de cepas de *C. albicans* resistentes a fluconazol en biofilms maduros

BIBLIOGRAFIA

1. Editorial. Antibacterial and antifungal drug discovery. *Nat. Biotechnol.* **18**, IT24–IT26 (2000).
2. Pfaller, M. a & Diekema, D. J. *Epidemiology of invasive mycoses in North America. Critical reviews in microbiology* **36**, (2010).
3. Ducel, G. Fabry, J. Nicolle, L. Girard, R. Perraud, M. Prüss, A. Savey, A. Prevención de las infecciones nosocomiales: Guía práctica. *Organ. Mund. la Salud* **2**, 70 (2002).
4. Morgan, J. *et al.* Excess mortality, hospital stay, and cost due to candidemia: a case-control study using data from population-based candidemia surveillance. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **26**, 540–7 (2005).
5. Silva, V., Díaz, M. C. & Febré, N. Invasive fungal infections in Chile: a multicenter study of fungal prevalence and susceptibility during a 1-year period. *Med. Mycol.* **42**, 333–9 (2004).
6. Brown, G. D. *et al.* Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Sci. Transl. Med.* **4**, 165rv13 (2012).
7. Martin, G. S., Mannino, D. M., Eaton, S. & Moss, M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1546–1554 (2003).
8. Sifuentes-Osornio, J., Corzo-Len, D. E. & Ponce-De-Len, L. A. Epidemiology of invasive fungal infections in Latin America. *Curr. Fungal Infect. Rep.* **6**, 23–34 (2012).
9. Yapar, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Therapeutics and Clinical Risk Management* **10**, 95–105 (2014).
10. Ostrosky-Zeichner, L., Casadevall, A., Galgiani, J. N., Odds, F. C. & Rex, J. H. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 719–727 (2010).
11. Ryley, J. f. *Chemotherapy of Fungus Diseases*. (2012). doi:10.1007/978-3-642-75458-6

12. Kontoyiannis, D. P. & Lewis, R. E. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet (London, England)* **359**, 1135–44 (2002).
13. Durán Porto A., B. C. D. y C. B. S. Estomatitis Protésica. Aspectos clínicos y tratamiento. *Form. Contin.* **5**, 622–627 (2002).
14. Dra. Eneida García López, Dra. Alina Roche Martínez, D. A. O. B. R. y D. L. O. R. G. La ozonoterapia en el tratamiento de la estomatitis subprótesis. *Rev. Cuba. Estomatol.* **40**, (2003).
15. Ayuso, R., Torrent, J. & López, J. Estomatitis protésica: puesta al día. *Rcoe.* **9**, 657–662 (2004).
16. Figueiral, M. H. *et al.* Effect of Denture-Related Stomatitis Fluconazole Treatment on Oral *Candida albicans* Susceptibility Profile and Genotypic Variability. 46–51 (2015).
17. Skupien, J. A., Valentini, F., Boscato, N. & Pereira-Cenci, T. Prevention and treatment of *Candida* colonization on denture liners: A systematic review. *Journal of Prosthetic Dentistry* **110**, 356–362 (2013).
18. Ramage, G., Tomsett, K., Wickes, B. L., López-Ribot, J. L. & Redding, S. W. Denture stomatitis: A role for *Candida* biofilms. *Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontology* **98**, 53–59 (2004).
19. Busscher, H. J., Cowan, M. M. & van der Mei, H. C. On the relative importance of specific and non-specific approaches to oral microbial adhesion. *FEMS Microbiol. Lett.* **88**, 199–209 (1992).
20. Bellon-Fontaine, M. N. *et al.* A comparison of thermodynamic approaches to predict the adhesion of dairy microorganisms to solid substrata. *Cell Biophys.* **17**, 93–106 (1990).
21. Gendreau, L. & Loewy, Z. G. Epidemiology and Etiology of Denture Stomatitis. *J. Prosthodont.* **20**, 251–260 (2011).
22. Lee, X. *et al.* Asociación entre Presencia de Levaduras del Género *Candida* y Factores del Paciente Adulto Mayor con y sin Estomatitis Protésica. *Int. J. Odontostomatol.* **7**, 279–285 (2013).
23. Mayer, F. L., Wilson, D. & Hube, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* **4**, 119–128 (2013).

24. Ramade, F. *Dictionnaire encyclopédique des sciences de la nature et de la biodiversité. Nature* (2008). at <<http://books.google.com/books?id=oMqwOgAACAAJ&pgis=1>>(15-05-2016)
25. Nobile, C. J. & Johnson, A. D. Candida albicans Biofilms and Human Disease. *Annu. Rev. Microbiol.* **69**, 71–92 (2015).
26. Shapiro, R. S., Robbins, N. & Cowen, L. E. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **75**, 213–267 (2011).
27. Ramage, G., Rajendran, R., Sherry, L. & Williams, C. Fungal biofilm resistance. *International Journal of Microbiology* (2012). doi:10.1155/2012/528521
28. Ramage, G., Bachmann, S., Patterson, T. F., Wickes, B. L. & López-Ribot, J. L. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in Candida albicans biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**, 973–980 (2002).
29. Mukherjee, P. K., Chandra, J., Kuhn, D. M. & Ghannoum, M. A. Mechanism of fluconazole resistance in Candida albicans biofilms: Phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infect. Immun.* **71**, 4333–4340 (2003).
30. Martins, M., Henriques, M., Lopez-Ribot, J. L. & Oliveira, R. Addition of DNase improves the in vitro activity of antifungal drugs against Candida albicans biofilms. *Mycoses* **55**, 80–85 (2012).
31. Nett, J. E., Crawford, K., Marchillo, K. & Andes, D. R. Role of Fks1p and matrix glucan in Candida albicans biofilm resistance to an echinocandin, pyrimidine, and polyene. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 3505–3508 (2010).
32. Lewis, K. Persister cells. *Annu. Rev. Microbiol.* **64**, 357–372 (2010).
33. LaFleur, M. D., Kumamoto, C. A. & Lewis, K. Candida albicans biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 3839–3846 (2006).
34. Kumamoto, C. a. A contact-activated kinase signals Candida albicans invasive growth and biofilm development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 5576–5581 (2005).

35. Perumal, P., Mekala, S. & Chaffin, W. L. Role for cell density in antifungal drug resistance in *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 2454–2463 (2007).
36. Walraven, C. J. & Lee, S. A. Antifungal lock therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **57**, 1–8 (2013).
37. Dar-Odeh, N. S., Al-Beyari, M. & Abu-Hammad, O. a. The role of antifungal drugs in the management of stomatitis. *Int. Arab. J. Antimicrob. Agents* **2**, 1–5 (2012).
38. Tobudic, S., Kratzer, C., Lassnigg, A. & Presterl, E. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. *Mycoses* **55**, 199–204 (2012).
39. Hernández P, G. *et al.* Uso de anfotericina B en mezcla lipídica: ¿previene la toxicidad de la droga en pacientes críticos? *Rev. Med. Chil.* **128**, 1101–1107 (2000).
40. Cardozo, E. I., Pardi, G., Perrone, M. & Salazar, E. 'Detección De *Candida Albicans* en pacientes con Estomatitis Sub-Protésica, medicados con Anfotericina Tópica'. *Acta Odontológica Venez.* **41**, 188–194
41. Walraven, C. J., Bernardo, S. M., Wiederhold, N. P. & Lee, S. A. Paradoxical antifungal activity and structural observations in biofilms formed by echinocandin-resistant *Candida albicans* clinical isolates. *J. Music Ther.* **52**, 131–139 (2015).
42. Butts, A. & Krysan, D. J. Antifungal Drug Discovery: Something Old and Something New. *PLoS Pathog.* **8**, 9–11 (2012).
43. Alem, M. A. S. & Douglas, L. J. Effects of Aspirin and Other Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs on Biofilms and Planktonic Cells of *Candida albicans* Effects of Aspirin and Other Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs on Biofilms and Planktonic Cells of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 41–47 (2004).
44. Al-Bakri, A. G., Othman, G. & Bustanji, Y. The assessment of the antibacterial and antifungal activities of aspirin, EDTA and aspirin-EDTA combination and their effectiveness as antibiofilm agents. *J. Appl. Microbiol.* **107**, 280–6 (2009).

45. Ricciotti, E. & Fitzgerald, G. A. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 986–1000 (2011).
46. Clària, J. Cyclooxygenase-2 biology. *Curr. Pharm. Des.* **9**, 2177–2190 (2003).
47. Alem, M. a S. & Douglas, L. J. Prostaglandin production during growth of *Candida albicans* biofilms. *J. Med. Microbiol.* **54**, 1001–1005 (2005).
48. Zhou, Y. *et al.* In vitro interactions between aspirin and amphotericin B against planktonic cells and biofilm cells of *Candida albicans* and *C. parapsilosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 3250–3260 (2012).
49. Bink, A. *et al.* The nonsteroidal antiinflammatory drug diclofenac potentiates the in vivo activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *J. Infect. Dis.* **206**, 1790–7 (2012).
50. Macherla, C. *et al.* Nitric oxide releasing nanoparticles for treatment of *Candida albicans* burn infections. *Front. Microbiol.* **3**, (2012).
51. Privett, B. J., Nutz, S. T. & Schoenfisch, M. H. Efficacy of surface-generated nitric oxide against *Candida albicans* adhesion and biofilm formation. *Biofouling* **26**, 973–83 (2010).
52. Gresele, P. & Momi, S. Pharmacologic profile and therapeutic potential of NCX 4016, a nitric oxide-releasing aspirin, for cardiovascular disorders. *Cardiovascular Drug Reviews* **24**, 148–168 (2006).
53. Odds, F. C. & Bernaerts, R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 1923–1929 (1994).
54. Romeo, O., Racco, C. Criseo, G. Amplification of the hyphal wall protein 1 gene to distinguish *Candida albicans* from *Candida dubliniensis*. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 2590–2592 (2006).
55. Deluca, M. A., Giusiano, G. & Mangiaterra, G. Modificación de la técnica de PCR – RFLP de Mirhendi y col . para diferenciación y tipificación de 11 especies de *Malassezia* . *Unne* **24–27** (2006).
56. Nccls. *Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved guideline. NCCLS Document M44-A* **24**, (2004).

57. Pierce, C. G. *et al.* A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat. Protoc.* **3**, 1494–1500 (2008).
58. Oliveira, M. T. *et al.* Interaction of *Candida parapsilosis* isolates with human hair and nail surfaces revealed by scanning electron microscopy analysis. *Micron* **41**, 604–8 (2010).
59. Staniszewska, M. *et al.* *Candida albicans* morphologies revealed by scanning electron microscopy analysis. *Braz. J. Microbiol.* **44**, 813–21 (2013).
60. Orhan, G., Bayram, A., Zer, Y. & Balci, I. Synergy tests by E test and checkerboard methods of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis*. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 140–143 (2005).
61. Pires, F. R., Santos, E. B. D., Bonan, P. R. F., De Almeida, O. P. & Lopes, M. A. Denture stomatitis and salivary *Candida* in Brazilian edentulous patients. *J. Oral Rehabil.* **29**, 1115–1119 (2002).
62. Papon, N., Courdavault, V., Clastre, M. & Bennett, R. J. Emerging and Emerged Pathogenic *Candida* Species: Beyond the *Candida albicans* Paradigm. *PLoS Pathog.* **9**, (2013).
63. Li, X., Yan, Z. & Xu, J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology* **149**, 353–362 (2003).
64. Whiteway, M. & Oberholzer, U. *Candida* morphogenesis and host-pathogen interactions. *Current Opinion in Microbiology* **7**, 350–357 (2004).
65. Wallace, J. L., Ignarro, L. J. & Fiorucci, S. Potential cardioprotective actions of no-releasing aspirin. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 375–382 (2002).
66. Noverr, M. C., Phare, S. M., Toews, G. B., Coffey, M. J. & Huffnagle, G. B. Pathogenic yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* produce immunomodulatory prostaglandins. *Infect. Immun.* **69**, 2957–2963 (2001).