



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS
ÁREA DE FARMACOLOGÍA

**EFFECTO ANTIFÚNGICO Y *ANTIBIOFILM* DEL ACEITE ESENCIAL DE
ORIGANUM VULGARE SOBRE ESPECIES DEL GÉNERO *CANDIDA***

Camila Nicole Cid Chevecich

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Alfredo Molina Berríos

TUTORES ASOCIADOS

Dra. Andrea Müller Sepúlveda

Adscrito a Proyecto PRI-ODO 2020/001
Santiago - Chile
2020



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS
ÁREA DE FARMACOLOGÍA

**EFFECTO ANTIFÚNGICO Y *ANTIBIOFILM* DEL ACEITE ESENCIAL DE
ORIGANUM VULGARE SOBRE ESPECIES DEL GÉNERO CANDIDA**

Camila Nicole Cid Chevecich

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Alfredo Molina Berríos

TUTORES ASOCIADOS

Dra. Andrea Müller Sepúlveda

Adscrito a Proyecto PRI-ODO 2020/001
Santiago - Chile
2020

ÍNDICE

1.	RESUMEN.....	1
2.	MARCO TEÓRICO.....	3
3.	HIPÓTESIS	21
4.	OBJETIVOS.....	21
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
6.	RESULTADOS.....	31
7.	DISCUSIÓN.....	49
8.	CONCLUSIONES.....	55
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
10.	ANEXOS.....	71

1. RESUMEN:

Introducción

La candidiasis oral es la patología fúngica oral más frecuente en el ser humano. *Candida albicans* es el agente causal más comúnmente aislado, y menos prevalente se encuentran *Candida tropicalis*, *Candida krusei* y *Candida glabrata*. El tratamiento de la candidiasis oral es una combinación entre el manejo de los factores de riesgo del paciente y la terapia antifúngica. Este tratamiento presenta altas tasas de resistencia y recidiva debido a la presencia de *biofilms*. Esto ha impulsado la búsqueda de tratamientos alternativos, dentro de los cuales se encuentran los aceites esenciales. Estos aceites corresponden a compuestos naturales extraídos de plantas aromáticas, que presentan diversas propiedades, dentro de la cual destaca el potencial antimicrobiano. De los aceites esenciales, uno de los más potentes es el aceite esencial de *Origanum vulgare* (AE-O), el que ha demostrado tener un efecto antifúngico, sin embargo, se desconoce su capacidad sobre *biofilms*.

Materiales y métodos

Se determinó el efecto antifúngico del AE-O a través de ensayos de difusión de disco y de la determinación de la concentración inhibitoria mínima sobre especies de *C. albicans*, *krusei*, *glabrata*, *dublinskiensis* y *tropicalis*. Además, se evaluó el efecto de AE-O sobre *biofilms* de *C. albicans* sensibles y resistentes a fluconazol, evaluando cada una de las etapas de formación del *biofilm*, para lo cual se estudió su efecto sobre la adhesión, la filamentación, la viabilidad y la formación y reparación de *biofilm*. Posteriormente se evaluó si el AE-O potenciaba el efecto de nistatina y fluconazol a través de un ensayo de combinaciones en células planctónicas y *biofilm*.

Resultados

El AE-O demostró inhibir el crecimiento de *C. albicans*, *krusei*, *tropicalis*, *glabrata* y *dublinskiensis*. Además, afecta todas las etapas de formación de *biofilm* de *C. albicans* sensible y resistente a fluconazol, desde la adhesión hasta la reparación. Asimismo, tiene la capacidad de potenciar el efecto de fluconazol y nistatina, tanto en células planctónicas como sobre *biofilms* de *C. albicans*.

Conclusiones

El AE-O es una alternativa para el desarrollo de nuevas formulaciones para el tratamiento de la candidiasis oral, como terapia única y en combinación con antifúngicos convencionales.

2. MARCO TEÓRICO

La salud oral es un tema que ha sido priorizado en diferentes instancias de participación por la población en Chile. Una encuesta de calidad de vida y salud mostró que un 42,7% de la población mayor de 15 años declaró que la salud oral afecta su calidad de vida (MINSAL, 2017).

Dentro de las patologías que pueden afectar la salud oral se encuentran las lesiones en la mucosa oral. La prevalencia a nivel mundial presenta grandes variaciones dependiendo principalmente del lugar geográfico, con resultados entre 5% a 65% (Da Silva y cols., 2019). En Chile, la población sobre 65 años tiene una prevalencia de lesiones orales de un 53% (Espinoza y cols., 2003). Las lesiones en la mucosa se deben a un origen traumático agudo o crónico, manifestaciones de patologías inflamatorias o autoinmunes, malformaciones vasculares, neoplasias o lesiones de origen infeccioso bacterianas o fúngicas. Dentro de las patologías de origen fúngico, la candidiasis oral se encuentra como la principal enfermedad en Chile (Warnakulasuriya, 2019).

1. Características y epidemiología de la Candidiasis oral

La candidiasis corresponde a una micosis provocada por cualquiera de las especies del género *Candida*. Es una infección de amplio espectro, que puede presentarse de forma superficial o profunda (Hani y cols., 2015). Se caracteriza por ser una infección oportunista y la más frecuente en el ser humano. En la mayoría de los casos se presenta como lesiones benignas, superficiales y restringidas. Dentro de los factores de riesgo locales está la hiposialia, las dietas altas en carbohidratos, el uso de prótesis dentales, hábito tabáquico, entre otros, que permiten un crecimiento excesivo de levaduras. Entre los factores sistémicos podemos mencionar el uso continuo de antibióticos de amplio espectro, la diabetes, las edades extremas (prematuros y adultos mayores), las deficiencias nutricionales e inmunosupresión. Clínicamente se puede presentar como candidiasis

pseudomembranosa, candidiasis eritematosa, estomatitis subprotésica, glositis romboidal media, candidiasis hiperplásica y queilitis angular (Epstein y Polsky, 1998; Akpan y Morgan, 2002). A pesar de que la prevalencia de esta patología se desconoce, se considera que 4 de cada 1000 pacientes en consulta general, presentan signos de infección, aunque una gran cantidad de pacientes suelen ser asintomáticos. Además, es una patología con una variabilidad de presentaciones clínicas, por lo que se estima que su prevalencia puede ser mayor (Otero y cols., 2015).

La candidiasis puede ocurrir en pacientes inmunocompetentes, pero es más frecuente en pacientes inmunocomprometidos e inmunosuprimidos (Taylor y Raja, 2020). A nivel mundial, un 25% de los pacientes diabéticos presenta candidiasis oral, la prevalencia en pacientes VIH es de un 35% y en pacientes irradiados en cuello y cabeza alcanza un 40% (Beech y cols., 2014; Howati y Tappuni, 2018; Nazir y cols., 2018). En Chile, se ha reportado en la población mayor de 65 años, un 26,1% de lesiones orales diagnosticadas como candidiasis oral, siendo la más frecuente la estomatitis subprotésica (Espinoza y cols., 2003). Estas lesiones no solo impactan en la salud y el funcionamiento de la cavidad oral, sino que también pueden causar dolor, dificultad para comer y hablar. Estas consecuencias de la infección por *Candida* spp., repercute en una baja en la adherencia al tratamiento en pacientes portadores de prótesis, asociado a una disminución en su confort y finalmente impacta negativamente en la calidad de vida de los pacientes (Kandelman y cols., 2008; Delwel y cols., 2018). Esta infección puede diseminarse y provocar candidiasis sistémicas (Hani y cols., 2015). Los pacientes diagnosticados con candidiasis sistémica presentan una alta tasa de mortalidad, que varían de un 40% a un 60%. Es una patología que generalmente requiere de hospitalizaciones prolongadas de un mínimo de 7 días con tratamientos farmacológicos extensos, y de un 30% a un 35% necesitan hospitalización en cuidados intensivos (Calandra y cols., 2016).

2. Aspectos microbiológicos de *Candida* spp.

Los hongos del género *Candida* spp. son levaduras de tamaño pequeño, entre 2 μm a 4 μm , ovaladas y su reproducción es asexual por gemación. En el medio de cultivo apropiado forma colonias cremosas, brillantes y blanquecinas. Este género se compone por un grupo heterogéneo de levaduras con más de 17 especies diferentes identificadas como agentes infecciosos en humanos. Sin embargo, más del 90% de las infecciones invasivas del ser humano son atribuidas a sólo cinco especies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei*. En menor proporción estas infecciones pueden ser provocadas por otras especies del género *Candida* como: *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* y *C. stellatoidea* (Akpan y Morgan, 2002; Pappas y cols., 2018).

C. albicans es el agente causal más común de candidiasis oral y sistémica, y se caracteriza por presentar diferentes estados morfológicos: levaduras, pseudohifas e hifas verdaderas (Figura 1). Las levaduras (forma planctónica) se reconocen por ser ovaladas y se asocian a su forma comensal. En la formación de las pseudohifas, la yema hija se alarga y posterior a la formación del septo permanece unida a la célula madre, lo que genera como consecuencia constricciones. Finalmente, en las hifas verdaderas, el tubo germinal es más largo y estrecho y no presenta constricciones, pero se puede observar la presencia de septos (Akpan y Morgan, 2002; Kauff y cols., 2015; Sudbery y cols., 2004).



Figura 1. Variaciones morfológicas de *Candida albicans*. A) Levadura B) Pseudohifa C) Hifa (Adaptada de Sudbery y cols., 2004).

Aunque en la actualidad *C. albicans* sigue siendo el agente causal principal, en los últimos años se ha descrito un aumento en el aislamiento de especies no-*albicans* en infecciones fúngicas invasivas (Megri y cols., 2020). En Estados Unidos ha aumentado la frecuencia de infecciones causadas por especies no-*albicans* de un 11% a un 37%, y en Latinoamérica de un 8% a un 26% desde 1993, con algunas variaciones dependiendo de la cepa (Albuquerque y cols., 2009).

Con respecto a las especies no-*albicans*, *C. glabrata* es el segundo agente causal más comúnmente aislado después de *C. albicans*, el cual ha incrementado su incidencia y su resistencia a antifúngicos (Fidel y cols., 1999). *C. tropicalis* es la tercera cepa más comúnmente aislada de los cultivos sanguíneos y se asocia con un aumento en el riesgo de candidemia en pacientes con leucemia, neutropenia y hospitalización prolongada en cuidados intensivos (Kontoyiannis y cols., 2001). *C. krusei* es intrínsecamente resistente a fluconazol y presenta una baja susceptibilidad frente a la mayoría de antifúngicos, además de asociarse con altas tasas de mortalidad (Abbas y cols., 2000). *C. dubliniensis* es una de las especies identificadas más recientemente del género *Candida*, asociada a pacientes VIH positivos, como agente causal de candidiasis oral y candidiasis sistémica (Gutiérrez y cols., 2002)

3. Tratamiento de la candidiasis oral.

Uno de los factores más importantes para el éxito en el tratamiento de la candidiasis oral es la educación del paciente. La educación debe ser individualizada en el autocuidado con enfoque en la higiene oral y en los factores que influyen en la aparición de la candidiasis (MINSAL, 2010; Otero y cols., 2015). En estudios con pacientes susceptibles al desarrollo de candidiasis, se observó una disminución significativa en aquellos que desarrollaban la patología cuando se les realizaba una instrucción de higiene oral. Sin embargo, no hubo diferencia significativa en pacientes con instrucción de higiene oral y enjuagues antimicrobianos profilácticos, demostrando la importancia de que el paciente maneje una buena técnica de

higiene para la prevención de candidiasis oral y así evitar futuras infecciones (Lam y cols., 2011).

La educación del paciente se debe asociar al manejo conjunto con otros factores de riesgo. En caso de pacientes portadores de prótesis removibles, se debe corroborar que cumpla con las condiciones de soporte, estabilidad y retención, en dónde podemos recurrir al uso de rebasado duros o blandos, también llamados acondicionadores de tejidos. En caso de pacientes con queilitis angular debemos corregir la dimensión vertical del paciente (Rodríguez y cols., 2002). Otra medida es el manejo y estabilización de los factores que no podemos eliminar, como el uso de saliva artificial en pacientes con xerostomía y manejo multidisciplinario en patologías sistémicas (Millsop y Fazel, 2016).

La educación y manejo de los factores de riesgo del paciente se deben implementar en conjunto con una terapia con antifúngicos convencionales (Tabla 1), ya que se ha visto que estas medidas sin el uso de antifúngicos son insuficientes en el tratamiento de la candidiasis oral (Lam y cols., 2011).

La terapia de candidiasis oral es esencialmente empírica. Los pacientes son tratados generalmente de forma local, con antifúngicos convencionales en diferentes presentaciones farmacéuticas, ya sea en forma de gel u orobase o mezclados con materiales dentales, como acondicionadores de tejidos o enjuagues bucales (Tabla 1). En pacientes con infecciones recurrentes, más severas o que presentan un grado importante de inmunosupresión, el tratamiento suele ser sistémico (MINSAL, 2010; Otero y cols., 2015).

Dentro de los antifúngicos más utilizados se encuentran dos familias de fármacos, los polienos (nistatina y anfotericina B) y los azoles (miconazol, clotrimazol, fluconazol, itraconazol y ketoconazol) (MINSAL, 2010). El tratamiento de elección tópico suele ser nistatina, mientras que en caso de tratamientos sistémicos la primera elección suele ser fluconazol (Millsop y Fazel, 2016). La nistatina es un polieno y se obtiene de cultivos de *Streptomyces noursei*, pudiendo

tener un efecto tanto fungicida como fungistático, dependiendo de su concentración. Su mecanismo de acción consiste en fijarse al ergosterol de la membrana fúngica provocando una alteración de la permeabilidad. Su aplicación es tópica ya que no se absorbe por el tracto gastrointestinal, y por vía oral provoca náuseas, vómito y diarrea. Además, provoca toxicidad por vía parenteral (Volpon y Lancelin, 2002).

Otro de los antifúngicos más utilizados es el fluconazol, perteneciente a la familia de los triazoles y con un efecto fungistático. Actúa inhibiendo la biosíntesis de ergosterol al interferir con la enzima lanosterol14- α -desmetilasa dependiente de citocromo P450 (Erg 11p), implicada en la transformación de lanosterol en ergosterol; provocando la alteración de la membrana plasmática y la inhibición del crecimiento de la célula fúngica. Puede provocar ardor e irritación local en formulaciones tópicas. Su uso sistémico está limitado por las interacciones farmacológicas que presenta por la inhibición del citocromo P450, afectando la metabolización de fármacos inmunosupresores (como ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, etc), anticoagulantes, benzodiacepinas, bloqueadores de canales de calcio, inhibidores de proteasas, algunos antiácidos y antihistamínicos (Quindós y cols., 2019). Otro de los efectos secundarios de este fármaco es el potencial hepatotóxico, siendo necesario el ajuste de dosis en pacientes con algún grado de daño hepático (Kyriaskidis y cols., 2017). Además, presenta altas tasas de recidiva y resistencia (Figueiral y cols., 2015).

Tabla 1. Ejemplos de tratamientos antifúngicos recomendados para candidiasis oral (Adaptada de MINSAL, 2010 y García-Cuesta y cols., 2014).

Fármaco	Formulación	Posología	Efectos adversos
Nistatina	Crema	Zona afectada 3-4 veces al día.	Absorción desde el tracto gastrointestinal despreciable.
	Pastillas, 100.000 unidades	Después de las comidas, 4 veces al día, por 7 días.	Puede causar náusea y vómitos a altas dosis.
Clotrimazol	Crema	Zona afectada 2-3 veces	Efectos locales leves, irritación, ardor en la zona.

		diarias, 3-4 semanas	Presenta actividad antiestafilococo.
	Solución	5 mL, 3-4 diario, por 2 semanas.	
Miconazol	Gel oral	Aplicar en zona afectada 3-4 veces al día.	Ocasionalmente produce reacciones locales leves, irritación, ardor. Náuseas, diarrea. Interactúa con anticoagulantes. Evitar en porfiria.
	Crema	Zonas afectadas 2 veces al día por 10 a 14 días.	
Ketoconazol	Tabletas	200-400 mg 1 o 2 veces al día con las comidas, por 2 semanas	Náuseas, vómitos, prurito y daño hepático. Interactúa con anticoagulantes, cisaprida y astemizol.
Fluconazol	Cápsulas	50-100 mg una vez al día por 2 a 3 semanas	Interactúa con anticoagulantes, terfenadina, cisaprida y astemizol. Puede causar diarrea, dolor de cabeza y disfunción hepática.
Itraconazol	Cápsulas	100 mg una vez al día, después de las comidas por 2 semanas.	Interactúa con terfenadina, cisaprida y astemizol. Puede causar náusea, neuropatía y rash.
Anfotericina B	50 mg infusión	100-200 mg/6 h	Renal, cardiovascular y neurológico.

4. Resistencia a los antifúngicos convencionales.

Los microorganismos tienen la capacidad de evolucionar, reproducirse y crecer bajo circunstancias desfavorables, generando resistencia a los fármacos antimicrobianos. Este problema es más grave cuando el arsenal disponible es

limitado, como ocurre en el caso de los antifúngicos, y con el aumento de la aparición de especies intrínsecamente resistentes. Esta aparición de especies resistentes, tanto de forma adquirida como intrínseca, se atribuye a diversas causas. Una de ellas es el incremento de la esperanza de vida en pacientes inmunosuprimidos, que reciben tratamientos con antifúngicos por un largo periodo de tiempo. Otra es el uso frecuente de algunos agentes antifúngicos como profiláctico, en donde las dosis suelen ser mayores a las usadas en tratamiento de candidiasis oral y por tiempos más prolongados (Cruciani y cols., 2006). Además, podemos encontrar diferencias en la resistencia a antifúngicos no sólo en diferentes especies, sino en aislados de la misma especie y en los distintos estados de crecimiento de un mismo aislado (Revie y cols., 2018).

Existen cepas del género *Candida* spp. con resistencia intrínseca a azoles, como *C. krusei* y *C. glabrata*. Además, se ha reportado un aumento en la adquisición de resistencia de otras especies de *Candida* spp. (Ramage y cols., 2012). Esta resistencia se refleja en el resultado clínico de los tratamientos de candidiasis oral. En pacientes con estomatitis subprotésica tratados con fluconazol sistémicos durante 30 días, un 60% de los pacientes aún presentaba infección después del tratamiento. Estos datos no se correlacionaban con las pruebas de susceptibilidad de los aislados clínicos de estos pacientes, en donde más del 80% de los aislados fueron sensibles a fluconazol (Figueiral y cols., 2015). Esta diferencia también fue observada en pacientes con candidiasis sistémicas, donde la resistencia de los aislados clínicos *in vitro* de pacientes hospitalizados fueron bajas (de un 5% a un 10%), sin embargo, presentaron una tasa de mortalidad de 47,9% (Tiraboschi y cols., 2017).

La discrepancia observada de los estudios mencionados se puede explicar por distintos mecanismos de patogenicidad y/o evasión del sistema inmune del hospedero, pero principalmente se debe a la presencia de *biofilms*, en donde se ha reportado una resistencia hasta 1000 veces mayor que en células planctónicas (Gendreau y Loewy, 2011; Rodrigues y cols., 2017).

5. Formación y características de los *biofilms* de *Candida* spp.

Los *biofilms* son comunidades biológicas altamente organizadas, con estructuras tridimensionales, adheridas a una superficie abiótica (dispositivos médicos, válvulas cardíacas, catéteres venosos centrales, prótesis dentales) o biológica (mucosas, piel, uñas, etc.). El *biofilm* se encuentra embebido en una matriz extracelular, formada principalmente por una densa capa de betaglucanos, lípidos y ácidos nucleicos; además, se encuentran presentes diferentes morfologías celulares de las levaduras, como hifas y pseudohifas. Se caracterizan por presentar bajas tasas de crecimiento celular y altas tasas de resistencia a antifúngicos convencionales, con un comportamiento muy distinto al de las células planctónicas (Cavalheiro y Teixeira, 2018).

La formación del *biofilm* se compone de 3 fases (figura 2):

- I. Fase temprana o adhesión, en la cual las células planctónicas se adhieren a una superficie formando una capa basal, que servirá de anclaje para la unión de nuevas capas celulares, siendo una etapa extremadamente importante para el proceso de infección.
- II. Fase intermedia o de proliferación, que involucra el proceso de iniciación de formación del *biofilm*, donde se continúan uniendo capas celulares y estas células adheridas filamentosas, cambiando su morfología hacia hifas y pseudohifas.
- III. Fase madura o tardía, donde ocurre el proceso de maduración y dispersión, en que las células se rodean de una densa matriz extracelular y paralelamente se dispersan células levaduriformes que van a contribuir a la diseminación de la infección (Silva y cols., 2011; Cavalheiro y Teixeira, 2018; Lohse y cols., 2018) .

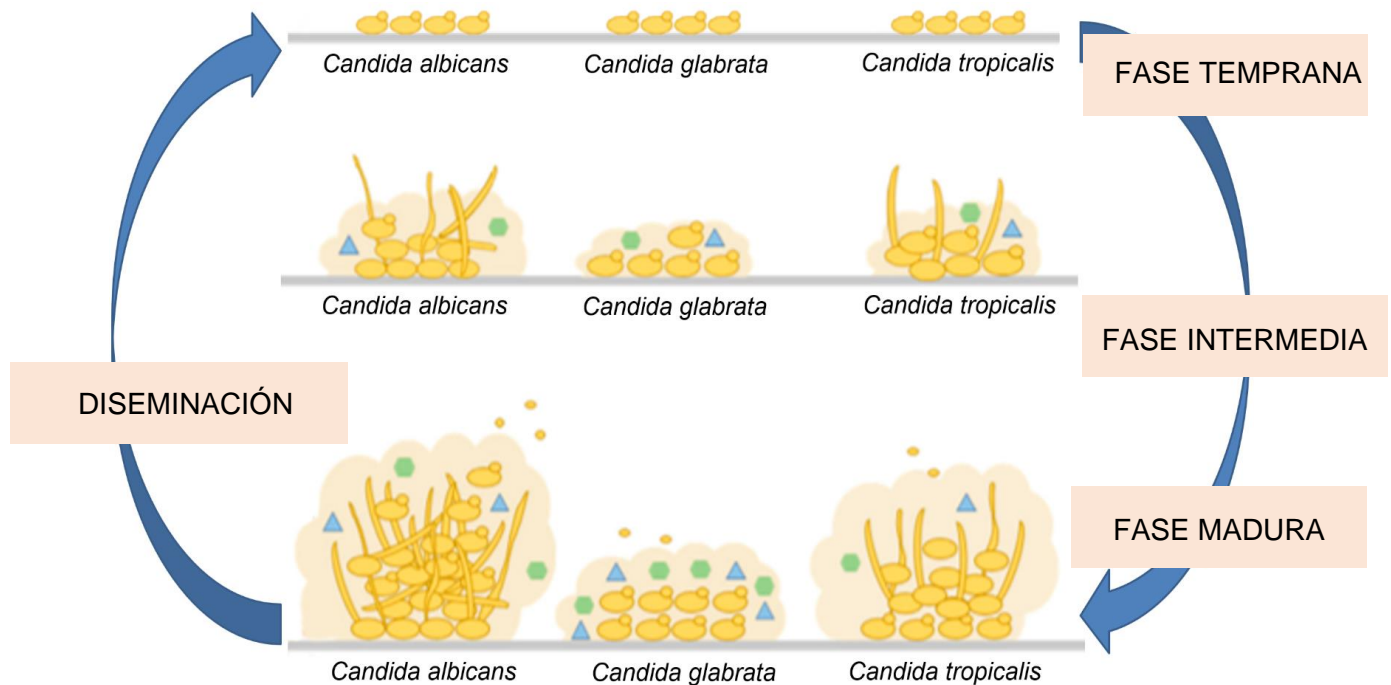


Figura 2. Esquema comparativo de las 3 fases de formación del *biofilm* en *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*, con sus distintas capacidades de producir matriz extracelular y distintas formas de filamentación (Adaptada de Cavalheiro y Teixeira, 2018).

6. Mecanismo de resistencia de los *biofilms*.

La resistencia que presentan los *biofilms*, se debe principalmente a 4 mecanismos (Figura 3):

l) Aumento de expresión de bombas de eflujo, que permiten remover los agentes antifúngicos de su medio interno. *C. albicans* tiene 2 tipos principales de bombas de eflujo, las facilitadoras principales y las de casete con unión a ATP (ABC o ATP Binding Casette). Se ha visto que en presencia de antifúngicos convencionales ocurren mutaciones en los promotores de los genes que codifican estas bombas de eflujo (*Cdr1*, *Cdr2* o *Mdr*) o en reguladores transcripcionales que controlan su expresión, los cuales están asociados a un aumento de la resistencia (Ramage y cols., 2002).

II) Características protectoras de la matriz extracelular, que actúa “secuestrando” los antifúngicos y actuando como barrera física. Se ha visto que además de contribuir a la solidez estructural del *biofilm*, la presencia de ADN complementario (ADNc) y polisacáridos aumentan la resistencia a antifúngicos. También se ha demostrado que la presencia de β -1,3-glucano es capaz de unirse y secuestrar a diferentes antifúngicos (Nett y cols., 2010).

III) Existencia de células persistentes en estado de latencia que contribuyen a la reinfección. Durante la formación del *biofilm* se desarrollan de forma estocástica y por un mecanismo desconocido, células persistentes, las cuales tienen la capacidad de revertir su estado metabólico de una baja a una alta tasa metabólica, cuando se necesita activar una reinfección (Lewis, 2010).

IV) Mayor densidad celular, mayor respuesta al estrés y disminución de la tasa metabólica. En el *biofilm* maduro de *C. albicans* se encuentran diversas capas con distintos tipos celulares (levadura, hifas y pseudohifas) lo que provoca la existencia de distintos microambientes, como nichos hipóxicos en las partes profundas del *biofilm* o nichos aeróbicos en las zonas más superficiales. Esto produce un aumento en su resistencia a los antifúngicos. Además, los *biofilms* maduros tienen una menor tasa metabólica, lo que disminuye los blancos farmacológicos de los antifúngicos convencionales (Lohse y cols., 2018).

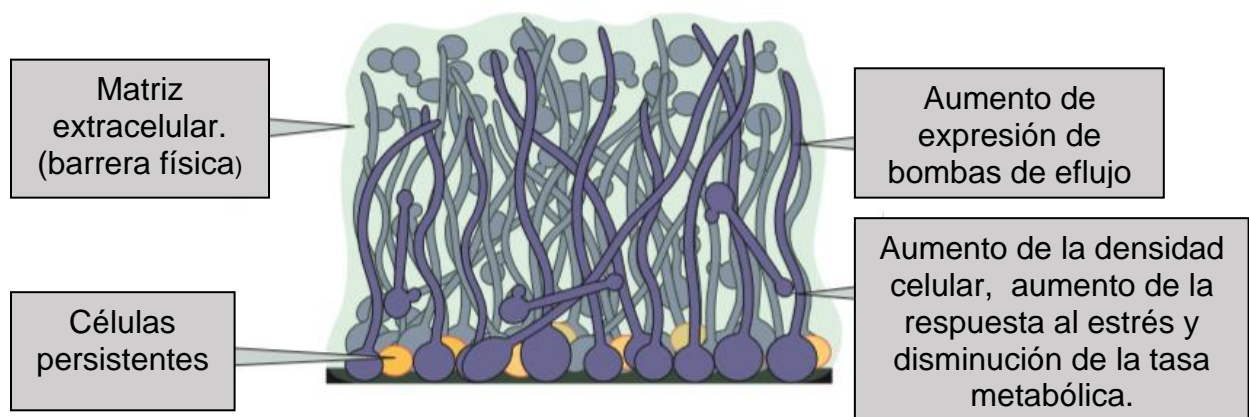


Figura 3. Mecanismos de resistencia en *biofilms* de *C. albicans* que le confieren resistencia a los antifúngicos (Adaptado de Lohse y cols., 2018).

Si bien existen otros fármacos con menores tasas de resistencia como las equinocandinas; estos son fármacos muy costosos, de administración parenteral, su uso se limita en casos de candidemias multirresistentes y no están disponibles en todos los países (Khan y cols., 2012). Por otro lado, existen reportes que indican que las equinocandinas pueden incluso favorecer la formación de *biofilms*, lo que ha sido denominado como el “efecto paradójico de las equinocandinas” (Walraven y cols., 2015).

La creciente incidencia de estos patógenos resistentes, la toxicidad de los compuestos antifúngicos existentes y el limitado número de antifúngicos disponibles, han impulsado la búsqueda de nuevas terapias con mayor eficacia y más seguras que las convencionales. Al respecto, los productos naturales han demostrado ser buenos candidatos, ya que, entre sus características, se destacan su amplia actividad antimicrobiana y baja toxicidad (Sardi y cols., 2013).

7. Uso de productos naturales en candidiasis.

El uso de productos derivados de plantas se ha convertido en una alternativa a los tratamientos basados en antifúngicos convencionales contra la candidiasis, debido a que sus moléculas bioactivas, pueden ser más selectivas sobre diferentes objetivos farmacológicos, además de presentar menores efectos secundarios (de Oliveira y cols., 2018).

Los derivados de plantas poseen una gran cantidad de compuestos bioactivos. Se ha estudiado que estos compuestos pueden actuar sinérgicamente en la actividad antimicrobiana, lo que permite su uso a nivel terapéutico. Además, otros compuestos no bioactivos presentes podrían influir en el potencial de acción de los principios activos, siendo un factor determinante en el mayor potencial antimicrobiano que tienen los extractos naturales completos a diferencia de sus moléculas aisladas (Martins y cols., 2015; Chouhan y cols., 2017). Por ejemplo, se

ha visto que ninguno de los componentes del aceite esencial de romero de forma individual tiene acción farmacológica sobre larvas de *Pseudaletia unipuncta*, sino que su acción inhibitoria se debía a la interacción de sus diferentes componentes en conjunto (Tariq y cols., 2019).

Numerosos estudios han reportado el efecto antifúngico contra *Candida* spp. de diversos productos naturales. Se han estudiado diferentes extractos derivados de plantas, como los extractos metanoicos, extractos hidroalcohólicos, extractos acuosos, entre otros (Zida y cols., 2017). Dentro de estos destacan los aceites esenciales debido a su mayor efectividad en comparación a otros tipos de extractos naturales (de Castro y cols., 2015).

8. Características y composición química de los aceites esenciales.

Los aceites esenciales son compuestos bioactivos, presentan de 20 a 100 compuestos diferentes, formados por una gran cantidad de sustancias orgánicas volátiles y semivolátiles, altamente lipofílicos, obtenidos generalmente de plantas aromáticas (Moghaddam y Mehdizadeh, 2017). Las principales especies de plantas que se utilizan para la elaboración de aceites esenciales pertenecen a las siguientes familias: Alliaceae, Apiaceae, Asteracea y la familia de las Lamiaceae. Los compuestos se pueden obtener de diferentes partes de la planta, como flores, tallos, hojas, madera o raíces. Existen diferentes métodos de extracción de estos compuestos activos, tales como destilación por vapor, hidrodestilación, extracción con solventes orgánicos, hidrodifusión, entre otras (Moghaddam y Mehdizadeh, 2017). Las plantas presentan 2 tipos de metabolitos. Los metabolitos primarios, que son compuestos universales presente en todos los seres vivos, como lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos. Y los metabolitos secundarios, que sólo se encuentran en algunas especies de plantas y corresponden a terpenoides, shikimates, policétidos y alcaloides. Los principales compuestos de los aceites esenciales con importancia farmacológica son generalmente terpenos y fenilpropanoides (Moghaddam y Mehdizadeh, 2017).

Los terpenos y terpenoides son resultado de la condensación de isopreno (figura 4), una unidad de pentacarbonato (con 2 enlaces insaturados), por lo que muchas veces son llamados también isoprenoides. Corresponden a la clase más grande y diversa de compuestos orgánicos volátiles y se clasifican según su estructura y función. Con respecto a la estructura, se pueden clasificar según el número de unidades de isoprenos presentes en hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, etc. Con respecto a sus grupos funcionales, se clasifican en óxidos, alcoholes, fenoles, aldehídos, ésteres, éteres, cetonas, lactonas, entre otros (Moghaddam y Mehdizadeh, 2017).

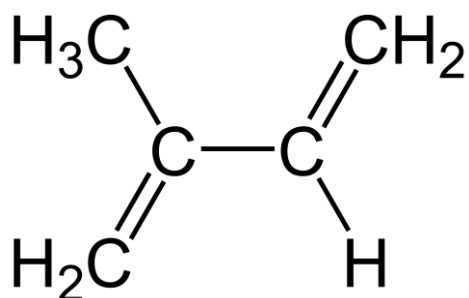


Figura 4. Unidad de isopreno

Los fenilpropanoides contienen 1 o más unidades de C₆-C₃, siendo el C₆ un anillo bencénico y generalmente con un grupo funcional metil éter unido al anillo. La mayoría de los fenilpropanoides de los aceites esenciales son fenoles, siendo los más comúnmente encontrados en los aceites esenciales, el eugenol (figura 5) y el safrol (Moghaddam y Mehdizadeh, 2017).

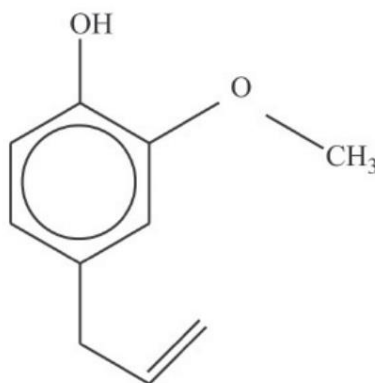


Figura 5. Estructura química de eugenol

Debido a la diversidad de componentes presentes en los aceites esenciales, estos exhiben múltiples propiedades, como acción antimicrobiana (Sakkas y Papadopoulou, 2017; Leyva-López y cols., 2017), antiinflamatoria, antioxidante (Silva y cols., 2015; Borges y cols., 2019) y anticancerígena (Yang y cols., 2017). Además, son utilizados como aditivos y preservantes en varios alimentos y son aceptados como seguros para su consumo (Stefanakis y cols., 2013). La actividad y la potencia de acción de estos aceites esenciales son diferentes según la planta de la cual son obtenidos. Esto se debe a las variaciones en la composición química, que puede variar según el genotipo de la planta, el lugar geográfico y las condiciones de cultivo, entre otros factores (Alves-Silva y cols., 2013; Moghaddam y Mehdizadeh, 2017). Uno de los aceites esenciales que ha demostrado una gran potencia de acción antimicrobiana, tanto en bacterias como en hongos, es el aceite esencial de orégano, el cual además presenta una potencia superior a otros aceites esenciales estudiados, como lavanda, murta, limón y tomillo (Man y cols., 2019).

9. Orégano (*Origanum vulgare*).

Origanum vulgare es una especie de orégano perteneciente a la familia de las Lamiaceae, que se encuentra ampliamente distribuido en el mundo y puede crecer con facilidad en diferentes ambientes. Es usado en la industria farmacéutica y cosmética, en la industria alimenticia como saborizante de alimentos y en bebidas alcohólicas (Leyva-López y cols., 2017).

El contenido de aceite esencial de *O. vulgare* que se puede obtener de una planta completa varía de un 0,5% a un 7%. Los componentes principales son el carvacrol y el timol, junto con otros monoterpenos. El compuesto principal corresponde al carvacrol (figura 6), y dependiendo de las variaciones de la planta, puede llegar a representar el 95% del aceite esencial (Sakkas y Papadopoulou, 2017).

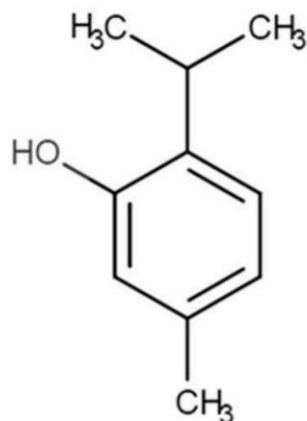


Figura 6. Estructura química del carvacrol

El carvacrol presenta actividad antiparasitaria (Silva y cols., 2017; Youssefi y cols., 2019), antibacteriana y antifúngica (Suntres y cols., 2014). Su mecanismo de acción se asocia a un aumento de la permeabilidad y despolarización de la membrana plasmática. También se describe su capacidad de inhibir la producción de toxinas microbianas, de ser capaz de inhibir la formación de *biofilm* bacterianos de *Escherichia coli* y afectar el desarrollo de sus fimbrias. Además, presenta un efecto bactericida, eliminando bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* (Man y cols., 2019). Otros componentes del aceite esencial de orégano son el timol, γ -terpineno, *p*-cimeno, terpineno-4-ol, linalool, β -mirceno, entre otros. La concentración de estos compuestos puede variar en el aceite esencial, ya que dependen de la planta y el método de obtención del aceite (Leyva-López y cols., 2017).

El aceite esencial de *O. vulgare* ha demostrado ser más potente en comparación a otras especies de orégano, como *O. majorana*, presentando menores concentraciones inhibitorias mínimas, tanto en bacterias como en levaduras del género *Candida* (Cleff y cols., 2010). Presenta un mayor efecto que antifúngicos convencionales como fluconazol y ketaconazol (Souza y cols., 2010). Además, ha demostrado ser capaz de inhibir la formación de *biofilms* bacterianos de diferentes especies como *Streptococcus mutans* (Hickl y cols., 2018). Sin embargo, no existe evidencia de su acción sobre *biofilm* de especies del género *Candida*.

10. Combinación de fármacos con aceites esenciales.

Otra de las características de los aceites esenciales, es la posibilidad de potenciar el efecto de antifúngicos convencionales al administrarlos en combinación con estos. El uso simultáneo de dos o más agentes antimicrobianos se utiliza en ciertas situaciones clínicas mostrando gran actividad sobre infecciones multirresistentes y, si este efecto es sinérgico, es posible disminuir las dosis con la consecuente disminución de efectos adversos (Jackson y cols., 2009). En este contexto, se han estudiado los posibles sinergismos de los aceites esenciales con antifúngicos convencionales para la formulación de terapias efectivas, menos costosas y más seguras. Existen reportes de actividad sinérgica de aceites esenciales en combinación con anfotericina B y fluconazol en levaduras del género *Candida* (Khan y cols., 2012; Gucwa y cols., 2018). Además, se ha visto actividad de algunos componentes aislados del aceite esencial de albahaca, como geraniol y linaool, sobre *biofilms* de *C. albicans* (Cardoso y cols., 2016). A la fecha, no hay reportes del efecto del aceite esencial de orégano sobre *biofilms* tanto de *C. albicans* como no-*albicans* (Cardoso y cols., 2016).

De acuerdo con los antecedentes presentados, en este trabajo se estudió el efecto antifúngico y el efecto anti-*biofilm* del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) sobre diferentes especies del género *Candida*. Se estudió el efecto sobre *C. albicans*, ya que es la especie más frecuente de encontrar en candidiasis orales y sobre especies no-*albicans* debido al aumento de su prevalencia.

3. HIPÓTESIS

El aceite esencial de *orégano* (*Origanum vulgare*) posee efecto antifúngico y anti-*biofilm* sobre *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* y *C. dubliniensis*, además de potenciar el efecto antifúngico de fluconazol y nistatina.

4. OBJETIVOS

I. Objetivo general

Evaluar el efecto antifúngico del aceite esencial de *orégano* en células planctónicas y sobre *biofilms* de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* y *C. dubliniensis*, de forma independiente y en combinación con fluconazol y nistatina.

II. Objetivo específico

- 1) Caracterizar el efecto antifúngico del aceite esencial de *orégano* sobre levaduras de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* y *C. dubliniensis*.
- 2) Determinar el efecto anti-*biofilm* del aceite esencial de *orégano* sobre *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* y *C. dubliniensis*.
- 3) Evaluar el efecto antifúngico de fluconazol y nistatina en combinación con el aceite esencial de *orégano* sobre *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* y *C. dubliniensis*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio: El estudio fue de tipo experimental y contó con la aprobación del Comité de Bioseguridad de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (Anexo 1). Además, este estudio se encuentra adscrito al proyecto PRI-ODO 2020/001 (Anexo 2).

Obtención del aceite esencial. El aceite esencial de *Origanum vulgare* (AE-O) se obtuvo por el método de destilación por arrastre de vapor en el Laboratorio de Nanobiomateriales de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. La destilación por arrastre de vapor corresponde a un método de extracción en donde el vapor de agua pasa por un matraz que contiene, en este caso hojas de *O. vulgare*, y arrastra junto con él los componentes volátiles que conforman el aceite esencial. Posteriormente decantan y se separa la fase acuosa del aceite esencial.

Especies de *Candida* spp. Se utilizaron las siguientes especies de referencia del género *Candida*: ATCC 90029 (*C. albicans* sensible a fluconazol), ATCC 10231 (*C. albicans* resistente a fluconazol), ATCC 6258 (*C. krusei*), ATCC 2001 (*C. glabrata*), ATCC 750 (*C. tropicalis*) y CD36 (*C. dubliniensis*). Las especies fueron mantenidas a 4°C en placas de agar Sabouraud cloranfenicol (Biokar Diagnosis®).

Objetivo específico 1. Caracterización del efecto antifúngico.

La caracterización del efecto antifúngico del aceite esencial se realizó mediante el ensayo de difusión de disco y la determinación de la concentración inhibitoria mínima. Como control positivo se utilizó fluconazol o nistatina (cuando corresponda) y como control negativo se utilizó DMSO, ya que fue el solvente vehículo para diluir el aceite esencial. A continuación, se detallan los métodos ensayados.

a) Ensayo de difusión de disco. Este ensayo nos permite determinar la susceptibilidad de las especies de *Candida* a fluconazol, nistatina y AE-O según el diámetro del halo de inhibición de los discos de difusión. A partir de una colonia aislada (1-2 mm) se preparó una suspensión en PBS estéril ajustada a 0,5

McFarland. Un hisopo de algodón estéril se sumergió en la suspensión del inóculo, se giró varias veces, y se presionó firmemente contra la pared del tubo por encima del nivel de la suspensión para eliminar el exceso de líquido. En la superficie seca de una placa de agar Sabouraud cloranfenicol se realizaron estrías de forma uniforme en tres direcciones diferentes. Sobre esta placa se depositaron los discos de difusión (OXOID®) que contenían fluconazol (0,025 mg), nistatina (100 unidades, equivalentes a 0,033 mg) y aceite esencial al 40% v/v (5 y 10 μ L, equivalentes a 1,84 y 3,68 mg). Se presionaron sobre la superficie de agar para asegurar un contacto completo. Los discos se colocaron en forma equidistante en cuadrantes. Después de 24 h de incubación a 37°C, se midió el diámetro del halo de inhibición con una regla. Según su diámetro de inhibición fueron clasificadas en susceptibles o resistentes, para fluconazol y nistatina se utilizó de referencia las tablas del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI) (Tabla 2) y en el caso del aceite esencial se consideró susceptible si existía halo de inhibición (Espinel-Ingroff, 2007).

Tabla 2: Clasificación de susceptibilidad para fluconazol y nistatina

CEPA	Susceptible	Dosis-dependiente	Resistente
Fluconazol	≥ 19	15–18	≤ 14
Nistatina	≥ 15	10-14	≤ 10

La clasificación se realiza según el diámetro de halo de inhibición en mm (Adaptado de las normas microbiológicas del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI), 2009).

b) Determinación de la concentración inhibitoria mínima. Mediante este ensayo se obtuvo la curva de concentración vs respuesta para cada fármaco y para el aceite esencial de orégano. Esta curva nos entregó la concentración inhibitoria mínima (CIM) para cada tratamiento, parámetro farmacodinámico que nos sirvió como referencia para comparar la potencia de cada estrategia farmacológica tanto en células planctónicas como en *biofilms*.

Para realizar estos ensayos se inoculó una colonia de aproximadamente un mm de diámetro previamente crecida en agar Sabouraud cloranfenicol, en 1 mL de medio

RPMI 1640 estéril y se dejó crecer por 18 h a 28°C. Posterior a este tiempo las células fueron resuspendidas en medio RPMI 1640 estéril a una concentración final de 1×10^6 células/mL. El recuento de las células se realizó en una Cámara de Neubauer a través de microscopía óptica.

Se sembraron 100 μ L de este inóculo en una placa de 96 pocillos de fondo plano estéril. Luego se adicionaron los diferentes tratamientos: fluconazol, nistatina y aceite esencial de orégano en concentraciones crecientes (Tabla 3), hasta completar un volumen final de 200 μ L con medio RPMI estéril. Como control negativo se incubaron las células con medio RPMI estéril sin ningún tratamiento. Posteriormente, se incubaron a 37°C sin agitación durante 24 h. Finalmente se determinó la absorbancia en un lector Infinite F50 (Tecan®) a 450 nm (Arendrup y cols., 2017).

Tabla 3. Rangos de concentración ensayadas de cada fármaco para *Candida* spp.

Cepa	Fluconazol	Nistatina	Aceite esencial orégano
ATCC 90029	0,01-3	0,01-2	0,002-0,02
ATCC 10231	0,01-300	0,01-10	0,01-10
ATCC 6258	0,1-300	0,01-10	0,1-10
ATCC 750	0,01-3	0,1-10	0,1-10
ATCCC 2001	0,1-300	0,2-20	0,1-10
CD 36	0,1-300	0,1-10	0,1-10

Las concentraciones están expresadas en μ g/mL (Adaptado de EUCAST, 2019).

Objetivo específico 2. Determinación del efecto anti-*biofilm*.

Tomando como referencia la CIM de cada fármaco y del AE-O, evaluamos si estos tratamientos eran capaces de inhibir la formación del *biofilm* en distintas etapas de su formación. Como se mencionó en la introducción, existen 3 etapas en la formación del *biofilm* de *Candida* spp.: primero una fase temprana en donde las células se adhieren a la superficie; segundo una fase intermedia, en donde el *biofilm* aumenta en densidad celular, se comienza a secretar matriz extracelular y se produce el fenómeno de morfogénesis; y tercero una etapa de maduración y

dispersión, dónde ya se encuentra un *biofilm* maduro con la capacidad de dispersar células levaduriformes para diseminar la infección. Para determinar del efecto anti-*biofilm* del aceite esencial no tuvimos control positivo debido a que los tratamientos convencionales no afectan el desarrollo de los *biofilms* y no existe un fármaco de referencia para este tipo de ensayos. Como control negativo fue utilizado fluconazol. En el desarrollo de este objetivo se realizaron los siguientes ensayos:

a) Inhibición de adhesión. La primera etapa en la formación del *biofilm* corresponde a la adhesión, por lo que evaluamos la capacidad de cada tratamiento de prevenir el inicio de la formación de *biofilms* de *Candida* spp. Debido a las condiciones experimentales en el laboratorio, no fue posible lograr la adhesión de las especies no-*albicans*. Se realizaron adaptaciones de la metodología para intentar obtener la adhesión de células necesarias para la formación del *biofilm*, sin embargo, debido a las variaciones entre especies, sus características de adhesión y los materiales disponibles no fue posible replicar estos experimentos. Por lo que este ensayo fue realizado sólo en las dos cepas de *C. albicans* en estudio.

En placas estériles de 96 pocillos de fondo plano, se sembraron 100 μL de un inóculo estandarizado a 1×10^6 células/mL en medio RPMI estéril, para luego adicionar los diferentes tratamientos: fluconazol, nistatina y aceite esencial de orégano, en 3 concentraciones (mitad de CIM, CIM y doble de la CIM). Posteriormente, se procedió a adicionar la cantidad necesario de medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% para alcanzar un volumen final de 200 μL . Se incubaron las placas a 37°C sin agitación durante 4 h (período que *C. albicans* demora en la fase de adhesión según las condiciones experimentales ensayadas en el laboratorio). Transcurrido el tiempo, se descartó el sobrenadante y se lavaron los pocillos con 100 μL de PBS para eliminar células no adheridas. Luego se tiñeron las células adheridas con 100 μL de cristal violeta al 0,1% durante 5 min para posteriormente ser lavadas 3 veces con PBS. Por último, se adicionaron 200 μL de ácido acético al 10% v/v, se incubaron por 15 min y se determinó el porcentaje de inhibición leyendo la absorbancia a 595 nm en un lector Infinite F50 (Tecan®) (Ghorpade y Dharmadhikari, 2014). Los resultados se expresaron como el porcentaje de adhesión con respecto al control tratado solo con el vehículo (DMSO).

b) Inhibición de la morfogénesis. La morfogénesis es parte de la segunda etapa de formación del *biofilm*, por lo que evaluamos la capacidad de inhibir la filamentación de las células con los diferentes tratamientos. Se utilizó la concentración correspondiente a la CIM de cada tratamiento según la especie para obtener el porcentaje de inhibición de la morfogénesis. Este ensayo fue realizado en todas las especies de *Candida* excepto en *C. glabrata*, ya que esta especie no presenta cambios morfológicos de célula levaduriforme a filamentosa (Rodrigues y cols., 2013).

En tubos Eppendorf de 1,5 mL se adicionaron 100 μ L de una suspensión estandarizada a 1×10^6 células/mL en RPMI suplementado con SFB al 10% v/v. Luego se adicionó la CIM de los diferentes tratamientos (fluconazol, nistatina y aceite esencial de orégano), se incubaron a 37°C con agitación a 125 rpm durante 5 h. La agitación es necesaria para impedir que las células se adhieran al tubo, pero permite que puedan filamentar. Finalmente se tomaron 10 μ L de cada cultivo y se determinó el porcentaje de células filamentosas (hifas y pseudohifas) respecto al control sin tratamiento, a través del recuento de células en Cámara de Neubauer por microscopía óptica (Mohammed y cols., 2004). El porcentaje de células hifales se calculó como el número de células hifales dividido por el número total de células observadas con microscopía óptica. Al menos 10 campos microscópicos (aproximadamente 200 células) se observaron bajo el microscopio (40x de aumento). Las células se clasificaron como a) células no filamentosas (menos de dos células unidas) o b) células filamentosas (más de dos células unidas). Se examinaron varias posiciones por portaobjetos para garantizar una selección representativa de las células.

c) Inhibición de la viabilidad de los *biofilms*. Para determinar si el aceite esencial de orégano era capaz de inhibir los *biofilms* ya formados tras 24 h de desarrollo, evaluamos la capacidad de disminuir la viabilidad celular sobre un *biofilm* formado de *Candida* spp. Este ensayo fue realizado en las dos cepas de *C. albicans*, ya que

las especies no-*albicans* no lograron adherirse para la formación del *biofilm* en las condiciones experimentales del laboratorio.

En placas estériles de 96 pocillos de fondo plano, se sembraron 100 μL de un inóculo estandarizado a 1×10^6 células/mL en medio RPMI estéril, hasta completar un volumen final de 200 μL por pocillo. Se incubaron a 37°C sin agitación durante 24 h. Transcurrido este tiempo se eliminó el sobrenadante y las células no adheridas se lavaron con PBS estéril, para luego adicionar los diferentes tratamientos (fluconazol, nistatina y aceite esencial de orégano), en concentraciones ascendentes (Tabla 4) con medio RPMI-1640 más SFB al 10% para alcanzar un volumen final de 200 μL por pocillo. Se incubaron nuevamente a 37°C sin agitación durante 24 h. Posterior al periodo de incubación se determinó la viabilidad de las células adheridas a través del método de reducción de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). En esta etapa, una vez incubado el *biofilm*, descartamos el sobrenadante y lavamos los pocillos 3 veces con PBS, luego se agregaron 50 μL de MTT en cada pocillo y se incubaron por 4 h con agitación, posteriormente se lavaron los pocillos 3 veces con PBS y se agregaron 200 μL de DMSO. Finalmente, se determinó la absorbancia a 570 nm en un lector Infinite F50 (Tecan®) para obtener la concentración inhibitoria del 50% (IC_{50}) (Sandoval-Acuña y cols., 2016).

Tabla 4. Rangos de concentración ensayadas de cada fármaco para *C. albicans*.

Cepa	Fluconazol	Nistatina	Aceite esencial orégano
ATCC 90029	0,01-3	0,1-100	1-20
ATCC 10231	0,01-300	0,1-100	0,5-15

Las concentraciones se expresan en $\mu\text{g/mL}$. Estos rangos se obtuvieron según las CIM obtenidas de cada cepa.

d) Inhibición de formación de *biofilm* (ensayo de la herida). Evaluamos la capacidad de regeneración de un biofilm formado de 24 h en presencia de aceite esencial de orégano, fluconazol y nistatina, al desprender una parte de éste (herida). Al igual que en el ensayo de viabilidad de *biofilms*, este ensayo no pudo ser realizado en las especies no-*albicans*, debido a que no se logró la adhesión para la

formación del *biofilm*.

En una placa de 6 pocillos de fondo plano se sembraron 1 mL de un inóculo estandarizado a 1×10^6 células/mL y 1 mL de medio RPMI-1640 más SFB al 10%. Se incubaron durante 24 h a 37°C sin agitación. Posterior a este periodo se eliminó el sobrenadante. Con una punta de micropipeta de 1000 μ L se rasgó el *biofilm* formando una “herida” y se lavó 3 veces con PBS estéril para remover las células no adheridas. A esta etapa se le denominó tiempo 0. Luego se adicionaron los tratamientos: fluconazol, nistatina y aceite esencial de orégano, a la concentración correspondiente a la CIM, hasta completar un volumen final de 2 mL. Se incubaron nuevamente durante 24 h a 37°C sin agitación. Posterior a ese periodo se eliminó el sobrenadante y se lavaron los pocillos 3 veces con PBS para eliminar las células no adheridas. Luego se tiñeron las células adheridas con cristal violeta al 5% durante 5 min, denominando tiempo 1 a esta etapa. Los pocillos se fotografiaron en el tiempo 0 y tiempo 1 con una cámara (Nikon®) adosada a un microscopio de fase invertida, en distintas zonas de la “herida”. Las fotografías se analizaron con el programa ImageJ® para calcular el área de la “herida”, y se calculó el porcentaje de cierre para determinar la formación o inhibición de un nuevo *biofilm*.

Objetivo específico 3. Evaluación del efecto antifúngico de las combinaciones de fármacos. Tomando como referencia las concentraciones obtenidas de la CIM en células planctónicas y de los ensayos de viabilidad en *biofilm*, se evaluó si al combinar el aceite esencial de orégano con fluconazol o nistatina, se potenciaba su efecto, tanto en células planctónicas como en *biofilm* formado de *C. albicans*. Las diferentes interacciones fueron clasificadas en antagonismo, sinergia o aditividad, a través de la construcción de un isoblograma. Se consideró sinergia cuando el efecto esperado de la acción del antifúngico y el AE-O en combinación fue mayor al efecto esperado de estos si se suman sus efectos de forma independiente. Antagonismo se definió cuando el efecto de la combinación del aceite esencial con fluconazol o nistatina fue menor a la suma de sus efectos obtenido de manera independiente, y aditividad se consideró cuando el efecto obtenido de la combinación AE-O y antifúngico fue igual a la sumatoria de los efectos independientes de ambos (Huang y cols., 2019).

a) Ensayo de ajedrez. A partir de la CIM de cada fármaco, se realizó una matriz de combinación de fármacos o tablero de ajedrez (Figura 7), dónde en cada pocillo hay una combinación de distintas concentraciones de fluconazol o nistatina y el aceite esencial de orégano. De esta forma determinamos si la combinación genera antagonismo, sinergia o aditividad entre los fármacos y el aceite esencial (Jhonson y cols., 2004; Meirelles y cols., 2017).

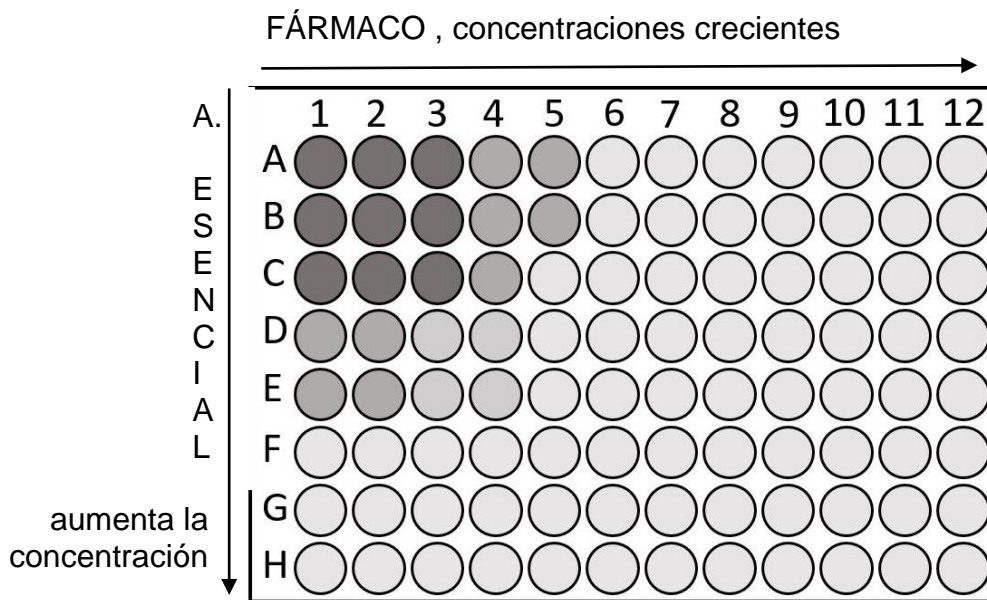


Figura 7. Esquema de ensayo de ajedrez.

a.1) Ensayo de ajedrez en células planctónicas.

En placas estériles de 96 pocillos de fondo plano, se sembraron 100 μL de un inóculo estandarizado a 1×10^6 células/mL en medio RPMI estéril, para luego adicionar los tratamientos en concentraciones crecientes a través de una matriz de combinaciones (según las CIM obtenidas para cada fármaco y para el aceite esencial). Cada pocillo tuvo un volumen final de 200 μL . Posteriormente, se incubaron a 37°C sin agitación durante 24 h. Finalmente se determinó la densidad óptica a 450 nm en un lector Infinite F50 (Tecan®). Los datos obtenidos se analizaron con un modelo de Loewe, mediante el programa Combenefit.

a.2) Ensayo de ajedrez sobre *biofilm*.

En placas estériles de 96 pocillos de fondo plano, se sembraron 100 μL de un inóculo estandarizado a 1×10^6 células/mL en medio RPMI estéril, para completar un volumen final de 200 μL por pocillo. Se incubaron a 37°C sin agitación durante 24 h. Posterior a la formación del *biofilm* se descartó el sobrenadante y las células no adheridas se lavaron con PBS estéril. Se adicionaron los tratamientos, con la misma matriz de combinación que en células planctónicas (Figura 7), basándonos en las curvas obtenidas con el ensayo de viabilidad de *biofilm*. Se adicionó medio RPMI-1640 más SFB al 10% hasta alcanzar un volumen final de 200 μL por pocillo. Se incubaron nuevamente a 37°C sin agitación durante 24 h. Posterior al periodo de incubación se determinó la viabilidad de las células adheridas a través del método de reducción de la sal de tetrazolio (MTT). Se determinó la absorbancia a 570 nm en un lector Infinite F50 (Tecan®).

Análisis de datos. Los datos obtenidos fueron graficados y analizados utilizando el software GraphPad Prism v6.0®. Todos los experimentos se realizaron al menos 3 veces por triplicado, excepto los ensayos de combinación que, debido a su diseño experimental, se realizaron de forma única 2 experimentos independientes. Los resultados fueron comparados mediante t-test, ANOVA de 1 vía o de 2 vías según el ensayo a analizar. Para todos los experimentos se consideró que existe una diferencia estadísticamente significativa cuando $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

Objetivo específico 1. Caracterización del efecto antifúngico.

a) **Caracterización de la susceptibilidad de las cepas de *Candida* spp. a fluconazol, nistatina y aceite esencial de orégano (AE-O).** Se determinó la susceptibilidad de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis* y *C. krusei* a fluconazol, nistatina y AE-O, mediante el método de difusión de disco, de acuerdo con lo descrito en Métodos. Las cepas se clasificaron en susceptibles (S) o resistente (R), según el diámetro de inhibición expresado en mm. En la literatura no existen reportes para la clasificación de aceites esenciales, por lo que sólo se estableció la presencia o ausencia de halo de inhibición (Tabla 5). De las 6 especies de *Candida* spp. analizadas, sólo una se comportó como susceptible a fluconazol, ya que su diámetro de inhibición fue mayor a 19 mm. Cinco fueron catalogadas como resistentes, ya que su halo de inhibición fue menor a 14 mm. Todas las cepas fueron catalogadas como susceptible a nistatina, ya que presentaron un halo de inhibición mayor a 15 mm.

Tabla 5: Halo de inhibición promedio de fluconazol, nistatina y AE-O y su clasificación de susceptibilidad (S o R).

	ATCC 90029	ATCC 10231	ATCC 6258	ATCC 750	ATCC 2001	CD 36
Fluconazol	32 ±1 S	12±0,6 R	0±0 R	0±0 R	0±0 R	0±0 R
Nistatina	28±0,8 S	23±0,8 S	20±0,5 S	20±0,3 S	25±0,5 S	26±0,7 S
AE-O 5 µL	24±1,4	20±0,5	17±0,7	12±0,8	14±0,8	14±0,6
AE-O 10 µL	50±1,2	48±1,3	18±0,8	17±0,8	17±1	19±0,9

Los resultados se expresan en mm ± DE.

Todas las cepas presentaron halo de inhibición en presencia de AE-O (Figura 8). Con la adición de 5 µL del AE-O, el halo de inhibición fue entre 12 y 25 mm, y con

la adición de 10 μL , el halo de inhibición fue entre 17 y 50 mm (Tabla 5). La diferencia del diámetro del halo de inhibición fue estadísticamente significativa entre 5 μL y 10 μL en todas las cepas excepto para ATCC 6258 (Figura 9).

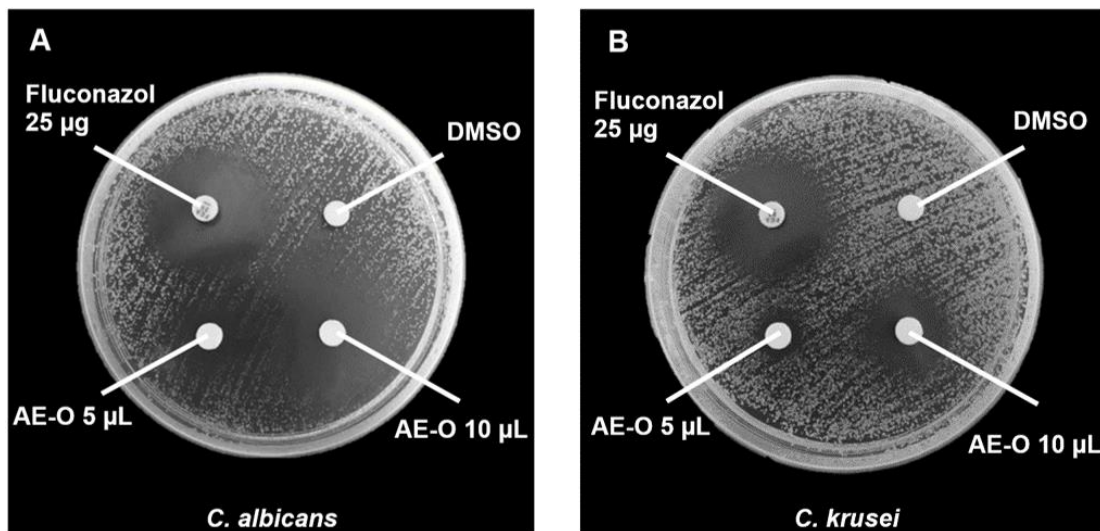


Figura 8. El AE-O inhibe el crecimiento de especies del género *Candida* spp. Imágenes representativas para las cepas ATCC 90029 (A) y ATCC 6258 (B). Cepas sensibles a AE-O y sus diferencias de halo de inhibición en 5 μL y 10 μL .

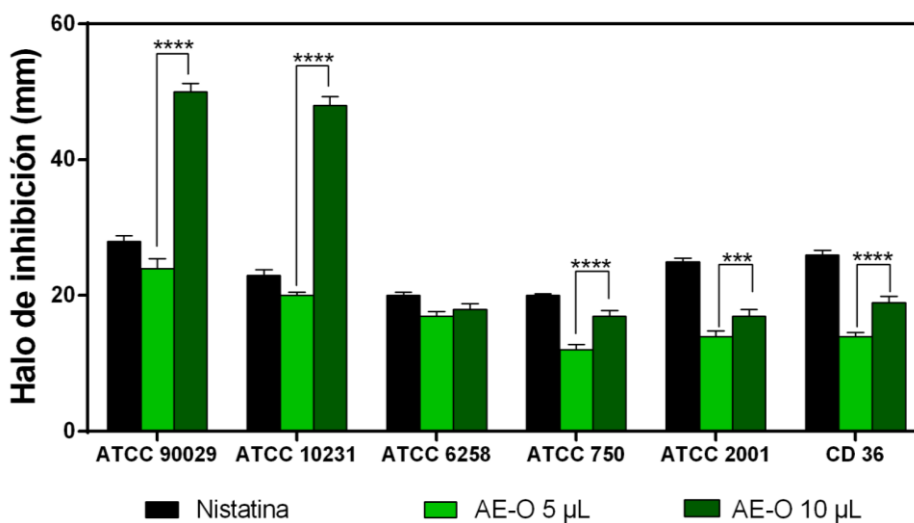


Figura 9. El AE-O inhibe el crecimiento de *Candida* spp. en el ensayo de difusión en disco. Las barras representan la cuantificación del diámetro de halo de inhibición en mm en presencia de AE-O y nistatina. *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (ANOVA de 2 vías). Los valores representan al menos 3 experimentos independientes \pm DE.

La cepa ATCC 10231 tuvo cambios de susceptibilidad frente a fluconazol en presencia de AE-O, dónde se produjo un aumento significativo en el halo de inhibición de fluconazol, clasificando como S (Figura 10).

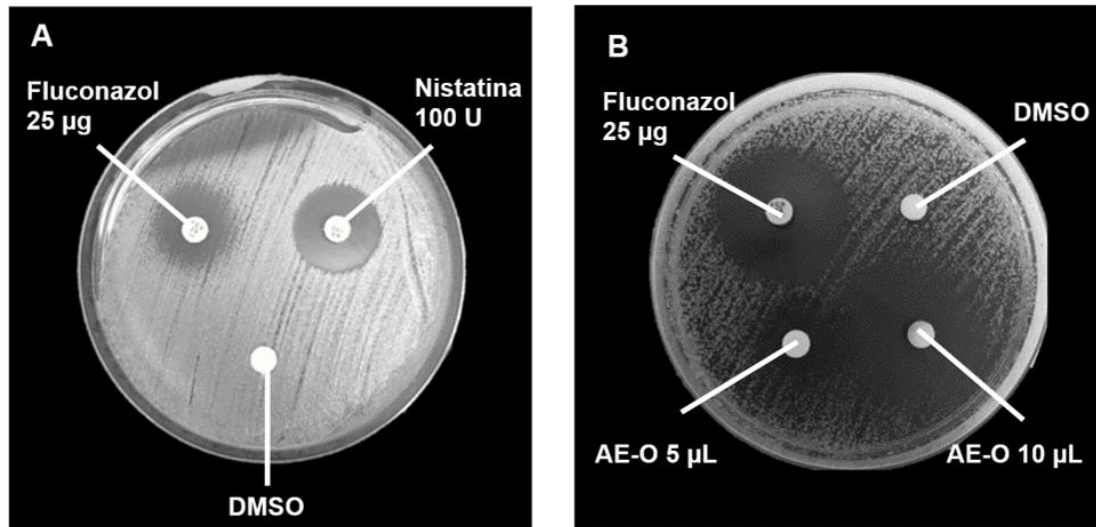


Figura 10. La cepa ATCC 10231 pierde la resistencia a fluconazol en presencia de AE-O : **(A)** Halo de inhibición de fluconazol menor a 14 mm, clasificada como R. **(B)** Halo de inhibición de fluconazol en presencia de AE-O, mayor a 19 mm, clasificada como S.

b) Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de las cepas de *Candida* spp. a fluconazol, nistatina y aceite esencial de orégano (AE-O). Una vez determinada la susceptibilidad de las cepas de *Candida* spp. se determinó la CIM del AE-O en cada una de ellas (Figura 11). Bajo nuestras condiciones experimentales, el valor de la CIM corresponde a la concentración que inhibe el 50% del crecimiento de especies del género *Candida* spp. (IC_{50}). Los IC_{50} obtenidos se detallan en la tabla 6. Se observa que las IC_{50} entre las cepas de *C. albicans* son similares, con valores entre 0,11 y 0,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lo que se observa también en las cepas no-*albicans*, dónde los valores se encuentran entre 2,61 y 5,33 $\mu\text{g}/\text{mL}$. De igual forma se determinó la CIM de las cepas para fluconazol y nistatina (Tabla 6). Para fluconazol, los IC_{50} obtenidos presentaron gran variabilidad; encontrándose entre 0,76 y 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para nistatina los IC_{50} se encontraron en un rango entre 0,33 y 3,52 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

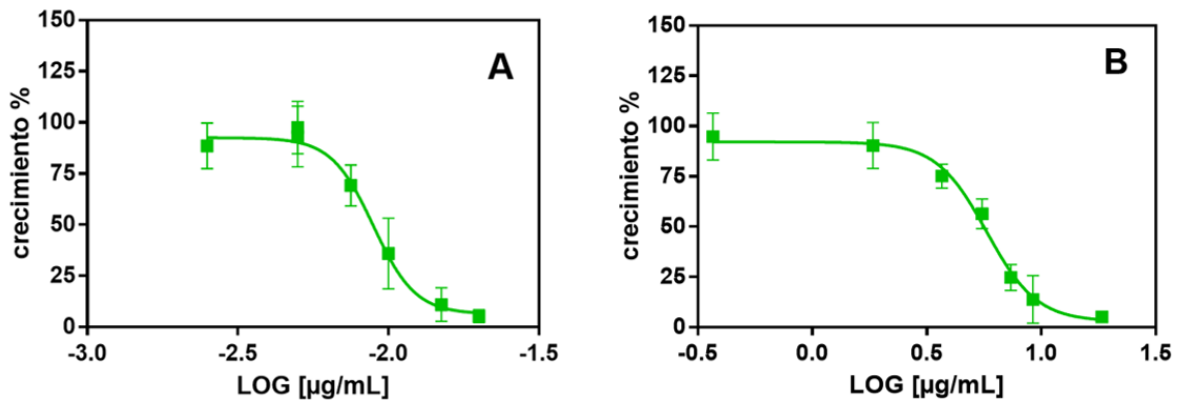


Figura 11. Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de orégano contra *Candida* spp. (A) Curva dosis-respuesta de la cepa ATCC 90029 (B) Curva dosis-respuesta de la cepa ATCC 6258. La figura corresponde a las curvas promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm DE.

Tabla 6: IC₅₀ promedio de fluconazol, nistatina y AE-O en las diferentes especies de *Candida* spp. ensayadas.

	ATCC 90029	ATCC 10231	ATCC 750	ATCC 6258	ATCC 2001	CD 36
Fluconazol	0,76 \pm 0,1	256 \pm 10	1,10 \pm 0,1	44,52 \pm 1,3	5,72 \pm 4,4	72,32 \pm 9
Nistatina	0,33 \pm 0,1	0,48 \pm 0,1	1,40 \pm 0,4	3,52 \pm 0,3	0,44 \pm 0,2	2,38 \pm 0,2
AE-O	0,11 \pm 0,01	0,12 \pm 0,01	3,78 \pm 0,5	5,33 \pm 0,9	2,61 \pm 0,2	4,13 \pm 0,1

Los resultados están expresados en $\mu\text{g/mL} \pm$ DE de al menos 3 experimentos independientes.

Objetivo específico 2. Determinación del efecto anti-*biofilm*.

a) Inhibición de adhesión. El proceso de adhesión es fundamental para la generación de *biofilms* de *C. albicans*. En este ensayo determinamos la capacidad de *C. albicans* de adherirse a una superficie abiótica (placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano), cómo un modelo de aproximación de lo que sucede en *C. albicans* ATCC 90029 y ATCC 10231, al adherirse en prótesis dentales removibles. El promedio de inhibición de la adhesión en presencia de AE-O para la cepa ATCC 90029, fue de un 15% para la concentración correspondiente a la mitad de la CIM; 35% para la concentración correspondiente a la CIM; y 66,5% para la concentración

correspondiente al doble de la CIM. Para la cepa ATCC 10231, el promedio de inhibición de adhesión fue de un 4% para la concentración de la mitad de la CIM, 35% para la concentración correspondiente a la CIM y 54% para la concentración correspondiente al doble de la CIM (Figura 12 y 13). Las 2 cepas de *C. albicans* ensayadas presentaron diferencias significativas entre el control sin tratamiento con respecto al tratamiento con AE-O ($p < 0,05$), con un efecto dependiente de la concentración al adicionar la CIM y el doble de la CIM (Figura 14). Fluconazol tuvo un comportamiento dosis-respuesta en la cepa ATCC 10231, sin embargo, este comportamiento no fue observado para la cepa ATCC 90029. Nistatina no presentó un comportamiento dosis-respuesta, por el contrario, aumentó la adhesión de forma significativa al utilizar la mitad de la CIM en la cepa ATCC 10231. Como se observa en la figura 12 y 13, ambos fármacos presentaron diferencias significativas con respecto al efecto inhibitorio del AE-O en ambas cepas.

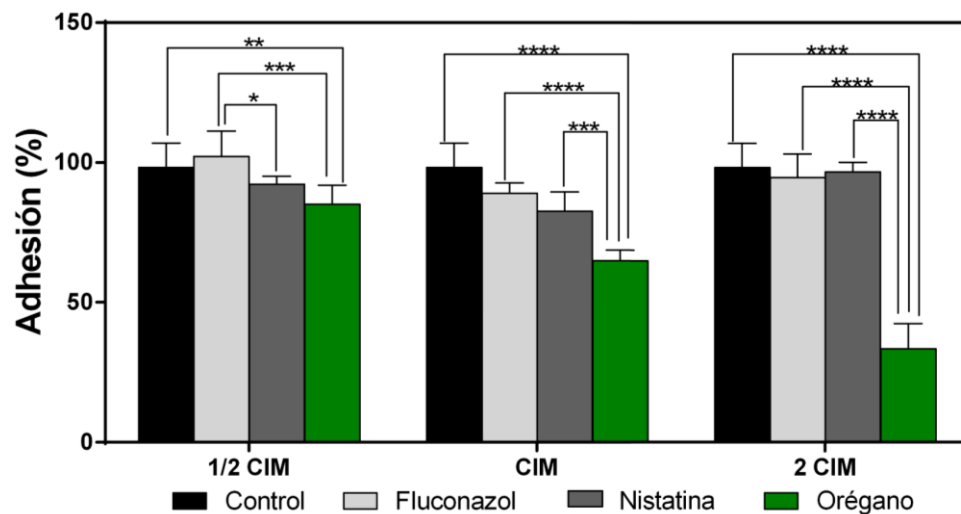


Figura 12. AE-O inhibe la adhesión de *C. albicans* sensible a fluconazol (ATCC 90029).

Las barras representan el porcentaje de células adheridas en presencia de los tratamientos en comparación con las células no tratadas $*p < 0,1$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$; $****p < 0,0001$ (ANOVA de 2 vías). Los valores representan al menos 3 experimentos independientes \pm DE.

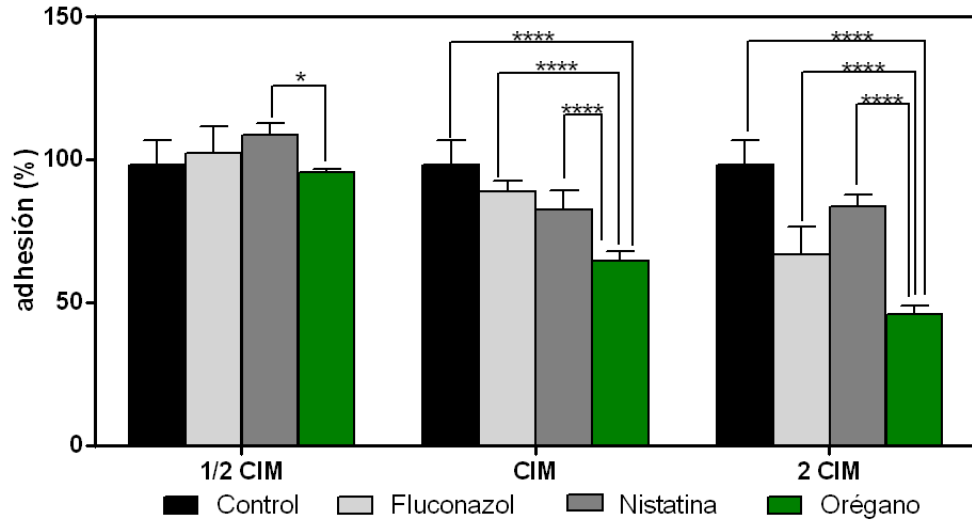


Figura 13. AE-O inhibe la adhesión de *C. albicans* resistente a fluconazol (ATCC 10231). Las barras representan el porcentaje de células adheridas en presencia de los tratamientos en comparación con las células no tratadas * $p < 0,1$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (ANOVA de 2 vías). Los valores representan al menos 3 experimentos independientes \pm DE.

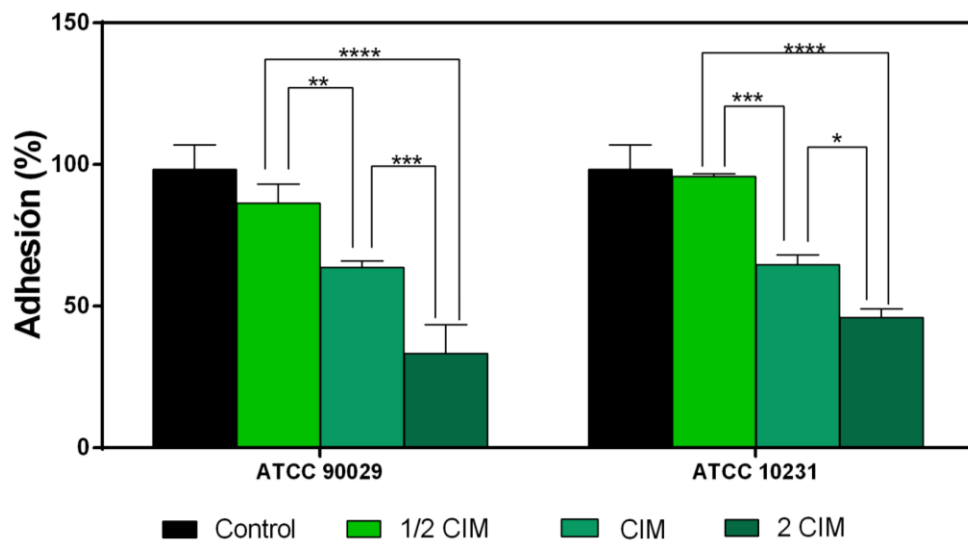


Figura 14. Inhibición de la adhesión de *C. albicans* por efecto del AE-O. Las barras representan el porcentaje de células adheridas en presencia de los tratamientos en comparación con las células no tratadas * $p < 0,1$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (ANOVA, 2 vías). Los valores representan al menos 3 experimentos independientes \pm DE.

b) Inhibición de la morfogénesis: Evaluación de la inhibición del cambio morfológico de *C. albicans* y no-*albicans*. El cambio morfológico de levadura a hifa o pseudohifa, forma parte de la formación y maduración del *biofilm* de *Candida* spp. Por este motivo luego de determinar el efecto inhibitorio del AE-O sobre la adhesión, evaluamos si era capaz de afectar el proceso de morfogénesis. En la Figura 15 se observa la morfología de las cepas bajo estudio tratadas con fluconazol, nistatina y AE-O, a través de microscopía óptica. Todas las cepas de *Candida* spp. estudiadas mostraron un efecto inhibitorio significativo del proceso de morfogénesis al ser incubadas con AE-O (Figura 16). El promedio de inhibición de la morfogénesis para *C. albicans* en presencia de AE-O fue de un 35% para la cepa ATCC 90029 y de un 41% para la cepa ATCC 10231. El promedio de inhibición de células filamentosas en presencia de AE-O en cepas no-*albicans* fue de un 33% para la cepa ATCC 750, de un 28% para la cepa ATCC 6258 y de un 42% para la cepa CD 36. A diferencia del AE-O, fluconazol presentó una inhibición de la morfogénesis de forma significativa sólo en *C. tropicalis* ATCC 750. Nistatina, por su parte, sólo tuvo un efecto inhibitorio estadísticamente significativo en *C. albicans* ATCC 10231.

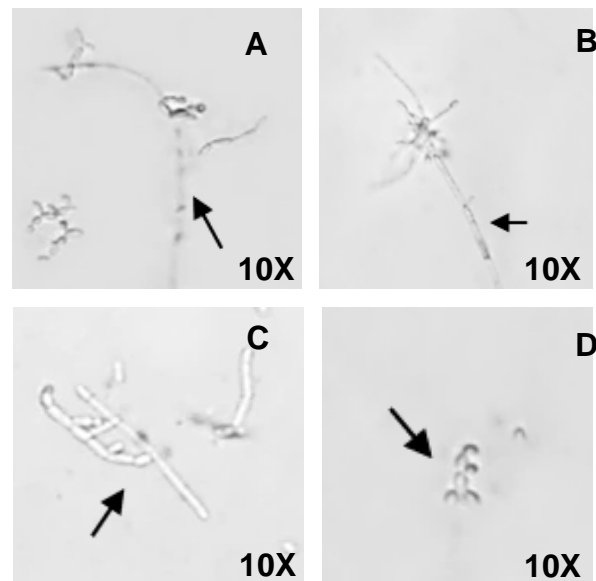


Figura 15. Efecto de fluconazol, nistatina y AE-O sobre células filamentosas de *C. albicans* y no-*albicans*. **A:** *C. albicans* ATCC 90029 sin tratamiento **B:** *C. albicans* ATCC 90029 tratada con fluconazol **C:** *C. albicans* ATCC 90029 tratada con nistatina **D:** *C. albicans* ATCC 90029 tratada con AE-O. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio óptico con un aumento de 10x.

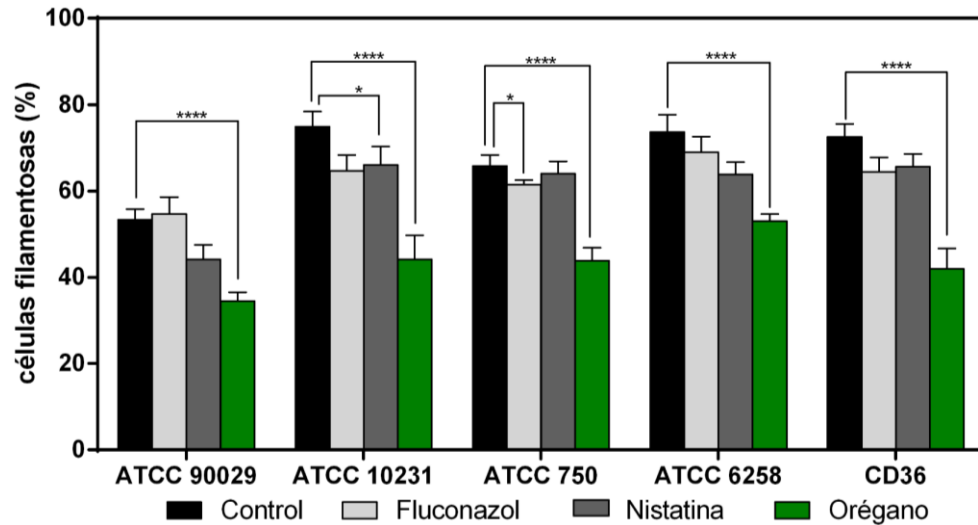


Figura 16. Inhibición de la filamentación de células plantónicas de *C. albicans* y no-*albicans*. Las barras representan el porcentaje de células filamentosas al ser incubadas en presencia de los tratamientos en comparación con las células no tratadas * $p < 0,1$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (ANOVA de 2 vías). Los valores representan al menos 3 experimentos independientes \pm DE.

c) Inhibición de la viabilidad de los *biofilms*. Una vez determinado el efecto del AE-O en la formación de *biofilm* de *Candida* spp., específicamente en cuanto a su adhesión y morfogénesis; evaluamos el efecto sobre la viabilidad. El AE-O disminuyó la viabilidad de *C. albicans* sensible (ATCC 90029) y resistente a fluconazol (ATCC 10231) (Figura 17). El IC_{50} obtenido para ATCC 90029 fue de $0,424 \mu\text{g/mL}$ y para ATCC 10231 fue de $0,127 \mu\text{g/mL}$. La viabilidad de los *biofilms* también se determinó en presencia de fluconazol, en dónde se observó un aumento en la viabilidad celular en ambas cepas, siendo no dependiente de la concentración (Figura 18). Al ensayar la viabilidad de las cepas en presencia de nistatina, se observó una disminución de la viabilidad de *C. albicans* en ambas cepas, con un efecto dosis-respuesta. El IC_{50} obtenido para ATCC 90029 fue de $16,69 \mu\text{g/mL}$ y para ATCC 10231 fue de $17,66 \mu\text{g/mL}$ (Tabla 7).

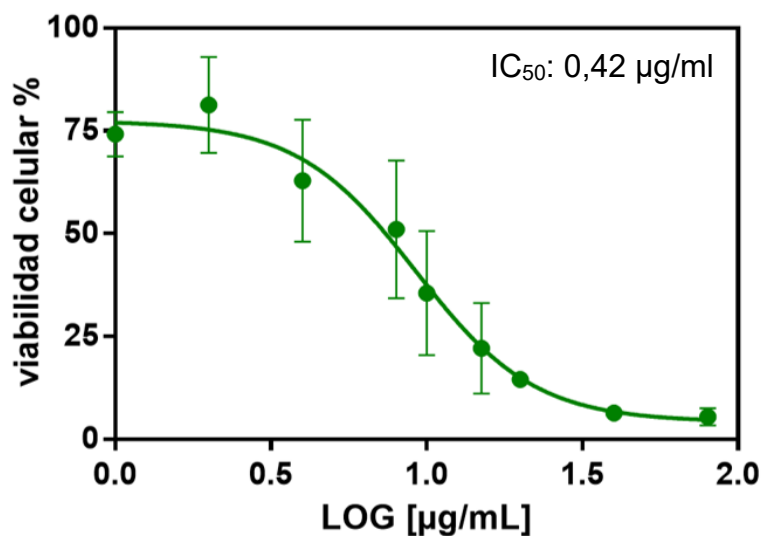


Figura 17. AE-O disminuye la viabilidad celular de *biofilms* de *C. albicans* sensible a fluconazol. El gráfico corresponde a la curva de viabilidad celular de ATCC 90029. Los valores representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm DE.

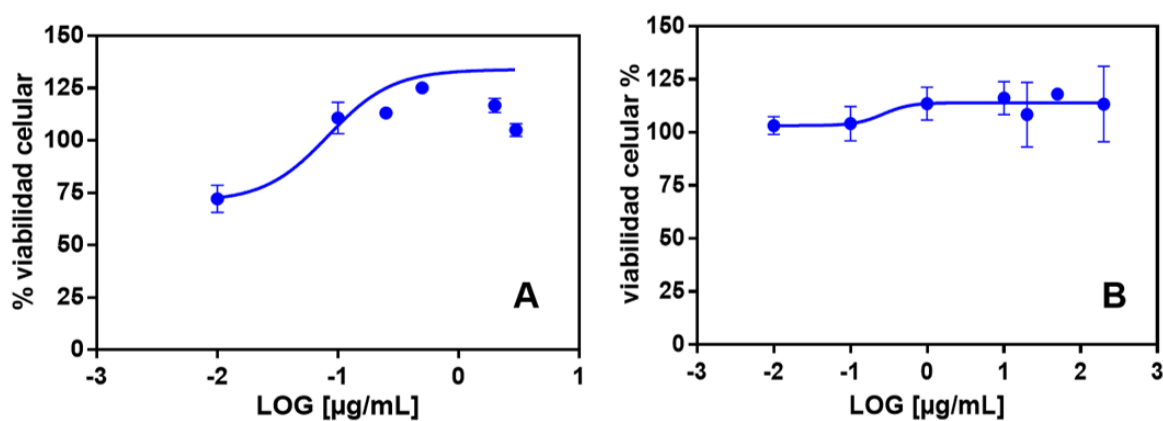


Figura 18. Fluconazol aumenta la viabilidad celular de *biofilms* de *C. albicans*. (A) ATCC 90029 (B) ATCC 10231. Las figuras corresponden a curvas concentración-respuesta de al menos 3 experimentos independientes \pm DE.

Tabla 7: Inhibición de la viabilidad celular de cepas de *Candida albicans* por efecto de fluconazol, nistatina y AE-O

	ATCC 90029	ATCC 10231
Fluconazol	ND	ND
Nistatina	12,7±0,2	17,7±5,2
AE-O	0,42±0,5	0,11±0,6

Los resultados corresponden al IC₅₀, se expresan en µg/mL ± DE y corresponden al menos a 3 experimentos independientes. ND: no determinado, ya que los resultados obtenidos del tratamiento con fluconazol no fueron concentración dependiente.

d) Inhibición de formación de *biofilm* (ensayo de la herida). Una vez evaluado el efecto sobre la formación de *biofilm* en las diferentes etapas y en su viabilidad después de 24 h, determinamos el efecto del AE-O sobre la capacidad de reparación de un *biofilm* formado de *C. albicans*, a través de la realización de una herida (Figura 19 y 20). El AE-O presentó una capacidad de inhibición de la formación y reparación de un nuevo *biofilm* significativa en ambas cepas de *C. albicans* (Figura 21). El *biofilm* de ATCC 90029 al ser tratada con el IC₅₀ de AE-O presentó un cierre de herida de un 1,8%, en comparación al control, en la cepa ATCC 10231 la herida del *biofilm* tuvo un cierre de un 13%. Al adicionar fluconazol, aumentó significativamente la formación de *biofilm* en la cepa ATCC 90029, donde la herida tuvo un cierre de 72%, mientras el control sin tratamiento tuvo un cierre de 56%. Fluconazol no tuvo efecto en la formación de *biofilm* de ATCC 10231. Nistatina no tuvo efecto en la formación del *biofilm* en ninguna de las cepas ensayadas de *C. albicans*.

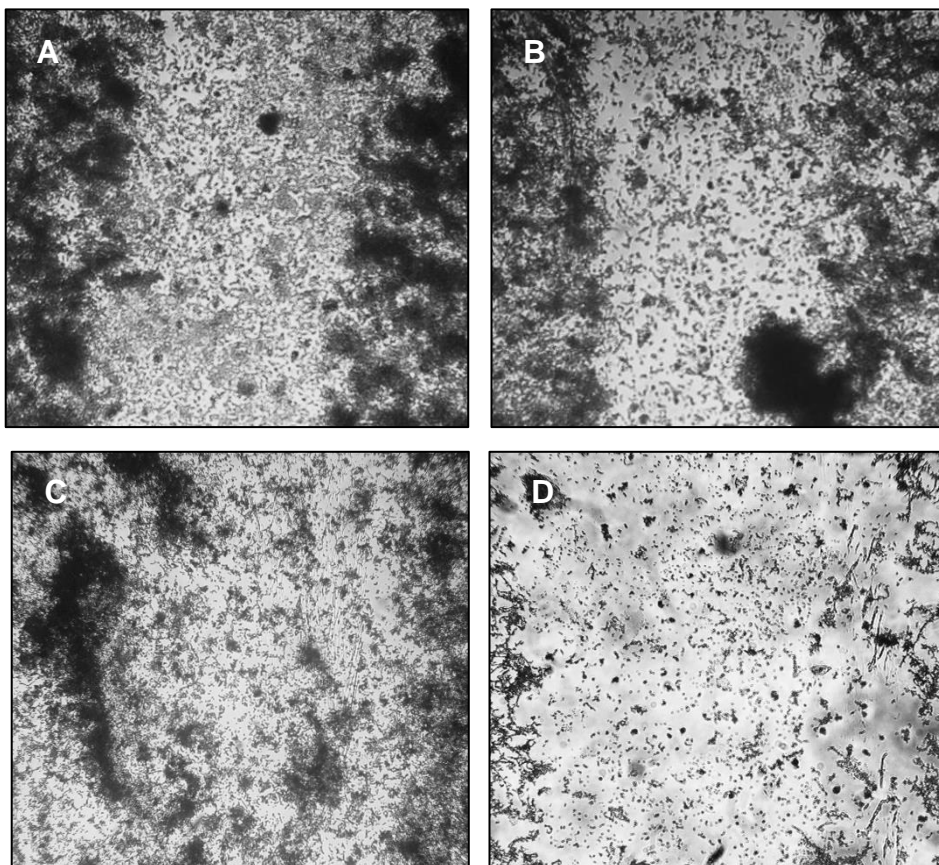


Figura 19. AE-O disminuye la reparación y formación de *biofilm* de *C. albicans* ATCC 90029. A: Control sin tratamiento **B:** Tratada con fluconazol **C:** Tratada con nistatina **D:** Tratada con AE-O. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio de fase invertida con un aumento 40X, después de 24 h de incubación con la concentración correspondiente al IC_{50} en cada tratamiento.

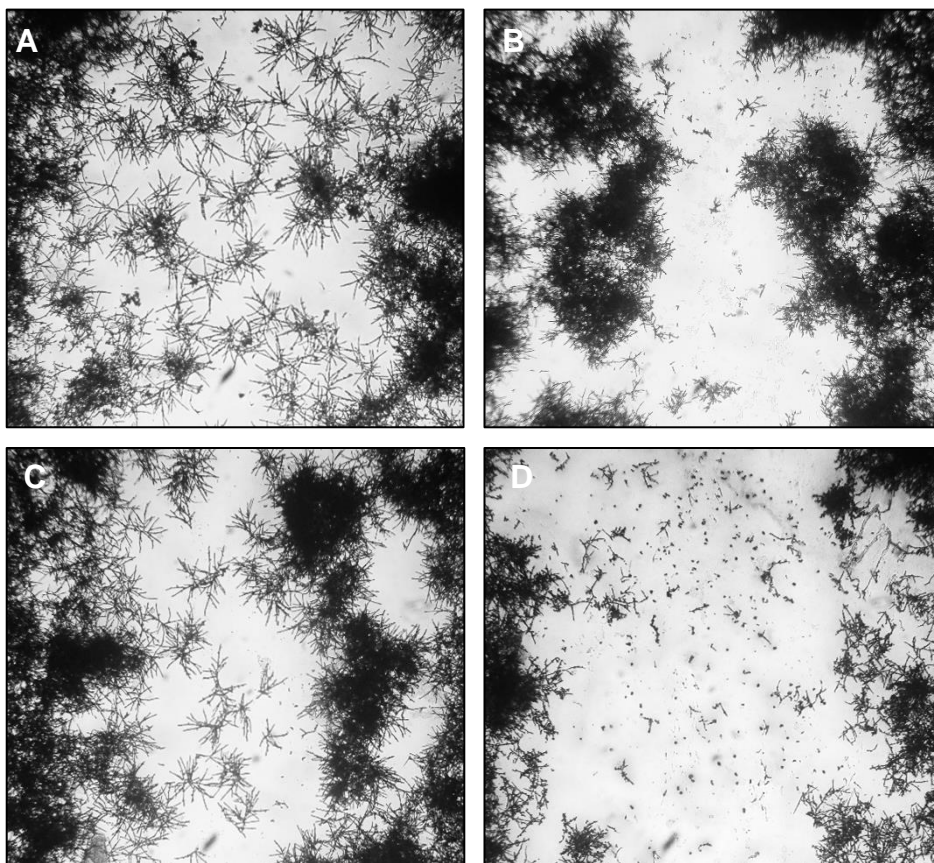


Figura 20. AE-O disminuye la reparación y formación de *biofilm* de *C. albicans* ATCC 10231. A: Control sin tratamiento B: Tratada con fluconazol C: Tratada con nistatina D: Tratada con AE-O. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio de fase invertida con un aumento 40X, después de 24 h de incubación con la concentración correspondiente al IC_{50} en cada tratamiento.

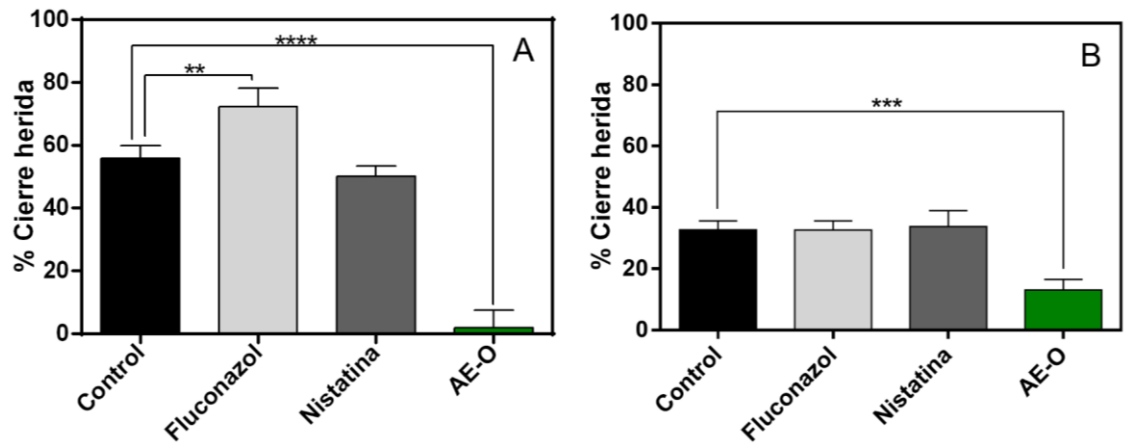


Figura 21. AE-O disminuye la reparación y formación de *biofilm* de *C. albicans*. A: ATCC 90029. **B:** ATCC 10231. Las barras representan el porcentaje de cierre de la herida respecto al control, la concentración ensayada corresponde al IC₅₀ de cada tratamiento. **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 (ANOVA de 1 vía). Los valores representan al menos 3 experimentos independientes ± DE.

Objetivo específico 3. Evaluación del efecto antifúngico de las combinaciones de fármacos.

a) **Susceptibilidad de células planctónicas de *C. albicans* en presencia de AE-O combinado con fluconazol y AE-O combinado con nistatina.** Una vez determinado el efecto anti-*biofilm* del AE-O, se determinó si su combinación con fluconazol o nistatina potenciaba el efecto antifúngico de estos fármacos en células planctónicas. Se realizó un análisis de Loewe, para cada combinación de fármacos; AE-O con fluconazol y AE-O con nistatina, para cada cepa de *C. albicans* ensayada. En la cepa ATCC 90029 la combinación de fluconazol con AE-O presentó un efecto aditivo y sinérgico dependiente de la concentración (Figura 22). Al utilizar altas concentraciones de fluconazol y altas concentraciones de AE-O, se observa un efecto sinérgico, al igual que al utilizar altas concentraciones de fluconazol y bajas concentraciones de AE-O. La curva dosis-respuesta de fluconazol tuvo una modificación de un 60% en presencia de AE-O, ya que el efecto del AE-O aumentó el efecto de fluconazol, disminuyendo la CIM (Figura 23). En la cepa ATCC 10231 al ensayar fluconazol en combinación con AE-O, se observó un efecto sinérgico en altas concentraciones de AE-O y fluconazol. La curva de dosis-respuesta de fluconazol en presencia de AE-O de ATCC 10231 tuvo una variación de un 40%.

Nistatina tuvo un efecto similar al fluconazol en combinación con AE-O (Figura 22). En la cepa ATCC 90029 la combinación de nistatina con AE-O tuvo un efecto de aditividad. A altas concentraciones de nistatina y altas concentraciones de AE-O presentó un efecto sinérgico. La curva dosis-respuesta de la nistatina varió en presencia del AE-O en un 45% (Figura 23). En la cepa ATCC 10231 la combinación de nistatina con AE-O presentó un efecto sinérgico o aditivo, en dónde a bajas concentraciones de nistatina y AE-O tuvieron un efecto sinérgico, lo que ocurrió también a altas concentraciones de nistatina y AE-O, teniendo una modificación de la curva dosis-respuesta de la nistatina de hasta un 80%.

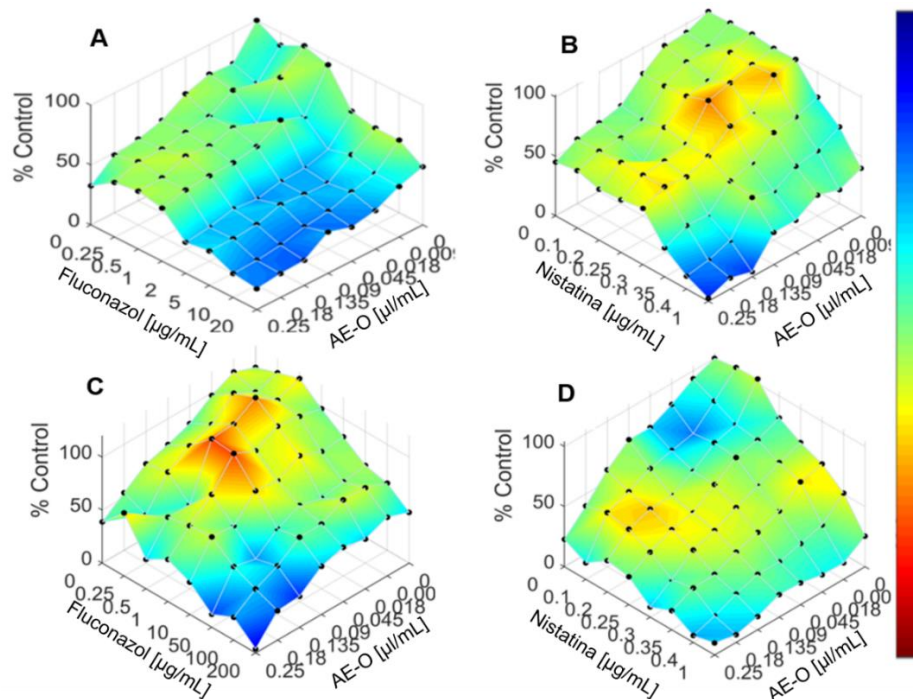


Figura 22. AE-O potencia el efecto antifúngico de fluconazol y nistatina dependiente de la concentración en células planctónicas de *C. albicans*. (A) ATCC 90029 tratada con fluconazol y AE-O (B) ATCC 90029 tratada con nistatina y AE-O (C) ATCC 10231 tratada con fluconazol y AE-O (D) ATCC 10231 tratada con nistatina y AE-O. Azul: indica un efecto sinérgico. Verde: indica un efecto aditivo. Rojo: indica un efecto antagónico. En el eje X se observan las curvas dosis respuesta del AE-O en presencia en combinación con nistatina o fluconazol. En el eje Z se observan las curvas dosis-respuesta de nistatina en combinación o fluconazol con AE-O, en el eje Y se observa el % de crecimiento celular en presencia de las diferentes concentraciones. La figura corresponde a un mapa promedio concentración-respuesta de al menos 2 experimentos independientes.

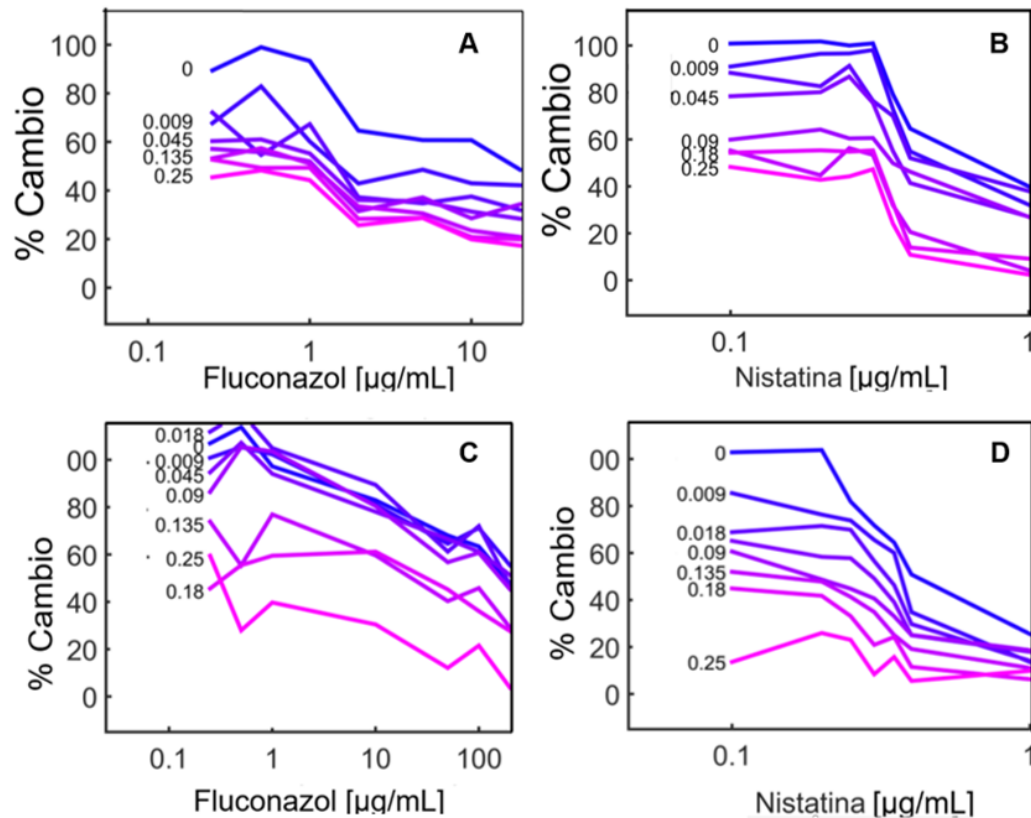


Figura 23. AE-O modifica la curva dosis-respuesta de fluconazol y nistatina dependiente de la concentración en células planctónicas de *C. albicans*. (A) ATCC 90029 tratada con fluconazol y AE-O (B) ATCC 90029 tratada con nistatina y AE-O (C) ATCC 10231 tratada con fluconazol y AE-O (D) ATCC 10231 tratada con nistatina y AE-O. Azul: indica la curva de efecto sin AE-O. Morado-rosado: indica la curva de efecto del fármaco en combinación con AE-O en las diferentes concentraciones ensayadas. A medida que existe una mayor concentración de AE-O, es necesaria una menor concentración de fármaco para inhibir el crecimiento celular, por lo tanto, existe una mayor variación de la curva respecto al control sin AE-O. La figura corresponde a curvas promedio concentración-respuesta de al menos 2 experimentos independientes.

b) Susceptibilidad de *biofilms* de *C. albicans* en presencia de AE-O combinado con fluconazol y AE-O combinado con nistatina. Luego de determinar el efecto de la combinación del AE-O con nistatina o fluconazol en células planctónicas, se determinó el efecto de estas combinaciones sobre *biofilm*. Al igual que en células planctónicas, se realizó el análisis de Loewe y se ensayó la combinación de fluconazol con AE-O y nistatina con AE-O. En la cepa ATCC 90029

la combinación de fluconazol con AE-O, presentó un efecto sinérgico en todas las concentraciones (Figura 24). La curva dosis-respuesta de fluconazol tuvo una modificación de un 90%, respecto al tratamiento de fluconazol solo. En la cepa ATCC 10231, esta combinación tuvo un efecto sinérgico cuando fluconazol se combinó con bajas concentraciones de AE-O, sin embargo, a altas concentraciones de AE-O tuvo un efecto aditivo (Figura 24). La curva dosis-respuesta de fluconazol en presencia de AE-O de la cepa ATCC 10231 tuvo una variación del 85% respecto al tratamiento de fluconazol solo (Figura 25). La combinación de nistatina con AE-O en la cepa ATCC 90029 tuvo un efecto sinérgico al combinar bajas concentraciones de nistatina con AE-O. La curva de dosis-respuesta de nistatina tuvo una variación de un 85% respecto al tratamiento sin combinación. En la cepa ATCC 90029 esta combinación presentó un efecto sinérgico a bajas concentraciones de nistatina y de AE-O. La curva de nistatina se modificó en un 90%. En la cepa ATCC 10231 la combinación de nistatina con AE-O presentó un efecto sinérgico en todas las combinaciones, aunque fue más potente a bajas concentraciones de AE-O. La curva de nistatina tuvo una modificación mayor al 80% respecto al control sin AE-O.

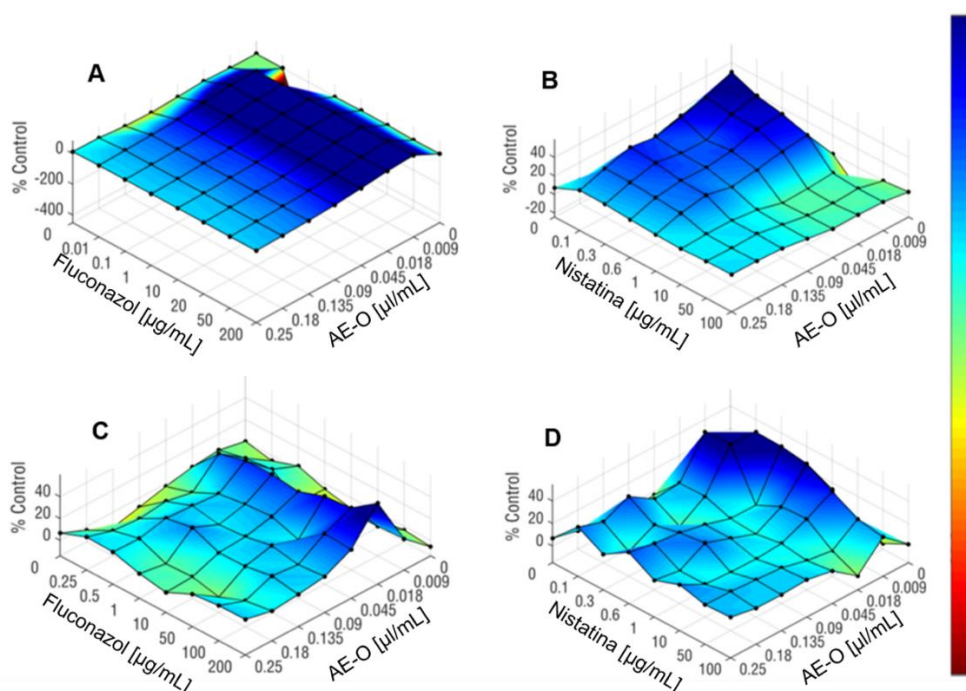


Figura 24. AE-O potencia el efecto anti-*biofilm* de fluconazol y nistatina dependiente de la concentración en *biofilms* de *C. albicans*. (A) ATCC 90029 tratada con fluconazol y AE-O (B) ATCC 90029 tratada con nistatina y AE-O (C) ATCC 10231 tratada con fluconazol y AE-O (D) ATCC 10231 tratada con nistatina y AE-O. Azul: indica un efecto sinérgico. Verde: indica un efecto aditivo. Rojo: indica un efecto antagónico. La figura corresponde a un mapa promedio concentración-respuesta de al menos 2 experimentos independientes.

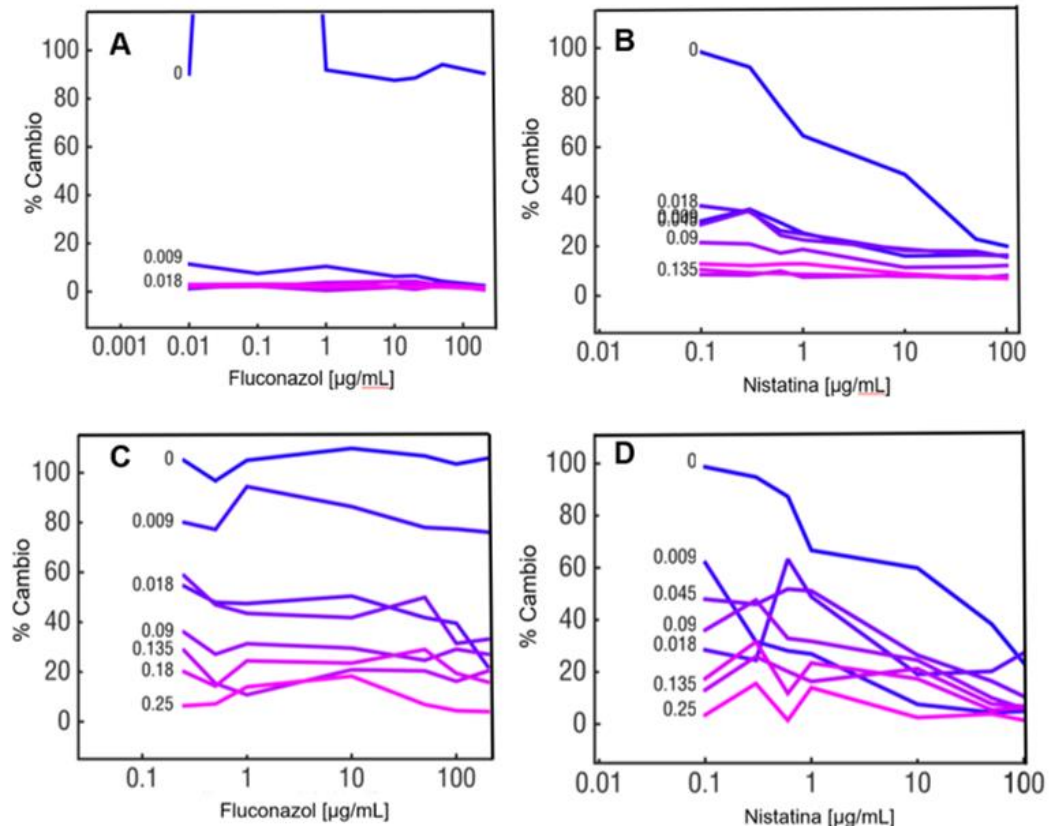


Figura 25. AE-O modifica la curva dosis-respuesta de fluconazol y nistatina dependiente de la concentración en *biofilms* de *C. albicans*. (A) ATCC 90029 tratada con fluconazol y AE-O (B) ATCC 90029 tratada con nistatina y AE-O (C) ATCC 10231 tratada con fluconazol y AE-O (D) ATCC 10231 tratada con nistatina y AE-O. Azul: indica la curva de efecto anti-*biofilm* sin AE-O. Morado-rosado: indica la curva de efecto anti-*biofilm* en presencia de AE-O en las diferentes concentraciones ensayadas. A medida que existe una mayor concentración de AE-O, es necesaria una menor concentración de fármaco para inhibir el crecimiento celular, por lo tanto, existe una mayor variación de la curva respecto al control sin AE-O. La figura corresponde a curvas promedio concentración-respuesta de al menos 2 experimentos independientes.

7. DISCUSIÓN

El efecto antifúngico del aceite esencial de orégano (AE-O) ha sido estudiado por diversos autores en cuanto a su capacidad para inhibir el crecimiento de hongos a través de ensayos de disco y de la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM), con resultados variables. Se han observado halos de inhibición para el AE-O de 30 a 42 mm de diámetro en *C. albicans* y de 32 a 36 mm en *C. no-albicans* (Bhat y cols., 2018; Helal y cols., 2019), y CIM entre 0,024 y 300 µg/mL para *C. albicans* y *no-albicans*, respectivamente (Manohar y cols., 2001; Cleff y cols., 2010; Vale-Silva y cols., 2011; Miller y cols., 2014; Sharifzadeh y Shoki, 2016; Brochot y cols., 2017; Bhat y cols., 2018; Ebani y cols., 2018; Helal y cols., 2019). Lo descrito por estos autores, concuerda con nuestros resultados, en donde el rango del halo de inhibición de *C. albicans* se observó entre 20 y 50 mm, y en *C. no-albicans* entre 12 y 19 mm. Con respecto a las CIMs, se determinó un rango de 0,11 y 0,12 µg/mL en *C. albicans* y entre 2,61 y 5,33 µg/mL en *C. no-albicans*.

Las diferencias entre los resultados obtenidos en nuestro estudio y los resultados realizados por otros autores, se puede deber a las diferencias en la elaboración y composición del aceite esencial. La zona geográfica de cultivo, la temporada de cosecha, el método de secado de la planta y el método de extracción, junto con los solventes utilizados, las cepas empleadas y algunas variaciones metodológicas según las condiciones propias del laboratorio, son factores que influyen en las características farmacológicas del aceite esencial, por lo que pueden justificar las diferencias observadas en los resultados de los distintos estudios realizados.

Según los resultados obtenidos, sólo en la cepa ATCC 10231 hubo diferencias entre los halos de inhibición en los discos de fluconazol incubadas en presencia y ausencia de AE-O. El halo de inhibición del disco de fluconazol sin AE-O fue de 12 mm, y con AE-O fue de 24 mm, pasando de ser una cepa clasificada resistente a sensible. Este efecto, posiblemente se debe a los componentes volátiles del AE-O que afectaron la resistencia de esta cepa a fluconazol; sin embargo, es

necesario realizar más estudios para poder comprobar el efecto sensibilizante del AE-O en *C. albicans* resistentes a fluconazol.

Existen escasos estudios del efecto anti-*biofilm* de aceites esenciales en modelos *in vitro* sobre *Candida* spp. Se ha reportado un efecto anti-*biofilm* del aceite esencial de laurel, árbol del té, salvia y citronela, y también se han realizado estudios de los componentes aislados de los aceites esenciales, como terpenos (Ramage y cols., 2012; Sujdana y cols., 2012; Raut y cols., 2013; Peixoto y cols., 2017; Sookto y cols., 2013; Guandalini y cols., 2020). A diferencia de los estudios descritos por los autores recién mencionados, este trabajo representa el primer estudio sistemático del efecto antifúngico y anti-*biofilm* del aceite esencial de orégano, en el cual se evaluó su efecto en las distintas etapas de formación del *biofilm* y sobre un *biofilm* maduro de *Candida* spp. Raut y cols. (2013), evaluó el efecto sobre *biofilm* de *C. albicans* de algunos componentes aislados de aceites esenciales, donde determinó que estos compuestos disminuyen de forma significativa la adhesión, morfogénesis y viabilidad de *biofilms*. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en este estudio, en donde se observó una disminución significativa de la adhesión de *C. albicans*. El AE-O inhibió en promedio un 35% la adhesión de las células a las placas de poliestirenos en una concentración correspondiente a la CIM, a diferencia de lo que ocurría con los antifúngicos convencionales estudiados, en donde no presentaron efecto sobre la adhesión y en el caso específico de la nistatina, se observó un aumento de la capacidad de adhesión de *C. albicans*. También se observó que el AE-O fue capaz de inhibir la morfogénesis tanto de *C. albicans* y no-*albicans*, disminuyendo significativamente entre un 28 a un 42% las células filamentosas respecto al control, en contraste con el efecto de fluconazol y nistatina, que sólo mostraron una disminución significativa en la cepa ATCC 10231 y ATCC 750, respectivamente.

Asimismo, nuestros resultados fueron concordantes con los de otros autores en la disminución de la viabilidad de *biofilms* ensayadas con otros aceites esenciales. El AE-O disminuyó la viabilidad de los *biofilms* y su capacidad reparativa en concentraciones similares a las utilizadas sobre células planctónicas, a diferencia

de los antifúngicos convencionales utilizados. Nistatina disminuyó la viabilidad de los *biofilms* de *C. albicans* a una concentración casi 40 veces mayor a la utilizada en células planctónicas, y fluconazol aumentó la viabilidad de los *biofilms* mostrando un efecto similar al “efecto paradójico” descrito para las equinocandinas (Walraven y cols., 2015). En la literatura existen diferentes hipótesis acerca del efecto antifúngico y anti-*biofilm* de los aceites esenciales. Varios estudios han demostrado que el potencial antifúngico en células planctónicas se debe a un efecto disruptivo de la membrana plasmática, interfiriendo y/o inhibiendo la formación de ergosterol, provocando inhibición del crecimiento y muerte celular (Kedia y cols., 2016). También se ha visto que pueden interferir en la formación de β -glucanos, alterando la formación de la pared celular (Tian y cols., 2012; Kedia y cols., 2016; Dwivedy y cols., 2017). Otro efecto descrito es la alteración del potencial de membrana mitocondrial, con una disminución de la producción de ATP, un aumento de las especies reactivas de oxígeno intracelular y la inhibición de las bombas de eflujo (da Cruz, 2013). El efecto anti-*biofilm* de algunos aceites esenciales adicionalmente se podría deber a la capacidad de bloquear la transición de célula levaduriforme a hifa reduciendo la expresión de algunos genes responsables del crecimiento de las hifas (*EFG1*, *CPH1*, *TEC1*, *EED1*, *UME6*, *HGC1*), reduciendo la hidrofobicidad de las células de *Candida* spp., inhibiendo la formación de farnesol (molécula crucial en el *quorum sensing*) e inhibiendo la producción de micotoxinas (Hammer y cols., 2004; Peleg y cols., 2010; Curvelo y cols., 2014).

Por otro lado, se ha observado un efecto sinérgico de algunos aceites esenciales con antifúngicos convencionales. Se ha descrito que el aceite esencial de olíbano, canelo, geranio y cajeput en combinación con fluconazol han presentado un efecto sinérgico sobre células planctónicas en cepas de *C. albicans* (Sadhasivam y cols., 2016; Essid y cols., 2017; Zhang y cols., 2018). Este efecto también se ha observado en la combinación de aceite esencial de tomillo con fluconazol sobre *biofilms* de *C. albicans* (Jafri y Ahmad, 2019). Estos estudios concuerdan con nuestros resultados, en donde el AE-O presentó un efecto sinérgico en combinación con fluconazol tanto en células planctónicas, como en *biofilms* de *C. albicans* sensibles y resistentes a fluconazol. Otros autores han evaluado el efecto de aceites

esenciales en combinación con nistatina, en donde han observado que el aceite esencial de geranio, árbol del té y orégano en combinación con nistatina, presentan un efecto sinérgico (Sadhasivam y cols., 2016; Essid y cols., 2017; Zhang y cols., 2018). Además, el aceite esencial que tuvo un mayor efecto sinérgico bajo las mismas condiciones experimentales fue el de *Origanum vulgare* según Rosato y cols. (2009). Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en nuestro estudio, en donde el AE-O mostró un efecto sinérgico en combinación con nistatina, sobre células planctónicas y sobre *biofilms*. Sin embargo, los estudios realizados por otros autores presentaron diferencias metodológicas en cuanto al análisis de resultados respecto a este estudio. Ellos evaluaron los efectos de la combinación en términos de un efecto sinérgico, antagónico o de aditividad, a través de la construcción de un isoblograma, basados en el “índice de combinación”. Este índice corresponde a un parámetro arbitrario, en donde el investigador puede elegir el resultado de la combinación más útil para calcularlo (Huang y cols., 2019). En el presente estudio, se realizó un análisis de construcción de isoblograma a través de un software específico (Combeneft), en donde se efectúa un análisis considerando los resultados de todas las combinaciones realizadas, integrando todos los resultados, siendo más objetivo y no dependiente del investigador. Al tener diferencias metodológicas, no se puede realizar una comparación objetiva de los resultados obtenidos por otros autores, que han estudiado la combinación de aceites esenciales y antifúngicos convencionales con metodologías que ahora están siendo actualizadas por unas más sofisticadas gracias al avance en programas computacionales.

Esta investigación es la primera en estudiar y comprobar el efecto antifúngico y anti-*biofilm* del aceite esencial de orégano sobre especies del género *Candida* spp. Si bien es necesario seguir investigando para poder descubrir los mecanismos específicos por los cuáles actúa, demuestra que el aceite esencial de orégano es una opción viable como potencial antifúngico y anti-*biofilm* en especies resistente de *Candida* spp. El aceite esencial de orégano mostró un efecto en todas las etapas de formación del *biofilm*, además, fue capaz de disminuir la viabilidad en *biofilms* maduros, siendo útil en infecciones resistentes a los tratamientos convencionales,

con las ventajas de ser más seguro y accesible. Además, puede ser utilizado como un potencial coadyuvante en el tratamiento de candidiasis con antifúngicos convencionales como fluconazol y nistatina. Puede ayudar a disminuir las dosis necesarias y seguir manteniendo un efecto antifúngico y anti-*biofilm*, disminuyendo la toxicidad de estos tratamientos, ampliado su rango de seguridad y evitando la interacción farmacológica en pacientes con otros tratamientos. Esto es de vital importancia ya que, en los grupos de mayor riesgo de candidiasis oral, es frecuente que reciban varios medicamentos a la vez, por lo que terapias menos tóxicas permiten mejorar las condiciones de salud y la calidad de vida de estos pacientes.

Con los resultados obtenidos en este trabajo y el análisis de estos podemos determinar que la hipótesis planteada fue aceptada para *Candida albicans*, ya que se demostró que el AE-O presentaba un efecto antifúngico y anti-*biofilm* tanto en *C. albicans* sensible y resistente a fluconazol, y la capacidad de potenciar el efecto de fluconazol y nistatina sobre células planctónicas y *biofilm* de *C. albicans*, sin embargo, debido a las condiciones experimentales no fue posible determinar el efecto anti-*biofilm* sobre otras especies del género *Candida* spp, por lo que para estas especies no es posible aceptar o rechazar nuestra hipótesis.

No se debe olvidar la importancia de la educación al paciente y el manejo de los factores de riesgo. Se debe empoderar al paciente, y convertirlo en un participante activo en su salud. El paciente es el primero que debe velar por su cuidado, ya que la mejor terapia en cualquier enfermedad bucal, especialmente en la candidiasis oral, es la prevención. Si el paciente cuida su salud bucal y maneja con cuidado los factores de riesgo, el éxito del tratamiento debiera estar garantizado.

Consideramos que este trabajo, a pesar de haber sido realizado con metodologías *in vitro*, abre posibilidades de obtener terapias combinadas de fármacos sintéticos con fármacos en base a productos naturales, que permitan controlar la eficacia y seguridad de los tratamientos disponibles hoy en día. Estos resultados abalan el uso de aceites esenciales como alternativas o potenciadores

de antifúngicos comúnmente usados en Odontología. Al ser más eficientes en el uso de antimicrobianos y ayudar a disminuir la resistencia a los antimicrobianos, específicamente a los antifúngicos, estamos contribuyendo al uso responsable de los medicamentos.

8. CONCLUSIONES

- El AE-O es una alternativa para el desarrollo de nuevas formulaciones para el tratamiento de la candidiasis oral, ya que es efectivo como agente antifúngico y anti-*biofilm* sobre *C. albicans*, que corresponde al agente más común en esta patología.
- El uso del AE-O puede ser como terapia única, ya que demostró ser eficaz a dosis similares en células planctónicas y *biofilms*.
- El uso del AE-O también puede ser utilizado en combinación con antifúngicos convencionales, como fluconazol y nistatina, ya que demostró poseer un efecto sinérgico con estos fármacos, lo que permite el uso de menores dosis tanto de aceite esencial, como de los antifúngicos.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, J., Bodey, G. P., Hanna, H. A., Mardani, M., Girgawy, E., Abi-Said, D., Raad, I. (2000). *Candida krusei* Fungemia. *Archives of Internal Medicine*, 160(17), 2659.

Akpan A, Morgan R. (2002). Oral candidiasis. *Clinics in Dermatology*, 34(4), 487–494.

Albuquerque, C. Hermosilla, G. Tapia C. (2009.). Distribución y susceptibilidad a fluconazol de levaduras del género *Candida*. *Revista Chilena de Infectología*, 26(5):435–439.

Alves-Silva, J. M., Dias dos Santos, S. M., Pintado, M. E., Pérez-álvarez, J. A., Fernández-López, J., y Viuda-Martos, M. (2013). Chemical composition and in vitro antimicrobial, antifungal and antioxidant properties of essential oils obtained from some herbs widely used in Portugal. *Food Control*, 32(2), 371–378.

Arendrup, M. C., Cuenca-Estrella, M., Lass-Flörl, C., y Hope, W. (2017). EUCAST DOCUMENTO DEFINITIVO 7.2 .Revisión Método de dilución en caldo para la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias de antifúngicos para levaduras.

Beech, N., Robinson, S., Porceddu, S., & Batstone, M. (2014). Dental management of patients irradiated for head and neck cancer. *Australian Dental Journal*, 59(1), 20–28.

Bhat, V., Sharma, S. M., Shetty, V., Shastry, C. S., Rao, C. V., Shenoy, S., Saha, S., & Balaji, S. (2018). Characterization of Herbal Antifungal Agent, *Origanum vulgare* against Oral *Candida* spp. Isolated from Patients with *Candida*-Associated Denture Stomatitis: An *In vitro* Study. *Contemporary clinical dentistry*, 9(5): 3-10.

Borges, R. S., Ortiz, B., Pereira, A., Keita, H., & Carvalho, J. (2019). *Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. *Journal of ethnopharmacology*, 229, 29–45.

Brochot, A., Guilbot, A., Haddioui, L., & Roques, C. (2017). Antibacterial, antifungal, and antiviral effects of three essential oil blends. *Microbiology Open*, 6(4), e00459.

Calandra, T., Roberts, J. A., Antonelli, M., Bassetti, M., & Vincent, J. L. (2016). Diagnosis and management of invasive candidiasis in the ICU: an updated approach to an old enemy. *Critical care (London, England)*, 20(1), 125.

Cardoso, N. N. R., Alviano, C. S., Blank, A. F., Romanos, M. T. v., Fonseca, B. B., Rozental, S., Rodrigues, I. A., y Alviano, D. S. (2016). Synergism Effect of the Essential Oil from *Ocimum basilicum* var. Maria Bonita and Its Major Components with Fluconazole and Its Influence on Ergosterol Biosynthesis. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. *Evid Based Complement Alternat Med*. 16(5): 5647182.

Cavalheiro, M., y Teixeira, M. C. (2018). *Candida Biofilms*: Threats, challenges, and promising strategies. *Frontiers in Medicine*, 5(2), 1–15.

Cleff, Marlete Brum, Meinerz, Ana Raquel, Xavier, Melissa, Schuch, Luiz Filipe, Meireles, Mário Carlos Araújo, Rodrigues, Maria Regina Alves, & Mello, João Roberto Braga de. (2010). In vitro activity of *Origanum vulgare* essential oil against *Candida* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(1), 116-123.

Clinical and Laboratory standards institute (CLSI). (2009). Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeast; Approved guideline. Segunda Edición.

Chouhan S, Sharma K, Guleria S. (2017). Antimicrobial Activity of Some Essential Oils-Present Status and Future Perspectives. *Medicines Basel*, 8;4(3):58.

Cruciani, M., Mengoli, C., Malena, M., Bosco, O., Serpelloni, G. and Grossi, P. (2006), Antifungal prophylaxis in liver transplant patients: A systematic review and meta-analysis. *Liver Transpl*, 12(5): 850-858.

Curvelo, J.A.R.; Marques, A.M.; Barreto, A.L.S.; Romanos, M.T.V.; Portela, M.B.; Kaplan, M.A.C.; Soares, R.M.A. (2014). A novel nerolidol-rich essential oil from *Piper claussonianum* modulates *Candida albicans* biofilm. *J. Med. Microbiol.*, 63(5), 697–702.

da Cruz CL, Pinto VF, Patriarca A (2013) Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *Int J Food Microbiol* 166(1):1–14.

Da Silva, K. D., de O. da Rosa, W. L., Sarkis-Onofre, R., Aitken-Saavedra, J. P., Demarco, F. F., Correa, M. B., & Tarquinio, S. B. C. (2019). Prevalence of oral mucosal lesions in population-based studies: A systematic review of the methodological aspects. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 19(0):1-10.

de Castro, R. D., de Souza, T. M. P. A., Bezerra, L. M. D., Ferreira, G. L. S., de Brito Costa, E. M. M., & Cavalcanti, A. L. (2015). Antifungal activity and mode of action of *thymol* and its synergism with nystatin against *Candida* species involved with infections in the oral cavity: An in vitro study. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), 1–7.

Delwel, S., Binnekade, T. T., Perez, R. S. G. M., Hertogh, C. M. P. M., Scherder, E. J. A., & Lobbezoo, F. (2018). Oral hygiene and oral health in older people with dementia: a comprehensive review with focus on oral soft tissues. *Clinical Oral Investigations*. Springer Verlag. 18(3) 22:93–108.

de Oliveira Santos, G. C., Vasconcelos, C. C., Lopes, A., de Sousa Cartágenes, M., Filho, A., do Nascimento, F., Ramos, R. M., Pires, E., de Andrade, M. S., Rocha, F., & de Andrade Monteiro, C. (2018). *Candida* Infections and Therapeutic Strategies: Mechanisms of Action for Traditional and Alternative Agents. *Frontiers in*

microbiology, 3(9): 1351.

Dwivedy AK, Prakash B, Chanotiya CS, Bisht D, Dubey NK (2017) Chemically characterized *Mentha cardiaca* L. essential oil as plant-based preservative in view of efficacy against biodeteriorating fungi of dry fruits, aflatoxin secretion, lipid peroxidation and safety profile assessment. *Food Chem Toxicol.*, 106(A):175–184.

Ebani, V. V., Nardoni, S., Bertelloni, F., Pistelli, L., & Mancianti, F. (2018). Antimicrobial Activity of Five Essential Oils against Bacteria and Fungi Responsible for Urinary Tract Infections. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(7), 1668.

Epstein, J. B., y Polsky, B. (1998). Oropharyngeal candidiasis: A review of its clinical spectrum and current therapies. *Clinical Therapeutics*, 20(1), 40–57.

Espinel-Ingroff A. (2007). Standardized Disk Diffusion Method for Yeasts. *Clinical Microbiology Newsletter*, 29(13), 97–100.

Essid, R., Hammami, M., Gharbi, D., Karkouch, I., Hamouda, T. B., Elkahoui, S., Tabbene, O. (2017). Antifungal mechanism of the combination of *Cinnamomum verum* and *Pelargonium graveolens* essential oils with fluconazole against pathogenic *Candida* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(18), 6993–7006.

Espinoza, I., Rojas, R., Aranda, W., & Gamonal, J. (2003). Prevalence of oral mucosal lesions in elderly people in Santiago, Chile. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 32(10), 571–575.

Fidel Jr PL, Vazquez JA, Sobel JD. (1999). *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev.* 12(1): 80–96.

Figueiral, M. H., Fonseca, P., Lopes, M. M., Pinto, E., Pereira-Leite, T., & Sampaio-

Maia, B. (2015). Effect of Denture-Related Stomatitis Fluconazole Treatment on Oral *Candida albicans* Susceptibility Profile and Genotypic Variability. *The open dentistry journal*, 9, 46–51.

Garcia-Cuesta, C., Sarrion-Pérez, M. G., & Bagán, J. V. (2014). Current treatment of oral candidiasis: A literature review. *Journal of clinical and experimental dentistry*, 6(5), e576–e582.

Gendreau, L., & Loewy, Z. G. (2011). Epidemiology and Etiology of Denture Stomatitis. *Journal of Prosthodontics*, 20(4), 251–260.

Ghorpade, M. v, y Dharmadhikari, C. A. (2014). Comparison of Various Methods Used to Detect Biofilm Production of *Candida* Species. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 8(11), 18–20.

Guandalini Cunha, B., Duque, C., Sampaio Caiaffa, K., Massunari, L., Araguê Catanoze, I., Dos Santos, D. M., de Oliveira, S., & Guiotti, A. M. (2020). Cytotoxicity and antimicrobial effects of citronella oil (*Cymbopogon nardus*) and commercial mouthwashes on *S. aureus* and *C. albicans* biofilms in prosthetic materials. *Archives of oral biology*, 109, 104577.

Gutiérrez, J., Morales, P., González, M. A., & Quindós, G. (2002). *Candida dubliniensis*, a new fungal pathogen. *Journal of Basic Microbiology*, 42(3), 207.

Gucwa, K., Milewski, S., Dymerski, T., y Szweda, P. (2018). Investigation of the antifungal activity and mode of action of *Thymus vulgaris*, *citrus limonum*, *pelargonium graveolens*, *cinnamomum cassia*, *ocimum basilicum*, and *eugenia caryophyllus* essential oils. *Molecules*, 18(5) 5 -23.

Hammer, K.A.; Carson, C.F.; Riley, T.V. (2004). Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Antimicrob. Chemother.*,53(6): 1081–5.

Hani, U., Shivakumar, H., Vaghela, R., M. Osmani, R., & Shrivastava, A. (2015). Candidiasis: A Fungal Infection- Current Challenges and Progress in Prevention and Treatment. *Infectious Disorders - Drug Targets*, 15(1), 42–52.

Helal, I. M., El-Bessoumy, A., Al-Bataineh, E., Joseph, M., Rajagopalan, P., Chandramoorthy, H. C., & Ben Hadj Ahmed, S. (2019). Antimicrobial Efficiency of Essential Oils from Traditional Medicinal Plants of Asir Region, Saudi Arabia, over Drug Resistant Isolates. *BioMed research international*, 2019, 8928306.

Hickl, J., Argyropoulou, A., Sakavitsi, M. E., Halabalaki, M., Al-Ahmad, A., Hellwig, E., Aligiannis, N., Skaltsounis, A. L., Wittmer, A., Vach, K., & Karygianni, L. (2018). Mediterranean herb extracts inhibit microbial growth of representative oral microorganisms and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *PloS one*, 13(12), e0207574.

Howati A, Tappuni A. (2018). Systematic review of the changing pattern of the oral manifestations of HIV. *J Investig Clin Dent.*, 9(4):e12351.

Huang, R. Y., Pei, L., Liu, Q., Chen, S., Dou, H., Shu, G., Yuan, Z. X., Lin, J., Peng, G., Zhang, W., & Fu, H. (2019). Isobologram Analysis: A Comprehensive Review of Methodology and Current Research. *Frontiers in pharmacology*, 10: 1222.

Jackson, C., Agboke, A., & Nwoke, V. (2009). In vitro evaluation of antimicrobial activity of combinations of nystatin and *Euphorbia hirta* leaf extract against *Candida albicans* by the checkerboard method. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(9), 666–669.

Jafri, H., & Ahmad, I. (2019). *Thymus vulgaris* essential oil and thymol inhibit biofilms and interact synergistically with antifungal drugs against drug resistant strains of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Journal de Mycologie Médicale*, 30(1): 100911.

Jing Zhang, Huihui Wu, Dan Jiang, Yongan Yang, Wenjian Tang & Kehan Xu (2019) .The antifungal activity of essential oil from *Melaleuca leucadendra* (L.) L. grown in China and its synergistic effects with conventional antibiotics against *Candida*. *Natural Product Research*, 33-17, 2545-25-48.

Johnson, M. D., MacDougall, C., Ostrosky-Zeichner, L., Perfect, J. R., & Rex, J. H. (2004). Combination antifungal therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(3), 693–715.

Kandelman D, Petersen PE, Ueda H (2008). Oral health, general health, and quality of life in older people. *Spec Care Dentist.*, 28(6): 224–236.

Kauff, C. A., Peter, ., Pappas, G., Sobel, J. D., & Dismukes Editors, W. E. (2015). *Essentials of Clinical Mycology, Second edition*: 160-167.

Kedia A, Dwivedy AK, Jha DK, Dubey NK (2016) Efficacy of *Mentha spicata* essential oil in suppression of *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination in chickpea with emphasis to mode of antifungal action. *Protoplasma* 253(3): 647–653.

Khan, M. S. A., Malik, A., & Ahmad, I. (2012). Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*. *Medical Mycology*, 50(1), 33–42.

Kontoyiannis, D. P., Vaziri, I., Hanna, H. A., Boktour, M., Thornby, J., Hachem, R., Raad, I. I. (2001). Risk Factors for *Candida tropicalis* Fungemia in Patients with Cancer. *Clinical Infectious Diseases*, 33(10), 1676–1681.

Kyriakidis, I., Tragiannidis, A., Munchen, S., & Groll, A. H. (2017). Clinical hepatotoxicity associated with antifungal agents. *Expert opinion on drug safety*, 16(2), 149–165.

Lam, O. L. T., Bandara, H. M. H. N., Samaranayake, L. P., McGrath, C., & Li, L. S. W. (2011). Oral health promotion interventions on oral yeast in hospitalised and medically compromised patients: a systematic review. *Mycoses*, 55(2): 123-142.

Lewis, K. Persister cells. (2010). *Annu. Rev. Microbiol.* 64, 357–372.

Leyva-López, N., Gutiérrez-Grijalva, E. P., Vazquez-Olivo, G., & Heredia, J. B. (2017). Essential Oils of Oregano: Biological Activity beyond Their Antimicrobial Properties. *Molecules*, 22(6), 989.

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

Man, A., Santacroce, L., Jacob, R., Mare, A., & Man, L. (2019). Antimicrobial activity of six essential oils against a group of human pathogens: A comparative study. *Pathogens*, 8(1), 1–11.

Manohar, V., Ingram, C., Gray, J., Talpur, N. A., Echard, B. W., Bagchi, D., & Preuss, H. G. (2001). Antifungal activities of *origanum oil* against *Candida albicans*. *Molecular and cellular biochemistry*, 228(1-2), 111–117.

Martins, N., Barros, L., Henriques, M., Silva, S., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. *Industrial Crops and Products*, 74, 648–670.

Meirelles, G. C., Pippi, B., Hatwig, C., de Barros, F. M. C., de Oliveira, L. F. S., von Poser, G. L., & Fuentefria, A. M. (2017). Synergistic antifungal activity of the lipophilic fraction of *Hypericum carinatum* and fluconazole. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 27(1), 118–123.

Megri, Y., Arastehfar, A., Boekhout, T., Daneshnia, F., Hörtnagl, C., Sartori, B., Hafez, A., Pan, W., Lass-Flörl, C., & Hamrioui, B. (2020). *Candida tropicalis* is the most prevalent yeast species causing candidemia in Algeria: the urgent need for antifungal stewardship and infection control measures. *Antimicrobial resistance and infection control*, 9(1), 50.

Miller, A. B., Cates, R. G., Lawrence, M., Soria, J. A. F., Espinoza, L. V., Martinez, J. V., & Arbizú, D. A. (2014). The antibacterial and antifungal activity of essential oils extracted from Guatemalan medicinal plants. *Pharmaceutical Biology*, 53(4), 548–554.

Millsop, J. W., & Fazel, N. (2016). Oral candidiasis. *Clinics in Dermatology*, 34(4), 487–494.

MINSAL. (2010). Guía Clínica: Salud Oral Integral Para Adultos De 60 Años. Gobierno de Chile. <http://web.minsal.cl/portal/url/item/7221747c2c9484b7e04001011f0141a4.pdf>

MINSAL (2017). Encuesta Nacional de Salud 2016-2017, primero resultados. Gobierno de Chile. https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2017/11/ENS-2016-17_PRIMEROS-RESULTADOS.pdf

Moghaddam, M., & Mehdizadeh, L. (2017). Chemistry of Essential Oils and Factors Influencing Their Constituents. In *Soft Chemistry and Food Fermentation*. Chapter 13, 379-419 .

Mohammed A., Alem S., Douglas J. (2004). Effects of Aspirin and Other Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs on Biofilms and Planktonic Cells of *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(1), 41–47.

Nazir MA, AlGhamdi L, AlKadi M, AlBejan N, AlRashoudi L, AlHussan M. (2018). The burden of Diabetes, Its Oral Complications and Their Prevention and

Management. *Maced J Med Sci.*, 6(8):1545–1553.

Nett, J. E., Crawford, K., Marchillo, K. & Andes, D. (2010). Role of Fks1p and matrix glucan in *Candida albicans* biofilm resistance to an echinocandin, pyrimidine, and polyene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54(8), 3505–3508.

Otero Rey, E., Peñamaría Mallón, M., Rodríguez Piñón, M., Martín Biedma, B., & Blanco Carrión, A. (2015). Candidiasis oral en el paciente mayor. *Avances en Odontoestomatología*, 31(3), 135-148.

Pappas, P. G., Lionakis, M. S., Arendrup, M. C., Ostrosky-Zeichner, L., & Kullberg, B. J. (2018). Invasive candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers*, 11;4, 18026.

Peixoto, L. R., Rosalen, P. L., Ferreira, G. L. S., Freires, I, de Carvalho, F., Castellano, L. R., & de Castro (2017). Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. *Archives of Oral Biology*, 73, 179–185.

Peleg, A.Y.; Hogan, D.A.; Mylonakis, E. (2010). Medically important bacterial-fungal interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* 8(5), 340–349.

Quindós, G., Gil-Alonso, S., Marcos-Arias, C., Sevillano, E., Mateo, E., Jauregizar, N., & Eraso, E. (2019). Therapeutic tools for oral candidiasis: Current and new antifungal drugs. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*, 24(2), 172–180.

Ramage, G., Bachmann, S., Patterson, T. F., Wickes, B. L. & López-Ribot, J. L. (2002). Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 49(6), 973–980.

Ramage, G., Rajendran, R., Sherry, L., & Williams, C. (2012). Fungal biofilm

resistance. *International Journal of Microbiology*, 12, 1-14.

Ramage, G., Milligan, S., Lappin, D. F., Sherry, L., Sweeney, P., Williams, C., Bagg, J., & Culshaw, S. (2012). Antifungal, cytotoxic, and immunomodulatory properties of tea tree oil and its derivative components: potential role in management of oral candidosis in cancer patients. *Frontiers in microbiology*, 18;3, 220.

Raut, J. S., Shinde, R. B., Chauhan, N. M., & Karuppayil, S. M. (2013). Terpenoids of plant origin inhibit morphogenesis, adhesion, and biofilm formation by *Candida albicans*. *Biofouling*, 29(1), 87–96.

Revie, N. M., Iyer, K. R., Robbins, N., & Cowen, L. E. (2018). Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. *Current Opinion in Microbiology*, 45, 70–76.

Rodrigues, C. F., Rodrigues, M. E., Silva, S., & Henriques, M. (2017). *Candida glabrata* biofilms: How far have we come?. *Journal of Fungi*, 3(1), 11.

Rodrigues, C. F., Silva, S., & Henriques, M. (2013). *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 33(5), 673–688.

Rodríguez Ortega, J., Miranda Tarragó, J., Morejón Lugones, H., & Santana Garay, J. (2002). Candidiasis de la mucosa bucal: Revisión bibliográfica. *Rev. Cubana Estomatología*, 39(2), 187-233.

Rosato, A., Vitali, C., Piarulli, M., Mazzotta, M., Argentieri, M. P., & Mallamaci, R. (2009). *In vitro* synergic efficacy of the combination of Nystatin with the essential oils of *Origanum vulgare* and *Pelargonium graveolens* against some *Candida* species. *Phytomedicine*, 16(10), 972–975.

Sadhasivam, S., Palanivel, S., & Ghosh, S. (2016). Synergistic antimicrobial activity

of *Boswellia serrata* Roxb. ex Colebr. (*Burseraceae*) essential oil with various azoles against pathogens associated with skin, scalp, and nail infections. *Letters in Applied Microbiology*, 63(6), 495–501.

Sakkas H., Papadopoulou C. (2017). Antomicrobial Activity of Basil, Oregano and Thyme Essential Oils., 27(3): 429-438.

Sandoval-Acuña, C., Fuentes-Retamal, S., Guzmán-Rivera, D., Peredo-Silva, L., Madrid-Rojas, M., Rebolledo, S., Castro-Castillo, V., Pavani, M., Catalán, M., Maya, J. D., Jara, J. , Parra, E., Calaf, G., Speisky, H., & Ferreira, J. (2016). Destabilization of mitochondrial functions as a target against breast cancer progression: Role of TPP+-linked-polyhydroxybenzoates. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 9(2): 407.

Sardi, J. C. O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M., & Mendes Giannini, M. J. S. (2013). *Candida* species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*, 62(1), 10–24.

Sharifzadeh, A., & Shokri, H. (2016). Antifungal activity of essential oils from Iranian plants against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida albicans*. *Avicenna journal of phytomedicine*, 6(2), 215–222.

Silva, G. L., Luft, C., Lunardelli, A., Amaral, R., Melo, D., Donadio, M. V., Nunes, F. , de Azambuja, M., Santana, J., Moraes, C., Mello, R., Cassel, E., Pereira, M., & de Oliveira, J. (2015). Antioxidant, analgesic and anti-inflammatory effects of lavender essential oil. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 87(2 Suppl), 1397–1408.

Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W., & Azeredo, J. (2011). Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* and *Candida* species. *Trends in Microbiology*, 19(5), 241–247.

Silva, V. B., Travassos, D. L., Nepel, A., Barison, A., Costa, E. V., Scotti, L., Scotti, M. T., Mendonça-Junior, F., La Corte Dos Santos, R., & de Holanda Cavalcanti, S. C. (2017). Synthesis and Chemometrics of Thymol and Carvacrol Derivatives as Larvicides against *Aedes aegypti*. *Journal of arthropod-borne diseases*, *11*(2), 315–330.

Sookto, T., Srithavaj, T., Thaweboon, S., Thaweboon, B., & Shrestha, B. (2013). In vitro effects of *Salvia officinalis* L. essential oil on *Candida albicans*. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, *3*(5), 376–380.

Souza, N. A. B., de Oliveira Lima, E., Guedes, D. N., de Oliveira Pereira, F., de Souza, E. L., & de Sousa, F. B. (2010). Efficacy of *Origanum* essential oils for inhibition of potentially pathogenic fungi. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *46*(3), 499–508.

Stefanakis, M. K., Touloupakis, E., Anastasopoulos, E., Ghanotakis, D., Katerinopoulos, H. E., & Makridis, P. (2013). Antibacterial activity of essential oils from plants of the genus *Origanum*. *Food Control*, *34*(2), 539–546.

Sudbery, P., Gow, N., & Berman, J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*, *12*(7), 317–324.

Sudjana, A. N., Carson, C. F., Carson, K. C., Riley, T. V., & Hammer, K. A. (2012). *Candida albicans* adhesion to human epithelial cells and polystyrene and formation of biofilm is reduced by sub-inhibitory *Melaleuca alternifolia*(tea tree) essential oil. *Medical Mycology*, *50*(8), 863–870.

Suntres, Z. E., Coccimiglio, J., & Alipour, M. (2014). The Bioactivity and Toxicological Actions of *Carvacrol*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *55*(3), 304–318.

Tariq, S., Wani, S., Rasool, W., Bhat, M. A., Prabhakar, A., Shalla, A. H., & Rather,

M. A. (2019). *A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. Microbial Pathogenesis*, 134:03580.

Taylor M, Raja A. Oral Candidiasis (Thrush) [Updated 2020 Apr 12]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545282/>

Tian J, Ban X, Zeng H, He J, Chen Y, Wang Y (2012) The mechanism of antifungal action of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) on *Aspergillus flavus*. *PLoS One* 7:e30147

Tiraboschi, I. N., Pozzi, N. C., Farías, L., García, S., & Fernández, N. B. (2017). Epidemiología, especies, resistencia antifúngica y evolución de las candidemias en un hospital universitario de Buenos Aires, Argentina, durante 16 años. *Revista Chilena de Infectología*, 34(5), 431–440.

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs for antifungal agents, version 10.0, 2019. <http://www.eucast.org/astoffungi/clinicalbreakpointsforantifungals/>.

Vale-Silva, L., Silva, M.-J., Oliveira, D., Goncalves, M.-J., Cavaleiro, C., Salgueiro, L., & Pinto, E. (2011). Correlation of the chemical composition of essential oils from *Origanum vulgare* subsp. *virens* with their in vitro activity against pathogenic yeasts and filamentous fungi. *Journal of Medical Microbiology*, 61(2), 252–260.

Volpon, L., & Lancelin, J. M. (2002). Solution NMR structure of five representative glycosylated polyene macrolide antibiotics with a sterol-dependent antifungal activity. *European Journal of Biochemistry*, 269(18), 4533–4541.

Walraven, C. J., Bernardo, S. M., Wiederhold, N. P. & Lee, S. A. (2015) Paradoxical antifungal activity and structural observations in biofilms formed by echinocandin-

resistant *Candida albicans* clinical isolates. *J. Music Ther.* 52(2), 131–139.

Warnakulasuriya, S. (2019). White, red, and mixed lesions of oral mucosa: A clinicopathologic approach to diagnosis. *Periodontology 2000*, 80(1), 89–104.

Yang, C., Chen, H., Chen, H., Zhong, B., Luo, X., & Chun, J. (2017). Antioxidant and Anticancer Activities of Essential Oil from Gannan Navel Orange Peel. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(8), 1391.

Youssefi MR, Moghaddas E, Tabari MA. (2019). *In Vitro* and *In Vivo* Effectiveness of Carvacrol, Thymol and Linalool against *Leishmania infantum*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(11): 20-72.

Zhang, J., Wu, H., Jiang, D., Yang, Y., Tang, W., & Xu, K. (2018). The antifungal activity of essential oil from *Melaleuca leucadendra* (L.) grown in China and its synergistic effects with conventional antibiotics against *Candida*. *Natural Product Research*, 33:17, 2545-2548

Zida, A., Bamba, S., Yacouba, A., Ouedraogo-Traore, R., & Guiguemdé, R. T. (2017). Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: A review. *Journal de mycologie medicale*, 27(1), 1–19.

10. ANEXOS

Anexo 1. Aprobación del Comité de Bioseguridad del Proyecto PRI-ODO.



Comité Institucional de Bioseguridad
 Administración Conjunta Campus Norte
 FDO N° 142

Santiago, 15 de Julio de 2020.

C E R T I F I C A D O

El Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) ha analizado el Proyecto PRI-ODO 2020 titulado "**Evaluation of the antibiofilm effect of essential oils obtained from *Lavandula dentata*, *Origanum vulgare*, *Ocimum basilicum* y *Schinus molle* against yeast from genus *Candida***". El Investigador Responsable de este proyecto es el Dr. Alfredo Molina Berríos, Académico del Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas, Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

Los ensayos propuestos en este Proyecto se realizarán en la Unidad Académica mencionada anteriormente e involucran el manejo de:

○ **Sustancias Químicas Peligrosas:**

- Se utilizarán agentes químicos de riesgo de tipo inflamables, corrosivos, tóxicos agudos, peligro (grave) para la salud y medio ambiente.

○ **Patógenos:**

- Cepas de referencia de las sptes. levaduras: *Candida albicans* ATCC 90029 y ATCC 10231, *Candida tropicalis* ATCC 750; *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida glabrata* ATCC 2001, *Candida dubliniensis* ATCC MYA-646, todas pertenecientes al grupo de riesgo 1.

Los ensayos se realizarán principalmente en el Laboratorio de Farmacología, en donde realiza sus investigaciones el Dr. Molina.

El CIB certifica que la Facultad de Odontología cuenta con las facilidades para el manejo y desecho del material biológico y químico a utilizar en el proyecto de acuerdo al Manual de Normas de Bioseguridad y Riesgos Asociados, Conicyt 2018. Además, el investigador se compromete a velar por el cumplimiento de las normas de

bioseguridad junto al Manual de Procedimientos para el Manejo y Desechos de Residuos biológicos y RESPEL de la Facultad, durante el desarrollo del proyecto.

Se extiende el presente certificado a solicitud del Dr. Molina para ser presentado en la Dirección de Investigación de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

Carla Lozano



Dra. Carla Lozano M.
Presidenta

Facultad de Odontología. Sergio Livingstone P. 943, Independencia, Fono 29781792-29781816, Fax: 29781748, Santiago.
<http://odontologia.uchile.cl>

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Sergio Livingstone P. 1007, Independencia, Fono 29781793 Fax: 29781748,
Santiago. <http://www.quimica.uchile.cl/>

Anexo 2. Aprobación del Proyecto PRI-ODO

**CARTA CERTIFICADO DE INSCRIPCIÓN DE PROYECTO PRI-ODO**

Santiago, 7 de enero de 2020

DIFO N°: 19/001

MAT.: Asigna Código DIFO - Proyecto PRI-ODO.

Señor

Dr. ALFREDO MOLINA BERRÍOS

Investigador Responsable

Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas

Facultad de Odontología

P R E S E N T E

Estimado Dr. Molina:

Informo a usted que con fecha de Registro de Inscripción **7 de enero de 2020**, el Proyecto de Investigación titulado: **“Evaluation of the antibiofilm effect of essential oils obtained from *Lavandula dentata*, *Origanum vulgare*, *Ocimum basilicum* y *Schinus molle* against yeast from genus *Candida*”**, del Investigador Responsable: **Dr. Alfredo Molina B.**, del Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas, y el Dr. José A. Jara S., Investigador Alterno.

fue asignado con el siguiente Código de Inscripción en la Dirección de Investigación:

PRI-ODO 2020 PRI-ODO 2020/001

Este proyecto cuenta con:


1. Carta del Director de Departamento (Inv. Responsable)	Si	No	N/A
2. Certificado de aprobación del Comité de Ética de la Facultad	Si	No	N/A
3. Certificado de aprobación del Comité de Bioseguridad	Si	No	N/A


A partir de la fecha de registro de este proyecto, se deberá considerar el periodo de duración del mismo, por lo tanto el día:

Fecha entrega Informe Final:	7 de enero de 2022
------------------------------	---------------------------

Usted deberá hacer llegar a la Dirección de Investigación el Informe Final del Proyecto en el Formulario ad-hoc, que encontrará en la página Web de la Facultad, en el enlace de INVESTIGACIÓN:

<http://odontologia.uchile.cl/investigación/formularios>


 Dirección de Investigación
 Facultad de Odontología – Universidad de Chile



ACC/rem.

