



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA  
LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DEL COMPUESTO BROMURO DE (12 - ((3,4,5-  
TRIHIDROXIBENZOIL) OXI) - DODECIL) TRIFENILFOSFONIO (TTP<sup>+</sup> - C<sub>12</sub> - AG)  
COMO INHIBIDOR DE LA RESPIRACIÓN CELULAR EN *CANDIDA ALBICANS***

**Paula Liliana Sánchez Quiroz**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

**REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE**

**CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. Alfredo Enrique Molina Berríos**

**TUTOR ASOCIADO**

**Dr. José Antonio Jara Sandoval**

**Adscrito a Proyecto PRIODO DIFO 2020/09**

**Santiago - Chile**

**2021**





**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLÓGIA  
LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DEL COMPUESTO BROMURO DE (12 - ((3,4,5-  
TRIHIDROXIBENZOIL) OXI) - DODECIL) TRIFENILFOSFONIO (TTP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG)  
COMO INHIBIDOR DE LA RESPIRACIÓN CELULAR EN *CANDIDA ALBICANS***

**Paula Liliana Sánchez Quiroz**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

**REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE**

**CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. Alfredo Enrique Molina Berríos**

**TUTOR ASOCIADO**

**Dr. José Antonio Jara Sandoval**

**Adscrito a Proyecto PRIBDO DIFO 2020/09**

**Santiago - Chile**

**2021**

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera partir agradeciendo a mi familia, las personas más importantes en mi vida. A mis padres, Liliana y Renato, quienes han dado todo de sí mismo para que hoy sea la mujer que soy. Gracias por enseñarme el amor verdadero y a ser perseverante. A mi hermano, Sebastián, quien jugaba conmigo al dentista cuando yo sólo tenía 6 años. Gracias por ser mi amigo, consejero y sobretodo, la persona que me impulsa cada día a ser mejor.

A Suyai, por ser mi fiel compañera. Llegaste a mi vida al comienzo de este camino y nunca te despegaste de mi lado. Gracias por tu compañía día a día.

A Rodrigo, mi cable a tierra. Este camino hubiese sido más difícil sin tu compañía a mi lado. Gracias por transmitirme paz, por obligarme a respirar en mis peores momentos y por abrazarme cuando más lo necesitaba. Deseo seguir recorriendo montañas y la vida a tu lado.

A las hermanas que elegí, Natalia, Valentina, Mayte, Ivana, Valentina y Michelle. Las mejores amigas que podría tener. Mujeres inteligentes y poderosas que me inspiran y enseñan de la vida cada día.

A las amigas más geniales que la U me permitió conocer. Gracias Isidora, Victoria, Javiera y Marcela. Infinitas gracias por todo el apoyo, consejos, risas, almuerzos y llantos. Las admiro y espero que nuestra amistad traspase regiones.

A mi tutor de tesis Dr. Alfredo Molina Berríos, el mejor docente que pude tener para este proceso. Gracias por la paciencia y siempre estar disponible para responder nuestras inquietudes y dar el tiempo que fuese necesario para nuestro aprendizaje. Estoy infinitamente agradecida de usted y su docencia. También agradecer al Dr. José Jara Sandoval, por su acompañamiento en este proceso, estando disponible y dar de su tiempo en pandemia para enseñarnos.

Finalmente, agradecer a todas las personas que conocí y compartieron conmigo este camino. Al CEO 2017, por todo lo que me ayudo a crecer y madurar. A mis amigos queridos que no menciono, pero saben que los tengo en mi corazón y estoy agradecida por su compañía y veo orgullosa como crecen y se convierten en excelentes profesionales y personas.

*“La ciencia del futuro tiene que ser feminista, integradora y humanista”.*

Raquel Yotti.

## ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN.	2
A. Estomatitis protésica.	2
B. <i>Candida albicans</i> .	3
C. Tratamientos antifúngicos actuales contra <i>Candida albicans</i> .	6
D. Mitocondria: posible blanco farmacológico.	9
E. Nuevas alternativas farmacológicas contra <i>Candida albicans</i> .	11
F. Cationes lipofílicos.	13
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.	17
A. HIPÓTESIS.	17
B. OBJETIVO GENERAL.	17
C. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	17
IV. METODOLOGÍA.	18
A. TIPO DE ESTUDIO REALIZADO.	18
B. CEPAS.	18
C. FÁRMACOS.	18
D. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM).	18
E. DETERMINACIÓN DE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL.	20
F. CITOMETRÍA DE FLUJO.	21
G. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.	22
V. RESULTADOS	23
A. MEDICIÓN CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA.	23

B. DETERMINACIÓN DE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL MEDIANTE OXIGRAFÍA.	27
C. CITOMETRÍA DE FLUJO.	34
VI. <i>DISCUSIÓN.</i>	37
VII. <i>CONCLUSIONES.</i>	44
VIII. <i>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.</i>	45
IX. <i>ANEXOS.</i>	56
A. Formulario de postulación PERIODO	56

## I. RESUMEN

**Introducción:** La candidiasis oral es una de las infecciones más frecuentes en la cavidad oral, asociada a altas tasas de recurrencia debido a la aparición de resistencia y pocas alternativas terapéuticas. Buscando nuevas estrategias farmacológicas, la mitocondria es un atractivo blanco debido a que posee un potencial de membrana más negativo que las células humanas, por lo que moléculas con carga positiva podrían dirigirse selectivamente a ella. El objetivo de este estudio es evaluar el efecto antifúngico y antibiofilm del compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG sobre *C. albicans* y su impacto sobre la respiración celular.

**Metodología:** Se realizaron ensayos de susceptibilidad y de reducción de MTT en dos cepas de *C. albicans*, ATCC-90029 y ATCC-10231 para evaluar el efecto antifúngico del compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG en la forma planctónica y biofilm. Posteriormente, se midió el consumo de oxígeno mediante oxigrafía. Finalmente, mediante citometría de flujo se evaluó si el consumo de oxígeno correspondía a un desacoplamiento de la respiración celular o por la producción de ROS.

**Resultados:** Con respecto al efecto antifúngico del compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG se determinó una CIM de 5,2±1,2 µg/mL en ATCC-90029 y 2,4±1,1 µg/mL en ATCC-10231. Posteriormente, el efecto antibiofilm nos dio como resultado 8,9 ± 1,5 µg/mL en ATCC-90029 y 4,8 ± 1,75 µg/mL en ATCC-10231. Se observó un aumento significativo en el consumo de oxígeno en la cepa ATCC-90029. Por citometría comprobamos que el compuesto probado no produce ROS.

**Conclusión:** El compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG inhibe el crecimiento de *C. albicans* en su estado planctónico y biofilm, con valores menores a los presentes en la literatura para el ácido gálico y similares a los antifúngicos actualmente utilizados. También comprobamos que el fármaco posee un efecto sobre la respiración celular, y a través de la citometría se concluye que posee un efecto desacoplante.

## II. INTRODUCCIÓN.

### A. Estomatitis protésica.

Según la Encuesta Nacional de Salud realizada entre los años 2016-2017 por el Ministerio de Salud, el 22,4% de la población declara ser portador de prótesis dentales removibles, de los cuales el 65,8% es mayor de 65 años (Ministerio de Salud de Chile, 2018).

El uso de prótesis dentales removibles altera las condiciones orales, causando queratinización y lesiones microtraumáticas en la mucosa de las zonas edéntulas, cuya etiología puede ser infecciosa, mecánica y/o alérgica, favoreciendo la formación del *biofilm* y permitiendo la acción de microorganismos en la mucosa (Lee y cols., 2015). Dentro de las lesiones más prevalentes asociadas a prótesis removibles se encuentra la estomatitis protésica, con una prevalencia que varía entre 20-67% de los pacientes portadores (Gual-Vaqués y cols., 2017). En Chile se observa una situación similar con una prevalencia entre 22,3%-68% en adultos mayores (Espinoza y cols., 2003; Gutiérrez y cols., 2013), mientras que en Ecuador varía en un 53%-80% (Farfán y Zabala, 2019; Malats, 2019) y en Reino Unido aproximadamente un 65% (Hannah y cols., 2017).

La estomatitis protésica se define como la inflamación crónica generalizada de la mucosa oral observada en pacientes con prótesis removible caracterizada por enrojecimiento, inflamación y dolor de la mucosa que está en contacto con la prótesis (Estrada y cols., 2017). El principal factor etiológico de la estomatitis protésica es la presencia de levaduras del género *Candida* (Lee y cols., 2015), que comprenden el 25-50% de la microbiota de la cavidad oral en individuos sanos y contribuyen a la formación de *biofilm* en las prótesis removibles (Zomorodian y cols., 2011). Algunos reportes de la prevalencia de *Candida* spp. en la cavidad oral en usuarios de prótesis removible, muestran que *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis* son las especies más comunes, siendo *C. albicans* la más prevalente (61-73%) (Gutiérrez y cols., 2013; Zomorodian y cols., 2011).

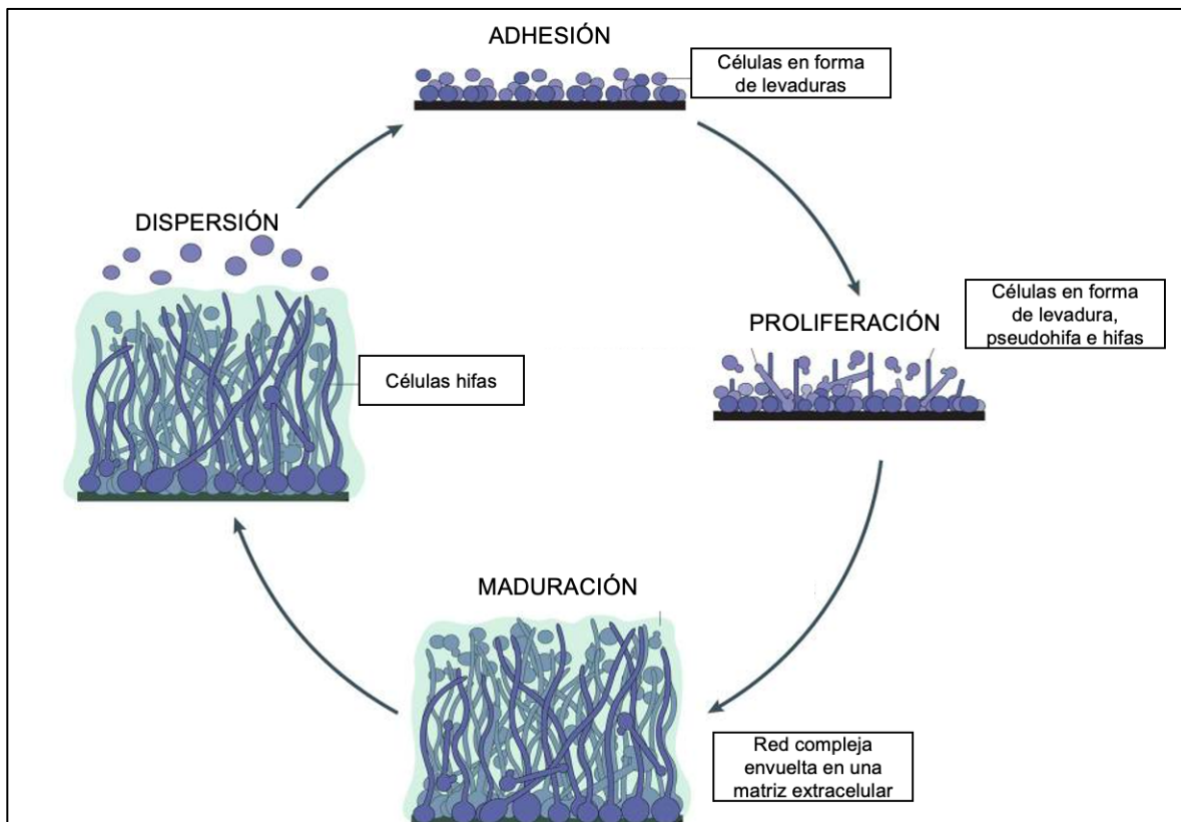


### **B. *Candida albicans*.**

*C. albicans* es parte de la microbiota comensal de los humanos, colonizando de manera asintomática el tracto gastrointestinal, el tracto reproductivo, la piel y la cavidad oral. Este hongo a menudo es inofensivo ya que se mantiene en equilibrio con otros miembros de la microbiota local (Nobile y Johnson, 2015). Sin embargo, alteraciones en la microbiota del hospedero causada, por ejemplo, por el uso de antibióticos, cambios en la respuesta inmune del hospedero ocasionada por episodios de estrés, terapia inmunosupresora, entre otros, o variaciones en el entorno local como cambios en el pH o contenido nutricional, pueden permitir que *C. albicans* prolifere aumentando su patogenicidad (Nobile y Johnson, 2015). *C. albicans* se distingue de muchas otras especies de hongos por su capacidad de cambiar desde una forma levaduriforme a células filamentosas (hifas) bajo ciertas condiciones ambientales. Esta levadura se encuentra principalmente en forma de *biofilm*, que se define como una comunidad microbiana adherida a una superficie y protegida por una densa matriz extracelular (MEC) que la protege del medio (Lohse y cols., 2018). Las hifas son un componente estructural importante de los *biofilm*, ya que contribuyen a su estabilidad arquitectónica general, actuando como un andamio de soporte para las células en forma de levadura y otras hifas. La capacidad tanto de formar hifas y la capacidad de éstas de adherirse entre sí y a las células en forma de levadura son fenómenos críticos para el desarrollo y mantenimiento normales de *biofilm*, las cuales se ha documentado que ayudan en gran medida a la resistencia contra la mayoría de los medicamentos antifúngicos actuales (Robbins y cols., 2016).

La formación de *biofilms* de *C. albicans* comienza con la adherencia de células en forma de levadura a un sustrato, pudiendo ser una superficie abiótica (por ejemplo, prótesis, catéteres) o biológica (mucosa oral). La siguiente etapa consiste en la proliferación celular y la filamentación en etapa temprana de las células adheridas generando una capa basal. A esto le sigue la maduración del *biofilm*, lo que da como resultado una red compleja de alta actividad metabólica y varias capas de células polimórficas, que incluyen células elongadas en forma de hifas, células pseudohifas

(células elipsoidales unidas de extremo a extremo) y levaduras, encerradas en una matriz extracelular, lo que le da al *biofilm* una apariencia gruesa y estructurada, además de brindar protección contra agentes químicos y físicos. El paso final del desarrollo del *biofilm* se denomina etapa de dispersión, en la que algunas levaduras se dispersan desde el *biofilm* para colonizar nuevos sitios; esta es la fase menos estudiada del desarrollo de *biofilm* de *C. albicans* (Lohse y cols., 2018). En el laboratorio, los *biofilm* de *C. albicans* pueden desarrollarse en varios sustratos diferentes y en muchos tipos diferentes de medios, lo que indica una solidez inherente del desarrollo de *biofilm* a una amplia gama de condiciones ambientales, y por lo tanto, su gran capacidad para generar infecciones (Figura 1) (Lohse y cols., 2018).



**Figura 1: Formación de *biofilm* de *Candida albicans*.** Representación de la formación de *biofilm* de *Candida albicans* en 4 grandes etapas: Adhesión, proliferación, maduración y dispersión (Imagen adaptada de Lohse y cols., 2018).

Las infecciones por *C. albicans* varían desde infecciones dérmicas o de la mucosa, hasta infecciones diseminadas de manera hematológica con tasas de mortalidad que varían entre 15% - 49% (Rhim y cols., 2020). Son especialmente graves en individuos inmunocomprometidos, como pacientes con SIDA o sometidos a terapias de inmunosupresión (Nobile y Johnson, 2015). También se ha evidenciado un riesgo en personas sanas con dispositivos médicos implantados, ya que la formación de *biofilm* de *C. albicans* se observa fácilmente en superficies sólidas como siliconas. Este material es comúnmente utilizado para los catéteres venosos centrales y urinarios, marcapasos, válvulas cardíacas mecánicas, prótesis articulares, lentes de contacto y prótesis removibles dentales, generando infecciones invasivas potencialmente mortales, con tasas de mortalidad cercanas al 40% incluso en pacientes tratados con antifúngicos sistémicos (Robbins y cols., 2016).

La enfermedad infecciosa ocasionada por el crecimiento de las colonias de *Candida* spp. y la penetración de estas en los tejidos orales, se denomina Candidiasis oral, y se da cuando las barreras físicas y las defensas del hospedero se encuentran alteradas. Entre las levaduras del género *Candida*, la especie *C. albicans* sigue siendo la especie con mayor prevalencia, comprendiendo hasta el 70% de los aislados (Gutiérrez y cols., 2013; Manuel y Urizar, 2002). Frente a la infección de *C. albicans* por el uso de prótesis removibles se dificulta la llegada de anticuerpos salivales, condicionando la creación de un medio ácido y anaeróbico que favorece su proliferación, adhesión y formación de *biofilm*, aumentando su patogenicidad (Lee y cols., 2015). *C. albicans* también es favorecida por su capacidad para evadir mecanismos de defensa del hospedero, colonizando y persistiendo en el epitelio por medio de secreción de enzimas hidrolíticas y transición fenotípica de levadura a hifas o pseudohifa (Williams y cols., 2011).

### **C. Tratamientos antifúngicos actuales contra *Candida albicans*.**

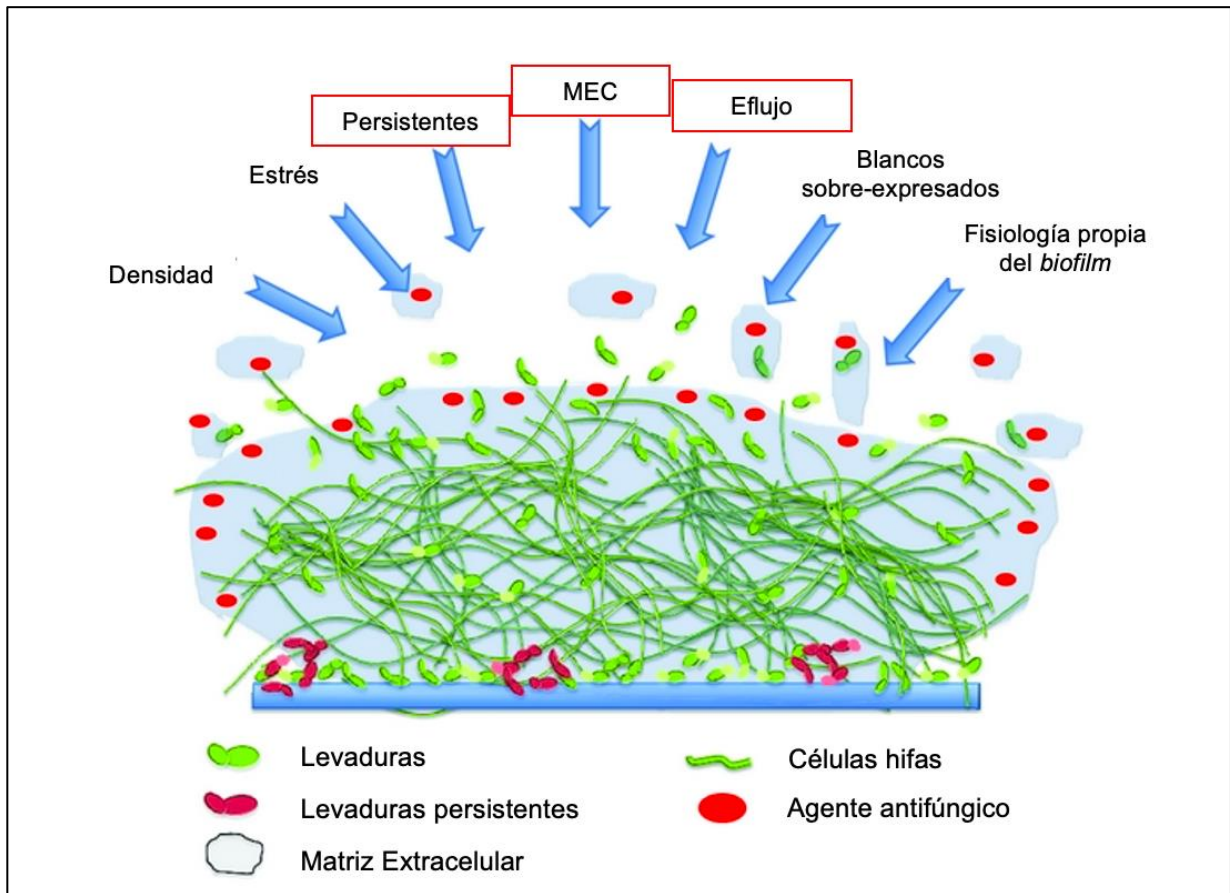
Actualmente el tratamiento de la estomatitis protésica asociada a *C. albicans* es complejo debido a su etiología multifactorial. La estrategia terapéutica más adoptada incluye el control de los factores locales de la prótesis removable junto al uso de medicamentos antifúngicos tópicos y sistémicos (Rodríguez, 2018).

El concepto de agente antifúngico o antimicótico engloba cualquier sustancia capaz de producir una alteración de las estructuras de la célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia y facilitando el funcionamiento de los sistemas de defensa del hospedero (Houšť y cols., 2020). El arsenal actual de compuestos antifúngicos aprobados como tratamiento consta de solo tres clases de agentes dirigidos contra un número limitado de procesos celulares (Robbins y cols., 2016). La mayoría de los antifúngicos se dirigen al ergosterol, el análogo fúngico funcional del colesterol, afectando su biosíntesis o uniéndose directamente a él; o la biosíntesis de (1,3) - $\beta$ -D-glucano, un componente principal de la pared celular fúngica (Revie y cols., 2018).

En el año 2011, los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades de EE.UU. han clasificado a las especies de *Candida* como una amenaza grave para la salud humana, debido al aumento dramático de la resistencia a los medicamentos existentes (Frieden, 2013). Esta resistencia se ha documentado tanto en el laboratorio como en la clínica y continúa siendo un problema creciente en la comunidad médica. Se han identificado numerosos mecanismos adaptativos de resistencia a los medicamentos antifúngicos, que incluyen la alteración o sobreexpresión del objetivo farmacológico, la regulación positiva de transportadores de múltiples fármacos y la activación de respuestas al estrés (Revie y cols., 2018).

La formación de *biofilm* por *Candida* spp. se ha relacionado también con las altas tasas de resistencia antifúngica, fenómeno multifactorial y complejo, pero se debe principalmente a tres factores principales: la regulación positiva de las bombas de eflujo, la presencia de la matriz extracelular y la existencia de células recalcitrantes

metabólicamente inactivas denominadas células "persistentes" (Figura 2) (Silva y cols., 2017).



**Figura 2: Descripción esquemática de los mecanismos de resistencia de *biofilm* de *Candida albicans*.** La figura ilustra la densidad y complejidad del biofilm de *C. albicans*, con diferentes morfotipos presentes rodeados de MEC. Las flechas representan los diferentes factores que impulsan la resistencia a los antifúngicos dentro del *biofilm*, incluida la densidad, el estrés, las células persistentes, la MEC, las bombas de eflujo, los blancos sobre expresados y la fisiología general del *biofilm*. Estos se han colocado según su aporte a la resistencia, siendo los encerrados en cuadro rojo los que tienen mayor efecto y estudios (Imagen adaptada de Ramage y cols., 2012).

Las bombas de eflujo en células planctónicas de *C. albicans* suelen estar reguladas en respuesta a los fármacos antimicóticos; sin embargo, en los *biofilm*, se regulan al alza dentro de las primeras horas de la adhesión y permanecen aumentadas durante el desarrollo del *biofilm*, incluso en ausencia de un fármaco antifúngico. Esta regulación ascendente inmediata de las bombas de eflujo que se produce en las primeras etapas del desarrollo del *biofilm* es un factor clave para la resistencia a

fármacos (Silva y cols., 2017). Por otro lado, la matriz extracelular del *biofilm* actúa como una barrera física para la penetración del fármaco y como un estabilizador de la arquitectura general del *biofilm*; se ha demostrado que la susceptibilidad al fluconazol, anfotericina B, nistatina y la clorhexidina se adquirió en el momento de la transición a la etapa intermedia, concomitante con el aumento de la actividad metabólica y la acumulación de material de la matriz. Este hallazgo está en consonancia con estudios recientes que revelan que el atrapamiento de los fármacos en la matriz extracelular es una fuente importante de resistencia al fármaco por parte del *biofilm* (Desai y Mitchell, 2015). Por último, la presencia de células persistentes son un subconjunto menor de células de levadura metabólicamente latentes que surgen estocásticamente como variantes fenotípicas dentro del *biofilm*, y son extremadamente resistentes a los fármacos antimicóticos, que en su gran mayoría requieren de una tasa metabólica alta para poder ejercer su efecto antifúngico (Silva y cols., 2017).

Se han investigado otros factores que influyen en la resistencia a agentes antifúngicos, tales como la alta densidad celular, la reducción de la tasa de crecimiento, la limitación de nutrientes, las alteraciones de la expresión génica y el aumento del contenido de esteroides en la membrana celular de *Candida* spp. (Silva y cols., 2017). También se ha informado que el estado fisiológico general de las células en forma de hifa está implicado en los perfiles de susceptibilidad del *biofilm* de *Candida* spp., como por ejemplo, la actividad metabólica confirma que las células dentro de los *biofilm* están experimentando respiración mitocondrial durante todo su desarrollo (Silva y cols., 2017).

Es por esto que existe una creciente necesidad de encontrar nuevos antifúngicos debido al crecimiento de poblaciones susceptibles, las limitaciones del espectro de actividad o la tolerabilidad de los antifúngicos actuales y el desarrollo de resistencia antifúngica (Ostrosky-Zeichner y cols., 2010).

Uno de los antifúngicos más usados actualmente para las infecciones por *Candida* spp. es el Fluconazol, debido a su baja toxicidad y bajo costo (Paul y cols., 2020). Este antifúngico inhibe a la enzima lanosterol demetilasa del citocromo P450, codificada por ERG11, en la ruta de biosíntesis de ergosterol, el análogo fúngico funcional del colesterol. Al tener un efecto más fungistático que fungicida, brinda mayor oportunidad de desarrollar resistencia adquirida por parte de *Candida* spp. (Berkow y Lockhart, 2017). En los EE. UU., se ha detectado que *Candida* spp. posee una resistencia a este fármaco que varía entre 2% y 13%, como también se ha encontrado en *C. auris* una tasa de resistencia al fluconazol de hasta el 93% (Lockhart y cols., 2017). Frente a esto, la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (IDSA) ha incentivado la investigación hacia la combinación de fármacos antimicrobianos, como los azoles, con agentes más nuevos, tal como quinolonas, cefalosporinas,  $\beta$ -lactámicos- $\beta$ -lactamasas, carbapenémicos, entre otros; ya que se ha estudiado que estas combinaciones permiten lograr una mayor eficacia terapéutica, minimizar la toxicidad del fármaco, economizar los costos de la terapia y limitar la resistencia a los medicamentos (Rhim y cols., 2020).

Hoy en día, el gran problema existente en la búsqueda de nuevos agentes antifúngicos es la gran similitud entre la célula humana con la fúngica, debido a que ambas son células eucariotas. Esto limita el número de blancos farmacológicos que pueden ser explotados para el desarrollo de fármacos selectivos a la célula patógena sin el riesgo de toxicidad en la célula humana (Calderone y cols., 2015)

#### **D. Mitocondria: posible blanco farmacológico.**

Dentro de los organelos aún no explotados como blanco farmacológico está la mitocondria de *C. albicans*. Este organelo aloja e integra múltiples funciones anabólicas y catabólicas involucradas en la producción de energía; el metabolismo de carbono, nitrógeno, lípidos y hierro; y la biosíntesis de aminoácidos, ácidos nucleicos y otros componentes celulares (Frantz y Wipf, 2010).

Su estructura se compone de cuatro compartimentos distintos que realizan funciones especializadas: la membrana mitocondrial externa (MME), el espacio

intermembrana (EIM), la membrana mitocondrial interna (MMI) y la matriz mitocondrial. El MMI está muy plegado en crestas que albergan los complejos proteicos de la cadena de transporte de electrones (CTE) y el complejo ATP sintasa, controlando las tasas fundamentales del metabolismo celular. Este papel esencial de la mitocondria es responsable de su referencia como la “planta de energía de la célula” (Frantz y Wipf, 2010). Sin embargo, la función de las mitocondrias no se limita a suministrar energía celular. La producción de trifosfato de adenosina (ATP) a través del proceso de fosforilación oxidativa requiere un flujo continuo de electrones. Como tal, las mitocondrias son la principal fuente de especies reactivas de oxígeno (ROS, es decir, superóxido y  $H_2O_2$ ), generadas como subproductos de la CTE. Las ROS reflejan el nivel de estrés oxidativo celular, causando un daño severo a las macromoléculas cuando se producen en exceso. Sin embargo, cuando se producen en una cantidad controlada, las ROS también pueden desempeñar funciones de señalización importantes en varios procesos dependientes de redox, incluida la apoptosis, la proliferación celular e hipoxia (Frantz y Wipf, 2010).

Algunos estudios han demostrado que la función mitocondrial es esencial para la virulencia de *C. albicans* debido a su importancia en la diferenciación de levadura a hifas y la formación de *biofilm*, frente a la adaptación al estrés, y en la biosíntesis y estructuración de la membrana y pared celular (Calderone y cols., 2015; She y cols., 2018). También, las mitocondrias están involucradas en las acciones de las bombas de eflujo, uno de los mecanismos de resistencia hacia antifúngicos más estudiados actualmente (Chang y cols., 2018). Se ha evidenciado su importancia en la susceptibilidad de *C. albicans* a los medicamentos antifúngicos, ya que en células con ausencia del organelo o delección de genes codificantes para los complejos de la cadena respiratoria han evidenciado una hipersensibilidad del hongo frente a fluconazol, uno de los tratamientos más utilizados contra *C. albicans* (Sun y cols., 2019).

Se ha postulado a la mitocondria de *C. albicans* como potencial blanco farmacológico debido a que, además de las características antes mencionadas, se



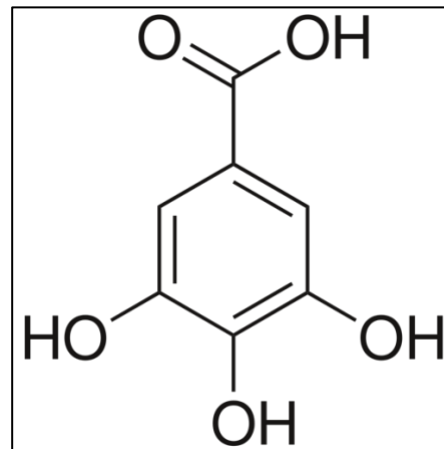
ha evidenciado que posee un potencial de membrana ( $\Delta\psi$ ) celular más negativo que el presente en células humanas. El valor del  $\Delta\psi$  celular de *C. albicans* es  $\sim -120$  mV siendo comparable al de las bacterias patógenas, que oscila entre  $\sim -130$  mV y  $\sim -150$  mV mientras que el potencial de las células de mamíferos es  $\sim -90$  mV (Suchodolski y Krasowska, 2019). Además, *C. albicans* posee un potencial de membrana mitocondrial más negativo que su potencial de membrana celular (Prasad y Höfer, 1986) por lo que moléculas cargadas de forma positiva podrían dirigirse de forma selectiva a la célula fúngica y al organelo en cuestión interfiriendo en procesos mitocondriales indispensables para su funcionalidad. Por tanto, las diferencias entre células humana y fúngicas sugieren que las mitocondrias podrían representar un objetivo terapéutico. Esta diferencia podría representar una nueva forma de antifúngico contra *C. albicans*.

#### **E. Nuevas alternativas farmacológicas contra *Candida albicans*.**

En los últimos años, los investigadores se han centrado en estudios farmacológicos con compuestos bioactivos extraídos de plantas o derivados semi-sintéticos a partir de los compuestos naturales para así desarrollar antimicóticos naturales de baja toxicidad (Chen y cols., 2019). En particular, los flavonoides han recibido gran atención debido a su presencia común en una variedad de plantas (Seleem y cols., 2017).

Los flavonoides son compuestos naturales pertenecientes a la familia de los polifenoles, que son metabolitos secundarios que ocurren naturalmente en las plantas y presentan uno o más anillos aromáticos unidos a uno o más grupos hidroxilo. Se encuentran principalmente en alimentos y bebidas, como frutas, verduras, cereales, té, café y vino tinto. Estudios epidemiológicos y clínicos han informado que la mayoría de los polifenoles poseen actividades antioxidantes y antimicrobianas que incluyen efectos antifúngicos, antivirales y antibacterianos (Seleem y cols., 2017). Entre estos compuestos flavonoides se encuentra el Ácido Gálico (ácido 3,4,5- trihidroxibenzoico), el cual es un compuesto fenólico obtenido mediante la hidrolización de los taninos y está presente en verduras y frutas como la corteza de la granada (Figura 3) (Li y cols., 2017). Se ha documentado su efecto anticancerígeno (Singh y cols., 2016), antiinflamatorio (Saygin y cols., 2016) y antibacteriano (Lu y cols., 2016). Por ejemplo, se ha demostrado que el ácido gálico afecta la membrana celular de las bacterias Gram positivos y Gram negativos, provocando un cambio en la hidrofobicidad y la carga de la superficie celular, lo que en última instancia provoca una fuga del contenido citoplásmico (Borges y cols., 2013). Últimamente se ha estudiado su actividad antifúngica descubriendo que inhibe el crecimiento y reduce el número de células en forma de levadura e hifas de *C. albicans* (Seleem y cols., 2017), y posee actividad antifúngica contra *biofilm* (Aldahash, 2018). Además, se ha evidenciado que disminuye la actividad de la enzima Lanosterol 14 alfa-desmetilasa del citocromo P450 y la escualeno epoxidasa fúngica de forma comparable al fluconazol interfiriendo en la biosíntesis de ergosterol de la membrana fúngica (Li y cols., 2017).

La evidencia sobre el efecto del ácido gálico en las mitocondrias fúngicas es escasa, pero hay estudios que han documentado un efecto inhibidor de la fosforilación oxidativa de las

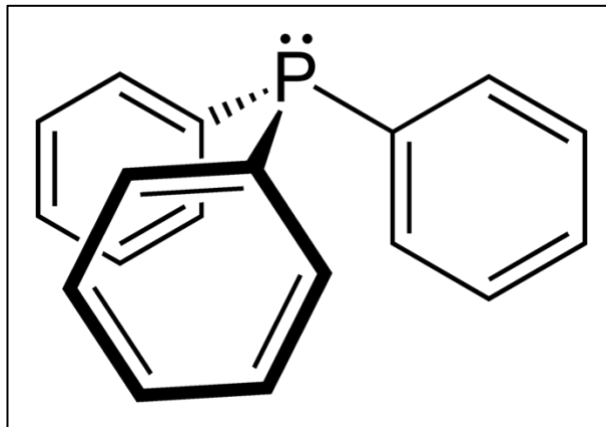


**Figura 3: Ácido gálico.** Ácido orgánico también conocido como ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico. La fórmula química es  $C_6H_2(OH)_3COOH$ .

mitocondrias en el hongo micotoxigénico *Penicillium expansum* (Kim y cols., 2010). Por otro lado, existe variada evidencia sobre su efecto en células cancerígenas; trabajos previos han demostrado que ésteres del ácido gálico inducen apoptosis en líneas celulares tumorales activando la vía apoptótica dependiente de mitocondrias, comportándose como inhibidores del transporte de electrones. Se informó que el aumento de las concentraciones de la molécula provocaba un efecto de desacoplamiento en el sistema de fosforilación oxidativa, seguido de una inhibición del flujo de electrones a través de la cadena respiratoria, predominantemente en el paso NADH-CoQ. Ambos efectos previenen la síntesis de ATP, lo que provoca la muerte celular (Jara y cols., 2014).

#### **F. Cationes lipofílicos.**

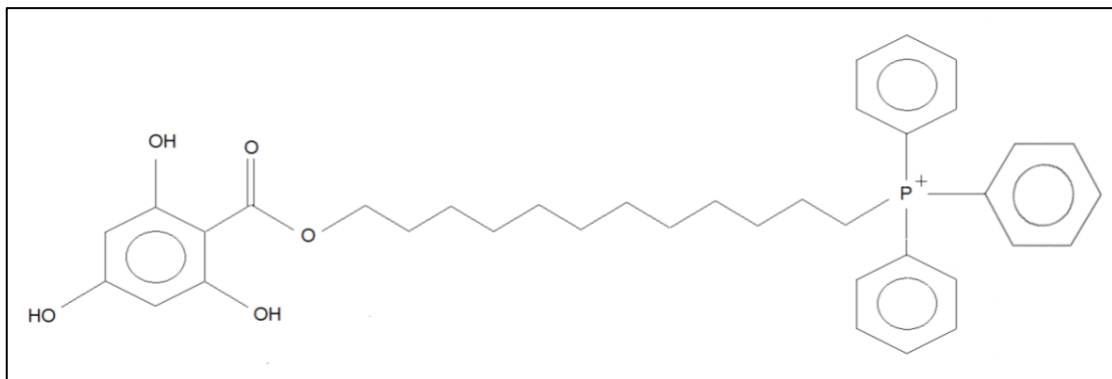
Teniendo en cuenta la actividad citotóxica del ácido gálico dentro de mitocondrias de células tumorales y su posible efecto en células fúngicas, se ha visto la necesidad de crear vehículos que conduzcan este componente dentro de la célula y a la mitocondria de forma selectiva. La mantención del gradiente electroquímico producido por la diferencia de concentración de H<sup>+</sup> en la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana es un fenómeno clave para la síntesis de ATP. Esta diferencia de potencial de membrana que otorga una carga negativa en la cara interna de la membrana interna mitocondrial, permite que cualquier catión con la capacidad de atravesar membranas biológicas se pueda acumular en la membrana mitocondrial (Barbosa y cols., 2012). Los cationes lipofílicos como las sales de fosfonio son moléculas cargadas positivamente que inicialmente se utilizaron como sondas para estudiar el mecanismo de acoplamiento del potencial de membrana mitocondrial con la fosforilación oxidativa y posteriormente se utilizaron para determinar el potencial de membrana mitocondrial. Últimamente se han utilizado como vehículos para conducir moléculas al interior de la mitocondria, aumentando así la especificidad y eficacia del compuesto transportado, y por consiguiente su actividad. En general, los cationes lipofílicos son compuestos anfifílicos con carácter altamente lipofílico que poseen la capacidad de deslocalizar su carga, lo que facilita el suministro de moléculas impermeables a través de bicapas lipídicas para unirse a su blanco farmacológico (Figura 4) (Demine y cols., 2019).



**Figura 4: Cation lipofílico Trifenilfosfonio (TPP<sup>+</sup>).** Ácido débil con carácter altamente lipofílico, posee la capacidad de atravesar bicapas lipídicas para unirse a blancos farmacológicos.

Frente a esto, en estudios sobre células cancerígenas se ha adaptado el enfoque de Murphy y Smith (Murphy y Smith, 2007), uniendo las moléculas antioxidantes con el catión lipofílico trifenilfosfonio (TPP<sup>+</sup>) mediante una cadena alquílica de 10 a 12 átomos de carbono, la cual ha demostrado que aumenta su citotoxicidad y selectividad. Esta unión se buscó debido a que la barrera de energía para algunos compuestos hidrófilos puede ser tan alta que incluso la conjugación con un catión lipofílico no es suficiente para conducirlos a organelos tal como las mitocondrias, por lo que se demostró que el aumento de la hidrofobicidad alargando la cadena de alquilo conduce a una absorción mitocondrial más rápida del TPP<sup>+</sup> (Zielonka y cols., 2017). Se ha estudiado que las cadenas con menos de ocho átomos de carbono son menos potentes y las que tienen cerca de 15 átomos de carbono son altamente tóxicas. Por lo tanto, la diferencia en la eficacia del compuesto depende de la longitud de la cadena lateral de alquilo (Jara y cols., 2014). Tal enfoque aumenta la lipofilia de los compuestos como el ácido gálico y los dirige de forma selectiva a las mitocondrias, dotando a estas moléculas de una mayor actividad antioxidante mitocondrial en comparación con sus compuestos originales (Sandoval-Acuña y cols., 2016).

En estudios con células tumorales, se ha demostrado que el compuesto resultante de la unión del ácido gálico con el catión lipofílico TTP<sup>+</sup> mediante la cadena alquílica de carbonos se acumula selectivamente dentro de las mitocondrias tumorales provocando su efecto citotóxico debido a que el potencial de membrana celular y mitocondrial de las células cancerosas es más negativo que el de células no cancerosas (Jara y cols., 2014). Esta característica coincide con las diferencias estructurales entre células fúngicas y humanas, ya que como se mencionó anteriormente, el potencial de membrana de las células fúngicas es más negativo que el de células humanas. Debido a su carga positiva, estos cationes son impulsados por el potencial del citoplasma y la membrana mitocondrial para acumularse selectivamente dentro del espacio intermembrana (Chang y cols., 2018).



**Figura 5: Estructura del fármaco TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG.** a) Grupo farmacóforo correspondiente a éster de ácido gálico. b) Cadena alquílica de 12 carbonos que otorga lipofilicidad necesaria para traspasar membrana externa mitocondrial. c) Grupo TPP<sup>+</sup>.

En este trabajo postulamos que derivados del ácido gálico unidos a un grupo trifenilfosfonio mediante una cadena alquílica de 12 carbonos se acumularán de forma selectiva dentro de la mitocondria de *C. albicans* (Figura 5). Esta molécula se uniría directamente a las bicapas de fosfolípidos debido a su gran superficie hidrofóbica, que reduce la energía de activación requerida para la absorción del resto TPP<sup>+</sup>. Debido a su carga positiva, estos cationes son impulsados por el potencial del citoplasma y la membrana mitocondrial para acumularse selectivamente dentro de la membrana mitocondrial interna en 500 veces (Ross y

cols., 2005). Al ingresar esta molécula, los cationes podrían ser oxidados enzimáticamente por componentes de los complejos mitocondriales, formando el derivado semiquinónico y luego la o-quinona del ácido gálico. Esta o-quinona a su vez, podría reaccionar formando enlaces covalentes, mediante el mecanismo conocido como la reacción de Michael, con grupos sulfhidrilos o aminas que se encuentran ampliamente disponibles en las proteínas integrantes de los complejos de la CTE. Esta unión provocaría cambios en su conformación alterando así la actividad de distintos complejos de la CTE (Frey y cols., 2007). Así también, los grupos hidroxilos aromáticos del ácido gálico por ser ácidos débiles lipofílicos, podrían comportarse como agentes desacoplantes clásicos, interfiriendo con la relación entre las concentraciones de protones del espacio intermembrana mitocondrial y de la matriz mitocondrial (Demine y cols., 2019). De esta manera, se provocaría un mal funcionamiento del sistema de fosforilación oxidativa que debería traducirse en una disminución en la síntesis de ATP e inhibición de la vía glucolítica, la cual es altamente dependiente del ATP producido por la fosforilación oxidativa.

Tomando en cuenta los antecedentes presentados, este trabajo evaluará el efecto antifúngico del fármaco Bromuro de (12-((3,4,5-trihidroxibenzoil)oxi)-dodecil) trifenilfosfonio (TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG) sobre *C. albicans* a través de la inhibición de la fosforilación oxidativa.

### **III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.**

#### **A. HIPÓTESIS.**

El fármaco Bromuro de (12- ((3,4,5-trihidroxibenzoil) oxi) - dodecil) trifenilfosfonio (TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG) presentará un efecto antifúngico sobre *Candida albicans*, a través de la inhibición de la fosforilación oxidativa.

#### **B. OBJETIVO GENERAL.**

Evaluar efecto antifúngico del derivado del ácido gálico unido al grupo trifenilfosfonio mediante una cadena alquílica de 12 carbonos y su efecto sobre la respiración mitocondrial en *Candida albicans*.

#### **C. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

1. Determinar el efecto antifúngico del fármaco sobre *Candida albicans* en su forma planctónica y *biofilm*.
2. Determinar el efecto del fármaco sobre la respiración mitocondrial de *Candida albicans* en cultivos planctónicos.

## **IV. METODOLOGÍA.**

### **A. TIPO DE ESTUDIO REALIZADO.**

Este estudio se encuentra adscrito al proyecto PERIODO DIFO 2020/09, y corresponde a un estudio de tipo experimental (analítico y prospectivo).

### **B. CEPAS.**

En este trabajo se utilizaron dos cepas de *Candida albicans*, una cepa susceptible ATCC-90029 y una cepa resistente a fluconazol ATCC-10231. Las cepas fueron mantenidas en placas de Agar Sabouraud Cloranfenicol (Biokar) hasta su utilización. A partir de estas placas se obtuvieron colonias aisladas que se resuspendieron en medio líquido (RPMI-1640, Sigma) para su utilización en los ensayos en cultivos planctónicos (células no adheridas a una superficie) o como *biofilms* (células adheridas) como se detalla más adelante.

### **C. FÁRMACOS.**

El fármaco Bromuro de (12- ((3,4,5-trihidroxibenzoil) oxi) - dodecil) trifenilfosfonio (TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG) fue donado por el Dr. José Jara del Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Las concentraciones stock fueron preparadas en DMSO (Sigma) y se ensayaron en distintas concentraciones cuidando de no exponer a las levaduras a una concentración de DMSO mayor al 1%.

### **D. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM).**

Para determinar la CIM del fármaco se utilizaron las cepas ATCC-90029 y ATCC-10231 en su forma planctónica y *biofilm*.

- Preinóculo: se aislaron una a dos colonias de 1-2 mm de diámetro de *C. albicans* de cada cepa y se resuspendieron por separado en medio RPMI-1640 (Sigma), incubando por 24 hrs a 28°C sin agitación.



### **1. Ensayo de Susceptibilidad en células en estado planctónico.**

Este método se realizó de acuerdo al Método de dilución en caldo para la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias de antifúngicos para levaduras (EUCAST, documento 7.2) (Arendrup y cols., 2020). A partir del preinóculo se contaron las células y se ajustaron a 200.000 UFC/mL a través de conteo en cámara de Neubauer. Se adicionó 100 µL de la suspensión en placas de 96 pocillos, se agregó el fármaco en distintas concentraciones y se adicionó cantidad suficiente de medio RPMI-1640 para un volumen total de 200 µL. Se dejaron incubando por 24 horas a 37 °C. Al cabo de este periodo, se midió la densidad óptica (DO) a 540 nm en un lector de microplacas (Infinite 50 TECAN). La CIM fue expresada como la concentración capaz de inhibir en un 50% el crecimiento (IC<sub>50</sub>), valor obtenido de la curva semilogarítmica concentración-respuesta obtenida mediante el software GraphPad Prism 6.

### **2. Ensayo de viabilidad de MTT sobre células en estado *biofilm*.**

La evaluación del efecto sobre la viabilidad celular del compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG se realizó mediante el ensayo de MTT. Este ensayo se basa en la capacidad de las células viables de reducir a partir de deshidrogenasas mitocondriales y reductasas citosólicas el bromuro de 3-{4,5-dimetiltiazol-2-ilo}-2,5-difeniltetrazol (MTT), reacción que genera un compuesto coloreado azul (cristales de formazán) (Stockert y cols., 2012). La actividad reductora indica la actividad metabólica celular, que es proporcional al número de células vivas y a su vez, es proporcional a la cantidad de formazán producido. Para la formación de *biofilms* se utilizó el protocolo reportado por Madariaga y cols. (2017). En breve, a partir del preinóculo se contaron las células en la cámara de Neubauer y se ajustaron a 1.000.000 UFC/mL. Se agregó 100 µL de la suspensión de células en las placas de 96 pocillos más 100 µL de RPMI-1640 suplementado con Suero fetal bovino al 10% (SFB), y se dejó incubando por 24 horas a 37 °C para la formación de *biofilm*. Pasado este tiempo, se descartaron las células no adherentes y se realizaron los ensayos con el *biofilm* formado en el fondo del pocillo. Estas células se lavaron con 100 µL de PBS al 1% tres veces y se agregó el fármaco en las distintas concentraciones hasta completar

un volumen total de 200  $\mu\text{L}$  con medio RPMI-1640 con SFB. Se dejaron incubando nuevamente por 24 horas a 37°C en aerobiosis. Pasado este periodo, se lavaron las células con 100  $\mu\text{L}$  de PBS al 1% tres veces y se agregó 100  $\mu\text{L}$  de MTT. Se incubaron por 2-3 horas a 37 °C, se retiró el MTT y se agregó 40  $\mu\text{L}$  de DMSO con posterior agitación de 15 min a 120 rpm. Al cabo de este periodo, se midió la DO a 540 nm en un lector de microplacas, con agitación leve por 10 segundos. A través de la curva semilogarítmica concentración-respuesta obtenida, se calculó la concentración capaz de inhibir en un 50% el crecimiento de los *biofilms* (IC50), utilizando el software GraphPad Prism 6.

## **E. DETERMINACIÓN DE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL.**

### **1. Oxigrafía.**

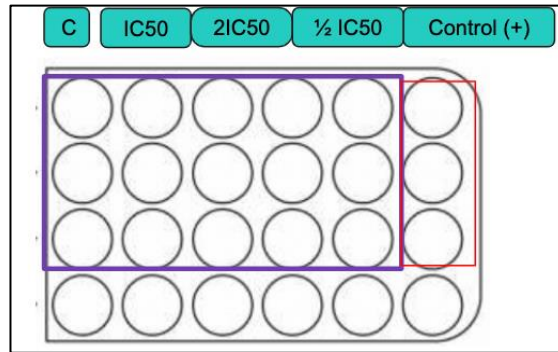
Para medir el efecto que posee el compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG sobre la respiración celular se calculó el consumo de oxígeno de *C. albicans* en presencia y ausencia del fármaco mediante Oxigrafía. Esta técnica tiene por objetivo cuantificar el consumo de oxígeno en preparados de células o mitocondrias mediante un electrodo de oxígeno. Para realizar este ensayo se utilizaron ambas cepas en su forma planctónica a partir de la técnica esencialmente descrita por Plaza y cols. (Plaza y cols., 2008). Se aislaron dos colonias de *C. albicans* de cada cepa y se resuspendieron por separado en medio RPMI-1640 sin SFB, incubándose por 24 horas a 28°C. A partir de este preinóculo, se ajustaron las células a 1x10<sup>7</sup> UFC/mL. Posteriormente las células fueron centrifugadas a 2500 rpm a 10°C por 5 min y se retiró el medio de cultivo. Las células fueron resuspendidas en 50  $\mu\text{L}$  de PBS. El consumo de oxígeno se midió polarográficamente con un electrodo de oxígeno Clark No. 5331 inserto en una cámara termorregulada a 25°C y a un monitor YSI modelo 53 conectado a un inscriptor Goerz RE 511 de canal simple 100 mV. Las células suspendidas fueron depositadas en la cámara del oxígrafo junto con 10  $\mu\text{L}$  de L-glutamina (1mM). Una vez que la señal de consumo de oxígeno se estabilizó, se agregaron los fármacos en las distintas concentraciones (½CIM, CIM, 2xCIM) y se completó el volumen de la cámara (600  $\mu\text{L}$ ) con PBS. Realizado este

procedimiento se calculó la pendiente del consumo de oxígeno registrado por el oxígrafo mediante el software GraphPad Prism 6. Los resultados se expresaron como porcentajes de consumo de oxígeno, siendo la pendiente del control el 100% de consumo de oxígeno.

#### **F. CITOMETRÍA DE FLUJO.**

Un aumento en el consumo de oxígeno podría deberse a la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y no necesariamente por un efecto sobre la respiración celular. Para descartar la generación de ROS en nuestro sistema, se cuantificó la producción de ROS mediante citometría de flujo a partir de la técnica descrita por Jara y cols. (2014). La sonda utilizada, diacetato de 2',7'-dicloro-dihidrofluoresceína (DCFH-DA) es un lipófilo no fluorescente que se difunde y atraviesa la membrana celular; bajo la acción de las esterasas intracelulares, DCFH-DA desacetila para formar 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH); el cual es impermeable a la membrana; DCFH reacciona con ROS intracelulares para dar el compuesto fluorescente 2',7'-diclorofluorescina (DCF). La luz de este compuesto es absorbida por el citómetro y leída a través de su longitud de onda.

Para este ensayo, se utilizó la cepa de *C. albicans* ATCC-90029 en su forma planctónica. Se aislaron dos colonias de *C. albicans* y se resuspendieron por separado en medio RPMI-1640 sin SFB, incubándose por 24 horas a 28°C. A partir de este preinóculo, se ajustaron las células a  $1 \times 10^6$  UFC/mL. En una placa de 24 pocillos, se depositaron 500  $\mu$ L de la suspensión de células. Se agregó el fármaco en concentraciones de  $\frac{1}{2}$ CIM, CIM, 2xCIM. Luego se incubaron a 37°C por 1 hora. Pasado el tiempo, se agregó 5  $\mu$ L de DCFH-DA a cada pocillo y se dejó incubando por 15 min más. Como control positivo se utilizó 100  $\mu$ L de peróxido de hidrógeno 3% ( $H_2O_2$ ) en ausencia del fármaco y el control negativo correspondió a las células sin tratamiento (Figura 6).



**Figura 6: Representación de placa de 24 pocillos con control, control positivo y concentraciones del compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG**

### **G. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.**

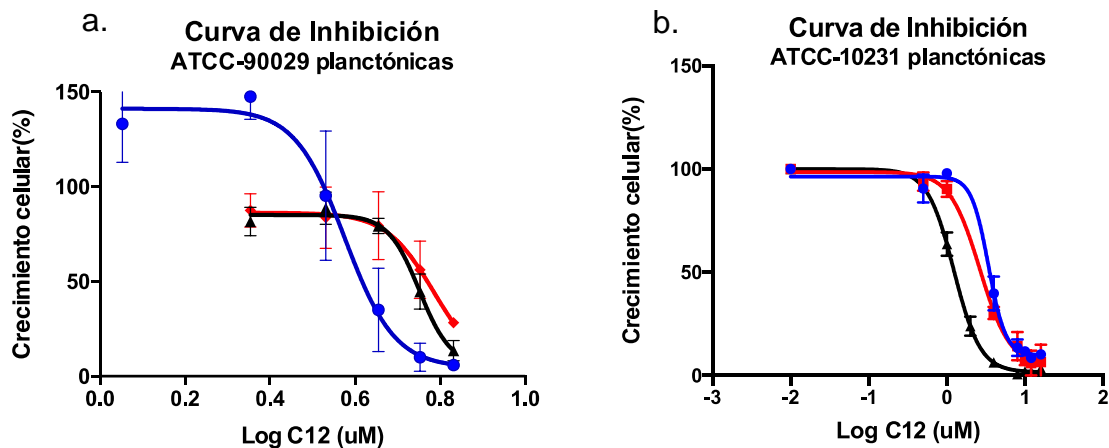
Cada ensayo se realizó al menos tres veces en triplicado. Para determinar las diferencias significativas se consideró un  $p < 0,05$  utilizando ANOVA de una vía. Los análisis se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 6.

## V. RESULTADOS

### A. MEDICIÓN CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA.

#### 1. Células en estado planctónico.

Para determinar la concentración inhibitoria mínima de TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG sobre *C. albicans* se realizó un ensayo de susceptibilidad para las cepas ATCC-90029 y ATCC-10231 obteniéndose la curva semilogarítmica concentración-respuesta presentada en la Figura 7. En la figura se puede observar un efecto inhibitorio concentración-dependiente sobre el crecimiento de *C. albicans*, tanto para la cepa ATCC-90029 (Figura 7A) como para la cepa resistente a fluconazol ATCC-10231 (Figura 7B).



**Figura 7: Curva dosis respuesta del compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG sobre el crecimiento de *C. albicans* en estado planctónico a través de ensayo de microdilución en medio líquido.** Representación gráfica del efecto concentración respuesta del compuesto en estudio sobre *C. albicans* medido a través del porcentaje de crecimiento en función del logaritmo de la concentración. Se muestran las curvas de tres experimentos independientes sobre la cepa ATCC-90029 (A) y ATCC-10231 (B). Cada ensayo se realizó por triplicado.

Los valores de CIM de ambas cepas se muestran en la Tabla 1. En la tabla se observa que el promedio de IC<sub>50</sub> del fármaco sobre *C. albicans* es de 5,2±1,2 µg/ml en ATCC-90029 y 2,4±1,1 µg/ml en ATCC-10231. Frente a estos resultados, el fármaco es capaz de inhibir el crecimiento de *C. albicans* de manera concentración dependiente. De esta manera, pudimos obtener la concentración a la cual se inhibe el 50% del crecimiento de la población celular.

**Tabla 1: Valores de CIM del compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG obtenidos mediante ensayo de microdilución en medio líquido sobre *C. albicans* en cepas ATCC-90029 y ATCC-10231 en estado planctónico.**

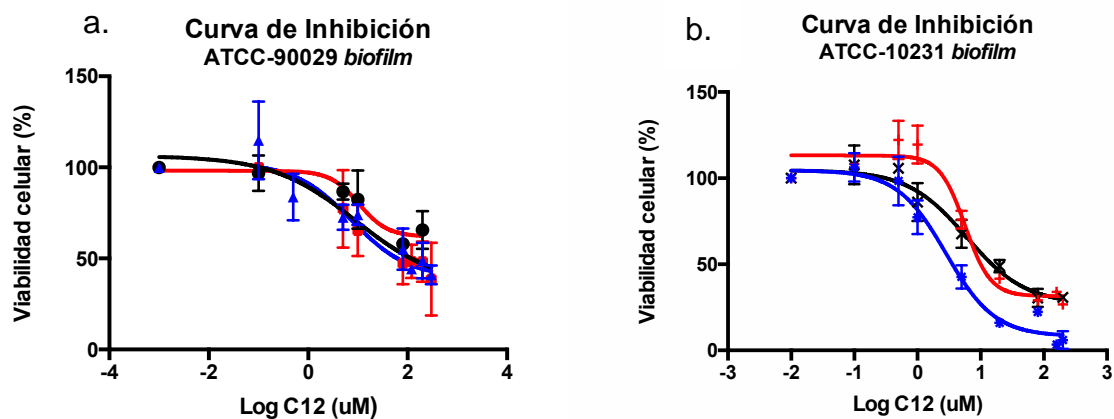
	IC50-1 (µg/ml)	IC50-2 (µg/ml)	IC50-3 (µg/ml)	Promedio ± DS (µg/ml)	IC50 (µM)
<b>ATCC90029</b>	3,8	5,6	6,1	<b>5,2 ± 1,2</b>	<b>8,3</b>
<b>ATCC10231</b>	3,4	2,7	1,2	<b>2,4 ± 1,1</b>	<b>3,9</b>

Se presentan los valores obtenidos de 3 experimentos independientes, su promedio y desviación estándar (DS).

## 2. Células en estado *biofilm*.

Teniendo las concentraciones inhibitorias mínimas del fármaco sobre ambas cepas en estado planctónico, se realizaron los ensayos de viabilidad para determinar el IC<sub>50</sub> de las cepas en estado *biofilm*. Los resultados obtenidos mediante ensayo de MTT en ambas cepas se visualizan en la Figura 8 y los valores de IC<sub>50</sub> se muestran en la Tabla 2.

Al igual que en los ensayos anteriores, los resultados obtenidos mediante ensayo de MTT demuestran que existe una actividad antibiofilm del compuesto. Esta actividad se visualiza en un efecto inhibitorio de la viabilidad de *C. albicans* en estado *biofilm* de manera concentración-dependiente en ambas cepas (Figura 8).



**Figura 8: Curva dosis respuesta del compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG sobre el crecimiento de *C. albicans* en estado *biofilm* a través de ensayo de microdilución en medio líquido.** Representación gráfica del efecto concentración respuesta del compuesto en estudio sobre *C. albicans* medido a través del porcentaje de crecimiento en función del logaritmo de la concentración. Se muestran las curvas de tres experimentos independientes sobre la cepa ATCC-90029 (A) y ATCC-10231 (B). Cada ensayo se realizó por triplicado.

Como se puede observar en la Tabla 2, la cepa ATCC-10231 es más susceptible al necesitar una menor concentración del compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG que la cepa ATCC-90029 ( $8,9 \pm 1,5 \mu\text{g/ml}$  versus  $4,8 \pm 1,75 \mu\text{g/ml}$ ) para inhibir el 50% de la viabilidad de los *biofilms*.

**Tabla 1: Valores de CIM del compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG obtenidos mediante ensayo de microdilución en medio líquido sobre *C. albicans* en cepas ATCC-90029 y ATCC-10231 en estado *biofilm*.**

	IC50-1 ( $\mu\text{g/ml}$ )	IC50-2 ( $\mu\text{g/ml}$ )	IC50-3 ( $\mu\text{g/ml}$ )	Promedio $\pm$ DS ( $\mu\text{g/ml}$ )	IC50 ( $\mu\text{M}$ )
<b>ATCC90029</b>	9,0	10,4	7,4	<b><math>8,9 \pm 1,5</math></b>	<b>14,3</b>
<b>ATCC10231</b>	2,8	5,7	6,0	<b><math>4,8 \pm 1,75</math></b>	<b>7,7</b>

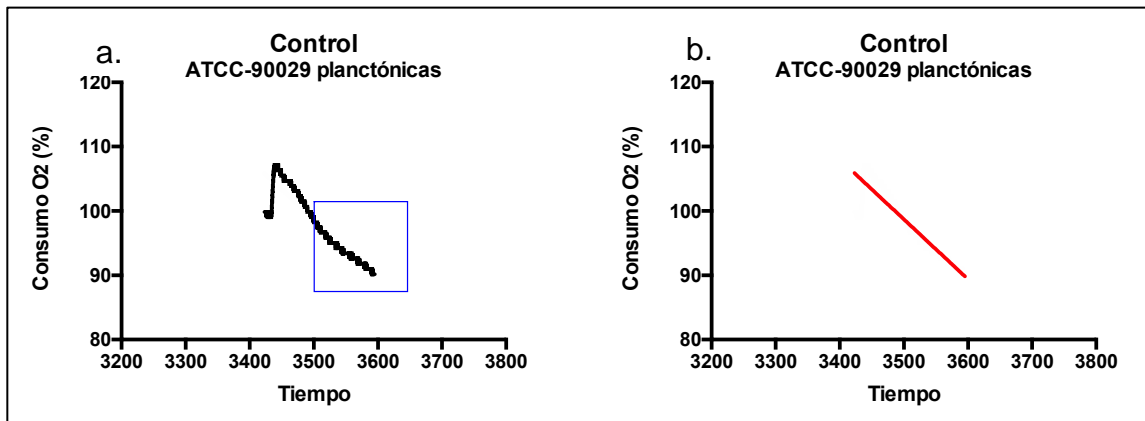
Se presentan los valores obtenidos de 3 experimentos independientes, su promedio y desviación estándar (DS).



## B. DETERMINACIÓN DE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL MEDIANTE OXIGRAFÍA.

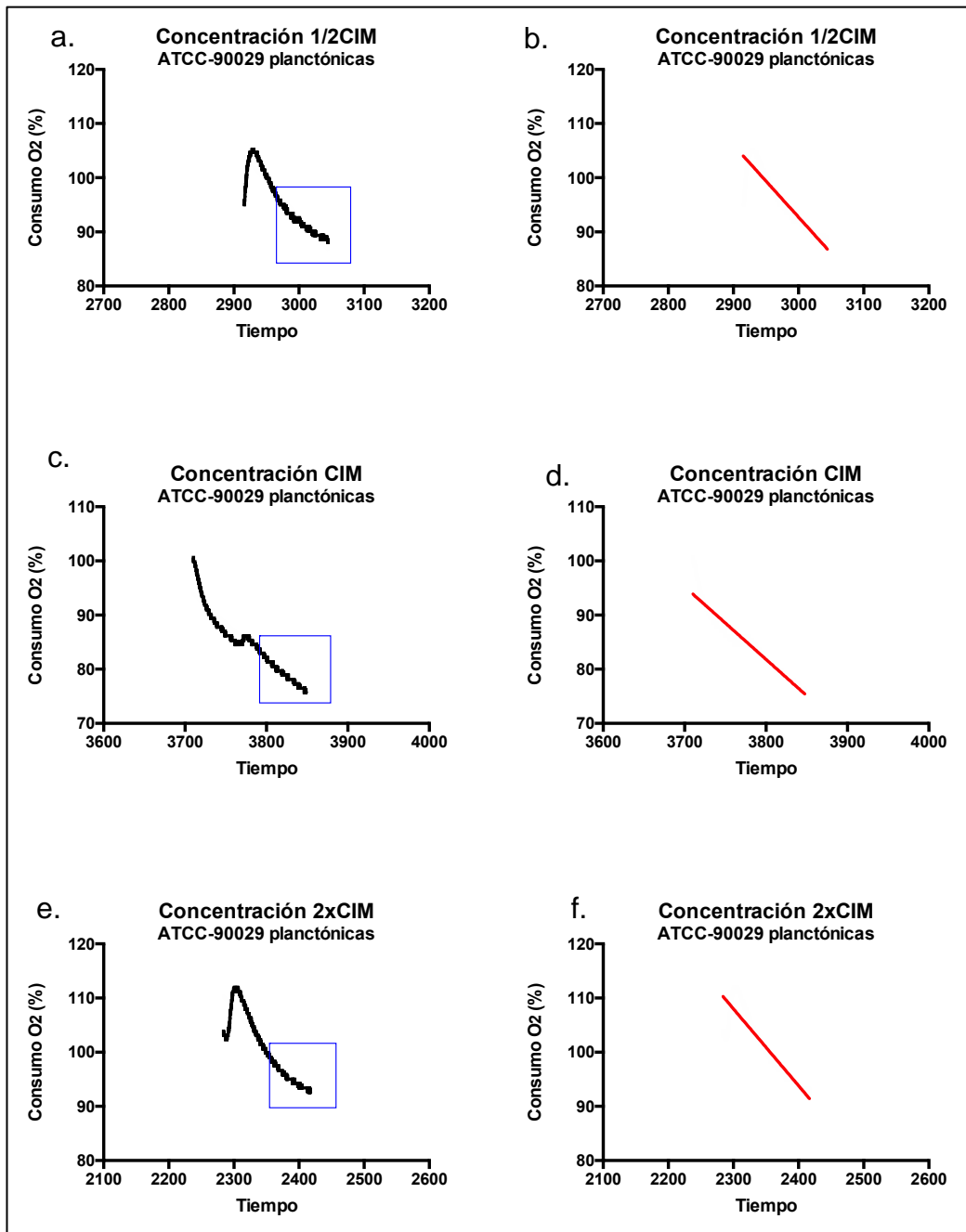
Teniendo en evidencia que el fármaco propuesto presenta actividad antifúngica debido a que inhibe el crecimiento de *C. albicans*, se quiso determinar si este efecto tenía relación con la interrupción de la respiración celular. Para esto, se midió a través de oxigrafía el consumo de oxígeno de las células en ambas cepas en ausencia del fármaco como control de nuestro experimento y en presencia del fármaco a concentraciones  $\frac{1}{2}$ CIM, CIM, 2xCIM, con el objetivo de evaluar si existe un comportamiento concentración-respuesta.

En la figura 9 se muestra la curva del consumo de oxígeno para la cepa ATCC-90029 en ausencia del compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG. Este gráfico representa entonces el porcentaje del consumo de oxígeno en el tiempo. La parte final de la curva representa el periodo en donde el consumo de oxígeno se hace estable en nuestras condiciones experimentales. La zona que demarca el recuadro azul en la figura se utilizó para calcular la pendiente de la curva, que representará la velocidad del consumo de oxígeno. De esta manera obtuvimos el consumo de oxígeno de la condición control (en ausencia de fármaco) asignándole a esta pendiente, representada en la figura B en color rojo, un valor de 100% de consumo de oxígeno basal.



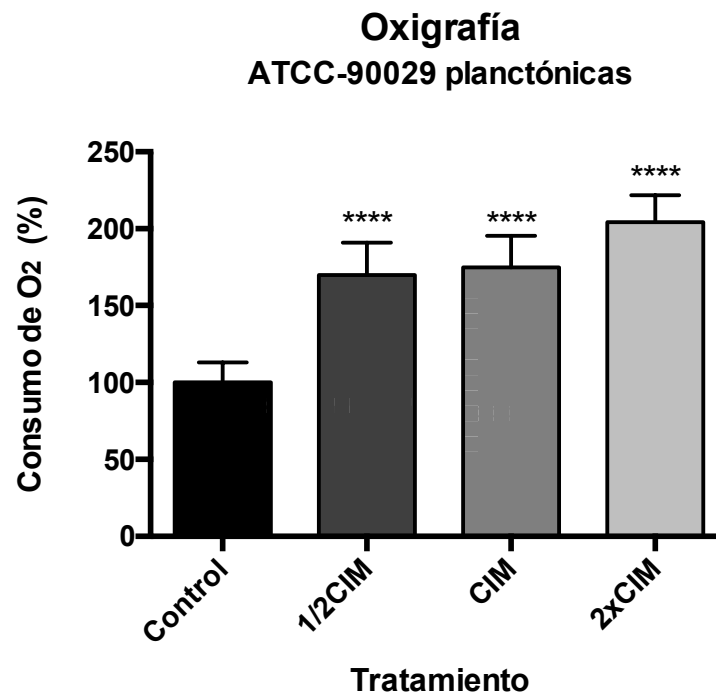
**Figura 9: Consumo de oxígeno de *C. albicans* (cepa ATCC-90029) a través de oxigrafía en ausencia de compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG.** Representación gráfica del consumo de oxígeno de *C. albicans* en ausencia de compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG a través del porcentaje de oxígeno presente en la cámara en función del tiempo. A) Curva de consumo de oxígeno; con cuadrado azul se observa porción de la curva que fue tomada para calcular pendiente. B) Pendiente del consumo de oxígeno.

En la Figura 10 se muestran las curvas representativas de las diferentes condiciones ensayadas en la cepa ATCC-90029 en presencia del fármaco TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG a concentraciones  $\frac{1}{2}$ CIM, CIM, 2xCIM. Es posible observar un cambio en las distintas curvas a distintas concentraciones.



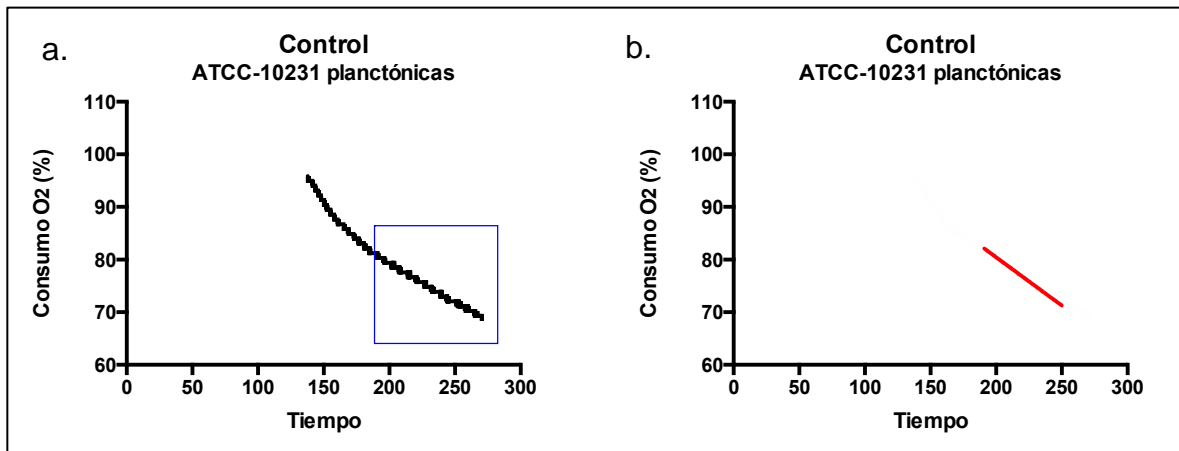
**Figura 10: Consumo de oxígeno de *C. albicans* en cepa ATCC-90029 a través de Oxigrafía en presencia de compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG a concentraciones 1/2CIM, CIM, 2xCIM.** Representación gráfica del consumo de oxígeno de *C. albicans* en presencia de compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG a través del porcentaje de consumo de oxígeno presente en la cámara en función del tiempo a concentraciones 1/2CIM, CIM, 2xCIM. A, C, E) Curva de consumo de oxígeno de concentraciones 1/2CIM, CIM, 2xCIM, respectivamente; con cuadrado azul se observa porción de la curva que fue tomada para calcular pendiente. B, D, F) Pendiente del consumo de oxígeno de concentraciones 1/2CIM, CIM, 2xCIM, respectivamente.

En la figura 11 se muestra la cuantificación del porcentaje de consumo de oxígeno en las distintas condiciones ensayadas. Se puede observar que el fármaco fue capaz de aumentar el consumo de oxígeno en las 3 concentraciones evaluadas de manera estadísticamente significativa ( $p=0,001$ ). La evaluación de la actividad de TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG sobre la respiración celular de la cepa ATCC-90029 mostró que este compuesto actúa aumentando la velocidad de consumo de oxígeno.



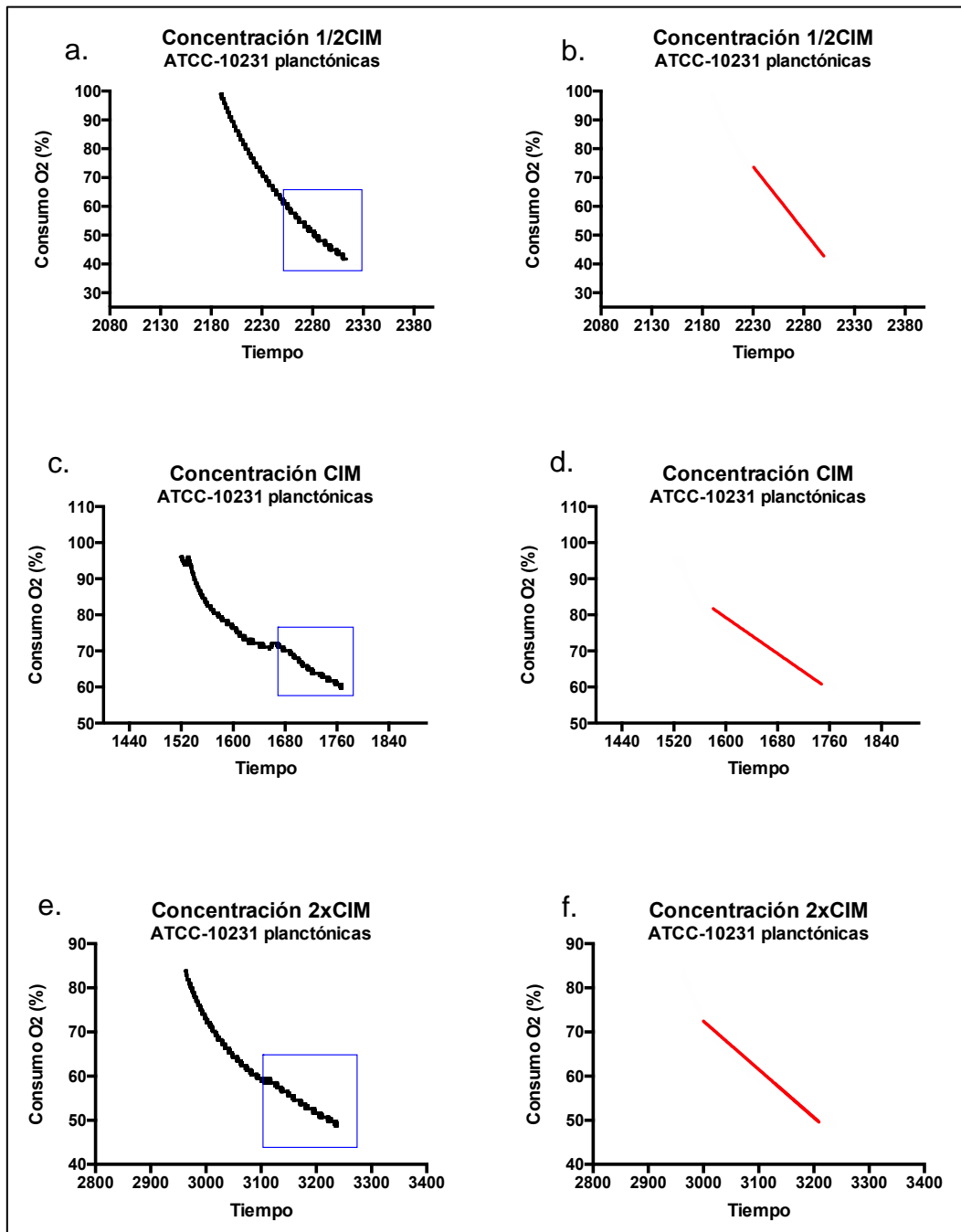
**Figura 11: Consumo de oxígeno de *C. albicans* cepa ATCC-90029 en ausencia y a concentraciones crecientes de compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG.** Representación mediante gráfico de barras de porcentajes de consumo de oxígeno de *C. albicans* cepa ATCC-90029 en ausencia y a concentraciones crecientes de compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG. Se observa un aumento significativo ( $p=0,001$ ) en el porcentaje de consumo de oxígeno cuando las células son tratadas con las concentraciones 1/2CIM, CIM, 2xCIM.

En la Figura 12 se muestra la curva del consumo de oxígeno para la cepa ATCC-10231 en ausencia del compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG.

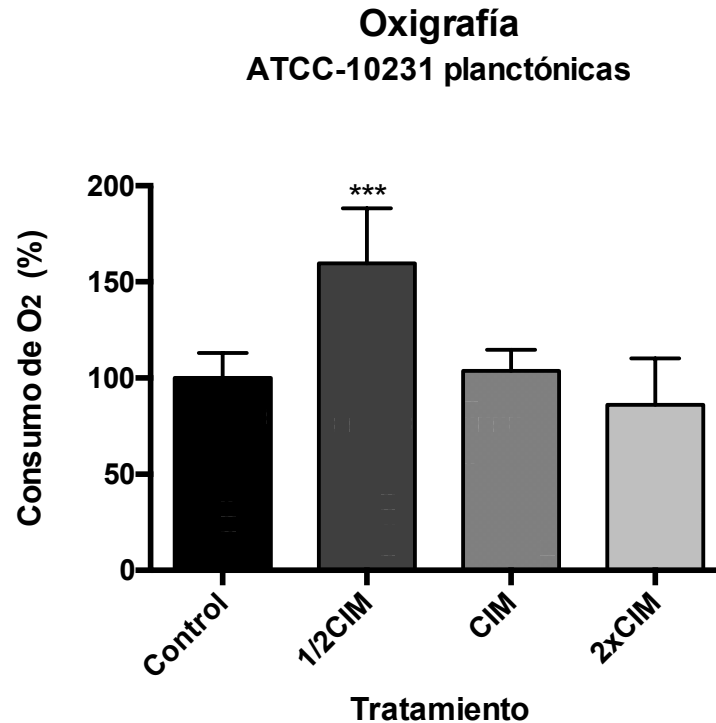


**Figura 12: Consumo de oxígeno de *C. albicans* en cepa ATCC-10231 a través de Oxigrafía en ausencia de fármaco TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG.** Representación gráfica del consumo de oxígeno de *C. albicans* en ausencia de fármaco TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG a través del porcentaje de consumo de oxígeno presente en la cámara en función del tiempo. A) Curva de consumo de oxígeno; con cuadrado azul se observa porción de la curva que fue tomada para calcular pendiente. B) Pendiente del consumo de oxígeno.

En la Figura 13 se muestran las curvas del consumo de oxígeno junto a su pendiente para la cepa ATCC-10231 en presencia del fármaco a concentraciones  $\frac{1}{2}$ CIM, CIM, 2xCIM. Al analizar los valores de consumo de oxígeno para cada condición respecto al control sin tratamiento podemos observar que se produjo una diferencia significativa ( $p=0,008$ ) solo con la concentración  $\frac{1}{2}$ CIM (Figura 14).



**Figura 13: Consumo de oxígeno de *C. albicans* en cepa ATCC-10231 a través de Oxigrafía en presencia de compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG a concentraciones 1/2xIC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub> y 2xIC<sub>50</sub>.** Representación gráfica del consumo de oxígeno de *C. albicans* en presencia de compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG a través del porcentaje de consumo de oxígeno presente en la cámara en función del tiempo a concentraciones 1/2CIM, CIM, 2xCIM. A, C, E) Curva de consumo de oxígeno de concentraciones 1/2CIM, CIM, 2xCIM, respectivamente; con cuadrado azul se observa porción de la curva que fue tomada para calcular pendiente. B, D, F) Pendiente del consumo de oxígeno de concentraciones 1/2CIM, CIM, 2xCIM, respectivamente



**Figura 14: Consumo de oxígeno de *C. albicans* cepa ATCC-10231 en ausencia y a concentraciones crecientes de compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG.** Representación mediante gráfico de barras de porcentajes de consumo de oxígeno de *C. albicans* cepa ATCC-10231 en ausencia y a concentraciones crecientes de compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG. Se observa un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en el porcentaje de consumo de oxígeno cuando las células son tratadas con la concentración 1/2CIM; frente a las concentraciones CIM y 2xCIM existe una disminución del porcentaje de consumo de oxígeno.

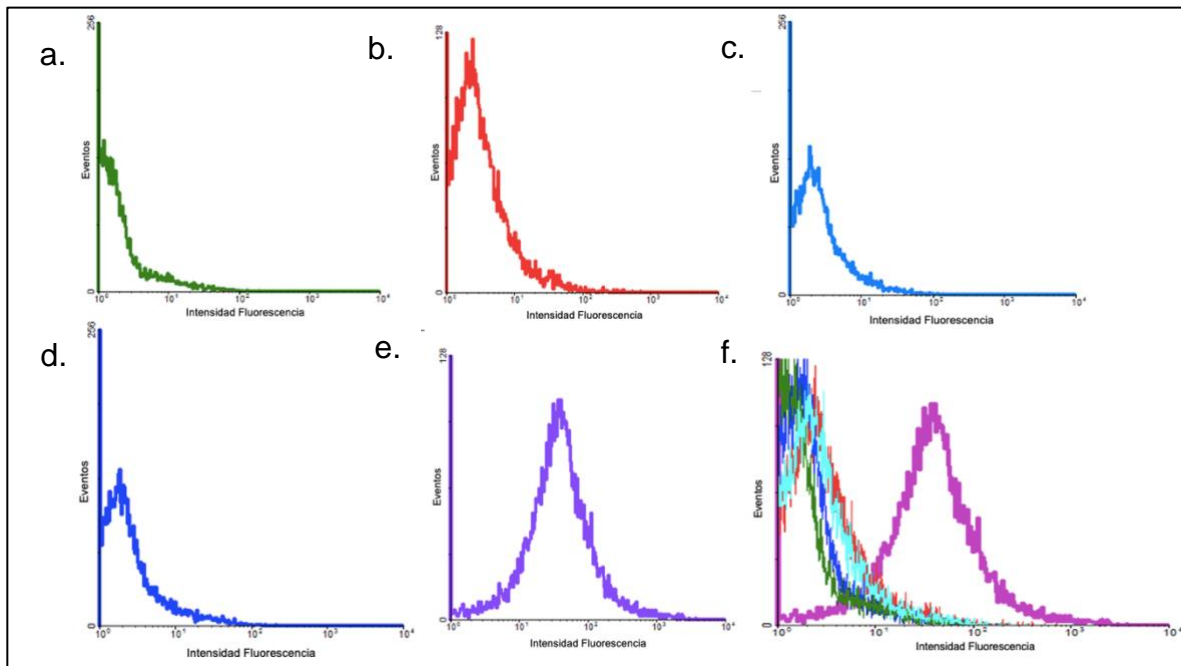
La evaluación de la actividad de TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG sobre la respiración celular de la cepa ATCC-10231 mostró que este compuesto actúa aumentando la velocidad de consumo de oxígeno solo en la concentración 1/2CIM. Por otro lado, frente a las concentraciones CIM y 2xCIM no se obtuvo diferencias en el consumo de oxígeno.

### C. CITOMETRÍA DE FLUJO.

El aumento en la velocidad de consumo de oxígeno puede deberse a un desacoplamiento de la respiración mitocondrial. Sin embargo, también podría producirse debido a la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS). Para poder diferenciar a cuál de los dos mecanismos responde el efecto de TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG, evaluamos la producción de ROS a través de citometría de flujo. Como se explicó en la metodología, si el consumo de oxígeno frente al compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG se da a partir de ROS, el compuesto DCFH conjugará con el ROS presente en el medio generando el elemento fluorescente DCF que será censado por el citómetro.

En la figura 15, se muestran las intensidades de fluorescencia de la cepa ATCC-90029 en ausencia del compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG (Figura 15.A), en presencia del compuesto a concentraciones ½CIM, CIM, 2xCIM (Figura 15.B, Figura 15.C, Figura 15.D respectivamente); y en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Control positivo)(Figura 15.E). Se observa un aumento en la fluorescencia de las células en el control positivo (Figura 15.E), donde la curva está desplazada hacia la derecha, lo que expresa que existe mayor cantidad del producto fluorescente DCF. No se observan diferencias en las fluorescencias entre los otros grupos.

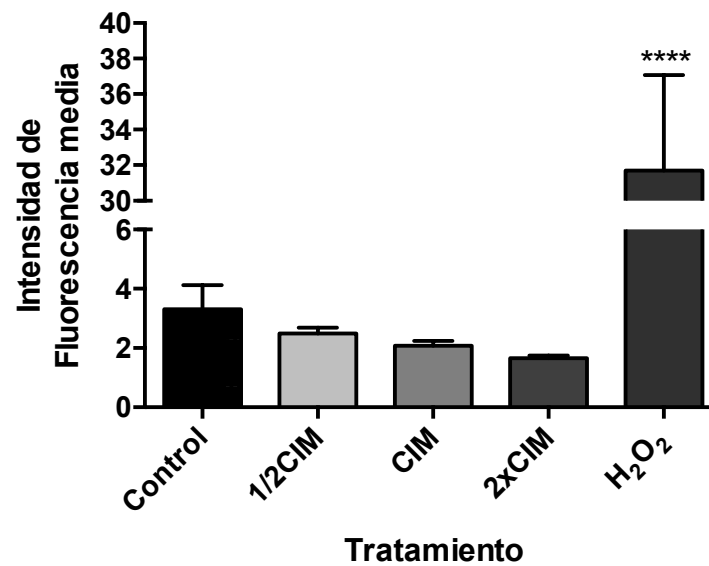




**Figura 15: Intensidad de fluorescencia de *C. albicans* cepa ATCC-90029.** Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia de *C. albicans* cepa ATCC-90029 a través del número de células en función de la intensidad de fluorescencia de la sonda DCF. A) Control. B, C, D). Células tratadas con concentración  $\frac{1}{2}$ CIM, CIM, 2xCIM, respectivamente. E) Células tratadas con  $H_2O_2$ . F) Todos los ensayos juntos.

La figura 16 muestra la comparación de los promedios de la intensidad de fluorescencia media (Figura 16). Existe una diferencia significativa entre los valores obtenidos con peróxido de hidrógeno y el control sin tratamiento, mientras que no se observaron cambios significativos entre el control y las células tratadas con el compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG. Esto indicaría que el aumento del consumo de oxígeno observado en el grupo tratado con TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG no estaría dado por la generación de ROS.

### Citometría de flujo ATCC-90029 planctónicas



**Figura 16: Comparación de intensidad de fluorescencia media de *C. albicans* cepa ATCC-90029.** Representación mediante gráfico de barras de promedio de intensidades de fluorescencia media de *C. albicans* cepa ATCC-90029 de control, células tratadas con concentración 1/2CIM, CIM, 2xCIM y células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Existe diferencia significativa entre las células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y los otros ensayos.

## VI. DISCUSIÓN.

Las infecciones fúngicas invasivas han sido durante mucho tiempo problemas graves para la salud humana, especialmente para la población inmunosuprimida (Pierce & Lopez-Ribot, 2013). En vista de la eficacia limitada de los tratamientos antifúngicos actuales y la aparición de *Candida* spp. resistentes a múltiples fármacos, existe una gran necesidad de nuevos enfoques terapéuticos. Los compuestos naturales se han considerado como una fuente de nuevas biomoléculas con un amplio espectro de propiedades biológicas y farmacológicas. Se han identificado compuestos bioactivos con actividad antimicrobiana donde muchos de ellos son eficaces contra diversos patógenos fúngicos, entre ellos *C. albicans* (Pierce & Lopez-Ribot, 2013).

En este estudio, se analizó la capacidad antifúngica del compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG en *C. albicans*. En relación con el análisis de valores de CIM, como se mencionó en los resultados, el compuesto posee un efecto inhibitorio del crecimiento de *C. albicans* en su forma planctónica en ambas cepas (Tabla 1). Resulta interesante que la cepa ATCC-10231 es más susceptible al necesitar una menor concentración del compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG que la cepa ATCC-90029 (2,4±1,1 µg/mL versus 5,2±1,2 µg/mL, respectivamente). Hasta la fecha no se han reportado valores de CIM para el compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG en *C. albicans* en estado planctónico, pero sí se han reportado para el ácido gálico, los cuales varían desde 8 µg/mL (Ozcelik y cols., 2011) hasta 200 µg/mL (Gehrke y cols., 2013) y 250 µg/mL (Leal, 2014) en la cepa ATCC-10231. No se han reportado valores para la cepa ATCC-90029. Comparando nuestros resultados con los documentados en la literatura, podemos ver que al conjugar el C<sub>12</sub>+AG con el grupo TPP<sup>+</sup> se produce un aumento en la susceptibilidad de la levadura en su estado planctónico. Estudios en células humanas tumorales, demuestran que al adicionar TPP<sup>+</sup> al compuesto C<sub>12</sub>+AG su potencia aumenta considerablemente (Jara y cols., 2014). Sin embargo, para poder comprobar este punto, es necesario realizar estudios de susceptibilidad comparando los valores obtenidos tanto para el TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG como con el derivado sin el grupo trifenílfosfonio.

Posteriormente, evaluamos la actividad antifúngica del compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG en *C. albicans* en *biofilm* mediante ensayo de MTT. Cabe destacar que actualmente existen varios métodos disponibles para evaluar cuantitativamente la viabilidad de *C. albicans*; pero un estudio reciente demostró que el ensayo de reducción de MTT proporciona la medición más reproducible y precisa (Tsang y cols., 2012). En relación con los análisis de valores de IC<sub>50</sub>, el compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG posee un efecto inhibitorio de la viabilidad de *C. albicans* en *biofilm* en ambas cepas (Tabla 2). Hasta la fecha, no existe evidencia sobre el efecto antibiofilm del compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG en *C. albicans*, por lo que nuestro ensayo sería el primero en evidenciar su efecto.

Pocos estudios han demostrado la influencia del ácido gálico contra *biofilms* de *Candida* spp., con valores de IC<sub>50</sub> de 1x10<sup>3</sup> µg/mL (Wang y cols., 2008) hasta 5x10<sup>3</sup> µg/mL (Alves y cols., 2014); sin embargo, en ambos estudios no especifican qué cepa utilizaron. Lima y cols. (2016) probó el ácido gálico en *C. albicans* y *C. glabrata* en estado *biofilm*, obteniendo como resultado un valor de IC<sub>50</sub> mayor a 1x10<sup>3</sup> µg/mL concluyendo que no existía actividad antifúngica (Lima y cols., 2016). Interesantemente, a diferencia de los resultados recién mencionados, bajo nuestras condiciones experimentales el TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG presentó un efecto antibiofilm y antifúngico a concentraciones mucho menores a las reportadas para el ácido gálico. Esto podría explicarse por la adición del TPP<sup>+</sup> al C<sub>12</sub>-AG, ya que ha sido demostrado un efecto sinérgico al conjugar el ácido gálico con el catión TPP<sup>+</sup>. Al respecto, Chang (2018) evidenció que moléculas que eran expulsadas a partir de bombas de eflujo, uno de los principales mecanismos de resistencia en *biofilms* de *C. albicans*, al ser conjugadas con el catión TPP<sup>+</sup> facilitaban su transporte a la célula, eludían la expulsión mediante bombas de eflujo y se acumulaban selectivamente en las mitocondrias del hongo (Chang y cols., 2018). Este enfoque puede usarse además para abordar problemas de resistencia a los antifúngicos, ya que las mitocondrias en *C. albicans* están involucradas en la acción de las bombas de eflujo (Thomas y cols., 2013).

En este estudio se obtuvo un IC<sub>50</sub> mayor para ambas cepas en estado *biofilm* en comparación a su estado planctónico. Esto puede explicarse ya que a medida que maduran los *biofilms*, los cambios en la disponibilidad de nutrientes y oxígeno pueden provocar una disminución en la función mitocondrial. De hecho, se ha demostrado que los *biofilms* crean un microambiente interno hipóxico cuando se cultivan en condiciones ambientales de oxígeno, sugiriendo un variado metabolismo y expresión genética entre las células en los diferentes niveles del *biofilm* (Fox y cols., 2014). Por otro lado, también se ha demostrado que en su estado de *biofilm*, disminuye el acceso de fármacos debido al atrapamiento que sufren los fármacos en la densa matriz extracelular que protege los *biofilms* (Ramage y cols., 2014).

El fluconazol es el agente que actualmente se usa con más frecuencia para tratar la infección por *Candida* spp. (Gao y cols., 2016). Se ha descrito una CIM que varía de 4  $\mu$ M para la cepa ATCC-90029 y 4081  $\mu$ M para la cepa ATCC-10231 en estado planctónico (Fang y cols., 2020), lo que demuestra la característica de alta resistencia que presenta la cepa ATCC-10231. También se han reportado IC<sub>50</sub> entre 12,5 y 25  $\mu$ g/mL en cultivos de *C. albicans* en estado *biofilm* para aislados clínicos (Li y cols., 2017). Comparándolo con nuestros resultados, esto sugiere la potente actividad antifúngica del compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG al poseer valores similares que fluconazol para la cepa ATCC-90029 y valores menores para la cepa resistente a fluconazol ATCC-10231, lo que indica que es capaz de actuar de manera potente incluso en cepas resistentes a antifúngicos convencionales, tanto en su estado planctónico como *biofilm*. Estos resultados concuerdan con lo demostrado por Rhimi (2020), quién probó la actividad antifúngica de ácido gálico frente a cepas de *C. albicans* y *Malassezia furfur* resistentes a azoles en estado planctónico teniendo como resultado que ambos hongos presentaban mayor susceptibilidad frente al ácido gálico que a fluconazol y otros compuestos fenólicos (Rhimi y cols., 2020).

Hasta la fecha existe solo un estudio que ha probado el compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG en células de mamíferos. Jara (2014) evaluó la citotoxicidad en células de epitelio mamario de ratón, donde su CIM tenía valor 1,38  $\mu$ M  $\pm$  0.4, exhibiendo valores de

CIM menores a los reportados en este trabajo para ambas cepas de *C. albicans*. Frente a esto, es probable que la baja selectividad de TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG produzca efectos adversos (Jara y cols., 2014). Por lo tanto, son necesarios más ensayos para evaluar la toxicidad de TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG en células humanas y en animales, ya que la especificidad de los antifúngicos sigue siendo una de las cuestiones más críticas en la búsqueda de nuevos fármacos contra *C. albicans*.

Como se mencionó anteriormente, nosotros postulamos que el compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG tendría como mecanismo generar una disfunción en la mitocondria a través del desacoplamiento de la respiración celular de *C. albicans*. El efecto del ácido gálico sobre la respiración celular no se ha estudiado en detalle, pero se ha informado que sus ésteres actúan como potentes moduladores de la respiración mitocondrial ya sea al afectar directamente la transferencia de electrones a través de los complejos respiratorios o indirectamente al desacoplar la fosforilación oxidativa (Kosuro y cols., 2017); también, se ha postulado que posee una acción citotóxica basado en la producción de radicales libres (Jara y cols., 2014). Por otro lado, se ha demostrado el mecanismo del catión TPP<sup>+</sup> como desacoplador de la respiración celular al actuar como un desacoplador tipo protonóforo, es decir, con la capacidad de translocar protones a través de la membrana mitocondrial interna generando una disminución en el potencial de membrana de la membrana interna de las mitocondrias, estimulan la respiración mitocondrial y la producción de calor (Demine y cols., 2019).

En este estudio, demostramos que el compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG generaba un aumento en el consumo de oxígeno en la cepa ATCC-90029, el cual puede ser explicado por un desacoplamiento de la respiración celular y no por una respuesta al estrés traducida en la generación de ROS a partir de nuestros resultados en la citometría de flujo (Figura 16). Se ha ensayado el compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG previamente como agente tripanocida contra *Trypanosoma brucei*, donde se informó que conducía a un desacoplamiento del sistema de fosforilación oxidativa (Cortés y cols., 2015). Severin (2010) demostró que el compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>

estimuló la respiración mitocondrial en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) independientemente del valor de pH extracelular (Severin y cols., 2010). Por otro lado, en la cepa ATCC-10231 observamos un aumento del consumo sólo frente a la concentración más baja del fármaco ( $\frac{1}{2}$ CIM); mientras que a medida se aumentaban las concentraciones del compuesto no hubo cambios estadísticamente significativos en la respiración celular. Esta acción también inhibitoria del compuesto se ha demostrado anteriormente. López (2020) utilizó el compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>10</sub>-AG sobre una línea celular de cáncer de pulmón generando una inhibición al complejo  $\alpha$ KGDH y, además, al complejo I de la cadena transportadora de electrones, provocando un efecto inhibitorio de la respiración celular (López, 2020). Frente a esto, sería interesante estudiar en específico sobre qué estructura actúa el fármaco TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG dentro de la respiración celular, para así entender su mecanismo de acción.

Un aspecto importante a considerar en la búsqueda de nuevos fármacos contra *C. albicans* son los posibles mecanismos de resistencia que pueden desarrollarse. Se ha descrito que la disfunción mitocondrial en algunos hongos en estado *biofilm*, en particular *S. cerevisiae* y *C. glabrata*, puede conducir a una menor o mayor susceptibilidad frente a los azoles (Shingu-Vazquez & Traven, 2011). Por ejemplo, se ha observado en cepas mutantes del complejo mitocondrial I en *C. albicans* una mayor susceptibilidad a los azoles (Sun y cols., 2013) y, en general, la disfunción mitocondrial conduce a una mayor sensibilidad a las equinocandinas (Shingu-Vazquez & Traven, 2011). Rhimi (2020) en su estudio indica que la combinación de compuestos naturales y fármacos convencionales podría ser una posible solución para limitar la resistencia a los fármacos antifúngicos, reportando que las combinaciones de azoles con concentraciones subinhibitorias de ácido gálico redujeron los valores de CIM de los azoles en más del 90% (Rhimi y cols., 2020). También se ha evidenciado un efecto de sinergismo entre fluconazol y ácido gálico sobre *C. tropicalis* (Lima y cols., 2016). Por otro lado, se ha documentado el potencial de TPP<sup>+</sup> de transportar moléculas al interior de mitocondrias de *C. albicans* eludiendo su expulsión mediante bombas de eflujo (Chang y cols., 2018).

Como mencionamos anteriormente, a partir de nuestro ensayo el compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG provoca una disfunción en la mitocondria de *C. albicans* (Fig. 11, Fig. 14). Se ha evidenciado el papel de la mitocondria de *C. albicans* en la homeostasis del hierro y por consiguiente en la biosíntesis del Ergosterol (Thomas y cols., 2013). Es posible que exista un efecto sinérgico entre el compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG y azoles, ya que los azoles inhiben la enzima lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilasa (CYP51A1), involucrada en la biosíntesis de Ergosterol (Thomas y cols., 2013). Además, se ha postulado que la sinergia de los compuestos genera en consecuencia una reducción en sus dosis (Rhimí y cols., 2020), lo que sugiere que la combinación podría reducir la toxicidad debida al uso de azoles y la posible toxicidad dada por el compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG mencionada anteriormente.

Un agente antifúngico "ideal" para las infecciones por *Candida* spp. no debería tener efectos secundarios ni toxicidad. Sin embargo, en realidad, todos los antifúngicos que se utilizan actualmente tienen algunos efectos secundarios en el tracto gastrointestinal, el hígado y los riñones (Teodoro y cols., 2015). Por lo tanto, prácticamente uno esperaría tener algunos efectos secundarios relacionados con la dosis de cualquier nuevo agente antifúngico. Es importante comprender esta limitación para apreciar las cualidades prometedoras del fármaco que se investiga. Se ha observado el efecto dañino del ADN de los ácidos fenólicos en líneas celulares de cáncer de colon (p53R) tratadas con ácido gálico (Hossain y cols., 2014). Además, *in vivo* se observó hepatotoxicidad en ratas cuando se les administró una dieta complementada con más de 200 mg/kg/día de ácido gálico (Galati y cols., 2006). Además, se observaron trastornos hematológicos, así como aumento de peso del hígado y los riñones en ratas alimentadas con 0,6–5% de ácido gálico diariamente durante 13 semanas (Niho y cols., 2001). Por otro lado, el compuesto TPP<sup>+</sup> unido a antioxidantes con baja eficacia han mostrado una baja toxicidad administrándose de manera segura en un largo plazo en diversos modelos de roedores. También se ha dado oralmente a pacientes en estudios de fase II hasta por un año sin ningún problema de seguridad (Luna-Ortiz y cols., 2014). Por lo tanto,



es imperativo examinar la toxicidad relacionada con el compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG en una serie de estudios completos *in vitro*, *in vivo* y clínicos antes de la administración como un agente antifúngico.

Finalmente, la maduración de los *biofilms* necesita una sólida formación de hifas en *C. albicans* (Lohse y cols., 2018). La morfogénesis de célula planctónica a hifa es un evento temprano que sigue a la adhesión del sustrato en el proceso de formación de *biofilm*. Se ha estudiado que la actividad mitocondrial es fundamental en las transiciones entre tipos de células y modos de crecimiento (levaduras, hifas, los *biofilms*) (Calderone y cols., 2015). Un estudio que utilizó la cepa filamentosa Sigma1278b de *Saccharomyces cerevisiae* indicó que la disfunción mitocondrial reducía la actividad de la vía Ras/PKA, inhibiendo así la expresión de adhesinas y afectando la capacidad de crecer como filamentos pseudohifales (Calderone y cols., 2015). Watanabe (2006) a partir de la teoría que el oxígeno es esencial para formar células hifas de *C. albicans*, demostró que la cadena transportadora de electrones funciona río arriba de la ruta de la señal RAS1 y que activa la expresión de la señal de formación de hifas, por lo que en condiciones de anaerobiosis *C. albicans* no fue capaz de transformarse a hifa (Watanabe y cols., 2006). Frente a esto, es probable que compuestos que se dirijan a la actividad mitocondrial bloqueen la formación de hifas, lo que podría ser beneficioso para reducir la virulencia de *C. albicans* y también para modular la respuesta inflamatoria desencadenada por la forma de hifas y que probablemente contribuye a la patología (Traven y Naderer, 2014). Por lo tanto, se sugiere la realización de estudios que evalúen el efecto del compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG en la morfogénesis de célula planctónica a hifa de *C. albicans*.

## VII. CONCLUSIONES.

En esta investigación se analizó si el compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG presenta un efecto antifúngico sobre *Candida albicans*, y si este efecto se da a través de la interrupción de la fosforilación oxidativa, lo cual a la fecha no ha sido documentado. Se concluye que el compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG posee un efecto antifúngico sobre *C. albicans* tanto en su forma planctónica como *biofilm*, obteniendo valores de IC<sub>50</sub> menores a los reportados en la literatura para el ácido gálico e incluso comparables con los valores de antifúngicos tradicionales como el fluconazol.

A partir de los resultados de la oxigrafía, el efecto del compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG se traduce por la disfunción mitocondrial provocada por el desacoplamiento de la respiración celular sobre *C. albicans*, que fue comprobado en su estado planctónico y fue significativo en la cepa ATCC-90029.

La literatura sugiere que la mitocondria de *C. albicans* es un blanco farmacológico de relevancia para la búsqueda y prueba de nuevos fármacos contra la levadura. Frente a esto, el compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG demostró ser un excelente candidato antifúngico, por lo que se justifica una mayor investigación del compuesto presentado como agente contra *C. albicans*. Las siguientes líneas de investigación deberían centrarse en evaluar el efecto del compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG en la morfogénesis de célula planctónica a hifa de *C. albicans*, como también estimar la toxicidad del compuesto TPP<sup>+</sup>-C<sub>12</sub>-AG en líneas celulares mamíferas.

Es importante buscar nuevas formas de combatir las infecciones por *C. albicans* debido al crecimiento de poblaciones susceptibles, las limitaciones del espectro de actividad o la tolerabilidad de los antifúngicos actuales y el desarrollo de resistencia a los antifúngicos.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Aldahash, R. (2018). *Effect of Gallic and Ferulic Acids on Oxidative Phosphorylation on Candida albicans (A72 and SC5314) During the Yeast-to-Hyphae Transition | Request* PDF.

[https://www.researchgate.net/publication/326057984\\_Effect\\_of\\_Gallic\\_and\\_Ferulic\\_Acids\\_on\\_Oxidative\\_Phosphorylation\\_on\\_Candida\\_albicans\\_A72\\_and\\_SC5314\\_During\\_the\\_Yeast-to-Hyphae\\_Transition](https://www.researchgate.net/publication/326057984_Effect_of_Gallic_and_Ferulic_Acids_on_Oxidative_Phosphorylation_on_Candida_albicans_A72_and_SC5314_During_the_Yeast-to-Hyphae_Transition)

Arendrup M. C., Cuenca-Estrella M., Lass-Flörl C., & Hope W. (2020). Método de dilución en caldo para la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias de antifúngicos para levaduras. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease*.

Aurelia N. Sudjana, Christine F. Carson, Kerry C. Carson, Thomas V. Riley, Katherine A. Hammer (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, <https://doi.org/10.3109/13693786.2012.683540>

Barbosa, I. A., Machado, N. G., Skildum, A. J., Scott, P. M., & Oliveira, P. J. (2012). Mitochondrial remodeling in cancer metabolism and survival: Potential for new therapies. In *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* (Vol. 1826, Issue 1, pp. 238–254). <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.04.005>

Berkow EL, Lockhart SR. (2017). Fluconazole resistance in *Candida* species: A current perspective [Internet]. Vol. 10, *Infection and Drug Resistance*. Dove Medical Press Ltd.; [cited 2020 Jun 22]. p. 237–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28814889/>

Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M. J., & Simões, M. (2013). Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 19(4), 256–265. <https://doi.org/10.1089/mdr.2012.0244>

Calderone, R., Li, D., & Traven, A. (2015). System-level impact of mitochondria on fungal virulence: to metabolism and beyond. *FEMS Yeast Research*, 15(4). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov027>

Chang, W., Liu, J., Zhang, M., Shi, H., Zheng, S., Jin, X., Gao, Y., Wang, S., Ji, A., & Lou, H. (2018). Efflux pump-mediated resistance to antifungal compounds can be prevented by conjugation with triphenylphosphonium cation. *Nature Communications*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07633-9>

Chen, L., Wang, Z., Liu, L., Qu, S., Mao, Y., Peng, X., Li, Y. xin, & Tian, J. (2019). Cinnamaldehyde inhibits *Candida albicans* growth by causing apoptosis and its treatment on vulvovaginal candidiasis and oropharyngeal candidiasis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(21–22), 9037–9055. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10119-3>

Cortes, LA, Castro, L., Pesce, B., Maya, JD, Ferreira, J., Castro-Castillo, V., Parra, E., Jara, JA y López-Muñoz, R. (2015). Nuevos derivados de galato de trifenilfosfonio con potente actividad antichagastica. *PloS uno*, 10 (8), e0136852. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136852>

Demine, Renard, & Arnould. (2019). Mitochondrial Uncoupling: A Key Controller of Biological Processes in Physiology and Diseases. *Cells*, 8(8), 795. <https://doi.org/10.3390/cells8080795>

Desai, J. V., & Mitchell, A. P. (2015). *Candida albicans* Biofilm Development and Its Genetic Control. *Microbiology Spectrum*, 3(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mb-0005-2014>

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. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0714.2003.00031.x>

Estrada PGA, Márquez FM, Agüero DLA. (2017). Clinical diagnosis of patients with subprosthesis stomatitis bearers of prosthetic aparatology. *MediSan*; 21(11):3180-3187.

Fang, J. Y., Tang, K. W., Yang, S. H., Alalaiwe, A., Yang, Y. C., Tseng, C. H., & Yang, S. C. (2020). Synthetic Naphthofuranquinone Derivatives Are Effective in Eliminating Drug-Resistant *Candida albicans* in Hyphal, Biofilm, and Intracellular Forms: An Application for Skin-Infection Treatment. *Frontiers in microbiology*, 11, 2053. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02053>

Farfán Mera, K. P., & Zabala Ramos, D. J. (2019). *Prevalencia de estomatitis subprotésica en adultos mayores, portadores de prótesis total superior del Distrito Metropolitano de Quito, Distrito Centro. Enero-junio 2017*. Universidad Católica de Santiago de Guayaquil. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/12802>

Fox, E. P., Cowley, E. S., Nobile, C. J., Hartooni, N., Newman, D. K., & Johnson, A. D. (2014). Anaerobic bacteria grow within *Candida albicans* biofilms and induce biofilm formation in suspension cultures. *Current biology : CB*, 24(20), 2411–2416. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.08.057>

Frantz, M. C., & Wipf, P. (2010). Mitochondria as a target in treatment. In *Environmental and Molecular Mutagenesis* (Vol. 51, Issue 5, pp. 462–475). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1002/em.20554>

Frieden, T. (2013). Antibiotic resistance threats in the United States. *Centers for Disease Control and Prevention*, 114. <https://doi.org/CS239559-B>

Galati, G., Lin, A., Sultan, A. M., and O'brien, P. J. (2006). Cellular and in vivo hepatotoxicity caused by green tea phenolic acids and catechins. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 570–580. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.09.014

Gao M, Wang H, Zhu L. (2016). Quercetin assists fluconazole to inhibit biofilm formations of fluconazole-resistant *Candida albicans in vitro* and *in vivo* antifungal managements of vulvovaginal candidiasis. *Cell Physiol Biochem* 40: 727–742

Gehrke ITS, Neto AT, Pedroso M, Mostardeiro CP, Da Cruz IBM, Silva UF, y cols (2013) Antimicrobial activity of *Schinus lenticifolius* (Anacardiaceae). *J Ethnopharmacol.* Jul 9;148(2):486–91.

Gual-Vaqués, P., Jané-Salas, E., Egido-Moreno, S., Ayuso-Montero, R., Marí-Roig, A., & López-López, J. (2017). Inflammatory papillary hyperplasia: A systematic review. In *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* (Vol. 22, Issue 1, pp. e36–e42). *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal.* <https://doi.org/10.4317/medoral.21405>

Gutiérrez, C. G., Luis, ;, Medina, B., Sanchez, M., Cornejo, Z., Zambrano, M. E., & Gutiérrez, F. C. G. ; (2013). Estomatitis Subprotésica en Pacientes de la IX Región, Chile Denture Stomatitis Present in Patients of the IX Region, Chile. In *Int. J. Odontostomat* (Vol. 7, Issue 2).

Hannah, V. E., O'Donnell, L., Robertson, D., & Ramage, G. (2017). Denture Stomatitis: Causes, Cures and Prevention. In *Primary dental journal* (Vol. 6, Issue 4, pp. 46–51). <https://doi.org/10.1308/205016817822230175>

Hossain, M. Z., Patel, K., and Kern, S. E. (2014). Salivary alpha-amylase, serum albumin, and myoglobin protect against DNA-damaging activities of ingested dietary agents in vitro. *Food Chem. Toxicol.* 70, 114–119. doi: 10.1016/j.fct.2014.05.002

Houšť, J., Spížek, J., & Havlíček, V. (2020). Antifungal Drugs. *Metabolites*, 10(3), 106. <https://doi.org/10.3390/metabo10030106>

Kosuru, R. Y., Roy, A., Das, S. K., & Bera, S. (2017). *Gallic Acid and Gallates in Human Health and Disease: Do Mitochondria Hold the Key to Success? Molecular Nutrition & Food Research*, 62(1), 1700699. doi:10.1002/mnfr.201700699

Jara, J. A., Castro-Castillo, V., Saavedra-Olavarría, J., Peredo, L., Pavanni, M., Jaña, F., Letelier, M. E., Parra, E., Becker, M. I., Morello, A., Kemmerling, U., Maya, J. D., & Ferreira, J. (2014). Antiproliferative and uncoupling effects of delocalized, lipophilic, cationic gallic acid derivatives on cancer cell lines. Validation *in vivo* in syngenic mice. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(6), 2440–2454. <https://doi.org/10.1021/jm500174v>

Kim, J. H., Campbell, B. C., Mahoney, N., Chan, K. L., Molyneux, R. J., & Xiao, C. L. (2010). Use of chemosensitization to overcome fludioxonil resistance in *Penicillium expansum*. *Letters in Applied Microbiology*, 51(2), 177–183. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02875.x>

Kozsul, R., Malpertuy, A., Frangeul, L., Bouchier, C., Wincker, P., Thierry, A., Duthoy, S., Ferris, S., Hennequin, C., & Dujon, B. (2003). The complete mitochondrial genome sequence of the pathogenic yeast *Candida (Torulopsis) glabrata*. *FEBS letters*, 534(1-3), 39–48. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)03749-3](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03749-3)

Labieniec, M., & Gabryelak, T. (2007). Antioxidative and oxidative changes in the digestive gland cells of freshwater mussels *Unio tumidus* caused by selected phenolic compounds in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or Cu<sup>2+</sup> ions. *Toxicology in Vitro*, 21(1), 146–156. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.09.017>

Lee Muñoz, X., Cajas Cajas, N., Gómez Carranza, L., Vergara Núñez, C., Ivankovic Silva, M., & Astorga Bustamante, E. (2015). Ocurrencia de levaduras del género *Candida* y estomatitis protésica antes y después del tratamiento rehabilitador basado en prótesis removible. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y*

*Rehabilitación Oral*, 8(1), 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.piro.2015.02.005>

Li, Z. J., Liu, M., Dawuti, G., Dou, Q., Ma, Y., Liu, H. G., & Aibai, S. (2017). Antifungal Activity of Gallic Acid In Vitro and In Vivo. *Phytotherapy Research*, 31(7), 1039–1045. <https://doi.org/10.1002/ptr.5823>

Lockhart SR, Etienne KA, Vallabhaneni S. (2017). Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. *Clin Infect Dis*. 2017;64(2):134–140

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. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.107>

López C (2020). La inhibición del complejo enzimático  $\alpha$ KGDH provocada por GA-TPP+C10 promueve vulnerabilidad a células de cáncer de pulmón humano. From <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/178353>.

Lu, J., Wang, Z., Ren, M., Huang, G., Fang, B., Bu, X., Liu, Y., & Guan, S. (2016). Antibacterial Effect of Gallic Acid against *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* Through Damaging Membrane Integrity. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17(13), 1153–1158. <https://doi.org/10.2174/1389201017666161022235759>

Luna-Ortiz P, Flores-Chávez P, Martínez-Rosas M (2014). Las mitocondrias como blanco terapéutico. *Rev Mex Anest.* ;37(4):283-296.

Malats Pacheco, J. A. (2020). *Prevalencia de estomatitis subprotésica en pacientes portadores de prótesis parcial y total UCSG semestre A-2019*. Retrieved April 29, 2020, from <http://repositorio.ucsg.edu.ec/handle/3317/13396>



Manuel, J., & Urizar, A. (2002). Candidiasis orales. In *Rev Iberoam Micol* (Vol. 19).

Ministerio de Salud de Chile. (2018). Encuesta nacional de salud 2016-2017 Segunda entrega de resultados. *Encuesta Nacional de Salud 2016-2017, Encuesta Nacional de Salud*, 1–59. [http://www.ipsuss.cl/ipsuss/site/artic/20171122/asocfile/20171122142253/ens\\_2016\\_17\\_primeros\\_resultados.pdf](http://www.ipsuss.cl/ipsuss/site/artic/20171122/asocfile/20171122142253/ens_2016_17_primeros_resultados.pdf)

Murphy, M. P., & Smith, R. A. J. (2007). Targeting Antioxidants to Mitochondria by Conjugation to Lipophilic Cations. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47(1), 629–656. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105110>

Niho, N., Shibutani, M., Tamura, T., Toyoda, K., Uneyama, C., Takahashi, N., y cols. (2001). Subchronic toxicity study of gallic acid by oral administration in F344 rats. *Food Chem. Toxicol.* 39, 1063–1070. doi: 10.1016/S0278-6915(01)00054-0

Nobile, C. J., & Johnson, A. D. (2015). *Candida albicans* Biofilms and Human Disease . *Annual Review of Microbiology*, 69(1), 71–92. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104330>

Ostrosky-Zeichner, L., Casadevall, A., Galgiani, J. N., Odds, F. C., & Rex, J. H. (2010). An insight into the antifungal pipeline: Selected new molecules and beyond. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 9, Issue 9, pp. 719–727). <https://doi.org/10.1038/nrd3074>

Paul S, Singh S, Sharma D, Chakrabarti A, Rudramurthy SM, Ghosh AK. (2020). Dynamics of in-vitro development of azole resistance in *Candida tropicalis*. *J Glob Antimicrob Resist.* 2020 Apr 24;

Pierce, C. G., & Lopez-Ribot, J. L. (2013). Candidiasis drug discovery and development: new approaches targeting virulence for discovering and identifying

new drugs. *Expert opinion on drug discovery*, 8(9), 1117–1126.  
<https://doi.org/10.1517/17460441.2013.807245>

Plaza, C., Pavani, M., Faundez, M., Maya, J. D., Morello, A., Becker, M. I., De loannes, A., Cumsille, M. A., & Ferreira, J. (2008). Inhibitory effect of nordihydroguaiaretic acid and its tetra-acetylated derivative on respiration and growth of adenocarcinoma TA3 and its multiresistant variant TA3MTX-R. *In Vivo*, 22(3), 353–362.

Prasad, R., & Höfer, M. (1986). Tetraphenylphosphonium is an indicator of negative membrane potential in *Candida albicans*. *BBA - Biomembranes*, 861(C), 377–380.  
[https://doi.org/10.1016/0005-2736\(86\)90442-6](https://doi.org/10.1016/0005-2736(86)90442-6)

Ramage, G., Robertson, S. N., & Williams, C. (2014). Strength in numbers: antifungal strategies against fungal biofilms. *International journal of antimicrobial agents*, 43(2), 114–120. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.10.023>

Revie, N. M., Iyer, K. R., Robbins, N., & Cowen, L. E. (2018). Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 45, pp. 70–76). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.02.005>

Rhimi, W., Aneke, C. I., Annoscia, G., Otranto, D., Boekhout, T., & Cafarchia, C. (2020). Effect of chlorogenic and gallic acids combined with azoles on antifungal susceptibility and virulence of multidrug-resistant *Candida* spp. and *Malassezia furfur* isolates. *Medical Mycology*, 58(8), 1091–1101.  
<https://doi.org/10.1093/mmy/myaa010>

Robbins, N., Wright, G. D., & Cowen, L. E. (2016). Antifungal Drugs: The Current Armamentarium and Development of New Agents. *Microbiology Spectrum*, 4(5).  
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0002-2016>

Rodríguez, L. R. (2018). *Estomatitis subprotésica asociada a candida: revisión de la literatura*. <https://repositorio.uft.cl/xmlui/handle/20.500.12254/789>

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. A., Parra, E., Calaf, G. M., 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*, 309, 2–14. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.08.018>

Saygin, M., Ozturk, O., Ozmen, O., Ilhan, I., Gonca, T., Gumral, N., Orhan, H., & Aslankoc, R. (2016). The impact of methotrexate on lung inflammatory and apoptotic pathway biomarkers—The role of gallic acid. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 84, 1689–1696. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.10.077>

Seleem, D., Pardi, V., & Murata, R. M. (2017). Review of flavonoids: A diverse group of natural compounds with anti-*Candida albicans* activity in vitro. In *Archives of Oral Biology* (Vol. 76, pp. 76–83). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.08.030>

Severin, F. F., Severina, I. I., Antonenko, Y. N., Rokitskaya, T. I., Cherepanov, D. A., Mokhova, E. N., Vyssokikh, M. Y., Pustovidko, A. V., Markova, O. V., Yaguzhinsky, L. S., Korshunova, G. A., Sumbatyan, N. V., Skulachev, M. V., & Skulachev, V. P. (2010). Penetrating cation/fatty acid anion pair as a mitochondria-targeted protonophore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(2), 663–668. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910216107>

She, X., Zhang, P., Gao, Y., Zhang, L., Wang, Q., Chen, H., Calderone, R., Liu, W., & Li, D. (2018). A mitochondrial proteomics view of complex I deficiency in *Candida albicans*. *Mitochondrion*, 38, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.08.003>

Shingu-Vazquez, M., & Traven, A. (2011). Mitochondria and fungal pathogenesis: drug tolerance, virulence, and potential for antifungal therapy. *Eukaryotic cell*, 10(11), 1376–1383. <https://doi.org/10.1128/EC.05184-11>

Silva, S., Rodrigues, C. F., Araújo, D., Rodrigues, M. E., & Henriques, M. (2017). *Candida* species biofilms' antifungal resistance. In *Journal of Fungi* (Vol. 3, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/jof3010008>

Singh, A., Fatima, K., Srivastava, A., Khwaja, S., Priya, D., Singh, A., Mahajan, G., Alam, S., Saxena, A. K., Mondhe, D. M., Luqman, S., Chanda, D., Khan, F., & Negi, A. S. (2016). Anticancer activity of gallic acid template-based benzylidene indanone derivative as microtubule destabilizer. In *Chemical Biology and Drug Design* (pp. 625–634). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12805>

Suchodolski, J., & Krasowska, A. (2019). Plasma membrane potential of *Candida albicans* measured by di-4-anepys fluorescence depends on growth phase and regulatory factors. *Microorganisms*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7040110>

Sun, N., Fonzi, W., Chen, H., She, X., Zhang, L., Zhang, L., & Calderone, R. (2013). Azole susceptibility and transcriptome profiling in *Candida albicans* mitochondrial electron transport chain complex I mutants. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(1), 532–542.

Sun, N., Parrish, R. S., Calderone, R. A., & Fonzi, W. A. (2019). Unique, diverged, and conserved mitochondrial functions influencing *Candida albicans* respiration. *MBio*, 10(3). <https://doi.org/10.1128/mBio.00300-19>

Teodoro GR, Ellepola K, Seneviratne CJ and Koga-Ito CY (2015) Potential Use of Phenolic Acids as Anti-*Candida* Agents: A Review. *Front. Microbiol.* 6:1420. doi: 10.3389/fmicb.2015.01420

Thomas, E., Roman, E., Claypool, S., Manzoor, N., Pla, J., & Panwar, S. L. (2013). Mitochondria influence CDR1 efflux pump activity, Hog1-mediated oxidative stress pathway, iron homeostasis, and ergosterol levels in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(11), 5580–5599. <https://doi.org/10.1128/AAC.00889-13>

Tsang, P. W., Bandara, H. M., & Fong, W. P. (2012). Purpurin suppresses *Candida albicans* biofilm formation and hyphal development. *PLoS one*, 7(11), e50866. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050866>

Wang, C., Cheng, H., Guan, Y., Wang, Y., & Yun, Y. (2009). *Zhongguo Zhong yao za zhi = Zhongguo zhongyao zazhi = China journal of Chinese materia medica*, 34(9), 1137–1140.

Williams, D. W., Kuriyama, T., Silva, S., Malic, S., & Lewis, M. A. O. (2011). *Candida* biofilms and oral candidosis: Treatment and prevention. *Periodontology 2000*, 55(1), 250–265. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2009.00338.x>

Zielonka, J., Sikora, A., Hardy, M., Ouari, O., Vasquez-Vivar, J., Cheng, G., Lopez, M., & Kalyanaraman, B. (2017). Mitochondria-Targeted Triphenylphosphonium-Based Compounds: Syntheses, Mechanisms of Action, and Therapeutic and Diagnostic Applications HHS Public Access. *Chem Rev*, 117(15), 10043–10120. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00042>

Zomorodian, K., Haghighi, N. N., Rajaei, N., Pakshir, K., Tarazooie, B., Vojdani, M., Sedaghat, F., & Vosoghi, M. (2011). Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. *Medical Mycology*, 49(2), 208–211. <https://doi.org/10.3109/13693786.2010.507605>

## IX. ANEXOS.

## A. Formulario de postulación PRIODO



## Dirección de Investigación

## FORMULARIO DE POSTULACIÓN PROYECTOS INTERNOS DE INVESTIGACIÓN EN ODONTOLOGÍA (PRI-ODO)

Línea de investigación:			
1	<b>INVESTIGADOR RESPONSABLE:</b>		Principal campo de especialización y aporte científico o técnico al proyecto: Farmacología Línea de trabajo: Búsqueda de estrategias farmacológicas contra biopelículas de levaduras del género <i>Candida</i> resistentes.  E-mail: aemolina@u.uchile.cl
	Nombre: Alfredo Molina Berrios		
	Departamento/Instituto: ICOD		
	Jerarquía académica actual (año de obtención): Prof. Asistente Nº de horas contratadas: 44		
2	<b>TÍTULO DEL PROYECTO:</b> Mitochondrial uncoupling as a novel pharmacological mechanism of antifungal agents against <i>Candida spp</i>  <b>Duración:</b> 24 meses		
3	<b>RESUMEN DEL PROYECTO.</b> Debe contener una breve introducción, objetivos, hipótesis, metodología y resultados que se espera obtener. Su extensión no debe exceder las 200 palabras.  Candida albicans biofilms are responsible for recurrent and resistant infections, such as denture stomatitis (DS), one of the most common human fungal infections. Current available drugs, such as fluconazole, are ineffective in the control of biofilms and in consequence, localized infections could lead to invasive candidiasis with high mortality rates. Hence, new pharmacological strategies are needed to treat these infections. In this sense, mitochondrion appears as an attractive organelle to deliver new antifungal/antibiofilm drugs. It is well known, that the main feature of the <i>Candida spp.</i> mitochondria is that its transmembrane potential is higher than in normal cells. Data exist about an important development of new molecules able to disrupt ATP synthesis in tumor cells. Among these molecules it have been demonstrated that uncoupling agents cause cytotoxicity and disrupt bioenergetics in human cancer cell lines. In this regard, we have successfully used the triphenylphosphonium group as a vehicle to deliver cytotoxic uncoupling molecules derived to Gallic acid with high selectivity to the mitochondria. Taken together these data support the idea to evaluate this uncoupling mechanism; using molecules containing both an uncoupling moiety, principally polihidroxibenzoates derivatives, and the triphenylphosphonium group, in order to targeting these molecules to mitochondria from fungal cells with high selectivity and safety. In consequence, we propose that triphenylphosphonium-uncoupling molecules are potent and selective cytotoxic agents against yeast from genus <i>Candida</i> , acting throughout the decreasing of mitochondrial ATP synthesis and disrupt the mitochondrial bioenergetic pathway.		
4	<b>FINANCIAMIENTO COMPROMETIDO POR INSTITUCIONES INTERESADAS EN EL PROYECTO:</b> Considere los aportes comprometidos por otras entidades o instituciones interesadas en los resultados; o por la Facultad (Departamentos/Instituto) y que co-financiarían el proyecto. Acompañe cartas de compromiso. Si no hay financiamiento señálelo en los casilleros. Especificar si los recursos son aportados en dinero (aporte pecuniario) o en insumo/equipos (aporte no pecuniario); la Institución que lo aportará (Fac. Odontología, Departamentos/Instituto u otra).		
	<b>Institución(es)/Dpto./Instituto</b>	<b>Aporte pecuniario M\$</b>	<b>Aporte no pecuniario M\$</b>
	ICOD	-----	1.500.000
<b>TOTAL APORTE (M\$)</b>			

Si los fondos vienen de una empresa privada del rubro se debe declarar si existe conflicto de interés mediante una carta.