



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas
Laboratorio de farmacología

**Caracterización de la actividad antifúngica y anti-virulencia
de Especies Arbóreas Nativas de la Patagonia chilena
sobre *Candida albicans***

Pablo Alfonso Sandoval López

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

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Alfredo Molina Berríos

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Dr. José Jara Sandoval
Dra. Merly de Armas

Adscrito a Proyecto PRI-ODO 2020/001 y
en colaboración con Proyecto BIP40000496 (FIC, Gobierno Regional de Aysén)

Santiago – Chile

2022

*Con cariño a la memoria de Beniamino Marsetti (1934-2018),
quien fue un ejemplo inspirándome trabajo y perseverancia*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente a todas aquellas personas que me han acompañado en este proceso.

Principalmente a mi familia, que siempre ha sido modelo y motivación para seguir adelante. Por los principios y valores que me han entregado y enseñado con su ejemplo. De manera especial, agradezco a mis hermanos: Gonzalo, que desde que yo era pequeño ha sido para mí un modelo a seguir; y María Angélica, en quien he podido ver los frutos del esfuerzo y la perseverancia.

A mis compañeros y amigos con los que he compartido este periodo, alegrándonos, y animándonos mutuamente.

Agradezco también, a mis profesores. Juan Carlos, Alberto y Glenda que ya en el colegio despertaron en mí la pasión por las ciencias. A los doctores Alfredo Molina y José Jara por darme la posibilidad de ingresar al laboratorio y por todo lo que me han enseñado en el área de investigación. Y a la Dra. Alejandra Fuenzalida por exhortarme a no darme por vencido.

También a los doctores de la Universidad de Aysén: Oney Ramírez y Merly de Armas, y a todos los responsables del proyecto por hacer que esta investigación fuera posible.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
I. RESUMEN.....	8
II INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO	
2.1 Candidiasis oral y su relevancia.....	9
2.2 Terapia antifúngica contra la candidiasis oral y sus limitaciones.....	14
2.3 Candida albicans, principal especie patógena.....	17
2.4 Estrategias actualmente investigadas contra <i>C. albicans</i>.....	21
2.5 Uso de compuestos naturales como alternativa de tratamiento de la candidiasis oral.....	22
2.6 Especies nativas de la Patagonia chilena.....	23
2.7 Planteamiento del problema.....	28
III HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	30
IV MATERIALES Y MÉTODOS	
4.1 Cepa de <i>C. albicans</i> y condiciones de cultivo	31
4.2 Extractos.....	32
4.3 Evaluación de susceptibilidad.....	33
4.4 Determinación de la actividad antifúngica.....	34
4.5 Ensayo de morfogénesis.....	36
4.6 Ensayo de adhesión.....	36
4.7 Análisis estadístico.....	37

V	RESULTADOS	
5.1	Actividad antifúngica de los extractos sobre <i>C. albicans</i>	39
5.2	Actividad anti-virulencia de los extractos sobre <i>C. albicans</i>	46
VI	DISCUSIÓN	51
VII	CONCLUSIONES	59
VIII	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
IX	ANEXOS	
9.1	Anexo 1. Certificado de aprobación Comité Institucional de Bioseguridad.....	71
9.2	Anexo 2. Detalle de la recolección de muestras vegetales y solventes empleados para la obtención de los extractos.....	73

I RESUMEN

La candidiasis oral es una infección oportunista producida por *Candida spp.* siendo *Candida albicans* su principal exponente. Farmacológicamente es tratada con antifúngicos (azoles y polienos) pero con efectividad moderada. Además, la compleja administración, alta resistencia y costo de estos tratamientos hace necesaria la búsqueda de otras estrategias terapéuticas. Los principales mecanismos que aumentan la virulencia *C. albicans* son su capacidad de formar células filamentosas (morfogénesis) y de adherirse a superficies, esenciales para la formación de biopelículas, que aumentan la resistencia a los antifúngicos convencionales.

Diferentes compuestos naturales han sido investigados y propuestos como alternativa en infecciones fúngicas resistentes; en este trabajo se evaluó la actividad antifúngica y anti-virulencia de extractos vegetales de *Azara lanceolata*, *Fuchsia magellanica*, *Lomatia ferruginea*, *Nothofagus betuloides*, *Nothofagus nitida* y *Raphithamnus spinosus*; especies nativas de la Patagonia chilena.

Se evaluó de manera *in vitro* la actividad de los extractos sobre la cepa ATCC-10231®, resistente a fluconazol. La actividad antifúngica se determinó mediante ensayos de difusión (por disco y por pocillo) en placas de agar, ensayos de microdilución y ensayos de viabilidad celular con MTT determinando el IC₅₀ en los casos posibles. La inhibición de la morfogénesis se evaluó cuantificando el porcentaje de células filamentosas por microscopía óptica, posterior al periodo de incubación en que se indujo la filamentación. La inhibición de la adhesión se evaluó mediante tinción con cristal violeta en placas de 96 pocillos, posterior al periodo de incubación. Los resultados se analizaron usando ANOVA de una vía (software GraphPad Prism 8.0).

No se observó susceptibilidad de *C. albicans* frente a los extractos en los ensayos de difusión ni de microdilución. El extracto de *A. lanceolata* presentó actividad antifúngica sobre la viabilidad celular de *C. albicans* (IC₅₀=0,68 µg/µL). Los extractos de *A. lanceolata*, *F. magellanica*, *L. ferruginea* y *N. nitida* disminuyeron los porcentajes de células filamentosas y de adhesión respecto al control (p<0,05).

Este estudio demostró que el extracto de *A. lanceolata* presenta actividad inhibitoria sobre la viabilidad de *C. albicans* y junto a los extractos de *F. magellanica*, *L. ferruginea* y *N. nitida* son capaces de inhibir los procesos de morfogénesis y adhesión de *C. albicans*.

II

INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO

2.1 CANDIDIASIS ORAL Y SU RELEVANCIA

2.1.1 Candidiasis oral

La candidiasis oral es una enfermedad que afecta los tejidos de la mucosa oral y que está caracterizada por el sobrecrecimiento e invasión superficial de microorganismos fúngicos pertenecientes al género *Candida* (*Candida spp.*) (Millsop & Fazel, 2016); siendo *Candida albicans* la principal especie representativa de éste (Lewis & Williams, 2017; Vila et al., 2020). A pesar de que últimamente se ha reportado un incremento de infecciones provocadas por especies no-*albicans* (Sullivan et al., 2004), se ha descrito que actualmente *C. albicans* es responsable de más del 95% de los casos de candidiasis oral (Coleman et al., 1997; Taylor, Michael; Raja, 2020; Vila et al., 2020).

Se ha constatado frecuentemente la presencia de *C. albicans* en los tejidos orales de individuos sanos (Lewis & Williams, 2017), y se estima que el 80% de la población es portadora asintomática de este microorganismo en las superficies orales (Vila et al., 2020; Williams & Lewis, 2011), esto ha hecho que se haya definido a *C. albicans* como especie normal de la microbiota oral (Lewis & Williams, 2017; Nobile & Johnson, 2015). Es por ello que, clásicamente se ha considerado a la candidiasis oral como una infección oportunista, dado que la sola presencia de *C. albicans* no es suficiente para el desarrollo del proceso patológico. Por lo tanto, se requiere además que se desarrollen ciertas condiciones que favorezcan el sobrecrecimiento y patogenicidad de estos microorganismos (Lewis & Williams, 2017; Taylor, Michael; Raja, 2020; Vila et al., 2020). Por otro lado, debido a que existe un alto porcentaje de la población que es portadora de *C. albicans* como parte de su microbiota comensal, en la actualidad, también se ha planteado que esta patología debiese ser considerada como una disbiosis de la microbiota oral y no como una infección, aunque en la literatura vigente se siguen usando estos términos (Villar & Dongari-Bagtzoglou, 2021).

2.1.2 Factores de riesgo

Existen múltiples factores que pueden favorecer el sobrecrecimiento de *C. albicans* y desencadenar su paso desde el comensalismo a la patogenicidad respecto al hospedero. Se pueden clasificar como factores locales y sistémicos. Estos han sido desarrollados en profundidad por Vila et al. (2020).

i. Factores locales

- ❖ **Hipofunción salival.** Deficiencias en la calidad o cantidad de saliva favorecen el crecimiento de *C. albicans*, esto se debe a que la saliva está enriquecida con proteínas antimicrobianas como lo es la histatina-5.
- ❖ **Uso de corticoesteroides tópicos locales (inhaladores).** Estos fármacos son capaces de producir como reacciones adversas una inmunosupresión local y una disminución del flujo salival (Taylor & Raja, 2020).
- ❖ **Uso de prótesis removible.** Se ha llegado incluso a definir la “estomatitis protésica” como un cuadro específico de candidiasis oral relacionado al uso de estos aparatos (Lewis & Williams, 2017). Sin embargo, el portar prótesis removible no constituye un riesgo de candidiasis oral *per se*, sino que es el uso incorrecto de estos aparatos el que favorece la infección. Específicamente:
1) Uso prolongado, que genera un microambiente ácido acompañado por bajos niveles de oxígeno y de saliva en las superficies que están en contacto con la prótesis. 2) Uso de prótesis desajustadas, que puede generar un trauma en la superficie epitelial creándose una brecha aprovechada por *C. albicans* para acceder a tejidos más profundos (Lewis & Williams, 2017). Y 3) mala higiene protésica, ya que se ha demostrado que *C. albicans* es capaz de adherirse a la superficie de las prótesis y formar biopelículas (*biofilms*) sobre éstas (Nobile & Johnson, 2015). Lo referente a las biopelículas y su relevancia será abordado más adelante. A pesar de que los factores relacionados con el desarrollo de estomatitis protésica son controlables, se estima que alrededor del 75% de los usuarios de prótesis removible presentan signos de estomatitis protésica (Lewis & Williams, 2017).
- ❖ **Uso prolongado de antibióticos de amplio espectro.** Son capaces modificar la microbiota oral al disminuir la presencia de otros microorganismos que

compiten con *C. albicans* por el nicho ecológico (Taylor, Michael; Raja, 2020; Vila et al., 2020).

ii. Factores sistémicos

- ❖ **Edad.** El crecimiento de *C. albicans* se ve favorecido en ambos extremos de la vida, ya que presentan deficiencias en el sistema inmune respecto al resto de la población (Taylor, Michael; Raja, 2020).
- ❖ **Inmunosupresión.** Existen distintos factores que pueden producirla, entre ellos: la infección por VIH/SIDA, que presenta a la candidiasis oral como la manifestación oral más común de estos pacientes (Pierce & Lopez-Ribot, 2013; Sullivan et al., 2004; Taylor, Michael; Raja, 2020), y se ha establecido una relación inversamente proporcional entre el recuento de linfocitos TCD4+ y la severidad de la candidiasis. Otras posibles causas de inmunosupresión son el consumo de fármacos antineoplásicos e inmunomoduladores.
- ❖ **Tabaquismo.** Si bien la razón por la cual se relaciona el consumo de tabaco con mayores niveles de *C. albicans* no está del todo dilucidada, existen varias teorías, dentro de ellas, la disminución del flujo salival, la acidificación del pH oral, la disminución de los niveles de inmunoglobulina A (IgA) y la disminución de la función de los neutrófilos (Taylor, Michael; Raja, 2020).
- ❖ **Malnutrición.** Se ha relacionado el crecimiento de *C. albicans* con déficit nutricionales de vitaminas, minerales y ácido fólico (Taylor, Michael; Raja, 2020;).

2.1.3 Manifestaciones clínicas

Existen diferentes manifestaciones de la enfermedad, comúnmente se clasifican como formas agudas y crónicas, además de una tercera forma “mucocutánea crónica. Dado que el principal reservorio de *C. albicans* en la cavidad oral es el dorso de la lengua, la mayoría de los cuadros clínicos inician en ahí (Scully C & Giovanni L, n.d.).

i. Manifestaciones agudas

- ❖ **Candidiasis pseudomembranosa.** Caracterizada por la presencia de placas blanquecinas en la mucosa oral que se desprenden al raspado (correspondientes a una mezcla de células fúngicas con células epiteliales e inmunes del hospedero) (García-Cuesta et al., 2014). Ha sido comúnmente asociada al consumo prolongado de corticoesteroides e inmunosupresión por VIH/SIDA. (Lewis & Williams, 2017; Vila et al., 2020)
- ❖ **Candidiasis eritematosa aguda.** Comúnmente es asociada al uso prolongado de antibióticos de amplio espectro, causantes de una disbiosis microbiológica que facilita el sobrecrecimiento de *C. albicans*. Se caracteriza por la presencia de lesiones eritematosas especialmente en el dorso de la lengua, por lo general, basta la suspensión del tratamiento antibiótico para resolver el cuadro. (Lewis & Williams, 2017; Vila et al., 2020).

ii. Manifestaciones crónicas

- ❖ **Candidiasis eritematosa crónica.** A pesar de que también puede encontrarse en pacientes inmunosuprimidos (especialmente VIH/SIDA), en la mayoría de los casos está asociada al uso de prótesis removible (estomatitis protésica). Se estima que aproximadamente un 75% de los portadores de prótesis removible presentan este cuadro y por lo general no hay sintomatología asociada (Jabra-Rizk et al., 2016). Dentro de las causas se encuentran la higiene deficiente, el uso prolongado e ininterrumpido y el mal ajuste de los aparatos protésicos; ya que contribuyen al generar un ambiente propicio para crecimiento de *C. albicans* (Lewis & Williams, 2017; Vila et al., 2020).
- ❖ **Candidiasis crónica hiperplásica.** Se manifiesta a través de lesiones blanquecinas que no se desprenden al raspado, ubicadas principalmente a nivel de la comisura labial y en los bordes laterales de la lengua. Se recomienda solicitar exámenes histopatológicos de estas lesiones por el riesgo de malignización. Este tipo de candidiasis ha sido fuertemente asociado al consumo de tabaco (Lewis & Williams, 2017; Vila et al., 2020).
- ❖ **Quelitis angular.** Se caracteriza por la presencia de lesiones eritematosas en las comisuras labiales, especialmente de forma bilateral. Generalmente se

asocia a la presencia de otro cuadro de candidiasis oral o a la disminución de la dimensión vertical oclusal (Lewis & Williams, 2017; Vila et al., 2020).

iii. Candidiasis mucocutánea crónica

Corresponde a un grupo aparte de infecciones mucocutáneas que se manifiestan de forma crónica y recurrente, capaces de involucrar diferentes zonas entre ellas piel, uñas, mucosa oral y genital (Manfredi et al., 2019). Se ha asociado a causas congénitas y a veces no responde a tratamientos convencionales para la candidiasis (Lewis & Williams, 2017; Vila et al., 2020)

Además, existe el riesgo de que una manifestación local de candidiasis oral evolucione hasta alcanzar el torrente sanguíneo generando una candidiasis invasiva, una infección severa que puede comprometer diferentes órganos cuyo rango de mortalidad oscila entre 40-60% (Bassetti et al., 2018).

2.1.4 Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico es principalmente clínico, considerando los factores predisponentes y los signos clínicos presentes (Taylor, Michael; Raja, 2020). En algunos casos se puede complementar con un estudio microbiológico para corroborar la presencia de *C. albicans* u otras especies *no-albicans* (Lewis & Williams, 2017)

Como parte fundamental del tratamiento está la promoción e instrucción de higiene oral (Quindós et al., 2019) y la identificación de la causa por la que se desarrolló la infección (Lewis & Williams, 2017). En algunos casos basta con controlar el factor predisponente para revertir el proceso infeccioso, en otros, es necesaria la terapia antifúngica ya sea local (tópica) o sistémica (Taylor, Michael; Raja, 2020).

2.2 TERAPIA ANTIFÚNGICA CONTRA LA CANDIDIASIS ORAL Y SUS LIMITACIONES

Consiste en la administración de un fármaco con efecto antifúngico, este puede ser fungistático si detiene la actividad metabólica de la célula blanco, o fungicida si ocasiona la muerte celular (Tsui et al., 2016). Sin embargo, comparado con los antibióticos, el arsenal terapéutico de los antifúngicos es extremadamente limitado y existen varias dificultades para el desarrollo de nuevos fármacos. Éstas están dadas principalmente por que tanto las células mamíferas como las fúngicas son eucariotas (a diferencia de las bacterianas), por lo que presentan mayores similitudes entre ambas, dificultando el encontrar blancos farmacológicos selectivos que permitan atacar a la célula fúngica sin ocasionar una toxicidad importante en las células del hospedero (Pierce & Lopez-Ribot, 2013).

2.2.1 Agentes antifúngicos

Actualmente los antifúngicos disponibles se agrupan principalmente en tres familias: polienos, azoles y equinocandinas; de estas sólo las primeras dos se emplean como terapia contra la candidiasis oral, reservando las equinocandinas para infecciones sistémicas resistentes a las otras familias (Pierce & Lopez-Ribot, 2013; Tsui et al., 2016; Vila et al., 2020). Existen además otros fármacos como los análogos de pirimidina o las alilamninias que son raramente empleados (Tsui et al., 2016) y el ibrexafungerp hace algunos años desarrollado (Quindós et al., 2019). A continuación, se describirá brevemente las tres principales familias de éstos fármacos.

- i. **Polienos:** corresponden a agentes fungicidas de amplio espectro, interactúan uniéndose con el ergosterol presente en la membrana celular fúngica (y ausente en la mamífera), como resultado, se forman poros en la membrana produciéndose una pérdida de la integridad de ésta, acompañada por un gradiente de fuga electrolítica y de los componentes del citoplasma (Mathé & van Dijck, 2013; Tsui et al., 2016). Dentro de esta familia se encuentran la

nistatina y la anfotericina B. La nistatina posee un amplio espectro contra *Candida spp.*, sin embargo, tiene una mala absorción vía oral mientras que su uso parenteral es tóxico. Por este motivo, se reserva su uso para candidiasis orofaríngea donde se requiere su acción local. Actualmente se intenta desarrollar nuevas formas de administrar este fármaco como la encapsulación en nanopartículas y liposomas. Por otro lado, la anfotericina B se ha utilizado durante varios años como colutorio para la candidiasis oral y también para infecciones sistémicas debido a su amplio espectro y la posibilidad de administrarse por vía endovenosa, pero presenta una alta toxicidad (especialmente a nivel renal) (Vila et al., 2020). Además, en varios países no se encuentra disponible en formulaciones de uso tópico oral, como es el caso de Chile (Quindós et al., 2019).

- ii. **Azoles:** son fármacos fungistáticos ampliamente utilizados que interactúan inhibiendo la síntesis de ergosterol a través del bloqueo de lanosterol 14- α -desmetilasa (Erg11), dependiente del citocromo P-450 fúngico (Tsui et al., 2016). Como resultado, se acumulan ergosteroles intermedios tóxicos, aumenta la permeabilidad de membrana y se detiene el crecimiento celular (Valdés, 2005). Comparados con los polienos, presentan un efecto más lento, pero con niveles de toxicidad significativamente menores (Quindós et al., 2019; Vila et al., 2020). Esta familia se subdivide según su estructura molecular en triazoles (fluconazol, itraconazol, voriconazol, ravuconazol y pozaconazol) e imidazoles (miconazol, ketoconazol y clotrimazol) (Valdés, 2005). Dentro de las principales desventajas de este grupo de medicamentos se describe su capacidad para inhibir el citocromo P-450, produciendo interacciones de relevancia clínica con fármacos como inmunomoduladores, anticoagulantes, estatinas, antihistamínicos, benzodiazepinas, bloqueadores de canales de calcio entre otros (Quindós et al., 2019). Además, su uso a largo plazo en infecciones persistentes se asocia con toxicidad hepática (Klatt & Eschenauer, 2021).
- iii. **Equinocandinas:** Son fármacos fungicidas de amplio espectro, y actualmente se emplean como última línea ante infecciones fúngicas resistentes. Inhiben la

β -1,3-glucano sintasa, necesaria para la síntesis de componentes de la pared celular, lo cual les confiere una alta selectividad y toxicidad sobre células fúngicas (Mathé & van Dijck, 2013; Quindós et al., 2019; Tsui et al., 2016). Se asocian con bajos niveles de toxicidad; sin embargo, han comenzado a aparecer mecanismos de resistencia para estos fármacos (Walraven et al., 2014). Por otro lado, su aplicación en odontología es extremadamente limitada ya que solo se administran vía intravenosa, y generalmente se usan en infecciones sistémicas. Dentro de esta familia están caspofungina, micafungina y anidulafungina (Tsui et al., 2016; Vila et al., 2020).

2.2.2 Terapias farmacológicas actuales

Para el tratamiento farmacológico de la candidiasis oral se opta inicialmente por formas farmacéuticas tópicas ya que presentan menores efectos adversos que las sistémicas. Sin embargo, estas últimas son indicadas en casos como infecciones más diseminadas, en los que la terapia tópica no haya sido efectiva (Quindós et al., 2019), en pacientes inmunosuprimidos o en aquellos que requieran algún cuidado especial al respecto (Dar-Odeh et al., 2012). Para la terapia tópica, actualmente se recomienda el uso de miconazol y nistatina, mientras que en la terapia sistémica se suele emplear fluconazol y caspofungina (equinocandina) según necesidad (García-Cuesta et al., 2014).

2.2.3 Limitaciones

La terapia antifúngica actualmente presenta una serie de desventajas, dentro de las cuales destacan:

- i. **Alto costo de los fármacos:** manifestado especialmente en los agentes antifúngicos empleados para la terapia sistémica. Además, se suma el hecho de que generalmente son tratamientos de larga duración (pudiendo sostenerse incluso por varias semanas) lo que conlleva un aumento del costo del tratamiento (Moreno M et al., 2010). Por otro lado, una parte del gasto asociado al uso de antifúngicos se debe al uso indiscriminado de estos fármacos. Sin

embargo, a pesar de que existe mayor control y uso racional en la actualidad, estos costos siguen siendo elevados (Barraza et al., 2018).

- ii. **Complejos esquemas de administración:** estos pueden perjudicar principalmente a la adherencia por parte de los pacientes al tratamiento, ya que esta tiende a ser menor a medida que aumentan el número de administraciones por día y el tiempo total del tratamiento (Susilo R et al., 2003).
- iii. **Aparición de mecanismos de resistencia:** una de las principales limitaciones de la terapia antifúngica es la aparición y desarrollo de diversos mecanismos de resistencia. Considerando el ya escaso arsenal terapéutico, la aparición de cepas multiresistentes o resistentes a los antifúngicos de “última generación” como las equinocandinas, supone una amenaza latente y un actual desafío para la búsqueda de nuevos principios activos contra estos microorganismos (Sanitá et al., 2013).

2.3 *CANDIDA ALBICANS* PRINCIPAL ESPECIE PATÓGENA

C. albicans es una especie perteneciente al género *Candida*, es el principal patógeno fúngico que afecta a humanos ocasionando una gran variedad de infecciones en el hospedero tanto locales como sistémicas (Sullivan et al., 2004; Tsui et al., 2016).

Macroscópicamente crece en los cultivos conformando colonias blancas, blandas, lisas y brillantes (Fig. 1); mientras que microscópicamente se han descrito células redondas u ovaladas capaces de emitir prolongaciones filamentosas (véase “1.3.2 Morfogénesis” más adelante) (Brandt, M. (2002).



Figura 1. *C. albicans* y sus características macroscópicas. Cultivo en agar *Sabouraud* cloranfenicol (Fotografía del autor, Laboratorio de Farmacología).

La patogenicidad de estos microorganismos está fuertemente relacionada a la capacidad de: 1) adherirse a las superficies, 2) realizar morfogénesis, y 3) formar biopelículas; estas propiedades a su vez influyen en la secreción de toxinas, evasión de la respuesta inmune y resistencia a antifúngicos (Lewis & Williams, 2017; Tsui et al., 2016; Vila et al., 2020).

2.3.1 Adhesión

Es el proceso en que la célula se adhiere al hospedero, a otra célula fúngica o a una superficie abiótica como catéteres o prótesis dentales (Lewis & Williams, 2017). Es necesaria para la colonización y persistencia durante la infección, puesto que la descamación epitelial junto con el flujo salival busca disminuir los niveles de *C. albicans* en los tejidos (Tsui et al., 2016; Vila et al., 2020). Este proceso se puede producir a dos niveles: primero de una forma reversible, a través de interacciones electroestáticas entre la célula y la superficie; y segundo, de forma irreversible, por la participación de **adhesinas** (glicoproteínas) tales como *agglutinin-like sequence* (ALS) (Tsui et al., 2016; Vila et al., 2020). Se ha descrito que la capacidad de

adhesión está directamente relacionada con la invasividad, formación de biopelículas y resistencia a fármacos (Mayer et al., 2013; Wächtler et al., 2011).

2.3.2 Morfogénesis

Se define a *C. albicans* como hongo pleomórfico, al ser capaz de cambiar su morfología según las condiciones en las que se encuentre (Noble et al., 2018), teniéndose así, por un lado las **formas levaduriformes** (no filamentosas) y por otro, las **formas filamentosas** (hifas y pseudohifas) (Nobile & Johnson, 2015; Noble et al., 2018; Tsui et al., 2016; Vila et al., 2020) (Fig. 2). Esta morfogénesis puede ser inducida por una serie de factores como temperatura, sustrato, disponibilidad de aminoácidos, pH y niveles de CO₂ (Noble et al., 2018; Tsui et al., 2016).

El estado filamentoso le confiere a la célula una serie de factores que favorecen la patogenicidad, entre ellos: 1) Tigmotropismo, capacidad de crecimiento direccional como respuesta al contacto, que le confiere a la célula la oportunidad de invadir uniones intercelulares (Noble et al., 2018; Vila et al., 2020). 2) Incremento de la adhesión, al aumentar la producción de adhesinas e incorporar la expresión de algunas específicas de estas formas celulares, como ALS-3 e *hyphal wall protein 1* (HWP-1) (Nobile & Johnson, 2015; Noble et al., 2018; Tsui et al., 2016; Vila et al., 2020). 3) Aumento de la destrucción de los tejidos del hospedero, a través de la secreción de varias enzimas hidrolíticas como aspartil proteinasas (SAPs), fosfolipasas y toxinas citolíticas (candidalisina), lo cual además permite a la célula degradar las uniones intercelulares del epitelio para penetrar en los tejidos. (Lewis & Williams, 2017; Noble et al., 2018; Tsui et al., 2016; Vila et al., 2020). Y 4) evasión de la respuesta inmune, se ha visto que las prolongaciones filamentosas son capaces de perforar la membrana de los macrófagos y evadir así la fagocitosis (Tsui et al., 2016).

Tradicionalmente se ha considerado que las formas levaduriformes corresponden a estados comensales y que las filamentosas son responsables de la patogenicidad, sin embargo, se ha demostrado que ambos tipos celulares son necesarios para la patogénesis (Noble et al., 2018).

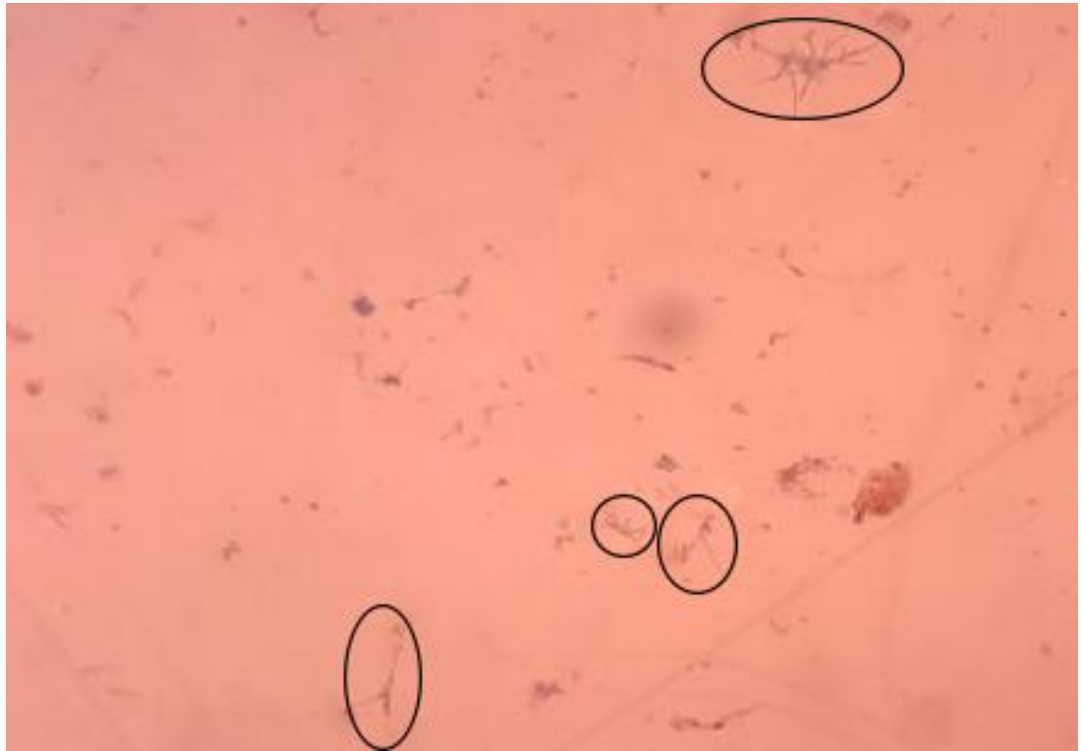


Figura 2. *C. albicans* y sus características microscópicas. Formas levaduriformes y filamentosas. Microscopía óptica 10x, contraste con azul de tripán. En negro se destacan algunas células filamentosas (Fotografía del autor, Laboratorio de Farmacología).

2.3.3 Formación de Biopelículas

Se puede definir como **biopelícula** o **biofilm** a una población organizada de microorganismos, adherida a una superficie, inmersa en una matriz y dentro de un ambiente nutricionalmente sustentable (Soll & Daniels, 2016; Wall et al., 2019). Este estado, les confiere a las células propiedades diferentes a las presentadas en las formas planctónicas, haciéndolas más virulentas y resistentes (Nobile & Johnson, 2015; Tsui et al., 2016). Se considera que la mayoría de las manifestaciones de candidiasis están relacionadas con la presencia de biopelículas, y que la formación de éstas es uno de los principales factores de virulencia de *C. albicans* (Wall et al., 2019).

Las etapas de la formación de biopelículas de *C. albicans* han sido muy estudiadas y definidas: 1) **Adhesión**, las células se unen a una superficie ya sea biótica o abiótica –por ejemplo, mucosa oral o prótesis removible respectivamente–

para conformar una capa basal. 2) **Proliferación**, donde tiene lugar la multiplicación celular y la aparición de formas filamentosas, que a su vez sirven de andamiaje para sostener la estructura de la biopelícula. 3) **Maduración**, caracterizada por la acumulación de una matriz autoproducida de exopolímeros. Y 4) **dispersión**, etapa en la que células levaduriformes son liberadas desde la biopelícula para colonizar otros nichos (Nobile & Johnson, 2015; Soll & Daniels, 2016; Tsui et al., 2016; Wall et al., 2019)

Sin duda, una de las principales características de las biopelículas es su alta resistencia a antifúngicos, al respecto, se ha descrito que las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) se incrementan entre 30 y 20.000 veces más respecto al estado planctónico (Mathé & van Dijck, 2013; Tobudic et al., 2012; Tsui et al., 2016).

Se han descrito múltiples mecanismos de resistencia antifúngica de *C. albicans*, estos son: la modificación del blanco farmacológico, la sobreexpresión de bombas de eflujo, el aumento de la densidad celular, la secreción de matriz extracelular y la formación de células persistentes. Si bien los tres primeros mecanismos son comunes tanto para los estados planctónico como en biopelículas, éstos se ven incrementados al estar en esta última forma (Mathé & van Dijck, 2013; Tsui et al., 2016).

2.4 Estrategias actualmente investigadas contra *C. albicans*

En la actualidad existen diferentes líneas de investigación que buscan nuevos compuestos con actividad contra *C. albicans*. De manera especial se ha realizado un enfoque dirigido a la inhibición del crecimiento, de la maduración, disrupción y erradicación de las biopelículas de *C. albicans*. (Pierce & Lopez-Ribot, 2013; Sardi et al., 2014).

Por otro lado, dada la gran relevancia de diversos factores de virulencia en la patogenicidad de *C. albicans*, y a la constante necesidad de nuevos blancos farmacológicos; se ha propuesto en los últimos años la búsqueda y desarrollo de compuestos con **actividad anti-virulencia**, capaces de inhibir la adhesión,

morfogénesis y formación de biopelículas, procesos esenciales en el desarrollo de los cuadros infecciosos (Clatworthy et al., 2007; Jacobsen et al., 2014). Dentro de las ventajas que ofrece este enfoque, están el aumento de blancos farmacológicos junto con una mayor especificidad según cada factor, mayor preservación de la microbiota simbiótica del hospedero y la menor aparición de mecanismos de resistencia (Pierce & Lopez-Ribot, 2013). Esta última gran ventaja se explica por selección natural, al enfocarse en inhibir los factores de virulencia disminuye la amenaza contra la supervivencia de las células infecciosas, y con ello, la necesidad de estas de bloquear a los agentes farmacológicos (Clatworthy et al., 2007).

En este contexto, los productos naturales han sido fuente de investigación para la búsqueda de nuevas estrategias farmacológicas capaces de inhibir los procesos asociados a la virulencia en *C. albicans* (Sardi et al., 2014).

2.5 Uso de compuestos naturales como alternativa de tratamiento de la candidiasis oral

Desde los primeros tiempos, el ser humano ha empleado componentes vegetales para el tratamiento de diversas molestias. El uso de plantas con fines medicinales se ha transmitido por generaciones con diversas formas de preparación y administración (Marcia Avello & Isabel Cisternas, 2010).

El fundamento de la utilidad de especies vegetales para estos propósitos radica en el mismo metabolismo de las plantas, las cuales a su vez -como todo organismo vivo- se ven expuestas y afectadas a la acción de diversos microorganismos, hecho que favorece el desarrollo de mecanismos de defensa por parte de éstas para así poder sobrevivir (Montes & Wikomirsky, 1996; Vivanco et al., 2005).

A pesar de que actualmente el uso de la farmacología convencional es la principal forma de tratamiento, en las últimas cuatro décadas ha incrementado la investigación con compuestos naturales, buscando validar su uso como terapia complementaria a la medicina convencional a través del método científico (Argolo

et al., 2004). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reconocido la importancia de la investigación y uso de compuestos naturales para el tratamiento y prevención de enfermedades, incentivando el desarrollo de políticas que los integren en los sistemas nacionales de salud. Por otro lado, ha destacado la relevancia económica que supone en comparación con el desarrollo de nuevos fármacos. (World Health Organization, 2013)

Actualmente se conoce como **fitoterapia** al uso de plantas medicinales con fines terapéuticos, ya sea empleando las mismas plantas, partes de ellas, o en forma de extracto concentrando los principales compuestos de éstas en un solvente o medio para facilitar su administración (Argolo et al., 2004). La composición y proporción de los diferentes metabolitos es diferente en cada especie y puede verse afectada por diversos factores como las condiciones de cultivo y de recolección (Vivanco et al., 2005).

Los diversos metabolitos que ejercen su efecto sobre los microorganismos pueden proceder de diferentes rutas metabólicas, destacando según estas, las familias fenólicas (flavonoides) terpénica, alcaloidea y esteroidea (Vivanco et al., 2005).

Se ha descrito la actividad antifúngica sobre *C. albicans* de diferentes compuestos de origen vegetal, principalmente aceites esenciales, extractos hidroalcohólicos, y extractos secos; proponiéndose su estudio y el desarrollo de formulaciones para el tratamiento de la candidiasis oral (Maureira et al., 2017; Mølgaard et al., 2011; Moreno et al., 2020; Pequeno et al., 2018; Simonsen et al., 2006; Singla & Dubey, 2019).

2.6 Especies nativas de la Patagonia chilena

Dentro de las grandes riquezas que presenta el territorio nacional, se encuentra la Patagonia chilena, caracterizada por una gran variedad geográfica y diversidad de ecosistemas, llegando a ser descrita como una región biológicamente

única en el mundo (Armesto et al., 2021). En base a esta realidad, existen muchas especies cuyas propiedades biológicas se desconocen.

El proyecto de investigación titulado “Bosque nativo: Cambio climático y compuestos bioactivos” (FIC-Aysén 2017 BIP 40000496) dirigido por los académicos de la Universidad de Aysén Dr. Oney Ramírez y Dra. Merly de Armas, actualmente en curso, busca caracterizar la actividad biológica de diferentes especies arbóreas nativas de la Patagonia chilena. En este contexto, el Dr. Alfredo Molina como colaborador de este proyecto, participa en la caracterización antimicrobiana de diferentes extractos vegetales de especies nativas de la Patagonia (*Azara lanceolata*, *Fuchsia magellanica*, *Lomatia ferruginea*, *Nothofagus betuloides*, *Nothofagus nitida* y *Raphithamnus spinosus*).

A continuación, se abordará a modo general cada una de estas especies.

2.6.1 *Azara lanceolata* (*A. lanceolata*)

Conocida comúnmente como Corcolén, es una especie arbórea perenne que crece en climas templados, está distribuida en Chile (desde Arauco hasta Magallanes) y Argentina. Puede alcanzar entre tres y cinco metros de alto; presenta ramas delgadas y flexibles a partir de las cuales se forman corimbos (agrupaciones) de flores aromáticas de color amarillo (Fig. 3) (Seemann et al., 2013).



Figura 3. *Azara lanceolata* “Corcolén”

No existen estudios que evalúen la aplicación de esta especie en medicina, pero sí hay evidencia del uso en medicina tradicional de *Azara microphylla* como antirreumático y antitusígeno (Muñoz et al., 1981).

2.6.2 *Fuchsia magellanica* (*F. magellanica*)

Conocida como Chilco, esta especie perenne se encuentra distribuida entre las regiones de Coquimbo y Magallanes, encontrándose más abundantemente en el sur. Crece y se desarrolla rápidamente en ambientes húmedos pudiendo alcanzar los cuatro metros de altura. Presenta ramas delgadas, flores de color rojizo-violáceo y sus frutos son comestibles (MINSAL, 2009).

Esta especie ha sido utilizada con fines medicinales durante bastante tiempo por el pueblo mapuche por sus efectos antipirético, diurético y emenagogo (Estomba et al., 2006; MINSAL, 2009; Mølgaard et al., 2011; Rodríguez et al., 1994).



Figura 4. *Fuchsia magellanica*. “Chilco”

2.6.3 *Lomatia ferruginea* (*L. ferruginea*)

De nombre común Palmilla (o romerillo, o pinué) es una especie distribuida entre las regiones del Maule y Magallanes, creciendo en ambientes más húmedos.

Puede alcanzar los diez metros de alto, presenta flores amarillas, que se vuelven rojizas con el tiempo (Grosfeld et al., 2010; Muñoz et al., 1981).



Figura 5. *Lomatia ferruginea*. “Palmilla”, “Romerillo” o “Pinué”. **A.** Hojas. **B.** Flores

También ha sido empleada por el pueblo mapuche con fines medicinales, sus hojas y corteza se ha empleado para al tratamiento de abscesos gástricos, hepáticos y externos, además de presentar efecto diurético (Muñoz et al., 1981; Schmeda-Hirschmann et al., 1992).

2.6.4 *Nothofagus betuloides* (*N. betuloides*)

Esta especie conocida como Coigüe de Magallanes es un árbol perenne endémico de los bosques de Chile y Argentina, se le puede encontrar entre Valdivia y el archipiélago de Cabo de Hornos. Es una especie de crecimiento lento que puede alcanzar los treinta metros de altura (Gerding & Thiers, 2002; Promis, 2011). No se ha empleado en medicina tradicional.



Figura 6. *Nothofagus betuloides*. “Coigüe de Magallanes”

2.6.5 *Nothofagus nitida* (*N. nitida*)

Conocida como Coigüe de Chiloé, es una especie arbórea perenne, en el género *Nothofagus*, es la que presenta la distribución geográfica más restringida, principalmente en el archipiélago de Chiloé. Es un árbol de gran tamaño que puede alcanzar los treinta y cinco metros de altura, presenta hojas más grandes, oscuras y brillantes que el resto de *Nothofagus spp.* (Premoli, 1996). De manera similar a *Nothofagus betuloides*, no existen antecedentes de uso medicinal de esta especie.



Figura 7. *Nothofagus nitida*. “Coigüe de Chiloé”

2.6.6 *Raphithamnus spinosus* (*R. spinosus*)

Comúnmente conocida como Espino negro o Arrayán macho, es una especie endémica distribuida entre las regiones de Coquimbo y Aysén. Puede alcanzar hasta 6 metros de alto, presenta pequeñas hojas de color verde oscuro con tonalidades más blanquecinas en el revés de éstas; sus flores y frutos son de color violáceo (Cortéz-Echeverría, 2016).

En la medicina tradicional se ha empleado para el tratamiento de erupciones corporales (como la tiña) frotando sus hojas sobre la piel (Valencia, 2013).



Figura 8. *Raphithamnus spinosus*. “Espino negro” o “Arrayán macho”

2.7 Planteamiento del problema

Dadas las actuales limitaciones del tratamiento farmacológico convencional para la candidiasis oral (alto costo, complejos esquemas de administración y especialmente la aparición de mecanismos de resistencia); se hace necesaria la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas. Como se ha visto la actividad antifúngica de extractos naturales de diversas especies vegetales, éstos se han propuesto como alternativa, sin embargo, se requieren más estudios especialmente evaluando su actividad contra biopelículas.

A pesar de que algunas de las especies antes descritas han tenido aplicaciones en la medicina tradicional, se desconocen sus propiedades antimicrobianas. Este estudio buscará evaluar la actividad antifúngica y anti-virulencia de extractos secos obtenidos de dichas especies sobre *C. albicans*.

III

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

Los extractos obtenidos de *A. lanceolata*, *F. magellanica*, *L. ferruginea*, *N. betuloides*, *N. nitida* y *R. spinosus* presentan actividad antifúngica y anti-virulencia sobre *C. albicans*.

3.2 Objetivo general

Evaluar la actividad antifúngica y anti-virulencia de los extractos obtenidos de *A. lanceolata*, *F. magellanica*, *L. ferruginea*, *N. betuloides*, *N. nitida* y *R. spinosus* sobre *C. albicans*.

3.3 Objetivos específicos

- i. Evaluar la susceptibilidad de *C. albicans* frente a los extractos obtenidos de *A. lanceolata*, *F. magellanica*, *L. ferruginea*, *N. betuloides*, *N. nitida* y *R. spinosus*.
- ii. Determinar la Concentración Inhibitoria 50 (IC₅₀) de los extractos obtenidos de *A. lanceolata*, *F. magellanica*, *L. ferruginea*, *N. betuloides*, *N. nitida* y *R. spinosus* sobre *C. albicans*.
- iii. Evaluar el efecto de los extractos obtenidos de *A. lanceolata*, *F. magellanica*, *L. ferruginea*, *N. betuloides*, *N. nitida* y *R. spinosus* sobre la morfogénesis de *C. albicans*
- iv. Evaluar el efecto de los extractos obtenidos de *A. lanceolata*, *F. magellanica*, *L. ferruginea*, *N. betuloides*, *N. nitida* y *R. spinosus* sobre la adhesión de *C. albicans*

IV MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio cuantitativo, con diseño experimental *in vitro*. Se trabajó empleando una técnica aséptica en mechero bunsen para evitar contaminación cruzada que pueda alterar los resultados (Sanders, 2012).

4.1 Cepa de *C. albicans* y condiciones de cultivo

Se empleó -en cada ensayo- la cepa estandarizada de *C. albicans* ATCC-10231(resistente a fluconazol). Ésta se inoculó en placas de agar *Sabouraud* cloranfenicol que se emplearon como *stock* para almacenar las células durante la duración del estudio. Las placas se almacenaron a 4°C y fueron constantemente refrescadas en placas nuevas para impedir el envejecimiento de las células.

Antes de cada ensayo se realizó un preinóculo. Para ello, se tomó desde una placa de *stock*, dos unidades formadoras de colonias (UFC) de *C. albicans*, cada una con un diámetro entre 1 y 2 mm. Luego se llevaron a un tubo con el medio de cultivo líquido “*Roswell Park Memorial Institute*” (RPMI-1640) (*Biological Industries*), que después fue agitado mediante vórtex para la disgregación de las colonias. El tubo fue incubado por 24 horas a 28°C.

Concluido el periodo de incubación, desde el preinóculo -que fue agitado para homogenizar -, se tomó una muestra a la que se le añadió un volumen determinado del medio de contraste “azul de tripán” (*Corning*®). Esta mezcla fue colocada en una cámara de *Neubauer* (*Superior Marienfeld*®) que se llevó al microscopio óptico (10x) para realizar conteo de células. Mediante la siguiente fórmula se determinó la concentración celular.

$$\frac{N^{\circ} \text{ células}}{ml} = \bar{x} \times FD \times 10.000$$

Donde:

- \bar{x} : promedio de células contadas en cada cuadrante de la cámara de *Neubauer*.

-FD: factor de dilución empleado (considerando el volumen de muestra y el volumen del medio de contraste).

Una vez obtenida la concentración de células del preinóculo se realizó una dilución con medio de cultivo RPMI-1640 hasta llegar a una concentración de 1×10^6 UFC/mL, correspondiente a la suspensión de trabajo que se empleó en los distintos ensayos (a excepción de los ensayos de difusión que se ajustó en escala *McFarland*, véase más adelante).

4.2 Extractos

Se emplearon extractos secos de las especies patagónicas *A. lanceolata*, *F. magellanica*, *L. ferruginea*, *N. betuloides*, *N. nitida* y *R. spinosus*; obtenidos a partir hojas de cada especie recolectadas en el verano de 2019 en la Reserva Nacional Río Simpson y el Parque Nacional Cerro Castillo (Región de Aysén, Chile) (Anexo 1).

Los extractos fueron preparados en el laboratorio del Dr. Ramírez de la siguiente manera: Las muestras vegetales se secaron en estufa a 40 °C y posteriormente se pulverizaron. A partir de este material vegetal seco se prepararon los extractos. Se masaron 10 g del material seco y se les adicionó 60 mL de etanol absoluto o de metanol. Se agitaron las muestras a 150 rpm durante 18 horas a 25 °C. Después, se eliminó a vacío el disolvente y los extractos secos se conservaron a -20°C para su posterior utilización.

Posteriormente, en el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, se prepararon varias soluciones *stock* de los diferentes extractos utilizando como solvente dimetilsulfóxido (DMSO) (*Sigma-Aldrich*) a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Éstas fueron almacenadas a -20°C.

4.3 Evaluación de susceptibilidad

Para determinar la susceptibilidad de *C. albicans* frente a los extractos, se realizaron dos ensayos de difusión: por disco (*disk difusión assay*) y por pocillo de agar (*agar well diffusion assay*).

4.3.1 Ensayo de difusión por disco

Estos ensayos se hicieron esencialmente de acuerdo con el protocolo del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, ex NCCLS) (Sheehan et al., 2004), con mínimas modificaciones.

A partir del preinóculo se ajustó la suspensión celular a 0,5 *McFarland* en medio RPMI-1640 a través de un estándar de turbidez obteniendo así la solución de trabajo para este ensayo. Se realizó una siembra “en césped” con dicha suspensión en placas de agar *Sabouraud* cloranfenicol. Posteriormente se colocaron discos (*Oxoid, Thermo Scientific™*) que contenían diferentes cantidades de extracto (20, 50, 100, 300 y 600 µg) más dos controles, el primero de fluconazol (25 µg) y el segundo con DMSO correspondiente al vehículo (volumen correspondiente a la cantidad de extracto colocada en los otros discos).

Las placas fueron incubadas a 37°C y se midió el diámetro de los halos de inhibición (cuando estaban presentes) a 24 y 48 horas. Se determinó la susceptibilidad o resistencia respecto a los intervalos proporcionados por el CLSI.

4.3.2 Ensayo de difusión por pocillo de agar

Se realizaron de acuerdo con el protocolo empleado por Miller et al. (2002), con mínimas modificaciones.

A partir del preinóculo se ajustó la suspensión celular a 0,5 *McFarland* a través de un estándar de turbidez obteniendo así la solución de trabajo para este ensayo. Se realizó una siembra “en césped” con dicha suspensión en placas de agar *Sabouraud*

cloranfenicol. Posteriormente, con la ayuda del extremo superior de puntas estériles de 1000 μL , se realizaron cortes circunferenciales y equidistantes en el agar hasta llegar al fondo de la placa (reemplazando la punta entre cada uno); luego con la ayuda de un asa se removió el agar recortado dejando conformados los pocillos. Después, se colocó un disco de fluconazol (25 μg) como control y se llenaron los pocillos con diferentes cantidades de extracto (2,5 y 5 mg) además de un pocillo con DMSO en volumen correspondiente a la cantidad de extracto colocada en los otros pocillos. Las placas se dejaron reposar cerradas durante una hora a temperatura ambiente para lograr mayor difusión de las muestras.

Finalmente, las placas fueron incubadas a 37°C y se midió el diámetro de los halos de inhibición (cuando estaban presentes) a 24 y 48 horas. Se determinó la susceptibilidad o resistencia respecto a los intervalos proporcionados por el CLSI.

4.4 Determinación de la actividad antifúngica

La actividad antifúngica de los extractos sobre *C. albicans*, fue evaluada a través de ensayos de microdilución y de viabilidad celular.

4.4.1 Ensayo de microdilución

Este ensayo, para cuantificar la Concentración Inhibitoria 50 (IC_{50}) del extracto en la proliferación celular de *C. albicans* se realizó siguiendo las referencias proporcionadas por el CLSI para estas pruebas (Pfaller et al., 2002).

En una placa de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano (*Falcon*®), se colocaron en cada uno, 100 μL de una suspensión estandarizada de levaduras (1×10^6 UFC/mL). Se les añadió, en triplicado, diferentes concentraciones de extracto (0,03; 0,06; 0,125; 0,5; 1 y 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), y se completó con medio de cultivo (RPMI-1640) hasta alcanzar los 200 μL del pocillo. Además, se consideraron pocillos controles con las células en ausencia de extracto, en presencia de vehículo (DMSO) y pocillos “en blanco” que contenían medio de cultivo y extracto a diferentes concentraciones (esto

último con la finalidad de evitar que el mismo color que presentan los extractos de manera intrínseca interfiera con la posterior lectura). Las placas se incubaron por 24 horas a 37°C.

Posteriormente se midió la densidad óptica (DO) en un lector de placas *Infinite F50* (*Tecan*®) a $\lambda=450$ nm con previa agitación (4,4mm / 7,8 Hz) por 5 segundos. Los resultados fueron expresados como porcentaje de DO respecto al control. Empleando el software *Grandpad prism v6.0* se construyó la curva correspondiente y se determinó -en los casos posibles- la concentración inhibitoria cincuenta (IC₅₀), definida como la concentración capaz de inhibir en un 50% el crecimiento de *C. albicans*.

4.4.2 Ensayo de viabilidad celular

Para el ensayo de viabilidad se empleó un método colorimétrico con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (*Thermo Fisher Scientific*) (H. C. Yang et al., 1998).

En una microplaca de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano (*Falcon*®), se colocaron en cada uno, 100µL de una suspensión estandarizada de levaduras (1x10⁶ UFC/mL). Se les añadió, en triplicado, diferentes concentraciones de extracto (0,03; 0,06; 0,125; 0,5; 1 y 2 µg/µL), y se completó con medio de cultivo (RPMI-1640) hasta alcanzar los 200µL del pocillo. Además, se consideraron pocillos controles con las células en ausencia de extracto, en presencia de vehículo (DMSO) y pocillos “en blanco” que sólo contenían medio de cultivo. Las placas se incubaron por 24 horas a 37°C.

Concluido el periodo de incubación, las placas fueron centrifugadas (centrífuga HERMLE Z 326 K) por 5 min a 3000 rpm y 25°C para desplazar todas las células al fondo de los pocillos. Posteriormente se retiró el medio sobrenadante quedando solamente las células en los pocillos. Se añadió a cada pocillo 100 µL de MTT (0,5 mg/mL) y se incubó por 2 horas a 37°C en ausencia de luz. Terminado este periodo, se centrifugaron nuevamente las placas por 5 min a 3000 rpm y 25°C y se eliminó el sobrenadante. Luego se añadió a cada pocillo 40 µL de DMSO y se incubó nuevamente por 15 minutos a 37°C y 150 rpm en ausencia de luz.

Finalmente se midió la DO en un lector de placas Infinite F50 (*Tecan*®) a $\lambda=570$ nm con previa agitación (4,4mm / 7,8 Hz) por 5 segundos. Los resultados fueron expresados como porcentaje de viabilidad celular respecto al control. Empleando el software *Grandpad prism v6.0* se construyó la curva correspondiente.

4.5 Ensayo de morfogénesis

Para evaluar el efecto del extracto sobre la morfogénesis de *C. albicans*, se utilizó el método empleado por Müller-Sepúlveda et al. (2020).

Para este ensayo, la dilución para obtener la suspensión de trabajo se realizó con medio suplementado con suero fetal bovino (RPMI+FBS 10%) con el fin de favorecer la filamentación. Se prepararon suficientes tubos de microcentrífuga con 100 μ L de células, y se les añadieron, en triplicado, concentraciones del extracto correspondientes a 0,5; 1 y 2 μ g/ μ L, complementando con RPMI+FBS 10% hasta alcanzar los 200 μ L. Además, se añadieron tubos correspondientes al control en ausencia del extracto y en presencia del vehículo (DMSO). Se incubaron por 5 horas a 37°C empleando agitación (150 rpm) para prevenir la formación de biopelícula.

Finalizada la incubación se tomaron muestras de cada tubo -previamente agitado para homogenizar- y se llevaron en una cámara de *Neubauer* -empleando el azul de tripán (1:1) como contraste- al microscopio óptico (10x). Se contaron 200 células y se clasificaron como filamentosas y no filamentosas; finalmente se calcularon los porcentajes correspondientes.

4.6 Ensayo de adhesión

Este ensayo se realizó empleando un método colorimétrico con cristal violeta (Gulati et al., 2018).

En este ensayo, la dilución para obtener la suspensión de trabajo se realizó con medio suplementado con suero fetal bovino (RPMI+FBS 10%). Se dispuso una microplaca de 96 pocillos de fondo plano (*Falcon*®) con 100µL de células en cada uno. Se les añadió, en triplicado, las concentraciones de extracto correspondientes a 0,5; 1 y 2 µg/µL y se completó con RPMI+FBS 10% hasta alcanzar los 200µL. Además, se consideraron pocillos controles con las células en ausencia de extracto, en presencia de vehículo (DMSO) y pocillos “en blanco” que sólo contuvieron medio de cultivo. (RPMI+FBS 10%).

Las placas fueron incubadas por 4 horas a 37°C sin agitación.

Al cabo de este periodo, se extrajo el sobrenadante dejando solamente las células adheridas al fondo de la placa y se lavó tres veces con solución de tampón fosfato salino (PBS). Se añadieron 135 µL de solución de cristal violeta 0,1% (*Amresco*®) y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la tinción de las células adheridas. Posteriormente, se lavó cuidadosamente con PBS hasta eliminar todos los excesos de cristal violeta, dejando solamente las células teñidas (que quedaron adheridas al fondo de los pocillos). Se agregaron 200 µL de solución de ácido acético 10% y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente para liberar el colorante de cristal violeta presente en las células. Finalmente se trasladó el sobrenadante coloreado a una nueva placa y se midió la absorbancia a $\lambda=590\text{nm}$ en un lector de placas Infinite F50 (*Tecan*®). Los resultados fueron expresados como porcentaje de adhesión respecto al control.

4.7 Análisis estadístico

Los experimentos fueron realizados al menos tres veces (n=3), en triplicado, y de forma independiente; los ensayos de adhesión al presentar comúnmente mayor variabilidad se realizaron cuatro veces (n=4). Los valores fueron expresados como promedio y desviación estándar respecto al control. Los datos fueron analizados a través del software *GraphPad Prism* (versión 6.0 para Windows).

Para determinar si las variaciones en los resultados entre los diferentes grupos fueron estadísticamente significativas se realizó un análisis de ANOVA de una vía. Se consideraron como estadísticamente significativas las diferencias que tuviesen un valor de $p < 0,05$.

V RESULTADOS

5.1 Actividad antifúngica de los extractos sobre *C. albicans*

5.1.1 Efecto de los extractos en la susceptibilidad de *C. albicans*

Para determinar de forma simple, rápida y costo-efectiva la susceptibilidad antifúngica de *C. albicans* frente a los diversos extractos se realizaron los ensayos de difusión por disco y por pocillo de agar.

En el ensayo de difusión por disco, transcurridas las 24 y 48 horas, ninguno de los extractos (a ninguna de las cantidades evaluadas), ni tampoco el vehículo de DMSO fueron capaces de formar una zona de inhibición en las placas (Fig. 9). Solamente fluconazol (FCA) fue capaz de formar un halo de inhibición promediando $11,7\pm 1,5$ y $9,3\pm 1,2$ mm en 24 y 48 horas respectivamente. La disminución del diámetro de FCA entre ambos periodos fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

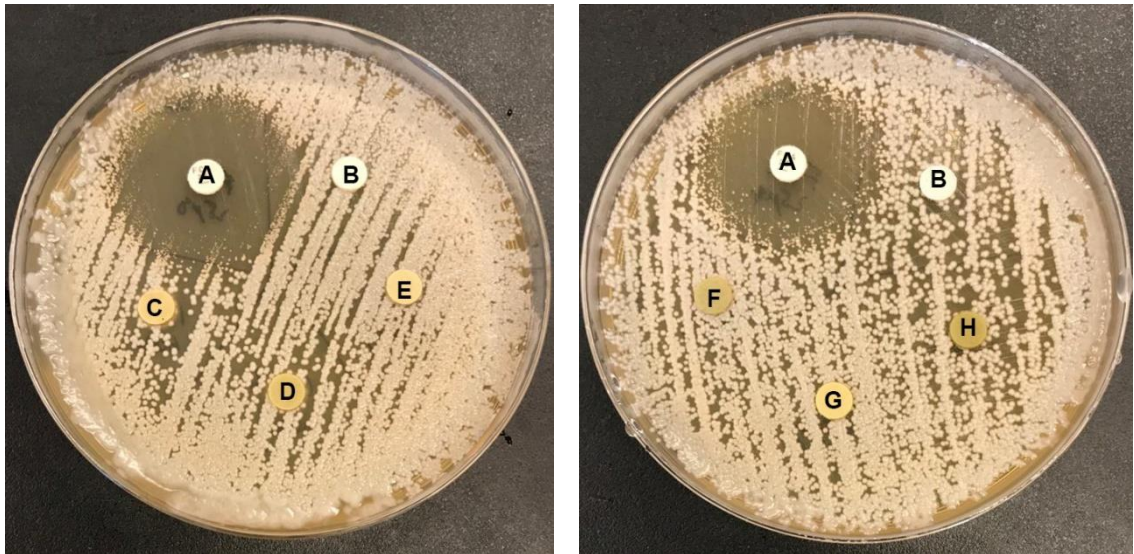


Figura 9. Ensayo de difusión por disco. Imágenes representativas para los extractos (600 μ g) sobre ATCC-10231 posterior a las 24 horas de incubación. (A) FCA 25 μ g (control); (B) DMSO 12 μ L (vehículo); (C) *A. lanceolata*; (D) *L. ferrugínea*; (E) *F. magellanica*; (F) *N. nítida*; (G) *N. betuloides* y (H) *R. spinosus*.

Estos resultados se encuentran resumidos en la Tabla 1.

Tabla 1. Difusión por disco. Cuantificación del diámetro de las zonas de inhibición (mm)			
Disco	Cantidad	24 horas \pm DS	48 horas \pm DS
FCA (control +)	25 μ g	11,7 \pm 1.5	9,3 \pm 1.2
DMSO (control -)	4-12 μ L	nd	nd
<i>A. lanceolata</i>	20 - 600 μ g	nd	nd
<i>F. magellanica</i>	20 - 600 μ g	nd	nd
<i>L. ferruginea</i>	20 - 600 μ g	nd	nd
<i>N. betuloides</i>	20 - 600 μ g	nd	nd
<i>N. nitida</i>	20 - 600 μ g	nd	nd
<i>R. spinosus</i>	20 - 600 μ g	nd	nd

Tabla 1. Difusión por disco, cuantificación del diámetro de las zonas de inhibición. Los valores corresponden a la media aritmética (n=3) del diámetro de las zonas de inhibición de los extractos de las especies probadas. DS=desviación estándar. nd=no detectado.

Para descartar que la ausencia de efecto se debiese a una baja difusión desde el disco al agar, se evaluó además el efecto antifúngico con el método de difusión por pocillo de agar. En este ensayo, la actividad antifúngica de los extractos se presentó de la siguiente manera. Aplicando 2,5 mg de extracto, ninguno de éstos fue capaz de producir una zona de inhibición en las placas. A la cantidad de 5 mg, los extractos obtenidos de *A. lanceolata*, *N. nitida* y *R. spinosus* no presentaron halos inhibitorios ni en 24 ni en 48 horas desde el tiempo inicial de incubación. Por otro lado, se produjeron zonas de inhibición de crecimiento celular a las 24 horas para los extractos obtenidos de *F. magellanica*, *L. ferruginea* y *N. betuloides*, las cuales desaparecieron transcurridas 48 horas. El control de fluconazol promedió un halo de 10,7 \pm 2,1 y 8,7 \pm 1 mm a las 24 y 48 horas respectivamente. DMSO promedió 12,3 \pm 0,6 a las 24 horas y su zona de inhibición desapareció transcurridas 48 horas. (Fig. 10).

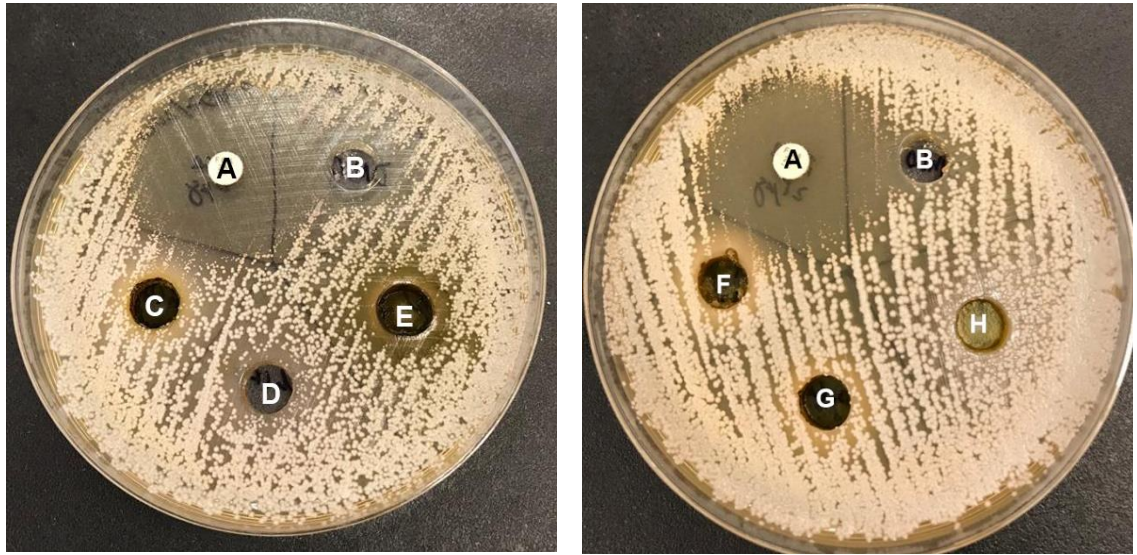


Figura 10. Ensayo de difusión por pocillo de agar. Imágenes representativas para los extractos (5 mg) sobre ATCC-10231 posterior a las 24 horas de incubación. (A) FCA 25 μ g (control); (B) DMSO 100 μ L (vehículo); (C) *N. betuloides*; (D) *F. magellanica*; (E) *L. ferruginea*; (F) *A. lanceolata*; (G) *N. nitida* y (H) *R. spinosus*.

La diferencia de los halos producidos por el extracto de *L. ferruginea* (5 mg) a las 24 horas fue estadísticamente significativa en comparación al halo de FCA en ese periodo ($p < 0,05$), sin embargo, no fue estadísticamente significativa respecto al halo obtenido por el vehículo de DMSO en el mismo periodo ($p > 0,05$). Las diferencias de los diámetros de las zonas de inhibición para los extractos de *F. magellanica* y *N. betuloides* no fueron estadísticamente significativas en comparación con los diámetros obtenidos para FCA y DMSO en el periodo de 24 horas ($p > 0,05$).

Los resultados del ensayo de difusión por pocillo de agar se encuentran detallados en la tabla 2.

Tabla 2. Difusión por pocillo de agar. Cuantificación del diámetro de las zonas de inhibición (mm)

Disco	Cantidad	24 horas ± DS	48 horas ± DS
FCA (control +)	25 µg	10,7 ± 2,1	8,7 ± 1
DMSO (control -)	100 µL	12,3 ± 0,6	nd
<i>A. lanceolata</i>	2,5-5 mg	nd	nd
<i>F. magellanica</i>	2,5-5 mg	11,3 ± 0,58(ns)	nd
<i>L. ferruginea</i>	2,5-5 mg	12,7 ± 1,2(ns)	nd
<i>N. betuloides</i>	2,5-5 mg	11 ± 1(ns)	nd
<i>N. nitida</i>	2,5-5 mg	nd	nd
<i>R. spinosus</i>	2,5-5 mg	nd	nd

Tabla 2. Difusión por pocillo de agar. Cuantificación del diámetro de las zonas de inhibición. Los valores corresponden a la media aritmética (n=3) del diámetro de las zonas de inhibición de los extractos de las especies probadas. DS=desviación estándar. nd=no detectado. ns=diferencia no significativa respecto al control que contenía sólo vehículo (DMSO) (ANOVA de una vía).

5.1.2 Efecto de los extractos sobre la proliferación celular de *C. albicans*

Para evaluar y cuantificar la proliferación celular de *C. albicans* en presencia de los diferentes extractos, se realizó un ensayo de microdilución con diferentes diluciones seriadas de cada extracto ([C] máxima 2 µg/µL) y luego de la incubación se determinó el porcentaje de proliferación celular midiendo la densidad óptica (DO) correspondiente para obtener la IC₅₀.

Todos los extractos presentaron valores negativos de DO a la concentración más alta (2 µg/µL), *F. magellanica* y *L. ferrugínea* presentaron, además, valores negativos para las concentraciones de 0,5 y 1 µg/µL, y 2 µg/µL respectivamente. En la figura 11, se muestran las diferentes curvas correspondientes a cada extracto, estas grafican las variaciones de DO en función de la concentración de éstos omitiendo aquellas concentraciones que resultaron en valores negativos. Se observó una disminución de la DO respecto al control en los extractos obtenidos de *F. magellanica* (IC₅₀~1,34 µg/µL) (Fig. 11B); *N. betuloides* (IC₅₀~0,5 µg/µL) (Fig. 11D); y *N. nítida* (IC₅₀~0,42 µg/µL) (Fig. 11E). El extracto de *A. lanceolata* (Fig. 11A) no

presentó claras diferencias de DO respecto al control en las diferentes concentraciones probadas. Los extractos *L. ferrugínea* (Fig. 11C) y *R. spinosus* (Fig. 11F) presentaron un incremento de la DO en las concentraciones de 0,5 y 1 µg/µL respectivamente. Las diferencias de los porcentajes de DO entre los grupos DMSO (2%) y control no fueron estadísticamente significativas para ningún extracto ($p>0,05$).

5.1.3 Efecto de los extractos sobre la viabilidad celular de *C. albicans*

La evaluación de la viabilidad celular de *C. albicans*, frente a los diferentes extractos se realizó mediante un ensayo de MTT con diferentes diluciones seriadas de cada extracto (0,125 - 2 µg/µL). La viabilidad fue determinada posterior a un periodo de 24 horas de incubación.

De todos los extractos probados, solamente el de *A. lanceolata* logró disminuir el porcentaje de células viables de *C. albicans* respecto al control, con un valor de $IC_{50}=0,68$ µg/µL (Fig. 12A). Por el contrario, los extractos obtenidos de *F. magellanica*; *L. ferrugínea* y *N. nítida*, incrementaron de manera concentración dependiente el porcentaje de viabilidad celular de *C. albicans* (Fig. 12B, C y E). Los extractos de *N. betuloides* y *R. spinosus* no afectaron la viabilidad celular de *C. albicans* (Fig. 12D y F). Las diferencias de los porcentajes de viabilidad celular entre los grupos DMSO (2%) y control no fueron estadísticamente significativas para ningún extracto ($p>0,05$).

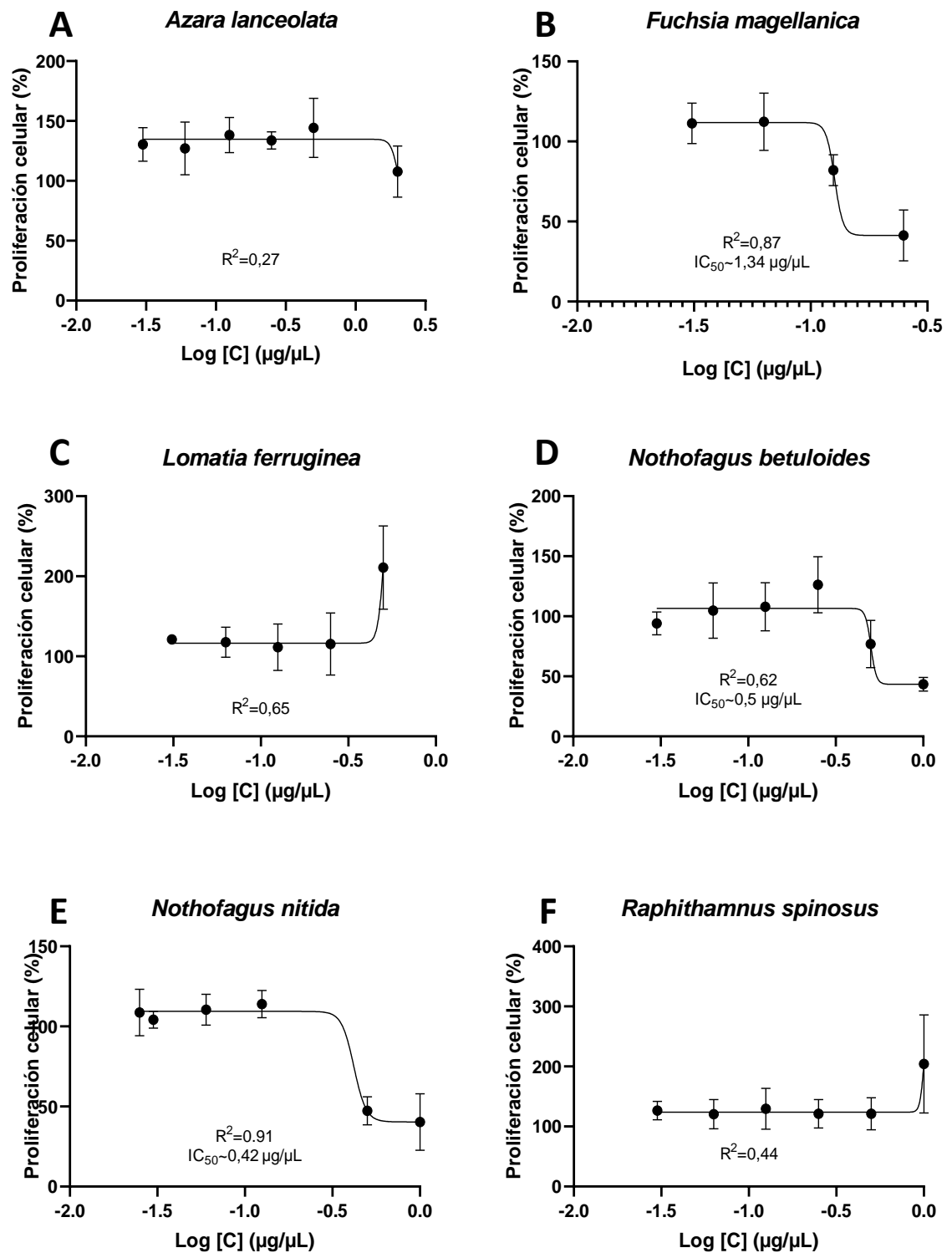


Figura 11. Ensayo de microdilución. Las curvas muestran el porcentaje \pm DS de la proliferación celular medida ($\lambda=450$ nm) respecto al control en función del logaritmo de la concentración de extracto. R^2 corresponde al coeficiente de determinación.

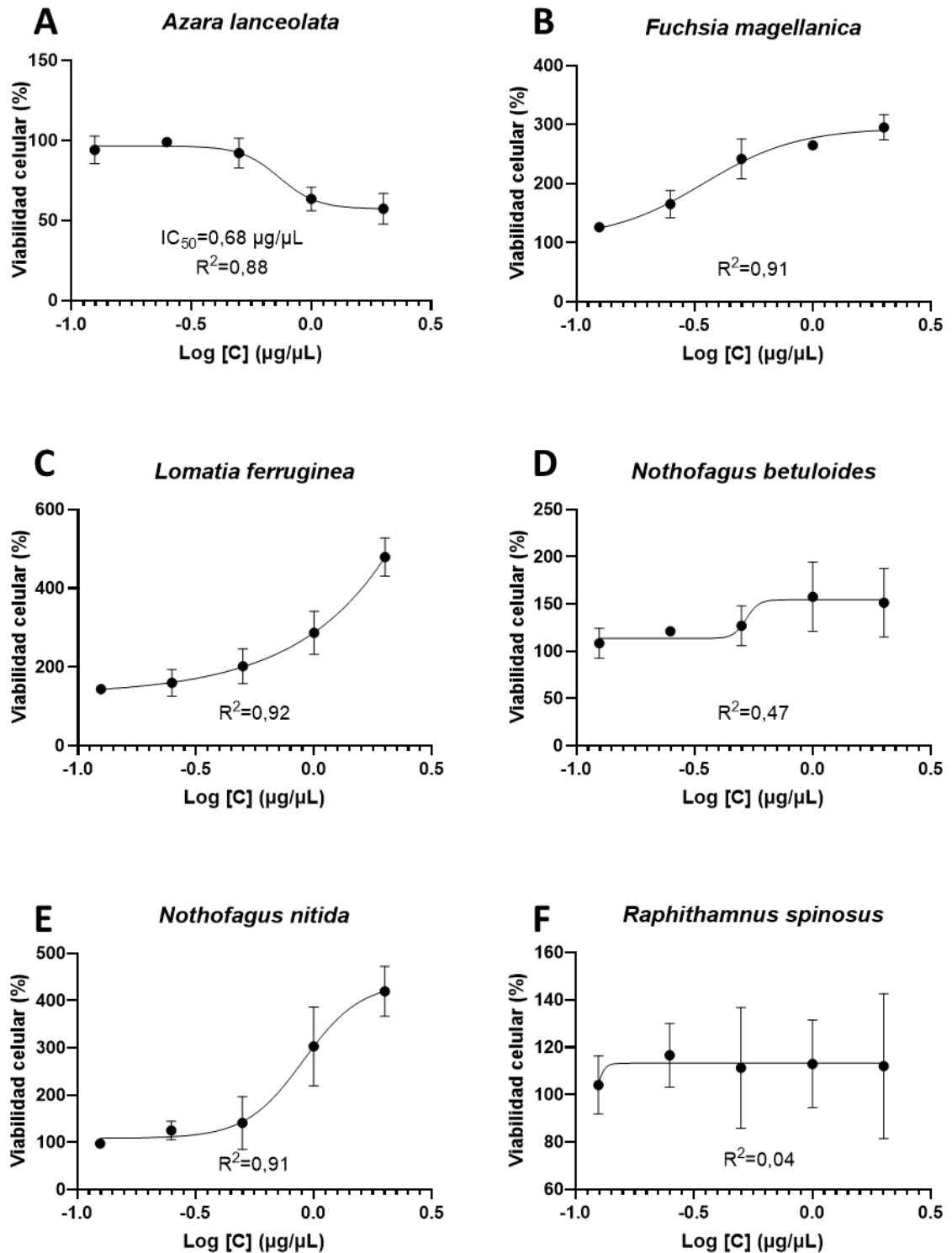


Figura 12. Ensayo de viabilidad celular. Las curvas muestran el porcentaje \pm DS de células viables respecto al control en función del logaritmo de la concentración de extracto. R^2 corresponde al coeficiente de determinación.

5.2 Actividad anti-virulencia de los extractos sobre *C. albicans*

La capacidad de adhesión y morfogénesis, son dos procesos relacionados con la virulencia de *C. albicans*. Por esta razón, para constatar la actividad anti-virulencia de los extractos se evaluó su capacidad para inhibir tanto la adhesión como la filamentación de las levaduras sobre *C. albicans*. Se realizaron dos pruebas para evaluar el efecto de éstos en la morfogénesis y en la adhesión respectivamente.

5.2.1 Inhibición de la morfogénesis

Uno de los principales procesos celulares de *C. albicans* asociados a una mayor virulencia por parte de esta especie es la capacidad de cambiar morfológicamente desde células levaduriformes hacia células filamentosas (hifas y pseudohifas).

Para constatar el efecto de los extractos sobre el proceso de morfogénesis, se incubaron las células en condiciones que favoreciesen la morfogénesis en presencia y ausencia de los extractos, posteriormente se cuantificaron los porcentajes de células filamentosas y no filamentosas, y se compararon con los controles.

De manera general se observó que los extractos de obtenidos de *A. lanceolata*; *F. magellanica*; *L. ferrugínea* y *N. nítida* fueron capaces de inhibir el proceso de morfogénesis respecto al control a la concentración máxima empleada ($p < 0,05$) (Fig. 13). Por otra parte, los extractos de *N. betuloides* y *R. spinosus* mostraron una aparente disminución de la morfogénesis, pero se constata una mayor presencia de células filamentosas en comparación al resto de los extractos (Fig. 13F y 13H).

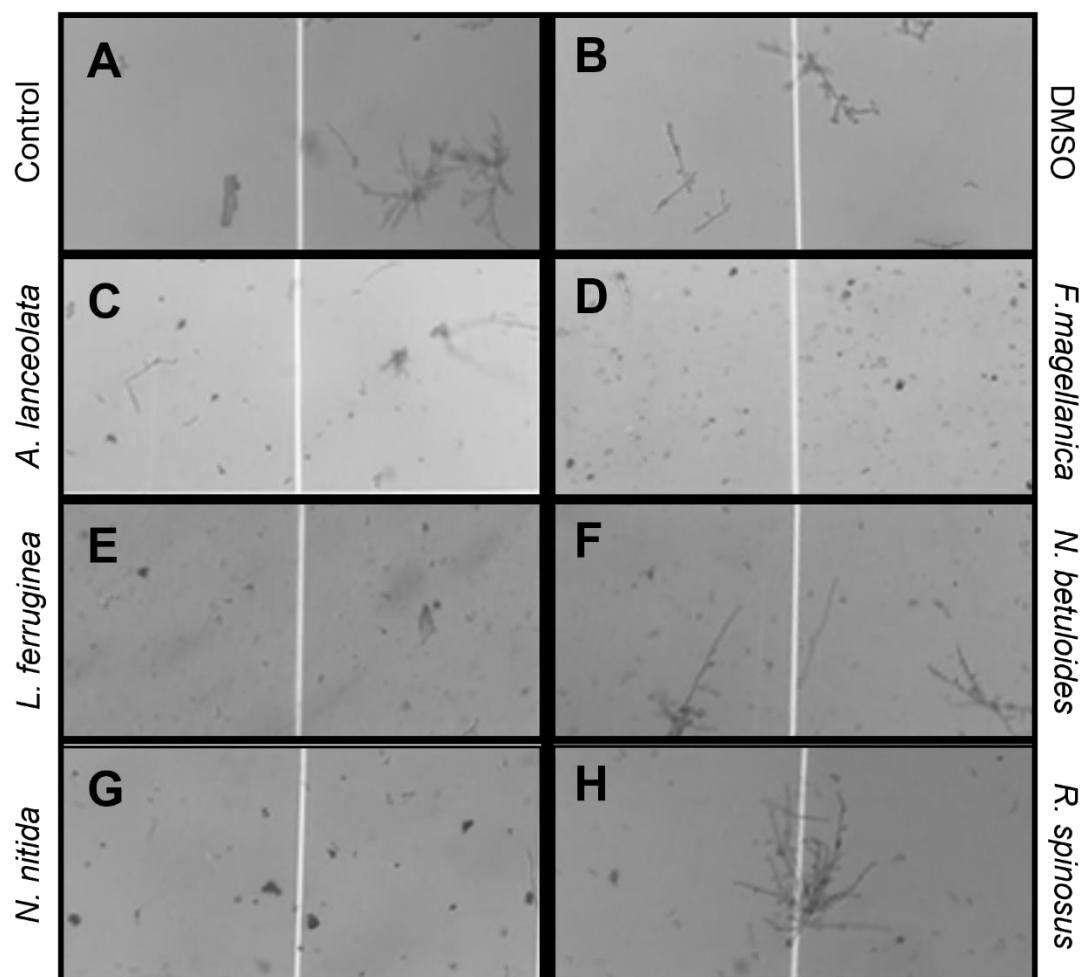


Figura 13. Ensayo de morfogénesis, microscopía óptica. Imágenes al 40X muestran de forma representativa la cantidad de células filamentosas (hifas y pseudohifas) de la cepa ATCC-10231 después de 5 horas de incubación en presencia (C-H) y ausencia de extractos (A-B) a la concentración máxima empleada (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Las barras verticales de color blanco corresponden a las divisiones propias de la cámara de *Neubauer*.

En la figura 14 se muestra la cuantificación de los resultados de este ensayo para cada extracto junto a su respectivo análisis estadístico. Como se puede observar los extractos obtenidos de *A. lanceolata* (14A); *F. magellanica* (14B) y *N. nítida* (14E) disminuyeron el porcentaje de células filamentosas de manera estadísticamente significativa a las concentraciones de 1 y 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($p < 0,05$). El extracto de *L. ferrugínea* (14C) sólo presentó una inhibición estadísticamente significativa de la morfogénesis a la concentración de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($p < 0,05$). Los extractos correspondientes a *N. betuloides* (14D) y *R. spinosus* (14F) no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de tratamiento y el control ($p > 0,05$).

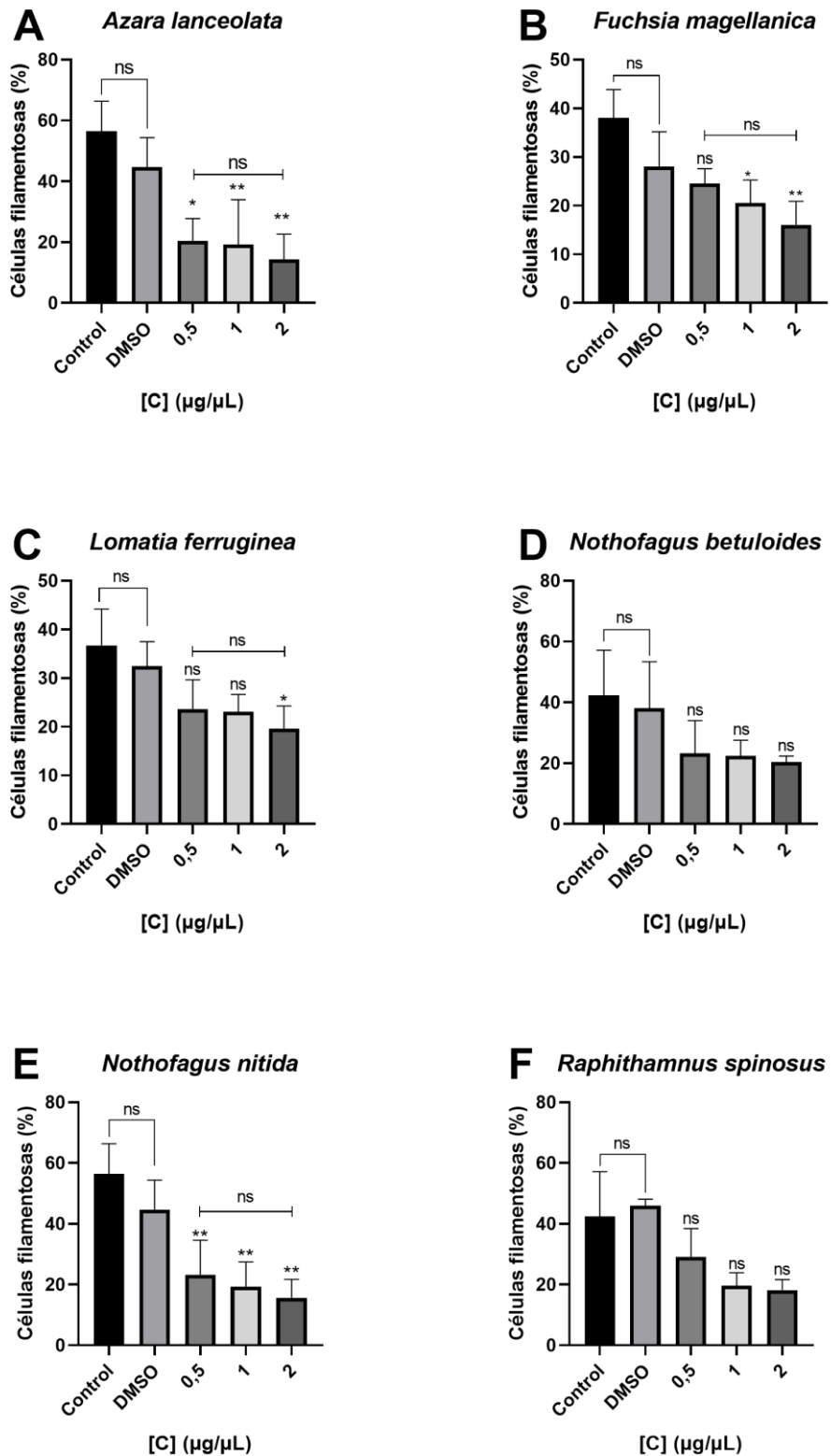


Figura 14. Ensayo de morfogénesis, cuantificación de porcentajes. Las barras representan el promedio \pm DS del porcentaje de células filamentosas de *C. albicans* respecto al control después de 5 horas de incubación con cada extracto. DMSO corresponde al vehículo empelado en los extractos y se muestra su control correspondiente. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, en comparación con el control. ns=diferencia no significativa. ANOVA de una vía.

5.2.2 Inhibición de la adhesión en superficies abióticas

Otro proceso que se ha asociado con fenotipos más virulentos de *C. albicans*, es su adhesión celular a diferentes superficies, capacidad que corresponde además a la primera etapa para la formación de una biopelícula. En este estudio se evaluó la actividad de los diferentes extractos sobre el proceso de adhesión de *C. albicans* en superficies abióticas (placas de poliestireno).

Transcurrido el periodo de incubación de cuatro horas, se observó que el extracto de *A. lanceolata* (Fig. 15A) fue capaz de disminuir el porcentaje de adhesión celular en las placas respecto al control de manera estadísticamente significativa en las concentraciones de 1 y 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($p < 0,05$); no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre dichas concentraciones ($p > 0,05$). Los extractos obtenidos de *F. magellanica* (15B), *L. ferruginea* (15C) y *N. nítida* (15E), sólo disminuyeron la adhesión de manera estadísticamente significativa a la concentración más alta (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ($p < 0,05$). Por el contrario, los extractos de *N. betuloides* (15D) y *R. spinosus* (15F) generaron un incremento del porcentaje de adhesión celular respecto al control a partir de la concentración más baja (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ($p < 0,05$); mientras que no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes concentraciones probadas de esos extractos ($p > 0,05$). La presencia del vehículo de DMSO en los diferentes extractos no influyó en el proceso de adhesión respecto al control ($p > 0,05$).

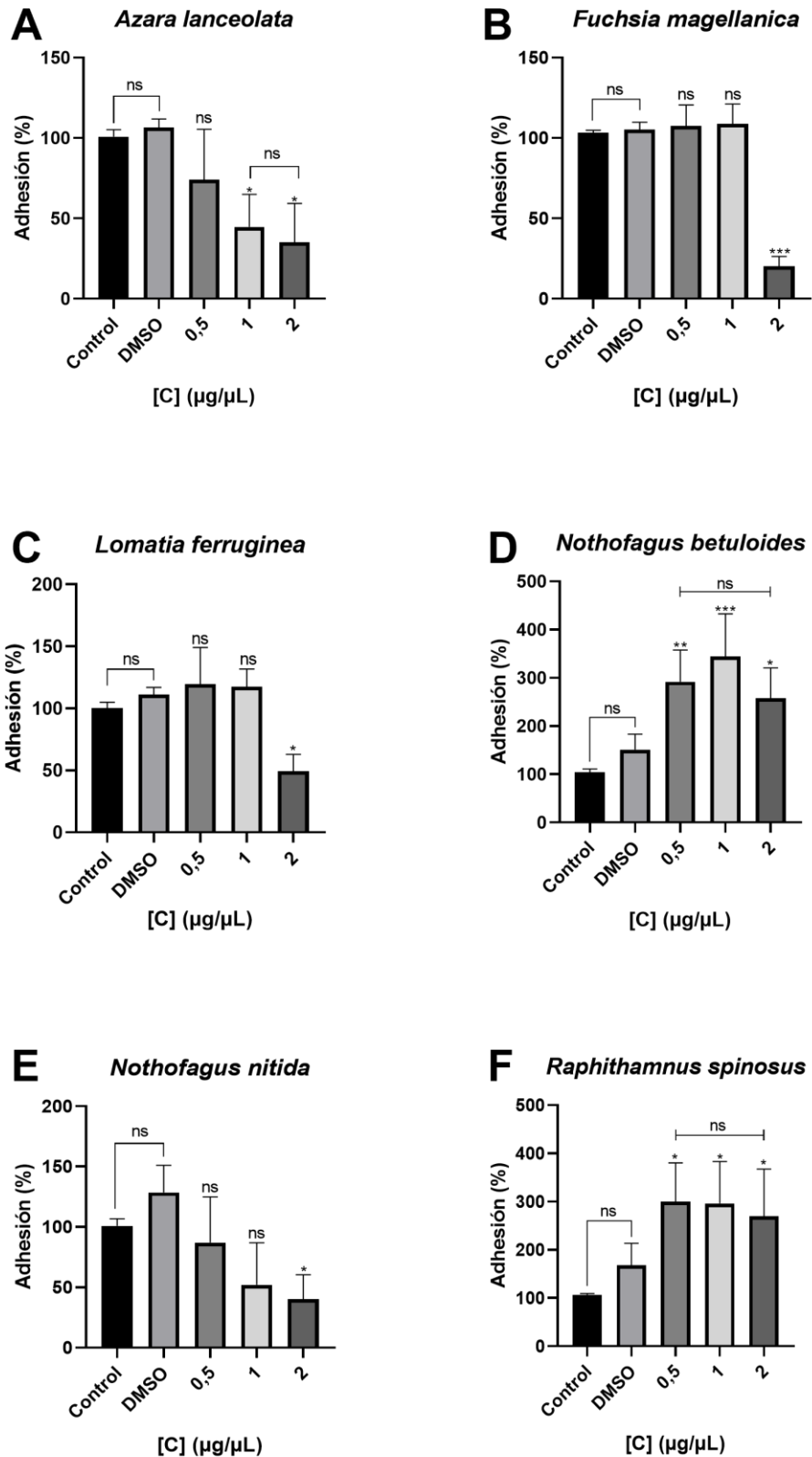


Figura 15. Ensayo de adhesión. Las barras representan el promedio \pm DS del porcentaje de adhesión celular de *C. albicans* sobre superficies abióticas de poliestireno respecto al control, posterior a 4 horas de incubación con cada extracto. DMSO corresponde al vehículo empleado en los extractos y se muestra su control correspondiente. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$. ns=diferencia no significativa. ANOVA de una vía.

VI DISCUSIÓN

En los últimos años ha aumentado el interés por los compuestos naturales y sus potenciales aplicaciones terapéuticas, de manera que, diferentes compuestos de una gran variedad de especies -principalmente de origen vegetal- están siendo actualmente investigados. El objetivo de este trabajo fue evaluar los extractos obtenidos de *A. lanceolata*; *F. magellanica*; *L. ferruginea*; *N. betuloides*; *N. nitida* y *R. spinosus*, en cuanto a su actividad antifúngica y anti-virulencia (morfogénesis y adhesión) sobre *C. albicans*.

En este estudio, se evaluó la actividad antifúngica de los extractos mediante cuatro ensayos: difusión por disco, difusión por pocillo de agar, microdilución y viabilidad celular.

En el ensayo de difusión por disco, considerando que los extractos no provocaron una zona de inhibición se define que: a las cantidades probadas, la cepa de *C. albicans* evaluada (ATCC-10231) no presentó susceptibilidad frente a los extractos. Además, como el diámetro alcanzado por FCA fue menor al estándar provisto por el CLSI (14 mm) (Sheehan et al., 2004) se confirma que la cepa empleada es resistente a fluconazol.

Pese a estos resultados, se deseó probar con concentraciones mayores de extracto. Dado que los discos empleados con los extractos tienen un límite de volumen aplicable (~15µL) se probó el método de difusión por pocillo de agar, que permite probar con cantidades mayores (~100µL). Además, algunos autores como Liu & Kwasniewska, (1981) y Devillers et al. (1989) han planteado que los métodos de difusión en agar son más efectivos cuando se aplican los compuestos directamente sobre el mismo agar. En este ensayo de difusión por pocillo de agar, los pocillos de tres extractos (*F. magellanica*, *L. ferruginea* y *N. betuloides*) presentaron zonas de inhibición del crecimiento celular a las 24 horas de incubación. Sin embargo, al comparar los diámetros de estas áreas con el obtenido por el control de DMSO (vehículo) y constatar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ellos, no se puede afirmar si estos halos son producto de una

actividad antifúngica de los extractos o de la acción del mismo vehículo; por lo tanto, se define que junto con los otros extractos no presentan actividad antifúngica a las cantidades probadas mediante este método.

Estos ensayos de difusión en agar han sido empleados comúnmente para evaluar la actividad antimicrobiana de diferentes compuestos naturales; pese a ello, las especies de este estudio no han sido probadas (al menos contra *C. albicans*). Algunos autores como Okigbo & Igwe (2007) han empleado estos ensayos de difusión y han podido constatar la actividad antifúngica de extractos secos de otras especies vegetales sobre *C. albicans*, sin embargo, emplearon cantidades de extracto hasta diez veces mayores que las probadas en este trabajo. Por su parte Vega, K. (2018) probó extractos secos de *R. spinosus* (10-40µg) en bacterias (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*) sin constatar actividad microbiana.

En lo que respecta a los ensayos de microdilución, los resultados (a excepción de *N. nitida*) se caracterizaron por presentar una alta variabilidad ($R^2 < 0,7$). Estas diferencias pueden ser explicadas en gran medida por las mismas coloraciones que presentaban los extractos de manera intrínseca. Al momento de realizar los ensayos, se constató que en las concentraciones más altas la cantidad de coloración en los pocillos era mayor (Fig. 16).

Esta particularidad, sin duda, fue una de las principales limitaciones de este método. Por un lado, al necesitar preparar pocillos “blanco” (con extracto y libres de células) para cada concentración de extracto con el fin de restar su absorbancia de los pocillos tratados; de manera que, al presentar un blanco diferente en cada concentración, podría aumentar la variabilidad respecto a un método con un mismo valor de blanco para todas las concentraciones.

La segunda razón por la que la coloración intrínseca de los extractos limitó este método, es que en la concentración mayor (2 µg/µL), al momento de sustraer en los pocillos tratados la absorbancia obtenida del blanco, se obtuvieron -para todos los extractos-, valores negativos (*F. magellanica* y *L. ferruginea* presentaron, además, valores negativos para las concentraciones de 0,5 y 1 µg/µL, y 1 µg/µL respectivamente). Éstos se pueden explicar por la dificultad del lector de discriminar entre las densidades ópticas de las células y de las altas concentraciones de

extracto (razón por la cual se decidió no considerar estas concentraciones al momento de construir las curvas).

Teniendo en consideración lo descrito anteriormente, y a pesar de que para *F. magellanica*, *N. betuloides* y *N. nitida* se pudo determinar un IC₅₀ aproximado, no se puede afirmar que esta disminución de la densidad óptica observada se deba a la acción de los extractos puesto a que puede producirse un falso negativo producto por la coloración misma de los extractos.

En cuanto a la evidencia disponible existe una gran variedad de publicaciones de este tipo de ensayos con extractos secos sobre *C. albicans*, y la inmensa diversidad de especies y métodos para la obtención de extractos dificulta la comparación entre ellas. Sin embargo, para este trabajo en que se usaron extractos obtenidos con metanol y etanol (Anexo 2); resulta interesante el estudio de Benabdesslem et al. (2020), en el cual se evaluó la actividad antifúngica de extractos de *Salvia argentea* obtenidos con diferentes solventes (metanol, etanol y agua) sobre *C. albicans* ATCC-10231; y no se detectaron diferencias entre la actividad antifúngica de los extractos en función del solvente empleado.

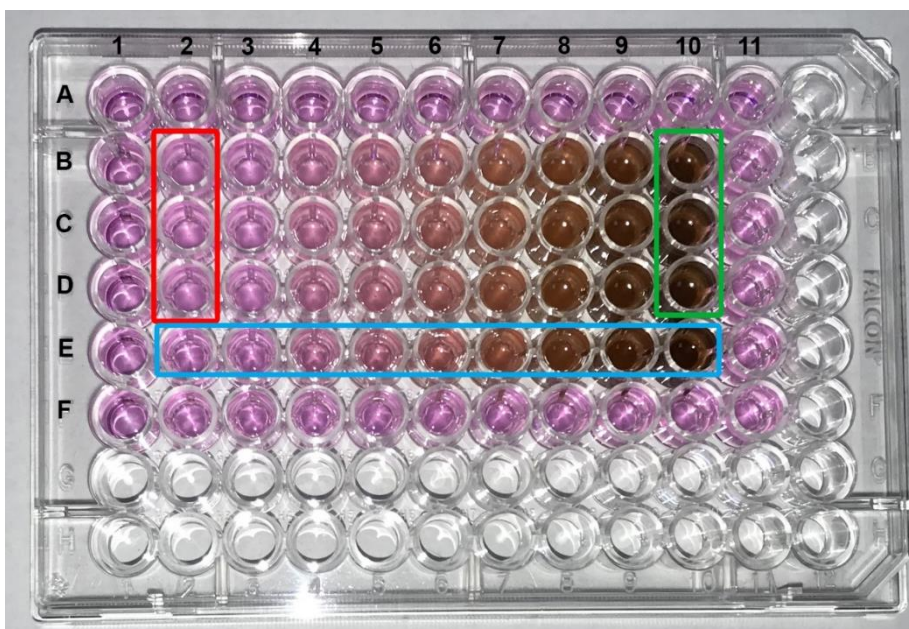


Figura 16.. Imagen representativa de una preparación para un ensayo de microdilución con el extracto de *F. magellanica*. Se observan los grupos control (rojo), tratamiento con la concentración más alta probada (verde) y “blanco” específico para cada concentración (azul). Nótese la gran diferencia de color entre la concentración más alta de extracto y el control

Para poder lidiar con la limitación que ejerce el color de los extractos sobre la DO, se optó por realizar un ensayo de viabilidad celular mediante MTT. Este método tiene una fase inicial muy similar al ensayo anterior (sin requerir pocillos “blanco” específicos para cada concentración); con la diferencia que antes de leer las placas se extrae el sobrenadante de cada pocillo, se aplica el MTT y se incuba por un nuevo periodo (2 horas). Durante este tiempo el MTT se reduce por acción de deshidrogenasas (si es que existe actividad metabólica en las células) formando cristales de formazán de color morado (H. C. Yang et al., 1998). De esta manera el color del extracto es eliminado junto con el sobrenadante (y con ello su influencia en la medición de la DO). Además, a diferencia del método anterior, este ensayo tiene como ventaja el permitir determinar si los extractos poseen actividad sobre la viabilidad de las células.

Mediante este ensayo, se observó que solamente el extracto obtenido de *A. lanceolata*, generó una disminución en la viabilidad celular de *C. albicans*, sin embargo, esta reducción no alcanzó el 50% respecto al control a las concentraciones probadas. Los extractos de *F. magellanica*, *L. ferruginea*, y *N. nitida*, mostraron un incremento de la viabilidad celular en función de la concentración. Por otro lado, los porcentajes de viabilidad celular en las curvas de *N. betuloides* y *R. spinosus* no mostraron alteraciones significativas respecto al control.

Se ha descrito que existe una interacción entre el MTT y los extractos naturales, los cuales producirían falsos positivos a altas concentraciones mostrando una sobrestimación de las células viables. Este efecto se explica por una capacidad reductora intrínseca que pueden presentar los mismos extractos naturales y se ha visto incrementado en aquellos con mayor capacidad antioxidante (mayor efecto reductor) (Akter et al., 2019). A pesar de que no se ha reportado esta interacción en estudios con *C. albicans*, sí se ha constatado que este efecto depende en gran medida del protocolo del ensayo empleado.

Al respecto, Bruggiser et al. (2002), probaron diferentes protocolos de aplicación de MTT para evaluar el efecto del kaempferol (compuesto presente en múltiples especies vegetales con gran actividad reductora) sobre la viabilidad de

células de cáncer de mama. Ellos observaron, en el primer grupo, que removiendo el medio de cultivo que contenía el kaempferol, y haciendo un lavado con medio de cultivo nuevo antes de la aplicación del MTT, disminuía la viabilidad celular de manera concentración dependiente; por el contrario, en el grupo en que se aplicaron kaempferol y MTT en conjunto se observó un incremento significativo del porcentaje de células viables respecto al control ($p < 0,05$). Estos resultados sugieren que al remover el medio de cultivo antes de aplicar el MTT disminuirían los falsos positivos derivados de esta interacción. Puesto que en el presente estudio se removió el sobrenadante (que contenía los extractos) antes de la aplicación del MTT, es poco probable que el incremento del porcentaje de viabilidad celular observado en *F. magellanica*; *L. ferruginea* y *N. nitida* se deba a esta interacción. Sin embargo, sería interesante evaluar el efecto de los extractos mediante otros ensayos de viabilidad celular que no se basen en la actividad de deshidrogenasas para descartar que un potencial efecto reductor de los extractos influya en los resultados.

Teniendo en consideración los resultados del ensayo de microdilución con sus limitaciones antes descritas, y los del ensayo de viabilidad celular donde no existe la influencia del color de los extractos en las mediciones, se puede afirmar que la disminución de la DO observada en los extractos de *F. magellanica*, *N. betuloides* y *N. nitida* se debió principalmente a la dificultad del lector para la discriminar entre las densidades ópticas de las células y de las concentraciones de extracto. De manera que para determinar la actividad antifúngica de los extractos sobre *C. albicans*, se optó por considerar solamente los resultados del ensayo de viabilidad celular, los cuales indican que los extractos probados a excepción del de *A. lanceolata*, no presentan actividad antifúngica sobre *C. albicans*.

En lo que respecta a la actividad anti-virulencia de los extractos sobre *C. albicans*, esta fue estudiada mediante dos ensayos: uno evaluando la morfogénesis y otro la adhesión sobre superficies abióticas. Inicialmente se deseaba realizar estos ensayos probando los extractos a las concentraciones equivalentes a $\frac{1}{2}$ IC₅₀; IC₅₀ y 2x IC₅₀. Sin embargo, dada las dificultades antes descritas para determinar los valores de IC₅₀ se optó por definir una concentración máxima de 2 µg/µL, la cual está determinada por el máximo volumen de DMSO (vehículo) que puede contener

un volumen final de 200 μL para que éste no ejerza efecto citotóxico sobre *C. albicans*.

El proceso de morfogénesis es esencial para la patogénesis de *C. albicans* y la proliferación de sus biopelículas, se ha demostrado que cuando las células se encuentran en estado filamentoso aumenta la expresión de factores de virulencia como Als1 y Als3 (glicoproteínas que le permiten a *C. albicans* adherirse a superficies biológicas e inertes), la evasión de la respuesta inmune y la destrucción tisular por acción de proteinasas y fosfolipasas. (Nobile & Johnson, 2015).

En el ensayo de morfogénesis realizado, se observó que posterior a 5 horas de incubación, en todas las concentraciones probadas, los extractos obtenidos de *A. lanceolata*; *F. magellanica* y *N. nitida* fueron capaces de inhibir el proceso de morfogénesis de *C. albicans* en ~40, ~20 y ~40% respectivamente; como no se observaron diferencias significativas entre las diferentes concentraciones se sugiere que dicho efecto no depende de la concentración. El extracto de *L. ferruginea* sólo inhibió la morfogénesis de manera significativa (~15%) a la concentración de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Por el contrario, los extractos de *N. betuloides* y *R. spinosus* no lograron inhibir de manera significativa el proceso de morfogénesis respecto al control.

Existen pocos estudios que evalúen el efecto de extractos de especies vegetales sobre la morfogénesis de *C. albicans*, y la diversidad de especies probadas y solventes empleados dificulta la comparación. Por ejemplo Silva-Rocha et al. (2015) evaluaron el efecto de un extracto cetónico de *Eugenia uniflora* sobre la morfogénesis de *C. albicans*, y obtuvieron resultados favorables empleando una concentración de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Se debe considerar que el ensayo de morfogénesis que se llevó a cabo está diseñado para evaluar la capacidad de un componente de inhibir la transición desde una forma levaduriforme a una filamentosa, de manera que, aunque se pudo comprobar que ciertos extractos inhiben la formación de hifas, no se puede afirmar que estos induzcan que las hifas “regresen” fenotípicamente a formas levaduriformes. Por su parte, Priya & Pandian (2020) evaluaron la actividad de la pimienta sobre la morfogénesis de *C. albicans*, y consideraron un ensayo para cada transición levadura-hifa y viceversa. Sería interesante evaluar el efecto de los extractos sobre la transición desde formas filamentosas a no filamentosas.

Otro proceso relevante en la patogénesis de *C. albicans* es la adhesión a superficies, esta constituye la primera etapa en la formación de una biopelícula y le permite a las células colonizar y persistir en un nicho ecológico. Este proceso de adhesión es favorecido también por la presencia de células filamentosas y su respectiva expresión de adhesinas (Nobile & Johnson, 2015).

En este estudio se evaluó la capacidad de los diferentes extractos para inhibir la adhesión de *C. albicans* en superficies abióticas de poliestireno. Se observó una reducción de la adhesión celular a la concentración de 2 µg/µL, por parte de los extractos obtenidos de *A. lanceolata* (~40%), *F. magellanica* (~75%), *L. ferruginea* (~50%) y *N. nitida* (~40%). Por el contrario, se constató que en los extractos de *N. betuloides* y *R. spinosus* se produjo un incremento de la adhesión celular respecto al control; estos resultados son congruentes con el ensayo de morfogénesis en el cual estos mismos extractos no fueron capaces de inhibir la formación de hifas, de manera que es de esperarse que no disminuyeran tampoco la adhesión celular.

En el desarrollo de la candidiasis oral, el proceso de adhesión se produce principalmente a nivel de la mucosa oral y de la superficie de prótesis removibles. Al respecto, existen otros modelos experimentales más acotados a este contexto y que permiten evaluar la adhesión sobre dichas superficies. Tal es el caso del modelo empleado por Tsutsumi-Arai et al. (2019), que fue realizado en superficies de polimetilmetacrilato (PMMA, empleado para la confección de prótesis dentales) inmersas en placas de 24 pocillos. O el método usado por Taweechaisupapong et al. (2005), para evaluar la adhesión de *C. albicans* sobre células epiteliales de la mucosa oral. En vista de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se podría esperar que el efecto en la adhesión de *C. albicans* por parte de los extractos sea similar sobre el PMMA, pero se desconoce totalmente la actividad que estos presentarían sobre la adhesión a superficies celulares.

Se ha definido clásicamente como factores de virulencia a aquellas proteínas codificadas por genes que participan en el desarrollo de la patogénesis de un agente, tales como las proteinasas (SAPs1-9) en el caso de *C. albicans* (Yang, Y., 2003). En el marco de esta definición los conceptos “morfogénesis” y “adhesión” por sí mismos no se ajustan a ella. A pesar de ello, algunos autores han propuesto que

dicha definición debiese ser aplicable solamente para patógenos primarios (que tienen la capacidad por sí solos de producir enfermedad) puesto que en el caso de patógenos oportunistas -cómo *C. albicans*- la presencia por si sola de estas proteínas no basta para el desarrollo del cuadro infeccioso, sino que estos microorganismos requieren además de otros procesos que les permitan evadir la respuesta inmune y proliferar en el ambiente (Haynes, 2001; Y. L. Yang, 2003). De manera casi contemporánea, Pla et al. (2001) enumeraron una serie de genes metabólicos que están relacionados de manera directa o indirecta con el crecimiento, desarrollo y patogénesis de *C. albicans*, como es el caso de RSR1 vinculado con la morfogénesis y de los genes HWP1 e INT1 cuya expresión favorece los procesos de adhesión celular, ampliando así el concepto de factor de virulencia. En el presente estudio no se evaluó el efecto de los extractos sobre la morfogénesis y adhesión de *C. albicans* a nivel genético y molecular, sin embargo, sí se puede afirmar que algunos de esos extractos ejercen una actividad anti-virulencia sobre *C. albicans* al inhibir dichos procesos que favorecen su patogénesis.

Actualmente existen pocos agentes farmacológicos contra las infecciones fúngicas y múltiples mecanismos de resistencia contra ellos. En el caso de *C. albicans*, estos mecanismos -en su gran mayoría- se relacionan con la capacidad de esta especie de formar biopelículas, para la cual los procesos de morfogénesis y adhesión son esenciales (Mathé & van Dijck, 2013; Nobile & Johnson, 2015; Wall et al., 2019). Considerando esta realidad se puede ver que los resultados obtenidos de esta investigación son prometedores para el extracto obtenido de *A. lanceolata*, que mostró presentar actividad antifúngica y anti-virulencia sobre *C. albicans*. También lo son para los extractos de *F. magellanica*; *L. ferruginea* y *N. nitida*, que, a pesar de no presentar una clara actividad antifúngica, sí presentaron una actividad sobre los procesos de morfogénesis y adhesión vinculados con fenotipos más virulentos y resistentes de *C. albicans*, y por lo que sería interesante evaluar su actividad en combinación con agentes antifúngicos convencionales como nistatina o fluconazol. Por otro lado, sería conveniente realizar una caracterización de los extractos para conocer su composición química lo que favorecería la comprensión de su actividad y comportamiento contra microorganismos como *C. albicans*.

VII CONCLUSIONES

En conclusión, el extracto obtenido de *A. lanceolata* presenta un efecto inhibitorio sobre la viabilidad celular de cepas de *C. albicans* resistentes a fluconazol. Los extractos de *A. lanceolata*; *F. magellanica*; *L. ferruginea* y *N. nitida* son unos efectivos agentes contra los procesos de morfogénesis y adhesión de *C. albicans*, que están asociados con fenotipos celulares más virulentos y son esenciales para la formación de biopelículas.

Con la finalidad de complementar los resultados aquí presentados se sugiere: realizar una caracterización para conocer la composición química de los extractos, evaluar la actividad de éstos sobre la viabilidad de *C. albicans* con pruebas que no se basen en procesos de óxido-reducción, y evaluar el efecto combinado de los extractos con antifúngicos convencionales.

VIII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akter, S., Addepalli, R., Netzel, M. E., Tinggi, U., Fletcher, M. T., Sultanbawa, Y., & Osborne, S. A. (2019). Antioxidant-rich extracts of *Terminalia ferdinandiana* interfere with estimation of cell viability. *Antioxidants*, 8(6). <https://doi.org/10.3390/antiox8060191>
- Argolo, A. C. C., Sant'Ana, A. E. G., Pletsch, M., & Coelho, L. C. B. B. (2004). Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. *Bioresource Technology*, 95(2), 229–233. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2003.12.014>
- Armesto, J., Martínez-Harms, M. J., Castilla, J. C., & Fuentes-Castillo, T. (2021). *Conservación en la Patagonia Chilena: Evaluación del conocimiento, oportunidades y desafíos* (J. C. Castilla, J. Armesto, & M. J. Martínez-Harms, Eds.; 1st ed.). Universidad Católica de Chile.
- Barraza, M., Barnafi, N., Ortiz, G., Torres, J. P., Coria, P., Catalán, P., Palma, J., Morales, J., Barraza, M., Barnafi, N., Ortiz, G., Torres, J. P., Coria, P., Catalán, P., Palma, J., & Morales, J. (2018). Evaluación de la indicación, consumo y costos de antifúngicos en un hospital pediátrico de Chile. *Revista Chilena de Infectología*, 35(4), 351–357. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182018000400351>
- Bassetti, M., Righi, E., Montravers, P., & Cornely, O. A. (2018). What has changed in the treatment of invasive candidiasis? A look at the past 10 years and ahead. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73, i14–i25. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx445>
- Benabdesslem, Y., Hachem, K., Kahloula, K., Belakredar, A., & Slimani, M. (2020). In Vitro Antimicrobial Activity of Aqueous, Ethanolic and Methanolic Leaves Extracts from *Salvia argentea*. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11(11), 1683–1691.

- Bruggiser, R., von Daeniken, K., Jundt, G., Schaffner, W., & Tullberg-Reinert, H. (2002). Interference of Plant Extracts, Phytoestrogens and Antioxidants with the MTT Tetrazolium Assay. *Planta Med*, 68, 445–448.
- Calderone, R. A. (2002). *Candida and Candidiasis*. 8(8).
- Clatworthy, A. E., Pierson, E., & Hung, D. T. (2007). Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature Chemical Biology*, 3, 541–548. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.24>
- Coleman, D., Sullivan, D. J., Bennett, D. E., Moran, G. P., Barry, H. J., & Shanley, D. B. (1997). *Candidiasis: the emergence of a novel species, Candida dubl... : AIDS*. AIDS. https://journals.lww.com/aidsonline/Fulltext/1997/05000/Candidiasis__the_emergence_of_a_novel_species,_2.aspx
- Cortéz-Echeverría, J. (2916). *Guías de campo de Fray Jorge.: Vol. Tomo II*.
- Dar-Odeh, N. S., Al-Beyari, M., & Abu-Hammad, O. A. (2012). The role of antifungal drugs in the management of denture-associated stomatitis. *International Arabic Journal of Antimicrobial Agents*, 2(1). <https://doi.org/10.3823/705>
- Devillers, J., Steiman, R., & Seigle-Murandi, F. (1989). The usefulness of the agar-well diffusion method for assessing chemical toxicity to bacteria and fungi. *Chemosphere*, 19(10–11), 1693–1700. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(89\)90512-2](https://doi.org/10.1016/0045-6535(89)90512-2)
- Estomba, D., Ladio, A., & Lozada, M. (2006). Medicinal wild plant knowledge and gathering patterns in a Mapuche community from North-western Patagonia. *Journal of Ethnopharmacology*, 103(1), 109–119. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2005.07.015>
- Garcia-Cuesta, C., Sarrion-Pérez, M. G., & Bagán, J. v. (2014). Current treatment of oral candidiasis: A literature review. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 6(5), e576. <https://doi.org/10.4317/JCED.51798>

- Gerding, V., & Thiers, O. (2002). Caracterización de suelos bajo bosques de *Nothofagus betuloides* (Mirb) Blume, en Tierra del Fuego, Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, 75(4), 819–833. <https://doi.org/10.4067/S0716-078X2002000400015>
- Grosfeld, J., Magnin, A., Gereá, M., & Barthélémy, D. (2010). *Phylogeny, distribution and biogeographic origin: a morpho-architectural approach from Valdivian trees*. <https://hal.inrae.fr/hal-02815504>
- Gulati, M., Lohse, M. B., Ennis, C. L., Gonzalez, R. E., Perry, A. M., Bapat, P., Arevalo, A. V., Rodriguez, D. L., & Nobile, C. J. (2018). In Vitro Culturing and Screening of *Candida albicans* Biofilms. *Current Protocols in Microbiology*, 50(1), 1–62. <https://doi.org/10.1002/cpmc.60>
- Haynes, K. (2001). Virulence in *Candida* species. *Trends in Microbiology*, 9(12), 591–596. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02237-5](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02237-5)
- Jabra-Rizk, M. A., Kong, E. F., Tsui, C., Nguyen, M. H., Clancy, C. J., Fidel, P. L., & Noverr, M. (2016). *Candida albicans* Pathogenesis: Fitting within the Host-Microbe Damage Response Framework. *Infection and Immunity*, 84(10), 2724. <https://doi.org/10.1128/IAI.00469-16>
- Jacobsen, I. D., Wilson, D., Wächtler, B., Brunke, S., Naglik, J. R., & Hube, B. (2014). *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. [Http://Dx.Doi.Org/10.1586/Eri.11.152](http://Dx.Doi.Org/10.1586/Eri.11.152), 10(1), 85–93. <https://doi.org/10.1586/ERI.11.152>
- Klatt, M. E., & Eschenauer, G. A. (2021). Review of Pharmacologic Considerations in the Use of Azole Antifungals in Lung Transplant Recipients. *Journal of Fungi* 2021, Vol. 7, Page 76, 7(2), 76. <https://doi.org/10.3390/JOF7020076>
- Lewis, M. A. O., & Williams, D. W. (2017). Diagnosis and management of oral candidosis. *British Dental Journal*, 223(9), 675–681. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2017.886>

- Liu, D., & Kwasniewska, K. (1981). An Improved Agar Plate Method for Rapid Assessment of Chemical Inhibition to Microbial Populations. *Bull. Environm. Contam. Toxicol*, 27, 289–294.
- Manfredi, M., Polonelli, L., Giovati, L., Alnuaimi, A., & McCullough, M. J. (2019). Oral and Maxillofacial Fungal Infections. *Contemporary Oral Medicine*, 935–981. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72303-7_1
- Marcia Avello, L., & Isabel Cisternas, F. (2010). Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. *Revista Medica de Chile*, 138(10), 1288–1293. <https://doi.org/10.4067/s0034-98872010001100014>
- Mathé, L., & van Dijck, P. (2013). Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. *Current Genetics*, 59(4), 251–264. <https://doi.org/10.1007/s00294-013-0400-3>
- Maureira, N., Viera, P., Fernandez, A., Urrejola, M., Bravo, C., Mardones, F., Vines, E. D., & Haidar, Z. S. (2017). Susceptibilidad de Cepas de *Candida* Oral a Extracto Etanólico del Propóleo Chileno de Olmué. *International Journal of Odontostomatology*, 11(3), 295–303. <https://doi.org/10.4067/s0718-381x2017000300295>
- Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119–128. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>
- Miller, D., Marangon, F., Romano, A., Alfonso, E., & Gonzalez, S. (2002). Evaluation of an Agar Well Diffusion Assay to Validate and Correlate Invitro Efficacy of Topical Antibacterial and Antifungal Preparations with Conventional Susceptibility Techniques. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 43(13), 1608–1608.
- Millsop, J. W., & Fazel, N. (2016). Oral candidiasis. *Clinics in Dermatology*, 34(4), 487–494. <https://doi.org/10.1016/J.CLINDERMATOL.2016.02.022>
- MINSAL. (2009). *Medicamentos Herbarios Tradicionales*. Ministerio de Salud de Chile. <https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2018/02/Libro-MHT-2010.pdf>

- Mølgaard, P., Holler, J. G., Asar, B., Liberna, I., Rosenbæk, L. B., Jebjerg, C. P., Jørgensen, L., Lauritzen, J., Guzman, A., Adersen, A., & Simonsen, H. T. (2011). Antimicrobial evaluation of Huilliche plant medicine used to treat wounds. *Journal of Ethnopharmacology*, 138(1), 219–227. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.09.006>
- Montes, M., & Wikomirsky, T. (1996). *Compendio de Fitoterapia* (1st ed.). Universidad de Concepción.
- Moreno, M. A., Zampini, I. C., & Isla, M. I. (2020). Antifungal, anti-inflammatory and antioxidant activity of bi-herbal mixtures with medicinal plants from Argentinean highlands. *Journal of Ethnopharmacology*, 253(January), 112642. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112642>
- Moreno M, C., del Valle M, G., & Coria D. la H, P. (2010). Estudio de costo del tratamiento de la aspergilosis invasora en pacientes oncológicos pediátricos: Santiago. Chile. *Revista Chilena de Infectología*, 27(4), 302–307. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182010000500002>
- Müller-Sepúlveda, A., Chevecich, C. C., Jara, J. A., Belmar, C., Sandoval, P., Meyer, R. S., Quijada, R., Moura, S., López-Muñoz, R., Díaz-Dosque, M., & Molina-Berrios, A. (2020). Chemical Characterization of *Lavandula dentata* Essential Oil Cultivated in Chile and Its Antibiofilm Effect against *Candida albicans*. *Planta Medica*, 86(16), 1225–1234. <https://doi.org/10.1055/a-1201-3375>
- Muñoz, M., Barrera, E., & Meza, I. (1981). *El uso medicinal y alimenticio de plantas nativas y naturalizadas en Chile* (Vol. 33). Museo Nacional de Historia Natural.
- Nobile, C. J., & Johnson, A. D. (2015). *Candida albicans* Biofilm and Human Disease. *Annu Rev Microbiol*, 69, 71–92. <https://doi.org/10.1146>
- Noble, S. M., Gianetti, B. A., & Witchley, J. N. (2018). *Candida albicans* cell type switches and functional plasticity in the mammalian host. *Nat Rev Microbiol*, 15(2), 96–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.157.Candida>

- Okigbo, R., & Igwe, D. (2007). Antimicrobial effects of Piper Guineense 'Uziza' and Phyllanthus amarus 'Ebe-Benizo' on Candida albicans and Streptococcus faecalis. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 54(4), 353–366. <https://doi.org/10.1556/amicr.54.2007.4.3>
- Pequeno, M. A., Silvestre, M. R., Améndola, I., Silva, C. R. G. e, Leao, M. V. P., & Santos, S. S. F. dos. (2018). Matricaria Recutita Extract (Chamomile) to reduce Candida Albicans and Entrobacter Cloacae biofilms: in vitro study. *RGO - Revista Gaúcha de Odontologia*, 66(2), 122–128. <https://doi.org/10.1590/1981-863720180002000033328>
- Pfaller, M. A., Haturvedi, V., Espinel-Ingroff, A., Ghannoum, M. A., Gosey, L. L., Odds, F. C., Rex, J. H., Rinaldi, M. G., Sheehan, D. J., Walsh, T. J., & Warnock, D. W. (2002). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts ; Approved Standard — Second Edition Serving the World ' s Medical Science Community Through Voluntary Consensus. *Clinical and Laboratory Standars Institute*, 22(15).
- 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>
- Pla, J., Navarro-García, F., Sánchez, M., & Nombela, C. (2001). Virulence genes in the pathogenic yeast Candida albicans. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(2), 245–268. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(00\)00066-8](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(00)00066-8)
- Premoli, A. C. (1996). Leaf architecture of South American Nothofagus (Nothofagaceae) using traditional and new methods in morphometrics. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 121(1), 25–40. <https://doi.org/10.1111/J.1095-8339.1996.TB00743.X>
- Priya, A., & Pandian, S. K. (2020). Piperine Impedes Biofilm Formation and Hyphal Morphogenesis of Candida albicans. *Frontiers in Microbiology*, 11(May), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00756>

- Promis, Á. (2011). *Aspectos de la ecología de la regeneración de Nothofagus betuloides para una propuesta de manejo forestal sustentable en bosques patagónicos* (P. Donoso & Á. Promis, Eds.; Vol. 1).
- Quindós, G., Gil-Alonso, S., Marcos-Arias, C., Sevillano, E., Mateo, E., Jauregizar, N., & Eraso, E. (2019). Therapeutic tools for oral candidiasis: Current and new antifungal drugs. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*, 24(2), e172–e180. <https://doi.org/10.4317/medoral.22978>
- Rodriguez, J., Pacheco, P., Razmilic, I., Loyola, J. I., Schmeda-Hirschmann, G., & Theoduloz, C. (1994). Hypotensive and Diuretic Effect of Equisetum bogotense and Fuchsia magellanica and Micropropagation of E. bogotense. In *PHYTOTHERAPY RESEARCH* (Vol. 8).
- Sanders, E. R. (2012). Aseptic laboratory techniques: Volume transfers with serological pipettes and micropipettors. *Journal of Visualized Experiments*, 63, 1–12. <https://doi.org/10.3791/2754>
- Sanitá, P. V., de Oliveira Mima, E. G., Pavarina, A. C., Jorge, J. H., Machado, A. L., & Vergani, C. E. (2013). Susceptibility profile of a Brazilian yeast stock collection of Candida species isolated from subjects with Candida-associated denture stomatitis with or without diabetes. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 116(5), 562–569. <https://doi.org/10.1016/J.OOOO.2013.07.002>
- Sardi, J. D. C. O., Pitangui, N. D. S., Rodríguez-Arellanes, G., Taylor, M. L., Fusco-Almeida, A. M., & Mendes-Giannini, M. J. S. (2014). Highlights in pathogenic fungal biofilms. In *Revista Iberoamericana de Micología* (Vol. 31, Issue 1, pp. 22–29). <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.09.014>
- Schmeda-Hirschmann, G., Loyola, J. I., Sierra, J., Retamal, R., & Rodriguez, J. (1992). Hypotensive Effect and Enzyme Inhibition Activity of Mapuche Medicinal Plant Extracts. In *PHYTOTHERAPY RESEARCH* (Vol. 6).
- Scully C, & Giovanni L. (n.d.). *Oral Candidosis*. European Association of Oral Medicine. Retrieved September 27, 2021, from <https://eaom.eu/education/eaom-handbook/oral-candidosis/?v=5bc574a47246>

- Seemann, P., Gutiérrez, T., Kramm, R., Awad, G., & Oyanedel, R. (2013). Vegetative propagation of selected Chilean woody ornamental species. *Acta Horticulturae*, 990, 437–442. <https://doi.org/10.17660/ACTAHORTIC.2013.990.56>
- Sheehan, D. J., Brown, S. D., Pfaller, M. A., Warnock, D. W., Rex, FRCPATH. J. H., Chaturvedi, F. V., Espinel-Ingroff, A., Ghannoum, M. A., Moore, L. S., Odds, F. C., Rinaldi, RCPATH. M. G., & Walsh, T. J. (2004). Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline. NCCLS Document MA44-A. In *Clinical and Laboratory Standards Institute* (Vol. 24, Issue 15).
- Silva-Rocha, W. P., de Brito Lemos, V. L., Ferreira, M. R. A., Soares, L. A. L., Svidzinski, T. I. E., Milan, E. P., & Chaves, G. M. (2015). Effect of the crude extract of *Eugenia uniflora* in morphogenesis and secretion of hydrolytic enzymes in *Candida albicans* from the oral cavity of kidney transplant recipients. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S12906-015-0522-X/FIGURES/7>
- Simonsen, H. T., Adsersen, A., Berthelsen, L., Christensen, S. B., Guzmán, A., & Mølgaard, P. (2006). Ethnopharmacological evaluation of radial (leaves of *Lomatia hirsuta*) and isolation of 2-methoxyjuglone. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6, 4–7. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-6-29>
- Singla, R. K., & Dubey, A. K. (2019). Molecules and Metabolites from Natural Products as Inhibitors of Biofilm in *Candida* spp. pathogens. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 19(28), 2567–2578. <https://doi.org/10.2174/1568026619666191025154834>
- Soll, D. R., & Daniels, K. J. (2016). Plasticity of *Candida albicans* Biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 565–595. <https://doi.org/10.1128/mubr.00068-15>
- Sullivan, D. J., Moran, G. P., Pinjon, E., Al-Mosaid, A., Stokes, C., Vaughan, C., & Coleman, D. C. (2004). Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research*, 4(4–5), 369–376. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00240-X](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00240-X)

- Susilo Rudy, Korting Hans C, & Strauss Phillip. (2003). Dermatomycoses of the glabrous skin : a double-blind, randomised, comparative trial of sertaconazole 2% cream once daily versus vehicle. *Clinical Drug Investigation*, 23(6), 387–394. <https://doi.org/10.2165/00044011-200323060-00002>
- Taweechaisupapong, S., Choopan, T., Singhara, S., Chatrchaiwiwatana, S., & Wongkham, S. (2005). In vitro inhibitory effect of *Streblus asper* leaf-extract on adhesion of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 96(1–2), 221–226. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2004.09.010>
- Taylor, Michael; Raja, A. (2020). Oral Candidiasis. *StatPearls*.
- Tobudic, S., Kratzer, C., Lassnigg, A., & Presterl, E. (2012). Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. *Mycoses*, 55(3), 199–204. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2011.02076.x>
- Tsui, C., Kong, E. F., & Jabra-Rizk, M. A. (2016). Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathogens and Disease*, 74(4), ftw018. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw018>
- Tsutsumi-Arai, C., Takakusaki, K., Arai, Y., Terada-Ito, C., Takebe, Y., Imamura, T., Ide, S., Tatehara, S., Tokuyama-Toda, R., Wakabayashi, N., & Satomura, K. (2019). Grapefruit seed extract effectively inhibits the *Candida albicans* biofilms development on polymethyl methacrylate denture-base resin. *PLOS ONE*, 14(5), e0217496. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0217496>
- Valdés, B. S. G. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana de Farmacia*, 39(2), 1–15.
- Valencia, E. (2013). *Validación y actualización del uso de plantas medicinales presentes en la selva valdiviana*.
- Vega, K. (2018). *Actividad antioxidante y antibacteriana determinadas en extractos metanólicos obtenidos desde partes aéreas de *Rhaphithamnus spinosus* (Juss) Moldenke*.

- Vila, T., Sultan, A. S., Montelongo-Jauregui, D., & Jabra-Rizk, M. A. (2020). Oral candidiasis: A disease of opportunity. *Journal of Fungi*, 6(1), 1–28. <https://doi.org/10.3390/jof6010015>
- Villar, C. C., & Dongari-Bagtzoglou, A. (2021). Fungal diseases: Oral dysbiosis in susceptible hosts. *Periodontology 2000*, 87(1), 166–180. <https://doi.org/10.1111/PRD.12378>
- Vivanco, J. M., Cosio, E., Loyola-Vargas, V. M., & Flores, H. E. (2005). Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigación y Ciencia*, 68–75.
- Wächtler, B., Wilson, D., Haedicke, K., Dalle, F., & Hube, B. (2011). From Attachment to Damage: Defined Genes of *Candida albicans* Mediate Adhesion, Invasion and Damage during Interaction with Oral Epithelial Cells. *PLOS ONE*, 6(2), e17046. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0017046>
- Wall, G., Montelongo-Jauregui, D., Vidal Bonifacio, B., Lopez-Ribot, J. L., & Uppuluri, P. (2019). *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, 52, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.04.001>
- Walraven, C. J., Bernardo, S. M., Wiederhold, N. P., & Lee, S. A. (2014). Paradoxical antifungal activity and structural observations in biofilms formed by echinocandin-resistant *Candida albicans* clinical isolates. *Medical Mycology*, 52(2), 131. <https://doi.org/10.1093/MMY/MYT007>
- Williams, D., & Lewis, M. (2011). Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *Journal of Oral Microbiology*, 3(2011). <https://doi.org/10.3402/JOM.V3I0.5771>
- World Health Organization. (2013). *WHO traditional medicine strategy: 2014-2023*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241506096>
- Yang, H. C., Mikami, Y., Yazawa, K., Taguchi, H., Nishimura, K., Miyaji, M., Branchini, M. L. M., Aoki, F. H., & Yamamoto, K. (1998). Colorimetric MTT assessment of antifungal activity of D0870 against fluconazole-resistant

Candida albicans. *Mycoses*, 41(11–12), 477–480.
<https://doi.org/10.1111/J.1439-0507.1998.TB00709.X>

Yang, Y. L. (2003). Virulence factors of *Candida* species. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 36, 223–338.

IX ANEXOS

Anexo 1. Certificado de aprobación Comité Institucional de Bioseguridad



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

Santiago, 15 de Julio de 2020.

C E R T I F I C A D O

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

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

o **Sustancias Químicas Peligrosas:**

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

o **Patógenos:**

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

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

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

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

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

Carla Lozano



Dra. Carla Lozano M.
Presidencia

Anexo 2. Detalle de la recolección de muestras vegetales y solventes empleados para la obtención de los extractos

Especie	Muestra	Estación	Sitio	Solvente
<i>A. lanceolata</i>				Metanol
<i>F. magellanica</i>				Etanol
<i>L. ferruginea</i>	Hojas	Verano 2019	Reserva	Etanol
<i>N. betuloides</i>			Nacional Río	Etanol
<i>N. nitida</i>			Simpson	Etanol
<i>R. spinosus</i>				Etanol