



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS
LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DE BROMURO DE TRIFENILFOSFONIO (10-((3,4,5-
TRIHIDROXIBENZOIL) OXI)-DECIL) (TPP⁺-C10) Y SU EFECTO INHIBIDOR
SOBRE LA RESPIRACIÓN CELULAR DE *Candida Albicans***

Macarena Sofía Delso Páez

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

TUTOR PRINCIPAL

Alfredo Molina Berrios

TUTOR ASOCIADO

José Jara Sandoval

**Adscrito a Proyecto PRIODO 2020/09
Santiago - Chile
2021**



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS
LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DE BROMURO DE TRIFENILFOSFONIO (10-((3,4,5-
TRIHIDROXIBENZOIL) OXI)-DECIL) (TPP⁺-C10) Y SU EFECTO INHIBIDOR
SOBRE LA RESPIRACIÓN CELULAR DE *Candida Albicans***

Macarena Sofía Delso Páez

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

TUTOR PRINCIPAL

Alfredo Molina Berrios

TUTOR ASOCIADO

José Jara Sandoval

**Adscrito a Proyecto PRIODO 2020/09
Santiago - Chile
2021**

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, quienes siempre han sido un pilar fundamental en mi vida y se esfuerzan cada día por darnos lo mejor, anteponiendo nuestras necesidades frente a las suyas y estando siempre presentes con mucho amor. El logro de mis objetivos es el reflejo de toda la confianza depositada en mi y de su apoyo incondicional a lo largo de estos años.

A mis hermanos, quienes siempre han estado ahí, para aconsejarme, reírnos y volver a ser niños cada vez que nos juntamos. La complicidad de nuestra relación y el cariño que nos tenemos es de las mejores cosas que tengo en mi vida.

A mi profesor tutor, Alfredo Molina, gracias por todo lo enseñado, toda la paciencia y la confianza depositada durante estos 5 años, es el ejemplo de la dedicación y vocación que un docente debe tener. Es un orgullo haber tenido un profesor como usted en la universidad.

A mis amigas del colegio, algunas nos conocemos hace casi 20 años, otras se fueron sumando en el camino, sin embargo todas son fundamentales en mi vida. Agradezco tenerlas, vernos crecer juntas y alcanzar nuestros objetivos, los cuales siempre hemos celebrado como propios, así que este lo comparto con ustedes.

A mis amigas y amigos de la universidad, gracias por hacer este paso por la carrera más ameno. Quienes estudian esta profesión, saben que muchas veces conlleva un compromiso psicológico y emocional que es más fácil de sobrellevar cuando se está rodeado de gente que te apoya, ayuda, comprende y te entrega momentos de alegría. Gracias a Gian, Vicky, Rodri, Johanny, Javi, Pauli y a todos los que de alguna u otra forma hicieron de esta una experiencia inolvidable, amistades que espero mantener. Especialmente gracias a Pablo, con quien desde el primer día y hasta el último nos acompañamos y apoyamos en todo, hoy es mi mejor amigo y una de las mejores cosas que me dejó la universidad.

A Martín, quien llegó a acompañarme los últimos años de esta carrera, gracias por volverte un compañero incondicional, por apoyarnos mutuamente en cada paso, por ayudarme en todo lo que fuera posible y por entregarme este amor tan lindo en el que espero que crezcamos juntos. Ansío pronto verte a ti en esta parte del camino, estoy orgullosa de en quien te estás convirtiendo.

A todos ellos y a aquellas personas que me gustaría seguir agradeciendo, infinitas gracias de todo corazón.

INDICE

I. RESUMEN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	2
A. Generalidades de <i>Candida</i>	2
B. Estructura y patogenicidad de <i>Candida albicans</i>	4
C. Agentes antifúngicos conocidos y su mecanismo de acción.....	7
D. Mitocondria de <i>C. albicans</i> como potencial blanco farmacológico.....	10
E. Derivados del ácido gálico y su potencial antifúngico	12
III. HIPÓTESIS	16
IV. OBJETIVO GENERAL.....	16
V. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	16
VI. METODOLOGÍA: EXPERIMENTAL IN VITRO.....	17
A. Cepas y condiciones de cultivo.....	17
B. Fármacos.....	17
C. Ensayo de susceptibilidad.....	17
1. Ensayo en cultivos planctónicos.....	18
2. Ensayo en biopelículas.....	18
D. Oxigrafía:	19
E. Expresión de resultados y análisis estadístico.....	20
VII. RESULTADOS.....	21
A. Efecto antifúngico del TPP ⁺ -C10 sobre las cepas <i>C. albicans</i> ATCC-90029 y ATCC-10231 en su forma planctónica.	21
B. Efecto antibiopelícula del TPP ⁺ -C10 sobre las cepas ATCC-90029 y ATCC-10231.....	22
C. Efecto de TPP ⁺ -C10 sobre la respiración celular en las cepas ATCC-90029 y ATCC-10231	23
VIII. DISCUSIÓN.....	26
IX. CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES	34
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

I. RESUMEN

Introducción: La candidiasis oral es una infección frecuente en la cavidad oral y se asocia a altas tasas de recurrencia, debido a aparición de resistencia y pocas alternativas terapéuticas. Buscando nuevas estrategias farmacológicas, la mitocondria aparece como un atractivo blanco farmacológico, al poseer un potencial de membrana más negativo que las células humanas, por lo que moléculas cargadas positivamente podrían dirigirse selectivamente hacia este organelo. El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto antifúngico y antibiopelícula del compuesto TPP⁺-C10 como trifenilfosfonio derivado del ácido gálico (AG) y su efecto sobre la respiración celular en *Candida albicans*.

Metodología: Se realizaron ensayos de susceptibilidad y de reducción de MTT en dos cepas de *C. albicans*, ATCC-90029 y ATCC-10231, para evaluar el efecto antifúngico de TPP⁺-C10 en la forma planctónica y biopelícula. Además, se determinó el consumo de oxígeno de *C. albicans* en presencia y ausencia del fármaco en un oxígrafo acoplado a un electrodo de Clark.

Resultados: Con respecto al efecto antifúngico de TPP⁺-C10 sobre las cepas ATCC-90029 y ATCC-10231 en su forma planctónica, el IC₅₀ fue 13 µM y 6,5 µM respectivamente. En cuanto al efecto antibiopelícula, el IC₅₀ fue 22,8 µM para la cepa ATCC-90029 y 50,8 µM para ATCC-10231. Por otro lado, el ensayo sobre la respiración celular, mostró que en la cepa ATCC-90029 se obtuvo una reducción significativa del consumo de oxígeno en presencia de las concentraciones ½IC₅₀ y 2xIC₅₀. Por otro lado, la cepa ATCC-10231, tuvo una disminución significativa del consumo de oxígeno en todas las concentraciones probadas.

Conclusión: TPP⁺-C10 inhibió el crecimiento de *C. albicans* en su forma planctónica y como biopelícula, con valores de IC₅₀ menores a los reportados en la literatura para AG y comparables con antifúngicos tradicionales. Este efecto estaría relacionado a su capacidad de inhibir la respiración celular fúngica.

II. MARCO TEÓRICO

A. Generalidades de *Candida*

Las infecciones asociadas a las especies del género *Candida*, patógenos oportunistas, son una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo y, por lo tanto, representan una grave amenaza para la salud pública. Estos patógenos pueden causar vaginitis, candidiasis oral, candidiasis cutánea, candidemia e infecciones sistémicas. Dentro de ellos, *Candida albicans* es la especie patógena aislada con mayor frecuencia (De Oliveira Santos y cols., 2018).

Las levaduras del género *Candida* pueden ser parte de la microbiota oral humana de hasta el 75% de las personas sin enfermedades subyacentes conocidas. Se puede observar una mayor colonización en los pacientes que han recibido antibióticos, corticoides o quimioterapia, o en pacientes que padecen diabetes, pacientes hospitalizados y personas afectadas por el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Quindós y cols., 2019). En algunos individuos, la alteración del equilibrio entre *Candida* y el hospedero debido a cambios no deseados en la microbiota oral (disbiosis) o al daño de las barreras anatómicas y fisicoquímicas facilita la presencia de candidiasis oral (Quindós y cols., 2019).

La candidiasis oral es una de las infecciones bucales oportunistas más comunes causada por *C. albicans* y otras especies incluidas en el género *Candida*. Es una manifestación de la adherencia de estas levaduras en su forma filamentosa (hifas) al tejido de la mucosa oral seguida de una invasión hifal que causa un daño extenso, en parte mediado por enzimas proteolíticas secretadas (Tsui y cols., 2016). Aunque se han descrito más de 150 especies de *Candida*, el 95% de la candidiasis oral es causada por *C. albicans* (Quindós y cols., 2019).

La candidiasis oral se puede clasificar en lesiones agudas, crónicas y otro tipo de lesiones. En la candidiasis aguda predomina la candidiasis pseudomembranosa y la eritematosa, que pueden volverse crónicas. Por otro lado, tenemos la candidiasis hiperplásica la cual es otra presentación de candidiasis crónica (Tabla 1) (García y cols., 2014).

Tabla 1. Clasificación clínica de Candidiasis oral.

Aguda	Crónica	Otras lesiones
Pseudomembranosa	Pseudomembranosa	Queilitis angular
Eritematosa	Eritematosa	Estomatitis protésica
	Hiperplasia	Glositis romboide mediana

Current treatment of oral candidiasis: A literature review (García y cols., 2014).

La candidiasis oral pseudomembranosa ocurre entre el 1% y el 30% de los lactantes y niños e incluso su prevalencia es mayor en pacientes con cáncer (7-60%) o que padecen SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida) (más del 90%) (Quindós y cols., 2019).

El diagnóstico de candidiasis oral es esencialmente clínico y se basa en el reconocimiento de las lesiones por parte del profesional, lo que puede confirmarse mediante la identificación microscópica de *Candida* (García y cols., 2014). Una característica diagnóstica de esta infección es que estas placas que consisten en células epiteliales e inmunes descamadas junto con levaduras e hifas, se pueden eliminar raspando suavemente, dejando una superficie mucosa eritematosa subyacente (Tsui y cols., 2016).

Entre los tipos de candidiasis oral, la manifestación clínica más frecuente es la estomatitis protésica, que corresponde a un proceso inflamatorio que afecta la mucosa de soporte protésico de diversa extensión y severidad. La prevalencia varía entre el 6,5% y el 75% de acuerdo a la población en estudio (Lee y cols., 2015). En Chile la información sobre la prevalencia de estomatitis es escasa; sin embargo, un estudio en adultos mayores realizado por Lee y colaboradores el año 2015 (región metropolitana), evidenció que esta lesión afecta al 55,9% de los sujetos portadores de prótesis removible no funcionales, coincidiendo con la alta prevalencia descrita en otros países (Lee y cols., 2015).

El uso de prótesis removibles altera las condiciones orales, causando queratinización y lesiones microtraumáticas en la mucosa de las zonas edéntulas, cuya etiología puede ser infecciosa, mecánica y/o alérgica. Otros factores tales como la higiene deficiente, las irregularidades superficiales, los desajustes y la presión negativa en la zona de contacto prótesis-mucosa favorecen la formación de biopelículas y afectan la acción de los microorganismos en la mucosa (Lee y cols., 2015). Aproximadamente el 65% de los usuarios de prótesis totales están predispuestos a la infección por *Candida*. Las posibles explicaciones incluyen una mayor adherencia de *Candida* a los dispositivos acrílicos mal ajustados, disminución del flujo de saliva debajo de las superficies de la dentadura y/o higiene inadecuada (Patil y cols., 2015).

El principal factor etiológico de estomatitis subprotésica es la presencia de levaduras del género *Candida*, que comienza a colonizar como comensal, pero que al producirse un desequilibrio hospedero-patógeno se transforman en oportunistas. Entre las levaduras del género *Candida*, *C. albicans* es la especie más frecuente, comprendiendo hasta el 70% de los aislados en cavidad oral (Lee y cols., 2015).

B. Estructura y patogenicidad de *Candida albicans*

La patogenicidad se define como la capacidad de un patógeno de causar enfermedad. Por otro lado, la capacidad relativa de un microorganismo para causar enfermedades se denomina virulencia, y está determinada por muchos factores. *C. albicans* es un microorganismo versátil en su virulencia, a lo cual contribuyen factores tales como su capacidad de sobrevivir como comensal en varios sitios anatómicos, cada uno con su propio estrés ambiental (Lim y cols., 2012)

Se han atribuido varios factores de virulencia de *C. albicans* al éxito de este patógeno fúngico oportunista, incluida la adherencia a las células hospedero, la cual es vital para iniciar y mantener una relación comensal, así como para establecer una infección a través de la colonización de sus nichos (Lim y cols., 2012). Por otro lado, en cuanto a la secreción de enzimas degradantes, proteinasas y fosfolipasas se han asociado con la invasión, sin embargo, solo se ha demostrado que la

fosfolipasa B1 es necesaria para la virulencia, la cual fue detectada en las hifas durante la invasión de tejidos (Ghannoum, 2000). Con respecto al cambio de morfología, la capacidad de *C. albicans* para cambiar entre las formas de levadura y filamentosa se considera crucial para la virulencia, se cree que la forma de levadura es útil para diseminar el hongo en el torrente sanguíneo, mientras que las formas filamentosas tienen la capacidad de penetrar las barreras del hospedero. Por otra parte, Lim y colaboradores, también describen la formación de biopelículas como parte de la virulencia de *C. albicans* (Lim y cols., 2012), las cuales, con su arquitectura elaborada, logran tener una mayor tolerancia tanto a los medicamentos antimicóticos como a la respuesta inmune del hospedero (Ramage y cols., 2005). La capacidad de este hongo para experimentar el cambio de morfología de la forma de levadura a la forma de hifas es crítica para la formación exitosa de biopelículas (Ramage y cols., 2001). Finalmente, el *quorum sensing*, es la señalización célula a célula, la cual utiliza moléculas de señal extracelular para mediar las interacciones entre su productor y el entorno químico y físico circundante, así como con otros microorganismos. La señalización celular es un fenómeno regulador básico del comportamiento de la población de *C. albicans* (Lim y cols., 2012)

La combinación de factores del hospedero, como un sistema inmune débil, con el conjunto de factores de virulencia de *C. albicans* que ayudan a invadir al hospedero y evadir los efectores inmunes, probablemente resultaría en un proceso de infección exitoso. Sin embargo, el mecanismo exacto de acción de cada factor de virulencia y la secuencia de eventos que culminan en una invasión exitosa del hospedero permanecen como hipótesis (Lim y cols., 2012).

C. albicans posee una pared celular ubicada por sobre la membrana plasmática, la cual es el compartimento celular que media todas las interacciones de la célula con el medio ambiente. Es una estructura que presenta gran plasticidad y es esencial para mantener la integridad y la viabilidad celular. La pared celular juega un papel importante en diferentes funciones biológicas, como el control de la permeabilidad celular y la protección de la célula del estrés osmótico y mecánico (García y cols., 2020). Además de estas funciones, la pared celular media interacciones con el entorno externo a través de adhesinas y una gran cantidad de receptores que,

después de su activación, desencadenarán una compleja cascada de señales dentro de la célula. Por otro lado, la membrana plasmática corresponde a una doble capa lipídica y la de *C. albicans* es de particular interés porque actúa como una barrera selectiva de permeabilidad que es esencialmente impermeable a la mayoría de las sustancias hidrofílicas (García y cols.,2020).

Algunos componentes de la pared celular fúngica, tales como mananos, glucanos y quitinas; y algunas de las enzimas de las vías biosintéticas de ergosterol que son exclusivas de las células fúngicas son blancos farmacológicos comunes. Entre las enzimas de la vía biosintética del ergosterol, el escualeno, la epoxidasa (ERG1), ERG11, ERG 24 y ERG 2 son los blancos de la mayoría de los agentes antifúngicos (Prasad y cols., 2016).

C. albicans es un hongo dimorfo, es decir tiene la capacidad de pasar de una morfología levaduriforme a filamentosa (hifas y pseudo hifas). Esta habilidad de morfogénesis es clave en su patogénesis, ya que facilita la formación de biopelículas. De hecho, la mayoría de las enfermedades causadas por este patógeno están asociadas con la formación de biopelículas tanto en superficies bióticas como abióticas (Tsui y cols., 2016). Las biopelículas son comunidades tridimensionales de poblaciones microbianas incrustadas en una matriz de polisacáridos extracelulares, que proporcionan un armazón estructural y protección para las células de la biopelícula. Por lo tanto, en una biopelícula, los microorganismos tienen un ambiente estable y pueden tolerar concentraciones extremadamente altas de antimicrobianos (Finkel y Mitchell, 2011). Se requieren altas concentraciones de fármaco para reducir su formación. Por ejemplo, para alcanzar el efecto antibiopelícula, se necesitan concentraciones de 5 a 8 veces más altas que la concentración inhibitoria mínima para las células planctónicas (Teodoro y cols., 2017).

El tratamiento de la candidiasis oral se basa en cuatro fundamentos: hacer un diagnóstico temprano y preciso de la infección, corrección de los factores predisponentes o enfermedades subyacentes, evaluar el tipo de infección por

Candida y el uso apropiado de medicamentos antimicóticos, evaluando la relación eficacia/toxicidad en cada caso (García y cols., 2014).

C. Agentes antifúngicos conocidos y su mecanismo de acción

Entre los agentes antifúngicos disponibles, los **azoles** son los fármacos preferidos y más utilizados para el tratamiento de las infecciones por *Candida* (De Oliveira Santos y cols., 2018). Los azoles inhiben la biosíntesis de ergosterol al interferir con la enzima lanosterol 14- α -desmetilasa, involucrada en la transformación de lanosterol en ergosterol, componente que forma parte de la estructura de la membrana plasmática del hongo. A medida que se reduce la concentración de ergosterol, se altera la estructura de la membrana celular, inhibiendo así el crecimiento de hongos (De Oliveira Santos y cols., 2018).

Dependiendo del tipo de infección, el sitio anatómico en el que ocurre y el perfil de sensibilidad de las especies, también se pueden usar otros antifúngicos. Entre estos, hay polienos, análogos de nucleósidos, alilaminas y equinocandinas (De Oliveira Santos y cols., 2018). Los **polienos**, como la anfotericina B y nistatina, actúan uniéndose fuertemente al ergosterol, el principal esteroide en las membranas fúngicas. Los agregados de los complejos de anfotericina B-ergosterol forman los poros de la membrana, lo que conduce a la fuga de componentes intracelulares (Ostrosky-Zeichner y cols., 2010). Por otro lado, las **alilaminas** inhiben el gen ERG1 de la biosíntesis de ergosterol y los **análogos de nucleósidos** se incorporan al ADN y al ARN durante la síntesis de biomoléculas, donde inhibe el funcionamiento celular bloqueando la síntesis de proteínas o inhibiendo la replicación del ADN (Prasad y cols., 2016). Finalmente, las **equinocandinas**, como la caspofungina, inhiben la síntesis de (1,3)- β -d-glucano, componente clave de muchas paredes celulares fúngicas (Figura 1).

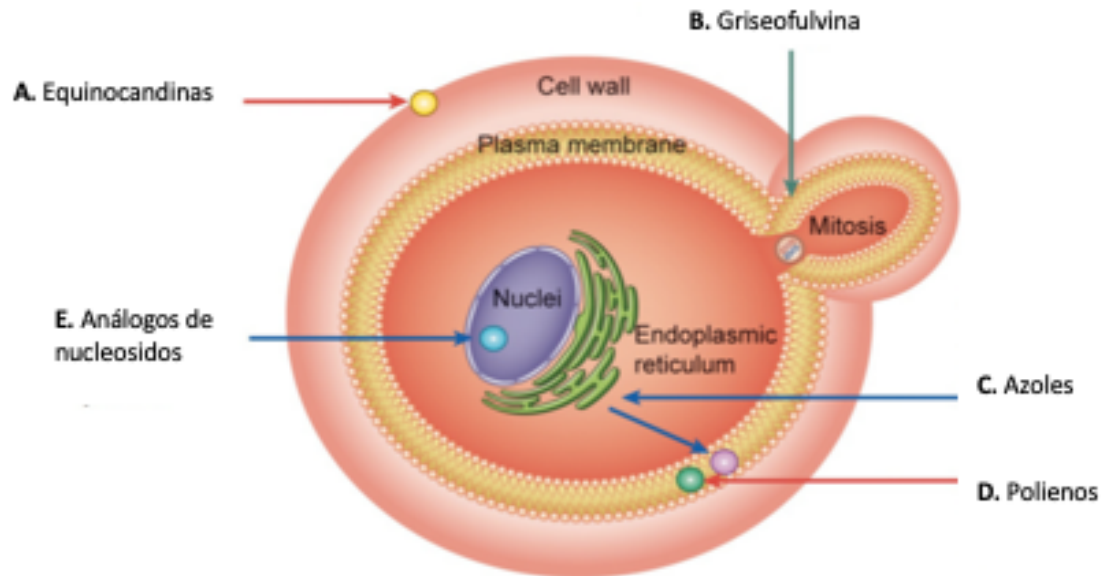


Figura 1. Mecanismos de acción de los agentes antifúngicos tradicionales sobre dianas celulares. (A) Las equinocandinas inhiben la síntesis de glucano, presente en la membrana celular. (B) La Griseofulvina interrumpe la producción de microtúbulos citoplásmicos y del huso, inhibiendo así la mitosis. (C) Los azoles inhiben la síntesis de ergosterol en el retículo endoplásmico. (D) Los polienos actúan uniéndose al ergosterol promoviendo la extravasación de componentes intracelulares. (E) La flucitosina inhibe la enzima timidilato-sintetasa que interfiere con el ADN. Modificado a partir de *Candida Infections and Therapeutic Strategies: Mechanisms of Action for Traditional and Alternative Agents* (De Oliveira Santos y cols., 2018).

En una revisión realizada por Ostrosky-Zeichner, se expone que desde el año 1954 hasta el 2000 hubo formulación de solo 17 fármacos antifúngicos, siendo algunos de estas reformulaciones de los previamente fabricados (Ostrosky-Zeichner y cols., 2010) (Figura 2). De hecho, en una actualización del año 2017 este autor indica que solo un antifúngico ha logrado la aprobación en la última década (Isavuconazol) (Gonzalez y cols., 2017). Los primeros fármacos se caracterizaron por poseer eficacia limitada debido a la toxicidad, como la nistatina y la anfotericina B. El nuevo milenio trajo las equinocandinas al mercado, que son la clase más nueva de antifúngicos y son la primera clase de agentes antifúngicos que actúan de manera selectiva contra un componente específico de hongos sin afectar a células de mamíferos (Ostrosky-Zeichner y cols., 2010).

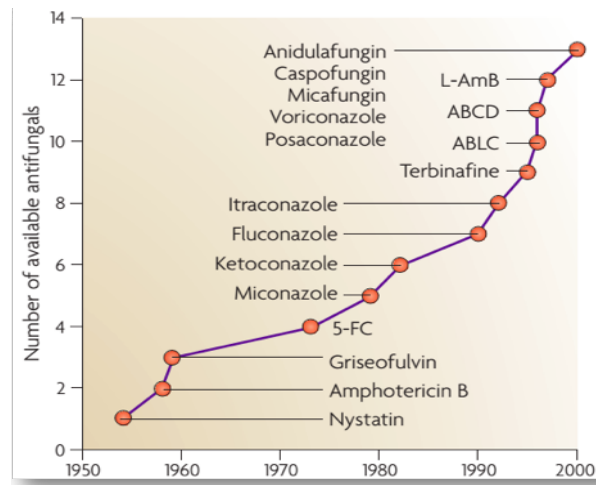


Figura 2. Cronología de antifúngicos sistémicos. El gráfico muestra agentes antimicóticos sistémicos disponibles desde la década de 1950 hasta la de 2000 (Tomado de Ostrosky-Zeichner y cols., 2010).

Desde el punto de vista sistémico, se ha demostrado que los fármacos antifúngicos de la familia de polieno y los imidazoles, entre otros, inhiben el crecimiento de *C. albicans*, con remisión de signos y síntomas clínicos después de 12 a 14 días. Sin embargo, producen varios efectos adversos (Lee y cols., 2019). Además, un aumento en la resistencia a los antimicóticos tradicionales ha resultado en la necesidad de controlar las infecciones por *Candida* a través del diagnóstico temprano y la prevención de la candidiasis (De Oliveira Santos y cols., 2018).

Dentro de los mecanismos de resistencia se ha descrito que en las levaduras se producen mutaciones que modifican los blancos farmacológicos o, más comúnmente, se aumenta el flujo de salida de los medicamentos entrantes. Los mecanismos comúnmente observados de resistencia a antifúngicos, particularmente contra azoles, polienos y equinocandinas, incluyen cambios en las propiedades de la membrana que afectan la importación normal de medicamentos; sobreexpresión de proteínas de eflujo que conducen a una salida rápida de fármacos; una alteración del objetivo farmacológico que conduce a una unión deficiente de fármacos a su objetivo y sobreproducción de genes que sintetizan las proteínas diana del fármaco (Prasad y cols., 2016).

D. Mitocondria de *C. albicans* como potencial blanco farmacológico

Los antifúngicos actuales, aunque eficaces, se dirigen a un número limitado de procesos celulares, y el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos es esencial. El diseño de nuevos medicamentos a partir de los tradicionales utilizados en la clínica y la identificación de nuevas moléculas con potencial antifúngico para la fabricación de nuevos medicamentos, más efectivos y menos tóxicos, son fundamentales para enfrentar el desafío (De Oliveira Santos y cols., 2018). La progresión de los agentes terapéuticos con mecanismos de acción específicos de hongos es de máxima prioridad (Ostrosky-Zeichner y cols., 2010).

Se ha demostrado que *C. albicans* requiere la función mitocondrial para su crecimiento normal, morfogénesis y virulencia, pero las mitocondrias no se habían explotado como objetivo terapéutico hasta la fecha (Duvenage y cols., 2019).

Dado el papel central de este organelo en los procesos esenciales para el crecimiento, el mantenimiento y la adaptabilidad, junto con la presencia de características específicas de los hongos, es posible desarrollar terapias basadas en la inhibición mitocondrial (Duvenage y cols., 2019).

En los hongos, el ATP se produce principalmente a través de la fosforilación oxidativa mitocondrial. Este mecanismo se logra mediante la cadena respiratoria de transporte de electrones y el complejo ATP sintasa, ambos localizados en la membrana interna mitocondrial (Ludovico y cols., 2001). La cadena respiratoria mitocondrial está compuesta por cinco grandes complejos enzimáticos (complejo I a V). El NADH y ubiquinona donan electrones al conjunto de ubiquinona a través del complejo I y el complejo II, respectivamente. El complejo III canaliza los electrones del conjunto de ubiquinona al citocromo c, y luego el complejo IV finalmente transfiere los electrones al oxígeno (Murante y Hogan, 2019). La energía liberada por la transferencia de electrones se utiliza para bombear H⁺. Para producir ATP, el complejo de ATP sintasa media el flujo de H⁺ de regreso a la matriz y la energía se conserva en la fosforilación de ADP a ATP (Ludovico y cols., 2001) (Figura 3)

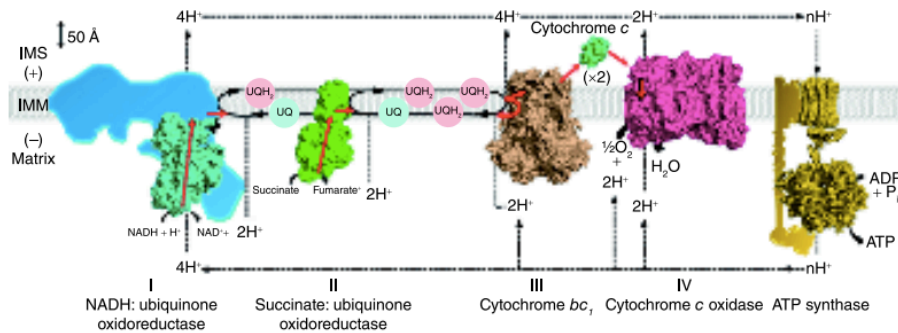


Figura 3. Cadena transportadora de electrones y síntesis de ATP. Las flechas rojas representan la transferencia de los dos electrones producida por la oxidación de NADH o succinato por el complejo I o II respectivamente. Estos electrones se transfieren al complejo III a través del conjunto de UQ y luego al complejo IV a través del citocromo c soluble. El número de protones, n , necesarios para formar ATP depende del número de subunidades c en el segmento de membrana de ATP sintasa. Las mitocondrias de levadura tienen diez subunidades c . Por tanto, el paso de diez protones provocará la formación de tres ATP. *The mitochondrial respiratory chain* (Brown y cols. 2010)

La función de la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias afecta múltiples aspectos de la patogénesis, particularmente el crecimiento, la susceptibilidad antifúngica, la respuesta inmune del hospedero y la transición de levadura a hifa (Murante y Hogan, 2019). Por ejemplo, la inhibición de la respiración en *C. albicans* y otros hongos patógenos conduce a una disminución de la tasa de crecimiento (Duvenage y cols., 2019). De hecho, Duvenage y colaboradores mencionan que la inhibición de la cadena de transporte de electrones puede inhibir la respiración hasta en un 90% y restringir severamente el crecimiento (Duvenage y cols., 2019). Como resultado, la mitocondria en *Candida* es un potencial blanco farmacológico para la terapia, y la identificación de objetivos mitocondriales es de gran importancia (Murante y Hogan, 2019).

El potencial de la membrana plasmática ($\Delta\psi$) regula el potencial electroquímico entre los lados externo e interno de las membranas celulares. *C. albicans*, regula el potencial de membrana en respuesta a las condiciones ambientales, así como el estado fisiológico de la célula (Suchodolski y Krasowska, 2019). El valor de potencial de membrana de *C. albicans* $\Delta\psi$ es ~ -120 mV es comparable al de bacterias, que oscila entre ~ -130 mV y ~ -150 mV. Por otra parte, el valor de potencial de las células de mamíferos es de ~ -90 mV (Suchodolski y Krasowska, 2019), siendo el

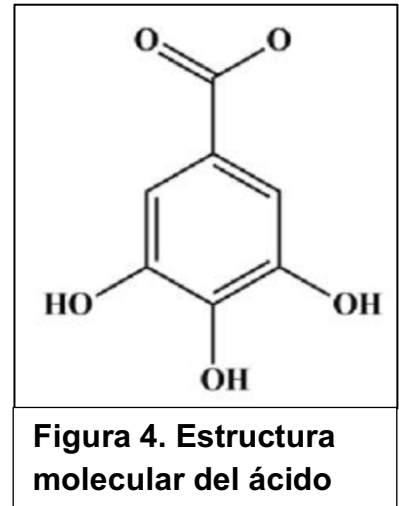
potencial de membrana de *C. albicans* más negativo. A su vez, se ha descrito que las mitocondrias son los únicos organelos que tienen una diferencia de potencial de membrana significativo, con una carga negativa en su interior (Ludovico y cols., 2001). Por lo tanto, compuestos lipofílicos con carga positiva deslocalizada podrían acumularse en las mitocondrias en un grado mucho mayor que en otros organelos. De hecho, se ha descrito en levaduras que estos compuestos pueden ingresar libremente a la célula por difusión simple y aunque el potencial de membrana plasmática contribuye a una cierta acumulación en el citoplasma, la concentración allí sería mucho menor que la de las mitocondrias (Ludovico y cols., 2001). La ecuación de Nernst predice una $\Delta\Psi_p$ de -60 mV y una $\Delta\Psi_p$ de -180 mV con relaciones de acumulación de 10 y 1000 en el citoplasma y las mitocondrias, respectivamente (Ludovico y cols., 2001).

Según lo descrito anteriormente respecto a que el potencial de membrana mitocondrial de *C. albicans* es más negativo que el de células humanas, se podría proponer como un blanco farmacológico más específico. Para atacar este blanco es necesario que moléculas cargadas positivamente se dirijan de manera selectiva a la mitocondria de *C. albicans* en lugar de las células humanas. En este contexto, un enfoque similar se ha ocupado en la terapia de cáncer, donde estudios han demostrado que moléculas derivada del ácido gálico logran inhibir de forma selectiva la mitocondria de células neoplásicas, demostrando ser TPP⁺-C10 el compuesto más efectivo (Sandoval y cols., 2016).

E. Derivados del ácido gálico y su potencial antifúngico

El ácido gálico (Figura 4), un polifenol, es el principal compuesto bioactivo que se encuentra en la corteza de la granada, así como en otras especies de plantas medicinales como *Quercus*. Se puede encontrar tanto en su forma libre como formando parte de taninos. A sus sales y esteres derivados se les denomina galatos (Li y cols., 2017).

Tanto en la industria farmacológica como en la industria alimentaria se ha utilizado el ácido gálico y sus derivados debido a sus propiedades antioxidantes y baja toxicidad. Estos, afectan la actividad de una variedad de virus animales, producen efectos antimicrobianos en bacterias Gram positivo, específicamente inhibiendo la cadena respiratoria de la membrana plasmática y sensibilizando a las cepas resistentes a antibióticos (Jara y cols., 2014). Además, en hongos del género *Penicillium* los galatos inhiben el



sistema de fosforilación oxidativa mitocondrial, lo que aumenta la efectividad de los fungicidas indicando que los alquil-galatos tienen como objetivo la respiración celular y/o su sistema de antioxidación (Jara y cols., 2014).

Distintos estudios han demostrado que la actividad antifúngica de los galatos está relacionada con la longitud de la cadena alquilo, aumentando al agregar moléculas de carbono, alcanzado un máximo en un cierto número de carbonos (Hsu y cols., 2009). La longitud específica de la cadena alquílica de estos fármacos para alcanzar la actividad máxima varía entre los microorganismos en los cuales se han ensayado, se postula que está correlacionado con sus diferentes estructuras de envoltura celular. Se describe que la actividad antifúngica máxima de los alcoholes secundarios probados y el aldehído alifático se obtiene con largos de cadena de carbono de 12 y 9 –12, respectivamente (Hsu y cols., 2009).

Los galatos de metilo (C1) y hexilo a dodecilo (C6-12) se han investigado previamente para determinar su actividad antifúngica contra el hongo *Saccharomyces cerevisiae* de importancia industrial. Se informó que la actividad máxima se encontró para el galato de decilo (concentración mínima inhibitoria MIC = 12,5 µg / mL), y que cuando la cadena alquílica era más larga (undecilo o dodecilo) los compuestos éster estaban inactivos. Los galatos de nonilo, octilo, heptilo y hexilo mostraron menor actividad fungistática, sin embargo, la actividad puede variar con los hongos probados, principalmente entre grupos de hongos (levaduras, hialohyphomycetes o dermatofitos) (Leal y cols., 2009).

El ácido gálico, un compuesto bioactivo natural, mostró una actividad antifúngica prometedora en *C. albicans* en su estado planctónico en un estudio anterior de Teodoro y colaboradores (2017). Sin embargo, este compuesto presenta una solubilidad limitada, lo que podría comprometer el tratamiento de las biopelículas de *C. albicans* (Teodoro y cols., 2017).

En el caso de la terapia anticáncer, se han propuesto moléculas que inducen apoptosis al desestabilizar las mitocondrias en las células cancerosas. Estas moléculas derivadas del ácido gálico, compuesto antioxidante, son compuestos hidrofílicos cuya absorción por las células puede presentar una limitación. Para aumentar su eficiencia se decidió aumentar la lipofilia de los compuestos uniéndolos a un grupo catiónico trifenilfosfonio (TPP⁺). De esta forma, se logró dirigirlos directamente a las mitocondrias, dotando a estas moléculas de una actividad antioxidante mitocondrial mejorada en comparación con sus compuestos originales (Sandoval y cols., 2016). Este grupo TPP⁺ se unió a la cadena alifática de varios alquil-galatos. Además, se demostró que los conjugados de TPP⁺ son considerablemente menos tóxicos para las células normales (Sandoval y cols., 2016). Dos características de los cationes lipofílicos que los hacen efectivos para entregar antioxidantes a las mitocondrias son que, pueden pasar directamente a través de bicapas de fosfolípidos sin requerir un mecanismo de absorción específico y se acumulan sustancialmente dentro de las mitocondrias debido al gran potencial de membrana (Murphy y Smith, 2007).

Finalmente, considerando que:

1. Existe una escasez de fármacos dirigidos a nuevos blancos farmacológicos contra *C. albicans*.
2. La mitocondria de *C. albicans* es un potencial blanco farmacológico debido a su potencial de membrana significativamente negativo.
3. Derivados de ácido gálico han demostrado inhibir el sistema de fosforilación oxidativa mitocondrial.
4. Un grupo catiónico trifenilfosfonio (TPP⁺) permitiría aumentar la lipofilicidad de los derivados del ácido gálico y así su selectividad hacia *C. albicans* en comparación a células humanas.

En este trabajo proponemos que una molécula derivada del ácido gálico, unido a una cadena alquílica de 10 carbonos y a un grupo catiónico trifenilfosfonio (TPP⁺-C10) (Figura 5) presentará un efecto antifúngico sobre *C. albicans*, a través de la inhibición de la función mitocondrial. Esta molécula se puede considerar anfifílica considerando que el grupo farmacóforo derivado del ácido gálico es hidrofílico y le otorga la capacidad de inhibir la cadena respiratoria; y, por otro lado, la cadena alquílica y el grupo TPP⁺ le otorgan hidrofobicidad y la capacidad de atravesar membranas lipídicas dirigiéndolos de manera selectiva hacia *C. albicans*.

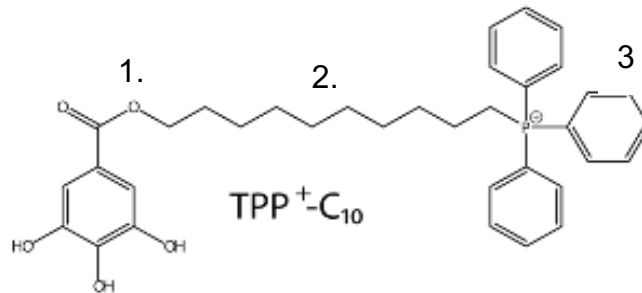


Figura 5. Estructura del compuesto TPP⁺-C10. 1) Grupo farmacóforo derivado del ácido gálico. 2) Cadena alquílica de 10 carbonos. 3) Grupo catiónico trifenilfosfonio TPP⁺.

III. HIPÓTESIS

El compuesto bromuro de trifenilfosfonio (10-((3,4,5-trihidroxibenzoil)oxi)-decil) (TPP⁺-C10), derivado del ácido gálico unido a un grupo trifenilfosfonio, presentará un efecto antifúngico sobre *Candida albicans*, en su forma pláctonica y formando parte de una biopelícula, a través de la inhibición de la respiración celular.

IV. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antifúngico y antibiopelícula del compuesto TPP⁺-C10 como trifenilfosfonio derivado del ácido gálico y su efecto sobre la respiración celular en *Candida albicans*.

V. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- a. Determinar el efecto antifúngico de TPP⁺-C10 sobre *Candida albicans* en su forma planctónica y como parte de una biopelícula.
- b. Determinar el efecto de TPP⁺-C10 sobre el consumo de oxígeno de *Candida albicans*.

VI. METODOLOGÍA: EXPERIMENTAL IN VITRO

A. Cepas y condiciones de cultivo.

Se utilizaron las cepas de referencia de *C. albicans* ATCC-90029 y ATCC-10231, las cuales se comportan como susceptibles y resistentes a fluconazol, respectivamente. Los cultivos stock de estas cepas fueron mantenidos en placas de agar Sabourad cloranfenicol (Biokar). Los ensayos fueron realizados en medio líquido RPMI-1640 (Sigma) para los ensayos en estado planctónico. Para los ensayos en biopelículas, las células fueron incubadas en RPMI-1640 en presencia de suero fetal bovino (SFB, 10). Luego de este periodo se descartaron las UFC (unidades formadoras de colonias) no adheridas y se realizaron los ensayos con la biopelícula formada en el fondo del pocillo.

B. Fármacos.

El compuesto bromuro de trifenilfosfonio (10-((3,4,5-trihidroxibenzoil) oxi)-decil), en adelante TPP⁺-C10, fue donado por el Dr. José Jara, del instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas de la Universidad de Chile. Las concentraciones stock fueron preparadas en DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma) y se ensayaron distintas concentraciones cuidando de no exponer las levaduras a una concentración de DMSO mayor al 1%.

C. Ensayo de susceptibilidad.

Se realizó con el objetivo de determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) del compuesto a través del método de microdilución en medio líquido, tanto para la forma planctónica como para biopelícula. Se realizó según la técnica descrita en el Método de dilución en caldo para la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias de antifúngicos para levaduras (EUCAST, documento 7.2).

1. Ensayo en cultivos planctónicos

Se utilizaron dos cepas de *C. albicans*, ATCC-90029 y ATCC-10231 cultivadas en medio líquido. En una placa de 96 pocillos, se sembraron 100 µL de una suspensión estandarizada de *C. albicans* (2×10^5 UFC/ml.). Se agregó el fármaco en distintas concentraciones (16 mg/L, 12 mg/L, 8 mg/L, 4 mg/L y 2mg/L, 1mg/L y 0,5 mg/L), dejando pocillos sin fármaco, los cuales fueron considerados como controles negativos, y se completaron con RPMI hasta un volumen final de 200 µL en cada pocillo. Se incubó por 24 horas a 37 °C.

Posteriormente las placas se leyeron midiendo la densidad óptica a 540 nm en un lector de microplacas (Infinite 50 TECAN) con agitación leve por 10 segundos. A partir de las lecturas resultantes y después de restar los valores correspondientes a los blancos, se calculó la concentración inhibitoria mínima (CIM) construyendo curvas dosis respuesta con el software Graphpad Prism 6.0. La CIM corresponde a la concentración capaz de inhibir en un 50% el crecimiento de las levaduras (IC_{50}).

2. Ensayo en biopelículas

La evaluación del efecto antibiopelícula se realizó mediante el ensayo de reducción de MTT. Este ensayo se basa en la reducción enzimática de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) a un compuesto de color azul (cristales de formazán) por las células viables, siendo estos cristales proporcionales a la cantidad de células vivas.

Para este ensayo se utilizaron las cepas *C. albicans* ATCC-90029 y ATCC-10231 cultivadas en biopelículas. Se sembraron 100 µL de una suspensión estandarizada (1×10^6 UFC/ml) en placas de cultivo de 96 pocillos y se dejaron incubando por 24 horas a 37°C para formar las biopelículas. Pasado este tiempo se lavaron las biopelículas con PBS estéril al 1% tres veces con el objetivo de eliminar las células planctónicas y/o no adherentes. Luego, las biopelículas fueron incubadas en ausencia o en presencia de distintas concentraciones de TPP⁺-C10 (400mg/L, 300 mg/L, 200mg/L, 160 mg/L, 120 mg/L; 80 mg/L; 20

mg/L; 5 mg/L). Como control se utilizaron pocillos que no fueron tratados con TPP⁺-C10. Se dejaron incubando nuevamente por 24 horas a 37°C. Pasado este tiempo se descartó el medio y se lavaron las biopelículas nuevamente con PBS al 1%. Una vez eliminado el sobrenadante se agregaron 100 µL de MTT 0,5 mg/mL y se dejó incubando por 2-3 horas a 37 °C en oscuridad. Luego se agregó a cada pocillo, 40 µL de DMSO para solubilizar los cristales de formazán y se agitó por 15 min a 37°C. Al cabo de este periodo, se midió la densidad óptica (OD) a 540 nm en un lector de microplacas (Infinite 50 TECAN). A partir de las lecturas colorimétricas resultantes y después de restar los valores correspondientes de los blancos, se calculó la concentración necesaria para inhibir en un 50% la viabilidad de las biopelículas (IC₅₀) construyendo curvas dosis respuesta con el software Graphpad Prism 6.0

D. Oxigrafía:

Con el objetivo de evaluar si el compuesto TPP⁺-C10 altera la actividad y respiración celular se determinó el consumo de oxígeno de las células fúngicas en presencia y ausencia del fármaco en un oxígrafo acoplado a un electrodo de Clark N°5331 (Yellow Springs Instrument) usando un monitor YSI modelo 53 acoplado a un computador, adquiriendo los datos a través del software WinDag Data Acquisition Software (DATAQ Instruments). Para determinar si TPP⁺-C10 actuaba como inhibidor o desacoplante se usaron células intactas para evaluar el efecto de sobre respiración celular medido como porcentaje de consumo de oxígeno, mediante la técnica descrita por Sandoval y cols (Sandoval y cols., 2016).

Se agregó a la cámara 540µL de PBS, luego se agregó 10 µL de glutamina 1mM y 50 µL de PBS que contenían 1×10^7 de UFC/ml de levaduras en estado planctónico. Se ajustaron las concentraciones del fármaco al volumen de la microcámara del oxígrafo (600 µL), teniendo en cuenta la CIM para células planctónicas, utilizando como concentraciones finales $\frac{1}{2} \times IC_{50}$, IC_{50} y $2 \times IC_{50}$. Como control se utilizó la porción del gráfico que describe el consumo de oxígeno de las células previo a la introducción del compuesto TPP⁺-C10.

El porcentaje de inhibición del consumo de oxígeno se calculó a partir de las pendientes del gráfico antes y después de la adición de TPP⁺-C10 en sus distintas concentraciones. Los resultados de la velocidad de consumo de oxígeno expresados como valores de pendiente, fueron analizados y graficados mediante el software GraphPad Prism 6.0 para evaluar significancia con respecto al control de la velocidad de respiración de células no tratadas.

E. Expresión de resultados y análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como el promedio \pm DS de al menos 3 experimentos independientes. Las comparaciones entre los distintos grupos experimentales versus el control se realizaron utilizando un análisis de ANOVA mediante el software GraphPad Prism 6.0. Los resultados se considerarán significativos cuando el $p < 0,05$.

VII. RESULTADOS

A. Efecto antifúngico del TPP⁺-C10 sobre las cepas *C. albicans* ATCC-90029 y ATCC-10231 en su forma planctónica.

Para determinar el efecto antifúngico de TPP⁺-C10 en la inhibición del crecimiento de *C. albicans* se construyeron curvas dosis-respuesta de acuerdo a lo descrito en métodos para obtener los valores de CIM en las cepas ATCC-90029 y ATCC-10231 resistente a fluconazol. En la Figura 6 se observan las curvas semilogarítmicas de las cuales se obtuvieron los valores para el cálculo del IC₅₀ del fármaco sobre cada cepa. Los resultados mostraron que TPP⁺-C10 inhibió el crecimiento celular de manera dependiente a la concentración en ambas cepas, alcanzando incluso más de un 90% de inhibición a la concentración más alta ensayada. Las respectivas curvas de dosis-respuesta obtenidas mostraron resultados similares en términos de dependencia de la concentración de sus efectos antifúngicos (Figura 6).

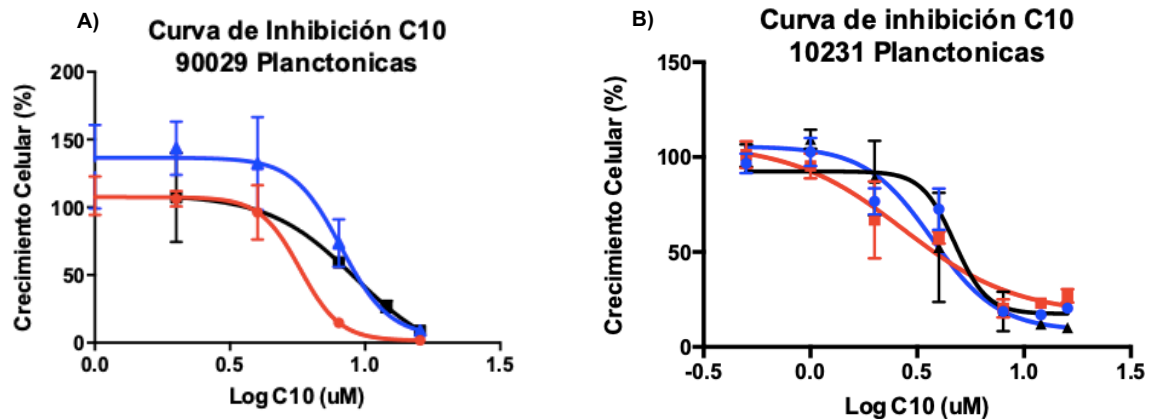


Figura 6. Efecto antifúngico de TPP⁺-C10 sobre las cepas ATCC-90029 y ATCC-10231.

Las cepas se incubaron con concentraciones crecientes de TPP⁺-C10 durante 24 horas. La imagen muestra la representación gráfica del efecto de TPP⁺-C10 sobre el crecimiento celular en función del logaritmo de la concentración de TPP⁺-C10 ensayado en células de *Candida albicans* ATCC-90029 (A) y ATCC-10231(B). Cada curva representa un experimento independiente. El porcentaje de crecimiento celular se calculó respecto del control sin tratamiento. Datos obtenidos mediante el promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm DS.

En la Tabla 2 podemos observar que el IC₅₀ fue de 13 μ M en la cepa ATCC-90029 y de 6,5 μ M para la cepa ATCC-10231 resistente a fluconazol, ambas en su forma planctónica. De esto podemos rescatar que el efecto de inhibición del crecimiento

de TPP⁺-C10 era mayor en la cepa ATCC-10231 ya que se necesita una menor concentración de este compuesto para lograr el efecto antifúngico deseado.

Tabla 2. Valores de IC₅₀ obtenidos a través del ensayo de susceptibilidad sobre las cepas ATCC-90029 y ATCC-10231 resistente a fluconazol.

	IC ₅₀ -1 (mg/L)	IC ₅₀ -2 (mg/L)	IC ₅₀ -3 (mg/L)	Promedio (mg/L)	DS (mg/L)	IC ₅₀ (μMol/L)
TPP⁺-C10 90029	5,75	8,15	9,20	7,70	±1.7	13
TPP⁺-C10 10231	4,73	2,72	3,70	3,71	±1	6,50

Los valores de IC₅₀ se calcularon a partir de curvas sigmoideas dosis-respuesta obtenidos a través del ensayo de susceptibilidad a 24hrs. Los resultados representan el promedio de al menos 3 experimentos en triplicado independientes ±DS.

B. Efecto antibiopelícula del TPP⁺-C10 sobre las cepas ATCC-90029 y ATCC-10231.

Para determinar el efecto antibiopelícula de TPP⁺-C10 se evaluó la viabilidad mediante un ensayo de MTT en las cepas *C. albicans* ATCC-90029 y ATCC-10231. En la Figura 7 se observan las curvas semilogarítmicas de las cuales se obtuvieron los valores para el cálculo del IC₅₀ del fármaco para las respectivas cepas.

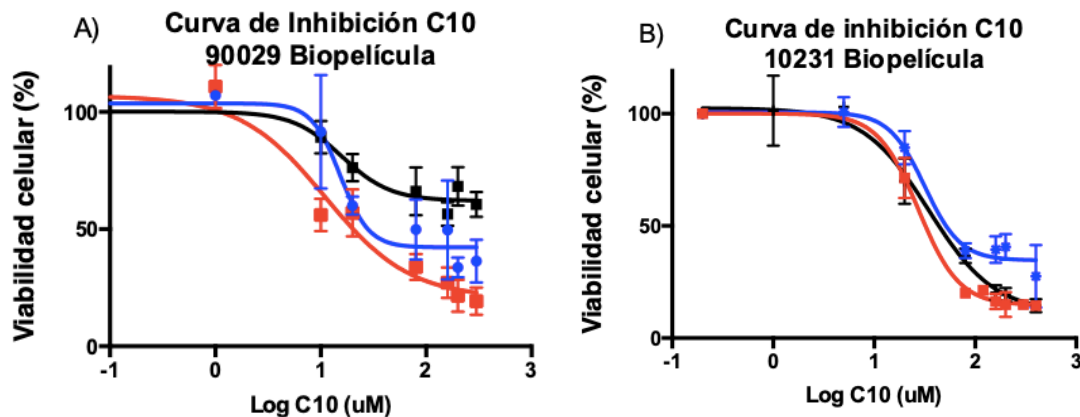


Figura 7. Efecto antibiopelícula de TPP⁺-C10 sobre las cepas ATCC-90029 y ATCC-10231 resistente a fluconazol mediante ensayo de viabilidad MTT. Las cepas se incubaron con concentraciones crecientes de TPP⁺-C10 durante 24 horas. La figura muestra la representación gráfica del efecto de TPP⁺-C10 sobre la viabilidad celular de la biopelícula en función del logaritmo de la concentración de TPP⁺-C10 ensayado en cepas ATCC-90029 (A) y ATCC-10231 (B). El porcentaje de viabilidad se calculó respecto del control sin tratamiento. Datos obtenidos mediante el promedio de al menos 3 experimentos independientes ±DS.

En la Tabla 3 podemos observar que el IC₅₀ del TPP⁺-C10 sobre las cepas fue de 22,8 µM en la cepa ATCC-90029 y de 50,8 µM para la cepa ATCC-10231 resistente a fluconazol, ambas en su forma biopelícula. De esto podemos rescatar que el efecto antibiopelícula de TPP⁺-C10 fue mayor en la cepa ATCC-90029 ya que se necesita una menor concentración de este compuesto para lograr el efecto deseado.

Tabla 3. Valores de IC₅₀ obtenidos a través del ensayo MTT sobre las cepas ATCC-90029 y ATCC-10231 resistente a fluconazol.

	IC ₅₀ -1 (mg/L)	IC ₅₀ -2 (mg/L)	IC ₅₀ -3 (mg/L)	Promedio (mg/L)	DS (mg/L)	IC ₅₀ (µMol/L)
TPP⁺-C10 90029	15,31	15,80	9,20	14,04	±2.60	22,80
TPP⁺-C10 10231	27,36	31,65	34,80	31,27	±3.70	50,80

Los valores de IC₅₀ se calcularon a partir de curvas sigmoideas dosis-respuesta obtenidos a través del ensayo MTT a 24hrs. Los resultados representan el promedio de al menos 3 experimentos en triplicado independientes ±DS

Los resultados mostraron que TPP⁺-C10 inhibió el crecimiento celular de manera dependiente a la concentración en ambas cepas en su forma biopelícula. Las respectivas curvas de dosis-respuesta obtenidas mostraron dependencia de la concentración en su efecto antifúngico (Figura 7).

C. Efecto de TPP⁺-C10 sobre la respiración celular en las cepas ATCC-90029 y ATCC-10231

Con el objetivo de identificar la acción del compuesto en estudio TPP⁺-C10 sobre la respiración celular en cepas *C. albicans* ATCC-90029 y ATCC-10231 resistente a fluconazol, se realizó un estudio para determinar la respiración celular. Para esto se determinó el consumo de oxígeno mediante un oxígrafo acoplado a un electrodo de Clark. Para este experimento se utilizaron como concentraciones de TPP⁺-C10 los valores de IC₅₀ obtenidos en el ensayo de susceptibilidad, el cual fue evaluado en las concentraciones del IC₅₀, su mitad y el doble.

En la figura 8 se observan las curvas de consumo de oxígeno obtenidas en la oxigrafía para las cepas ATCC-90029 y ATCC-10231 probando las distintas concentraciones de TPP⁺-C10 y su comparación con el control sin fármaco. La línea

roja representa la pendiente del consumo de oxígeno en presencia del fármaco. El consumo de oxígeno por parte de la cepa ATCC-90029 disminuyó en presencia de TPP⁺-C10 en todas las concentraciones probadas al igual que la cepa ATCC-10231 respecto al control sin tratamiento.

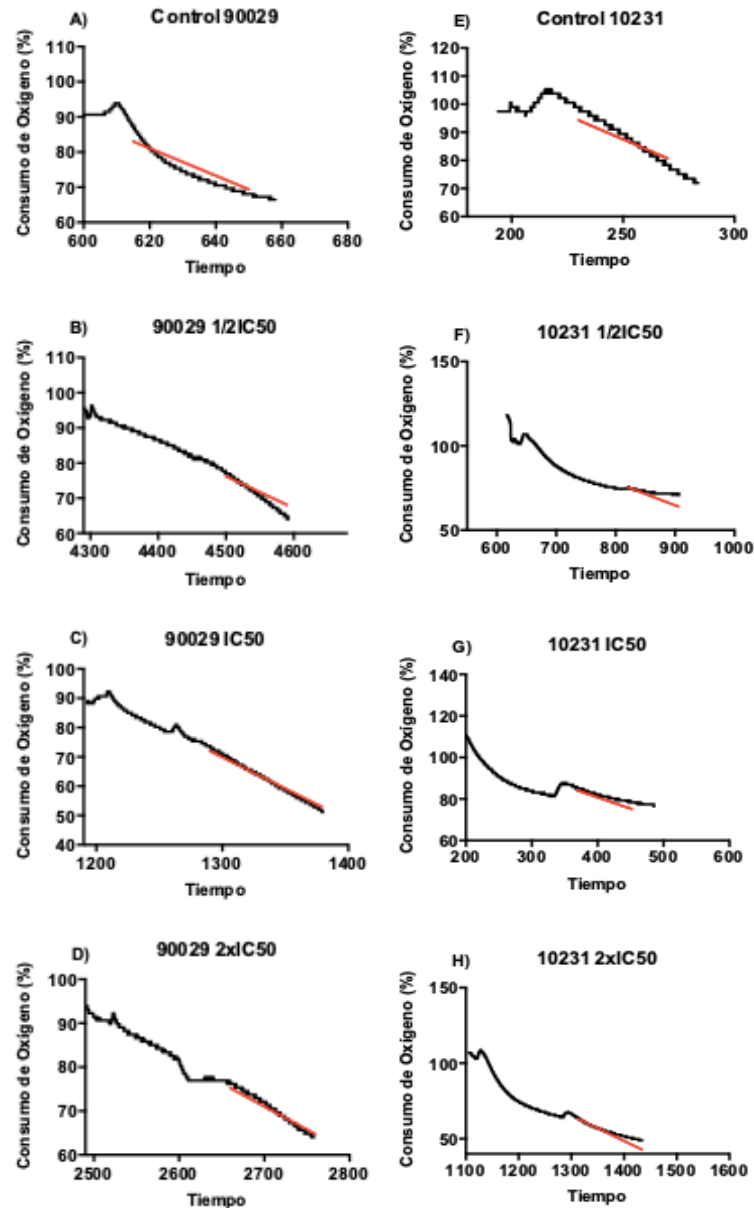


Figura 8. Consumo de oxígeno de las cepas ATCC-90029 y ATCC-10231 en presencia de TPP⁺-C10. Representación gráfica del consumo de oxígeno obtenido a través de la oxigrafía. En la cepa ATCC-90029 se observa una disminución de la respiración celular en presencia de las concentraciones $\frac{1}{2}$ IC₅₀ (B), IC₅₀ (C) y 2xIC₅₀ (D) en comparación al control de esa cepa(A). En la cepa ATCC-10231 se observa una disminución de la respiración celular a las concentraciones de $\frac{1}{2}$ IC₅₀ (F), IC₅₀ (G) y 2xIC₅₀ (H) con respecto al control (E). En rojo se pueden observar las pendientes obtenidas de los gráficos de consumo de oxígeno mediante el software GraphPad Prism 6.0. Resultados obtenidos mediante el promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm DS.

En la Figura 9 se puede observar el promedio del porcentaje de consumo de oxígeno a las distintas concentraciones del compuesto, obtenido a partir de las pendientes de los gráficos, para las distintas cepas. Se puede observar que la cepa ATCC-90029 obtuvo una reducción significativa del consumo de oxígeno en presencia de las concentraciones $\frac{1}{2}$ IC₅₀ y 2xIC₅₀. Por otro lado, la cepa ATCC-10231, tuvo una disminución significativa del consumo de oxígeno en todas las concentraciones probadas en comparación al control.

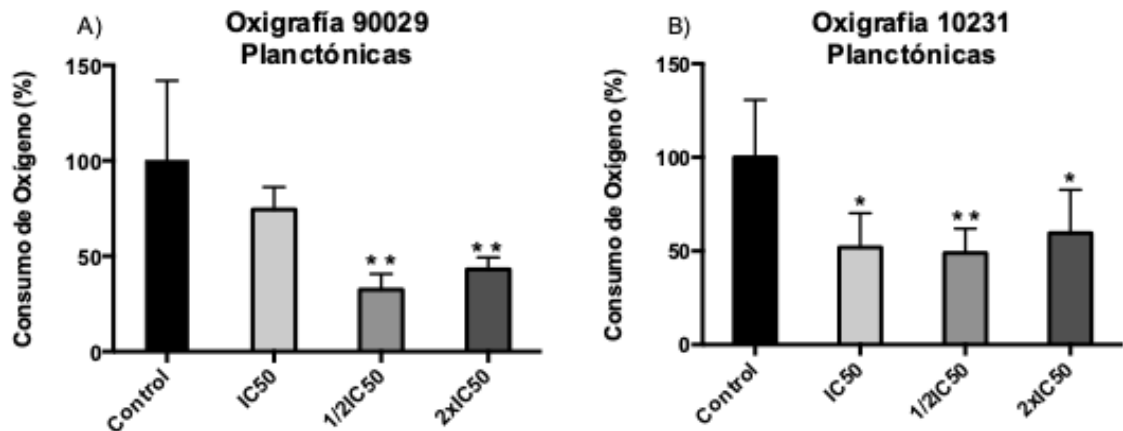


Figura 9: Efecto de TPP⁺-C10 en la respiración celular de las cepas ATCC-90029 y ATCC-10231 mediante Oxigrafía. Las cepas ATCC-90029 y ATCC-10231 fueron expuestas a distintas concentraciones del compuesto TPP⁺-C10 en un oxígrafo asociado a un electrodo de Clark. Se muestra el consumo de oxígeno de ambas cepas ATCC-90029 (A) y ATCC-10231 (B) y su respectiva comparación con el control. El porcentaje de consumo de oxígeno se calculó mediante el análisis de las pendientes obtenidas en la Oxigrafía. Resultados obtenidos mediante el promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm DS. Las barras de error representan la desviación estándar. * p <0,05; ** p <0,01 respecto al control sin tratamiento (ANOVA).

VIII. DISCUSIÓN

Se ha propuesto la mitocondria como un posible blanco farmacológico para atacar a *C. albicans* (Murphy y Smith, 2007). Este hongo requiere la función mitocondrial para su crecimiento, morfogénesis y virulencia; sin embargo, las mitocondrias no se han explotado como objetivo terapéutico hasta la fecha. Dado el papel central de este organelo en los procesos esenciales para el crecimiento, el mantenimiento y la adaptabilidad, unido a la presencia de características específicas de los hongos, puede ser posible desarrollar terapias basadas en la inhibición mitocondrial (Duvenage y cols., 2019).

En la literatura se ha mostrado al ácido gálico, como un compuesto bioactivo natural, con una prometedora actividad antifúngica contra *C. albicans* en su forma planctónica (Teodoro y cols., 2015; Teodoro y cols., 2017). Su mecanismo de acción no se comprende por completo, pero se ha propuesto que puede actuar mediante una ruptura de la membrana de los hongos impidiendo el desarrollo de las células (Teodoro y cols., 2015). Sin embargo, este compuesto presenta una solubilidad limitada, lo que podría comprometer el tratamiento de las biopelículas de *C. albicans* (Teodoro y cols., 2017). Los valores de CIM para el ácido gálico reportados en la literatura varían según la especie y van desde 2,5 mg/L a 16.000 mg/L (Teodoro y cols., 2015). Por ejemplo, el valor de CIM del ácido gálico obtenido en el estudio de Teodoro y colaboradores (2015) en cepas estándar fue de 12.500 mg/L para *C. albicans*, similar al observado por Govindarajan y colaboradores (Govindarajan y cols., 2006). Por otro lado Alves y colaboradores (2014) describen que, en los resultados obtenidos de sus experimentos, se demuestra claramente que el ácido gálico fue el componente en estudio más eficaz contra las células planctónicas de *C. albicans* con un valor de CIM de 156 mg/L (Alves y cols., 2014). Además, se han evaluado distintos derivados del ácido gálico como posibles fármacos antifúngicos. Al respecto, la actividad antifúngica de los galatos de alquilo parece depender de la presencia de una cadena de alquilo hidrófoba. Los estudios realizados por Leal y colaboradores (2009), demostraron que la lipofilia de cada galato podría desempeñar un papel importante en su actividad (Leal y cols., 2009). En este contexto, en el presente estudio se propuso que una molécula derivada del ácido

gálico, unido a una cadena alquílica de 10 carbonos y a un grupo catiónico trifenilfosfonio (TPP⁺-C10) mostraría una acción antifúngica sobre las cepas *C. albicans* ATCC-90029 y ATCC-10231, de manera concordante con lo descrito en la literatura (Govindarajan y cols., 2006; Alves y cols., 2014; Teodoro y cols., 2015).

En relación con los análisis de los valores de IC₅₀ obtenidos de los experimentos de susceptibilidad para las cepas ATCC-90029 y ATCC-10231 en nuestro estudio (Tabla 2), se observó que los valores IC₅₀ fueron de 7,7 mg/L para la cepa ATCC-90029 y de 3,71 mg/L para la cepa ATCC-10231. En un estudio realizado por Leal y colaboradores (2009), se ensayó la actividad antifúngica de los galatos de propilo, octilo y dodecilo contra los hongos *S. cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *C. albicans* y *Aspergillus niger*. De estos, solo se encontró que el galato de octilo era activo contra *S. cerevisiae* (CIM = 25 mg/L) y también contra los otros hongos probados, con valores de CIM entre 25 y 50 mg/L. Los ésteres de propilo y dodecilo eran inactivos (Leal y cols., 2009). Los resultados muestran que el compuesto TPP⁺-C10 probado en nuestro estudio, presenta una actividad antifúngica mayor en comparación a los derivados del ácido gálico probados de forma independiente en estudios previos.

La mayoría de las infecciones por *Candida* spp. se asocian con la formación de biopelículas, que son muy resistentes a los agentes antifúngicos. Las biopelículas tienen una arquitectura compleja que proporciona un refugio seguro para los patógenos persistentes y otros oportunistas y los protege del sistema inmunológico (Chang y cols., 2018). En la mayoría de los entornos naturales, los microorganismos existen predominantemente como biopelículas, en lugar de células planctónicas (Alves y cols., 2014). Por lo tanto, el segundo objetivo de este trabajo fue probar el efecto de TPP⁺-C10 contra biopelículas preformadas de *C. albicans*.

Con respecto a los resultados obtenidos de los experimentos de viabilidad en las biopelículas de las cepas ATCC-90029 y ATCC-10231 en nuestro estudio (Tabla 3), se observó que los IC₅₀ fueron de 14,04 mg/L (22,8 µM) para la cepa ATCC-90029 y de 31,27 mg/L (50,8 µM) para la cepa ATCC-10231. En este ensayo de viabilidad

vimos un efecto diferente a lo observado en el ensayo de susceptibilidad de la forma planctónica, donde el compuesto TPP⁺-C10 presentó mayor efectividad frente a la cepa ATCC-10231 en comparación a la cepa ATCC-90029.

Otros estudios han reportado el efecto del ácido gálico y otros derivados sobre biopelículas de *C. albicans*. Los valores de IC₅₀ para el ácido gálico reportados en un estudio Alves y colaboradores (2014) mostraron una actividad antibiopelícula del ácido gálico para *C. albicans* a una concentración de 5000 mg/L, lo cual representaba 32 veces el valor de CIM encontrado en ese estudio probado en cepas de referencia (Alves y cols., 2014). En ese estudio, los efectos de los compuestos fenólicos en las biopelículas de *Candida* revelaron una menor susceptibilidad de estos microorganismos en comparación con sus contrapartes planctónicas, observando una reducción significativa solo a la concentración mas alta probada la cual era 5000 mg/L (Alves y cols., 2014). En el estudio de Pedroso y colaboradores (2019), evaluaron la concentración mínima inhibitoria de biopelículas, la cual describen como la capacidad de reducir en un 90% los valores de densidad óptica obtenidos en comparación a un control, en este caso los valores del ácido gálico para *C. albicans* eran >2000 mg/L (Pedroso y cols., 2019). De estos resultados podemos rescatar que, si bien la literatura afirma que para lograr un efecto antibiopelícula en *C. albicans* se necesitan concentraciones mayores a las necesarias para la inhibición de la forma planctónica, los IC₅₀ de TPP⁺-C10 obtenidos para biopelículas en nuestro ensayo de viabilidad son mas bajos que los reportados en la literatura para el ácido gálico. Esto podría indicar que la incorporación de una cadena alquílica y su conjugación con el grupo TPP⁺ efectivamente mejora el efecto antifúngico en comparación con el ácido gálico sin modificaciones.

Si comparamos estos resultados con las concentraciones de inhibición de antifúngicos tradicionales, en la literatura encontramos que el fluconazol tiene una buena actividad antifúngica contra la mayoría de las especies de *Candida*. Para los aislados clínicos de las especies *albicans*, *parapsilosis* y *tropicalis*, el punto de corte de susceptibilidad in vitro es de 2 mg/L (Quindós y cols., 2019). En un estudio

realizado por Müller y colaboradores (2020), la CIM observada para fluconazol fue de 0,69 mg/L para la cepa de *C. albicans* ATCC-90029 y > 256 mg/L para la cepa ATCC-10231. Sin embargo, si bien el fluconazol fue activo frente a *C. albicans* en su forma planctónica, en biopelículas no mostraba actividad en las mismas condiciones experimentales que las reportadas en este trabajo (Müller y cols., 2020).

En las infecciones resistente al fluconazol, se recomienda la solución oral de itraconazol. El itraconazol es un triazol lipofílico de primera generación de uso limitado debido a su absorción oral irregular y sus interacciones farmacológicas. Es activo contra muchos aislados clínicos de *C. glabrata* y *C. krusei* resistentes al fluconazol. En el caso de cepas clínicas de *Candida*, el punto de corte de susceptibilidad in vitro es 0,125 mg/L (Quindós y cols., 2019). En un estudio de Li y colaboradores (2017), las CIM de fluconazol para todas las cepas de *Candida* probadas estuvieron entre 12,5 y 25,0 mg/L, ambas dentro del rango reportados previamente (Li y cols., 2017).

Si bien existen reportes del ácido gálico como posible molécula antifúngica contra *C. albicans*, la mayoría de los estudios que evalúan los derivados alquilgalatos asociados con TPP⁺, han sido realizados en modelos in vitro e in vivo de cancer. Algunos estudios (Murphy y Smith, 2007; Jara y cols., 2014; Sandoval y cols., 2016) han descrito que los derivados del ácido gálico se relacionan con actividades antitumorales selectivas. Se describe que los galatos de n-alkilo inducen apoptosis en líneas celulares tumorales predominantemente activando la vía apoptótica dependiente de mitocondrias debido a su asociación con metabolismo oxidativo mitocondrial alterado. Para mejorar los efectos citotóxicos de los ésteres de ácido gálico, sintetizaron diferentes cationes lipofílicos deslocalizados reuniendo un éster de ácido gálico con trifenilfosfonio (TPP⁺). El compuesto resultante podría acumularse selectivamente dentro de las mitocondrias tumorales para provocar su efecto citotóxico, aprovechando el hecho de que el potencial de membrana mitocondrial difiere entre células cancerosas y no cancerosas, hipótesis similar a la planteada en nuestro estudio. Las comparaciones de los valores de IC₅₀ entre

células tumorales y no tumorales del epitelio mamario del ratón revelaron que TPP⁺-C10 era el compuesto más selectivo de la serie (Jara y cols., 2014).

Si comparamos los resultados de IC₅₀ obtenidos para el ácido gálico sobre la línea celular de adenocarcinoma mamario de ratón, este nos da un valor de 163,1 µM, un valor alto comparado con los 0,40 µM necesarios para el TPP⁺-C10 en la misma línea celular (Jara y cols., 2014). En nuestro estudio los valores de IC₅₀ de TPP⁺-C10 sobre las cepas ATCC-90029 y ATCC-10231 fueron de 22,8 µM y 50,8 µM respectivamente para la forma de biopelícula. En el caso de la línea celular de leucemia linfoblástica aguda humana, los IC₅₀ del ácido gálico y de TPP⁺-C10 fueron >200 µM y 7,1 µM respectivamente (Jara y cols., 2014). Por lo tanto, en nuestro estudio el TPP⁺-C10 mostraría una menor potencia sobre las biopelículas de *C. albicans* en comparación con lo reportado en células humanas. Esto podría significar que, a las concentraciones necesarias para eliminar las biopelículas, el TPP⁺-C10 podría ser tóxico frente a las células mamíferas. Sin embargo, es necesario evaluar este fármaco sobre células humanas normales para poder determinar su toxicidad.

A pesar de que el mecanismo de acción del ácido gálico sobre las células de levadura no se ha entendido ampliamente, existen distintas hipótesis al respecto. Alves y colaboradores (2014), proponen que actúa alterando la estructura de la membrana celular e inhibiendo el proceso de gemación normal (Alves y cols., 2014). Li y colaboradores (2017), describen que observaron una disminución significativa en el contenido de ergosterol en presencia del ácido gálico, lo que sugiere que se inhibió la vía de biosíntesis de ergosterol. Por lo tanto, el mecanismo antifúngico de GA puede estar relacionado tanto con la inhibición de la biosíntesis de ergosterol de la membrana fúngica como con la actividad de la enzima CYP51, que, en su estudio in vivo, se redujo significativamente en la membrana fúngica (Li y cols., 2017). Leal y colaboradores (2009), determinaron que, desde el punto de vista de la longitud de la cadena y su contribución a la hidrofobicidad del ácido gálico, este es un factor que determina la capacidad de penetrar las membranas celulares fúngicas y llegar a los sitios de interacción, influyendo así en la actividad antifúngica de estos compuestos (Leal y cols., 2009). Sin embargo, en estudios de cáncer, unieron

antioxidantes con el grupo catiónico trifenilfosfonio (TPP⁺). Tal enfoque aumentó la lipofilicidad de los compuestos y los dirigió directamente a las mitocondrias, dotando a estas moléculas de una actividad antioxidante mitocondrial mejorada en comparación con sus compuestos originales (Sandoval y cols., 2016). La respiración celular es una función clave de las mitocondrias. La actividad respiratoria mitocondrial se ha implicado en varias funciones relacionadas con la virulencia en patógenos fúngicos humanos, incluidas las transiciones entre tipos de células y modos de crecimiento (levaduras, hifas, biopelículas), susceptibilidad a fármacos antifúngicos, biogénesis de la pared celular e interacciones inmunitarias (Calderone y cols., 2015).

Considerando estos antecedentes, en este estudio se evaluó el efecto de TPP⁺-C10 sobre la respiración celular. Para esto, se realizó la medición de la velocidad del consumo de oxígeno a través de oxigrafía para ver si el compuesto en estudio alteraba la respiración celular. Los resultados muestran que en la cepa ATCC-90029 todas las concentraciones probadas producen una disminución del consumo de oxígeno, siendo significativa la reducción en las concentraciones $\frac{1}{2}$ IC₅₀ y 2xIC₅₀, en el caso de la cepa 10231 todas las concentraciones mostraron tener una disminución significativa del consumo de oxígeno, sin ser en ningún caso resultados concentración dependiente.

Luego de determinar los porcentajes de respiración celular a través de la velocidad de respiración celular, utilizando las pendientes de las rectas de las distintas concentraciones de C10 se llegó a la conclusión de que el compuesto actúa como inhibidor de la respiración celular en ambas cepas.

En los hongos, las mitocondrias juegan un papel en el desarrollo y cambios morfogénicos como la diferenciación de hifas y la formación de biopelículas, la adaptación al estrés, la biosíntesis y estructura de la pared celular, la interacción de las células inmunes innatas y la susceptibilidad a los fármacos antifúngicos (Calderone y cols., 2015). Se ha descrito en la literatura, que la inhibición de la respiración celular tiene un rol fundamental en distintas funciones en las levaduras. Por ejemplo, un informe de Guedouari y colaboradores (2014), sugiere que es

necesaria una gran actividad mitocondrial para sustentar el crecimiento de las hifas (Guedouari y cols., 2014), y por lo tanto, la respiración celular en la mitocondria es necesaria para la formación de las biopelículas. Por otro lado, se ha sugerido que la respiración celular podría ser una señal para RAS/PKA (Watanabe y cols., 2006) la cual es una vía crítica de transducción de señales para el cambio morfológico en *C. albicans*.

Shingu-Vazquez y colaboradores (2011), demostraron que en otras especies de *Candida* como en *C. parapsilosis*, el tratamiento con inhibidores de las vías respiratorias mitocondriales resultó en una disminución de la CIM de caspofungina, lo que también sugiere un rol de la respiración celular en la integridad de la pared celular y la tolerancia a las equinocandinas (Shingu-Vazquez y cols., 2011).

Calderone y colaboradores (2015) destacan que, en cualquier caso, si se desarrollan futuros fármacos antimicóticos que se dirijan a la actividad mitocondrial, es probable que estos compuestos bloqueen la formación de hifas, pudiendo esto ser beneficioso para reducir la virulencia de *C. albicans* y también para modular la respuesta inflamatoria desencadenada por la forma hifal (Calderone y cols., 2015).

Se ha realizado una gran cantidad de investigación para dilucidar los mecanismos que subyacen al aumento de la resistencia y tolerancia en las células de *C. albicans* asociadas a la biopelícula. Al igual que las biopelículas bacterianas, en comparación con las células planctónicas, las biopelículas de hongos muestran un aumento de hasta 20.000 veces en las CIM para los antifúngicos clásicos. Se han propuesto varios mecanismos que expliquen el aumento de la resistencia y tolerancia de las células asociadas a la biopelícula, algunos de los cuales son compartidos entre las células planctónicas y las asociadas a la biopelícula y otros son específicos de la biopelícula (Tsui y cols., 2016). Dentro de los mecanismos de resistencia conocidos, destaca la modificación del blanco farmacológico, aumento de la densidad celular y regulación al alza de las bombas de eflujo.

Entre la variedad de mecanismos moleculares de resistencia que han desarrollado las especies de *Candida*, la regulación ascendente de las bombas de eflujo MDR1

y/o CDR1 / CDR2 contribuye a la resistencia a los azoles en la mayoría de los aislados clínicos de *C. albicans*. El catión trifenilfosfonio (TPP⁺), un catión lipofílico, puede atravesar fácilmente las bicapas lipídicas debido a su alta lipofilicidad y carga catiónica estable, y el gradiente de potencial impulsa la acumulación de conjugados TPP⁺ en la matriz mitocondrial. De hecho, se ha utilizado la conjugación de TPP⁺ con fármacos contra el cáncer para mejorar su eficacia aumentando la distribución del fármaco en las mitocondrias (Chang y cols., 2018). En esta misma línea, en el estudio de Chang y colaboradores (2018) la conjugación de antifúngicos sustratos de bombas de eflujo con TPP⁺ restauró la actividad antifúngica de estas moléculas contra *C. albicans* y les permitió dirigirse a las mitocondrias. Por lo tanto, TPP⁺ puede funcionar como un conductor para administrar agentes bioactivos a las células y superar el eflujo de fármacos que se produce a través de las bombas transportadoras que normalmente provocan su expulsión de la célula inhibiendo su actividad antifúngica. Esta característica de la conjugación TPP⁺ no depende de los blancos farmacológicos de los compuestos. Además, los conjugados de TPP⁺ también fueron activos contra otros tipos de cepas resistentes de *C. albicans*, lo que respalda una amplia aplicación de estos conjugados para abordar los problemas de resistencia a los medicamentos. Por lo tanto, este método de conjugación de TPP⁺ puede ser particularmente útil para mejorar o restaurar la actividad antifúngica de compuestos dirigidos a las mitocondrias (Chang y cols., 2018).

IX. CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES

El compuesto TPP⁺-C10 fue capaz de inhibir el crecimiento de *C. albicans* tanto en su forma planctónica como en biopelícula en ambas cepas probadas, obteniendo valores de IC₅₀ menores a los reportados en la literatura para el ácido gálico.

Dado los resultados obtenidos de la oxigrafía se desprende que uno de los efectos de TPP⁺-C10 sobre *C. albicans* fue la inhibición de la respiración celular, dando como resultado una disminución del consumo de oxígeno, la cual fue significativa en presencia de casi todas las concentraciones probadas en ambas cepas.

El mecanismo por el cual este compuesto ejerce su actividad antifúngica aún no se ha determinado, se postula que la adición del grupo trifenilfosfonio (TPP⁺) podría dirigir la molécula de forma selectiva a la mitocondria de *C. albicans* además de superar la resistencia antifúngica al evitar el flujo activo. Por lo tanto, este estudio puede contribuir al desarrollo de nuevas terapias contra *C. albicans* y ayudar a resolver el problema de la resistencia a los fármacos por microorganismos fúngicos.

Es importante buscar nuevas formas de combatir las infecciones por *C. albicans* debido al crecimiento de poblaciones susceptibles, las limitaciones del espectro de actividad o la tolerabilidad de los antifúngicos actuales y el desarrollo de resistencia a los antifúngicos. Actualmente, son pocos los productos terapéuticos que se encuentran en desarrollo activo, y la progresión de agentes terapéuticos con mecanismos de acción específicos de hongos es de máxima prioridad (Ostrosky-Zeichner y cols., 2010).

Como proyección del trabajo presentado, podemos mencionar que los resultados obtenidos durante esta investigación, se entregan las bases para realizar nuevos experimentos, tales como pruebas del compuesto en aislados clínicos, ya que se ha demostrado que las cepas clínicas son menos susceptibles a los agentes antimicrobianos y que además las cepas de referencia de laboratorio de *Candida* y los aislados clínicos forman biopelículas a diferentes velocidades, por lo tanto la selección de una cepa de referencia de laboratorio para estudios de biopelículas

debe tener en cuenta la capacidad de formación de biopelículas y los resultados deben ser comprobados en aislados clínicos (Alnuaimi y cols., 2013).

Por otro lado, también es relevante evaluar la citotoxicidad de TPP⁺-C10 y comprobar su selectividad frente a las células humanas además de realizar ensayos de combinación con otros antifúngicos y evaluar si existe una acción sinérgica de los antifúngicos al usarlos combinados.

Finalmente el mecanismo completo por el cual estos derivados ejercen su acción antifúngica no se ha dilucidado aun, por lo que queda pendiente realizar experimentos que nos permitan dilucidar si la disminución en el consumo de oxígeno observada en los experimentos se debe a estrés mitocondrial, midiendo los niveles de ATP.

Estos resultados no solo respaldan la investigación del efecto ácido gálico, sus derivados y conjugados con trifenilfosfonios en el tratamiento de la infección por hongos, sino que también sugieren que TPP⁺-C10 es un agente antifúngico potencial que debe investigarse clínicamente más a fondo.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alnuaimi, A. D., O'Brien-Simpson, N. M., Reynolds, E. C., & McCullough, M. J. (2013). Clinical isolates and laboratory reference *Candida* species and strains have varying abilities to form biofilms. *FEMS yeast research*, 13(7), 689-699.

Alves, C. T., Ferreira, I. C., Barros, L., Silva, S., Azeredo, J., & Henriques, M. (2014). Antifungal activity of phenolic compounds identified in flowers from North Eastern Portugal against *Candida* species. *Future microbiology*, 9(2), 139-146.

Arendrup, M. C., Cuenca-Estrella, M., Lass-Flörl, C., Hope, W., & EUCAST-AFST. (2012). EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). *Clinical Microbiology and Infection*, 18(7), E246-E247.

Brown, G. C., Murphy, M. P., Rich, P. R., & Maréchal, A. (2010). The mitochondrial respiratory chain. *Essays in biochemistry*, 47, 1-23.

Calderone, R., Li, D., & Traven, A. (2015). System-level impact of mitochondria on fungal virulence: to metabolism and beyond. *FEMS yeast research*, 15(4).

Chang, W., Liu, J., Zhang, M., Shi, H., Zheng, S., Jin, X., ... & Lou, H. (2018). Efflux pump-mediated resistance to antifungal compounds can be prevented by conjugation with triphenylphosphonium cation. *Nature communications*, 9(1), 1-12.

De Oliveira Santos, G. C., Vasconcelos, C. C., Lopes, A. J., de Sousa Cartágenes, M. D. S., Allan Filho, K. D. B., do Nascimento, F. R., ... & de Andrade Monteiro, C. (2018). *Candida* infections and therapeutic strategies: mechanisms of action for traditional and alternative agents. *Frontiers in microbiology*, 9,1351.

Duvenage, L., Walker, L. A., Bojarczuk, A., Johnston, S. A., MacCallum, D. M., Munro, C. A., & Gourlay, C. W. (2019). Inhibition of classical and alternative modes

of respiration in *Candida albicans* leads to cell wall remodeling and increased macrophage recognition. *MBio*, 10(1), e02535-18.

Finkel, J. S., & Mitchell, A. P. (2011). Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nature Reviews Microbiology*, 9(2), 109-118.

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.

Garcia-Rubio, R., de Oliveira, H. C., Rivera, J., & Trevijano-Contador, N. (2020). The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2993.

Ghannoum, M. A. (2000). Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clinical microbiology reviews*, 13(1), 122-143.

Gonzalez-Lara, M. F., Sifuentes-Osornio, J., & Ostrosky-Zeichner, L. (2017). Drugs in clinical development for fungal infections. *Drugs*, 77(14), 1505-1518.

Govindarajan, R., Vijayakumar, M., Singh, M., Rao, C. V., Shirwaikar, A., Rawat, A. K. S., & Pushpangadan, P. (2006). Antiulcer and antimicrobial activity of *Anogeissus latifolia*. *Journal of Ethnopharmacology*, 106(1), 57-61.

Guedouari, H., Gergondey, R., Bourdais, A., Vanparis, O., Bulteau, A. L., Camadro, J. M., & Auchère, F. (2014). Changes in glutathione-dependent redox status and mitochondrial energetic strategies are part of the adaptive response during the filamentation process in *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1842(9), 1855-1869.

Hsu, F. L., Chen, P. S., Chang, H. T., & Chang, S. T. (2009). Effects of alkyl chain length of gallates on their antifungal property and potency as an environmentally

benign preservative against wood-decay fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(5), 543-547.

Jara, J. A., Castro-Castillo, V., Saavedra-Olavarría, J., Peredo, L., Pavanni, M., Jana, F., ... & Kemmerling, U. (2014). Antiproliferative and uncoupling effects of delocalized, lipophilic, cationic gallic acid derivatives on cancer cell lines. Validation in vivo in syngenic mice. *Journal of medicinal chemistry*, 57(6), 2440-2454.

Kim, J. H., Campbell, B. C., Mahoney, N., Chan, K. L., Molyneux, R. J., & Xiao, C. L. (2010). Use of chemosensitization to overcome fludioxonil resistance in *Penicillium expansum*. *Letters in applied microbiology*, 51(2), 177-183.

Leal, P. C., Mascarello, A., Derita, M., Zuljan, F., Nunes, R. J., Zacchino, S., & Yunes, R. A. (2009). Relation between lipophilicity of alkyl gallates and antifungal activity against yeasts and filamentous fungi. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 19(6), 1793-1796.

Lee Muñoz, X., Cajas Cajas, N., Gómez Carranza, L., Vergara Núñez, C., Ivankovic Silva, M., & Astorga Bustamante, E. (2015). Ocurrencia de levaduras del género *Candida* y estomatitis protésica antes y después del tratamiento rehabilitador basado en prótesis removible. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*, 8(1), 31-37.

Lee, X., Vergara, C., & Lozano, C. P. (2019). Severity of *Candida*-associated denture stomatitis is improved in institutionalized elders who consume *Lactobacillus rhamnosus* SP 1. *Australian dental journal*, 64(3), 229-236.

Li, Z. J., Liu, M., Dawuti, G., Dou, Q., Ma, Y., Liu, H. G., & Aibai, S. (2017). Antifungal activity of gallic acid in vitro and in vivo. *Phytotherapy research*, 31(7), 1039-1045.

Lim, C. Y., Rosli, R., Seow, H. F., & Chong, P. P. (2012). *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 31(1), 21-31.

Ludovico, P., Sansonetty, F., & Côte-Real, M. (2001). Assessment of mitochondrial membrane potential in yeast cell populations by flow cytometry. *Microbiology*, 147(12), 3335-3343.

Madariaga-Venegas, F., Fernandez-Soto, R., Duarte, L. F., Suarez, N., Delgadillo, D., Jara, J. A., ... & Molina-Berrios, A. (2017). Characterization of a novel antibiofilm effect of nitric oxide-releasing aspirin (NCX-4040) on *Candida albicans* isolates from denture stomatitis patients. *PloS one*, 12(5).

Müller-Sepúlveda, A., Chevecich, C. C., Jara, J. A., Belmar, C., Sandoval, P., Meyer, R. S., ... & 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.

Murante, D., & Hogan, D. A. (2019). New Mitochondrial Targets in Fungal Pathogens. *mBio*, 10(5), e02258-19.

Murphy, M. P., & Smith, R. A. (2007). Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 47, 629-656.

Ostrosky-Zeichner, L., Casadevall, A., Galgiani, J. N., Odds, F. C., & Rex, J. H. (2010). An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. *Nature reviews Drug discovery*, 9(9), 719-727.

Patil, S., Rao, R. S., Majumdar, B., & Anil, S. (2015). Clinical appearance of oral *Candida* infection and therapeutic strategies. *Frontiers in microbiology*, 6, 1391.

Pedroso, R. D. S., Balbino, B. L., Andrade, G., Dias, M. C. P. S., Alvarenga, T. A., Pedroso, R. C. N., ... & Pires, R. H. (2019). In vitro and in vivo anti-*Candida* spp. activity of plant-derived products. *Plants*, 8(11), 494.

Prasad, R., Shah, A. H., & Rawal, M. K. (2016). Antifungals: mechanism of action and drug resistance. In *Yeast Membrane Transport* (pp. 327-349). Springer, Cham.

Quindós, G., Gil-Alonso, S., Marcos-Arias, C., Sevillano, E., Mateo, E., Jauregizar, N., & Eraso, E. (2019). Therapeutic tools for oral candidiasis: Current and new antifungal drugs. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*, 24(2), e172.

Ramage, G., Saville, S. P., Thomas, D. P., & Lopez-Ribot, J. L. (2005). *Candida* biofilms: an update. *Eukaryotic cell*, 4(4), 633-638.

Ramage, G., Walle, K. V., Wickes, B. L., & Lopez-Ribot, J. L. (2001). Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Revista iberoamericana de micología*, 18(4), 163-170.

Sandoval-Acuña, C., Fuentes-Retamal, S., Guzmán-Rivera, D., Peredo-Silva, L., Madrid-Rojas, M., Rebolledo, S., ... & Jara, J. A. (2016). Destabilization of mitochondrial functions as a target against breast cancer progression: Role of TPP+-linked-polyhydroxybenzoates. *Toxicology and applied pharmacology*, 309, 2-14.

Shingu-Vazquez, M., & Traven, A. (2011). Mitochondria and fungal pathogenesis: drug tolerance, virulence, and potential for antifungal therapy. *Eukaryotic cell*, 10(11), 1376-1383.

Suchodolski, J., & Krasowska, A. (2019). Plasma Membrane potential of *Candida albicans* measured by Di-4-ANEPPS fluorescence depends on growth phase and regulatory factors. *Microorganisms*, 7(4), 110.

Teodoro, G. R., Brighenti, F. L., Delbem, A. C. B., Delbem, Á. C. B., Khouri, S., Gontijo, A. V. L., ... & Koga-Ito, C. Y. (2015). Antifungal activity of extracts and isolated compounds from *Buchenavia tomentosa* on *Candida albicans* and non-*albicans*. *Future Microbiology*, 10(6), 917-927.

Teodoro, G. R., Gontijo, A. V. L., Borges, A. C., Tanaka, M. H., Lima, G. D. M. G., Salvador, M. J., & Koga-Ito, C. Y. (2017). Gallic acid/hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex: Improving solubility for application on in vitro/in vivo *Candida albicans* biofilms. *PloS one*, 12(7), e0181199.

Tsui, C., Kong, E. F., & Jabra-Rizk, M. A. (2016). Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *FEMS Pathogens and Disease*, 74(4), ftw018.

Watanabe, T., Ogasawara, A., Mikami, T., & Matsumoto, T. (2006). Hyphal formation of *Candida albicans* is controlled by electron transfer system. *Biochemical and biophysical research communications*, 348(1), 206-211