

Original

Actividad antifúngica in vitro del ajoeno en cinco aislamientos clínicos de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*

Joel Torres e Hilda Romero *

Cátedra de Micología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 1 de diciembre de 2010

Aceptado el 1 de abril de 2011

On-line el 4 de mayo de 2011

Palabras clave:

Histoplasmosis

Histoplasma capsulatum

Ajoeno

Sensibilidad in vitro

Antifúngicos

R E S U M E N

Antecedentes: Con el advenimiento del sida, la histoplasmosis ha aumentado considerablemente y su tratamiento continúa siendo relativamente eficaz, si bien provoca efectos adversos.

Objetivo: Evaluar el efecto inhibitorio del ajoeno sobre *Histoplasma capsulatum*, en fase micelial, utilizando como medios de cultivo caldo glucosado de Sabouraud y RPMI-1640.

Métodos: Las curvas de crecimiento y el efecto inhibitorio del ajoeno (1,25-20 µg/ml) se realizaron a temperatura ambiente, en agitación y se registraron turbidimétricamente (540 nm) cada 48 h, durante 14 días. Se construyeron gráficas para estimar el tiempo de generación (Tg), concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración inhibitoria 50% (IC_{50}). La concentración fungicida mínima (CFM) se determinó por el método de cultivo en placas. Se usaron las pruebas de Mann-Whitney y T-test para evaluar la significación estadística entre los medios de cultivo y los parámetros Tg, CMI, IC_{50} , CFM y efecto fungistático (EF) con un nivel de significación de 0,05.

Resultados: Para los dos medios de cultivo, en todos los aislamientos se obtuvieron curvas de crecimiento con Tg de 43 a 67 h, EF a concentraciones de 1,25 y 2,5 µg/ml y CFM de 5 y 10 µg/ml. Los valores de la CMI, en CSD fueron de 2,5 y 5 y en RPMI, de 1,25 a 5 µg/ml. La IC_{50} en CSD fue de 1,9 a 2,6 y en RPMI, de 3,8 a 4,3 µg/ml de ajoeno. No hubo diferencias significativas entre los medios de cultivo para los parámetros estudiados ($p > 0,05$).

Conclusiones: Los hallazgos del presente trabajo corroboran que el ajoeno inhibe el desarrollo de *H. capsulatum* en fase micelial.

© 2010 Revista Iberoamericana de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

In vitro antifungal activity of ajoene on five clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*

A B S T R A C T

Keywords:

Histoplasmosis

Histoplasma capsulatum

Ajoeno

In vitro susceptibility tests

Antifungal drugs

Background: The number of histoplasmosis cases have considerably increased since the advent of AIDS, and the therapy for this mycosis is not always effective, as well as having adverse effects.

Aims: To evaluate the inhibitory effect of ajoene on five clinical isolates of *Histoplasma capsulatum*, on the mycelial form, using Sabouraud dextrose broth (SDB) and RPMI-1640 culture media.

Methods: Growth curves and inhibitory activity of the drug (at concentrations of 1.25 µg/ml to 20 µg/ml) were performed at room temperature, under mechanical agitation, and the turbidimetric readings (540 nm) were recorded every 48 h for 14 days, in both culture media. Generation times (GT) were calculated and graphs were constructed to estimate Minimal Inhibitory Concentrations (MIC) and Inhibitory Concentration 50% (IC_{50}). The fungicidal minimal concentrations (FMC) were determined by plate cultures. The U-Mann-Whitney and t-test with a significance level of 0.05 were used to evaluate the statistical significance between culture media and GT, MIC, IC_{50} FMC and fungistatic effect (FE).

Results: In both media and for all isolates, growth curves showed a GT of 43 to 67 hrs, an FE at 1.25-2.5 µg/ml, and a FMC at 5-10 µg/ml of ajoene. Values of MIC were 2.5-5 in SDB and in RPMI medium these values were 1.25-5 µg/ml of ajoene. For IC_{50} , in SDB, the values were 1.9-2.6 µg/ml and

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: hildarom4@hotmail.com (H. Romero).

in RPMI medium, they were of 3.8–4.3 µg/ml of ajoene. There were no significance differences between culture media for GT, FE, MIC, IC₅₀ and MFC ($p > 0.05$).

Conclusions: These findings corroborate that ajoene inhibits the growth of the mycelial form of *H. capsulatum*.

© 2010 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

El ajoeno [(E, Z) 4,5,9-tritiadodeca-1,6,11-trieno-9-oxido] es un compuesto organosulfurado derivado del ajo, del que se ha demostrado, sistemáticamente, su potencial actividad inhibitoria in vitro e in vivo sobre la mayoría de los hongos causantes de micosis humanas^{4,6,9–12,14,15,19,20,27–33,37,25,26,35}. Este compuesto actúa selectivamente sobre la membrana plasmática inhibiendo la síntesis de fosfatidilcolina, con acumulación de fosfatidiletnanolamina y, en consecuencia, provocando la muerte celular^{28,34}. La histoplasmosis, micosis sistémica endémica con predilección por el sistema macrofágico mononuclear y causada por el hongo dimorfo *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, fue descrita en 1985 como una enfermedad indicadora de sida^{2,18}. Con el advenimiento de este síndrome, su frecuencia se ha incrementado considerablemente convirtiéndose en la micosis respiratoria más frecuente del mundo y la tercera en pacientes con sida^{2,16,22,24}. En Venezuela, esta entidad ocupa el primer lugar entre las micosis profundas^{7,23}.

La terapia para esta micosis es relativamente eficaz, si bien es muy costosa y provoca efectos adversos indeseables^{5,8,13,17,36}, por lo que, la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas es una prioridad. En estudios previos se informó, por primera vez, acerca de la actividad antifúngica del ajoeno sobre un aislamiento de *H. capsulatum*, en fase micelial, utilizando medios de cultivo líquidos y sólidos y diferentes metodologías^{25,33}. Con el fin de corroborar estos hallazgos, en el presente estudio se evaluó el efecto inhibitorio del ajoeno sobre cinco aislamientos clínicos de *H. capsulatum*, en fase micelial, empleando los medios de cultivo líquidos Sabouraud dextrosa (CSD) y RPMI-1640.

Material y métodos

Se utilizaron cinco aislamientos clínicos de *H. capsulatum* provenientes de sangre periférica y médula ósea, de pacientes inmunocomprometidos, del Hospital Universitario de Caracas. Estos aislamientos se identificaron siguiendo la metodología convencional, según las características macro y microscópicas de los cultivos, y se mantuvieron en medio Mycosel, a temperatura ambiente hasta el momento del ensayo.

Los medios de cultivo usados fueron CSD (Oxoid) y RPMI-1640 (Sigma) tamponado con ácido-3-N-morfolinopropanosulfónico (MOPS) 0,165 mol.L⁻¹ y suplementado con glucosa al 2%^{21,25}.

Para preparar los inóculos fúngicos se siguió el procedimiento descrito previamente^{25,26}. El ajoeno fue donado por el Dr. Rafael Apitz-Castro (patente N.º 4665088. Mayo 1987)^{1,3}. Se preparó una solución madre de 8 mg.ml⁻¹, en dimetilsulfóxido (DMSO), a partir de la cual se obtuvieron soluciones de trabajo de 1,25, 2,5, 5, 10 y 20 µg/ml en un volumen de 10 ml²⁵. Como control de crecimiento, para cada aislamiento y medio de cultivo, se utilizó un erlenmeyer que contenía el medio de cultivo y el inóculo sin ajoeno y otro que contenía DMSO y el inóculo.

Los cultivos se incubaron durante 14 días a temperatura ambiente y, en agitación mecánica constante (80 rpm). Las curvas de crecimiento fúngico y la actividad inhibitoria del ajoeno se registraron mediante lecturas turbidimétricas (540 nm) cada 48 h. Se calculó el tiempo de generación (Tg) de los cultivos, sin ajoeno, representando la densidad óptica (DO) sobre una escala semilogarítmica en función del tiempo, y entendiéndose como Tg el tiempo en el cual la DO es 2DO°. La concentración mínima

inhibitoria (CMI) y la concentración inhibitoria 50% (CI₅₀) se calcularon representando las DO en función de las concentraciones de ajoeno²⁵; se consideró efecto fungistático la inhibición del crecimiento fúngico durante los primeros días de incubación, en comparación con el control, y la determinación de la concentración fungicida mínima (CFM) se realizó cinco días después de la culminación del ensayo, a partir de la CMI, según la técnica de subcultivos en placas, y se consideró como la menor concentración de ajoeno que produjo subcultivos negativos o el crecimiento de únicamente dos a tres colonias, en comparación con el control de crecimiento³⁰. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Análisis estadístico

Para comprobar si existían diferencias significativas entre los cinco aislamientos con respecto a los parámetros Tg, CMI, CFM, CI₅₀ y efecto fungistático (EF) se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis, y para evaluar si existía diferencia significativa entre los medios CSD y RPMI con relación a las variables usadas, se aplicó la prueba U de Mann-Whitney. Ambas pruebas se aplicaron con un nivel de significación de 0,05.

Resultados

Curvas de crecimiento y tiempos de generación

En los aislamientos estudiados, se observó que la fase exponencial comenzó entre los tres y siete días, con tiempos de generación de 43 a 67 h, en ambos medios de cultivo (fig. 1 y tabla 1).

Efecto inhibitorio del ajoeno

En CSD hubo inhibición del crecimiento de los aislamientos Hc1, Hc2, Hc4 y Hc5 a partir de concentraciones de ajoeno de 5 µg/ml, mostrando un efecto fungistático cuando se usaron 2,5 µg/ml del compuesto. Las concentraciones de ajoeno \geq 2,5 µg/ml frenaron totalmente el crecimiento del aislamiento Hc3, revelando un efecto fungistático con 1,25 µg/ml (fig. 1A y tabla 1). Los valores de la CMI fueron de 2,5 y 5 µg/ml y de la CI₅₀ de 1,9 a 2,6. La CFM fue de 5 y 10 µg/ml de ajoeno (tabla 1).

En RPMI, las concentraciones de ajoeno \geq 5 µg/ml bloquearon el crecimiento de los aislamientos Hc2, Hc4 y Hc5. Para los aislamientos Hc1 y Hc3 la inhibición se observó con 2,5 y 1,25 µg/ml de ajoeno, respectivamente. En los aislamientos Hc2, Hc4 y Hc5 hubo efecto fungistático con 2,5 µg/ml de ajoeno; en el Hc1 este se observó con 1,25 µg/ml y en el Hc3 este efecto no se evidenció.

Los valores de la CMI fueron de 1,25 a 5 µg/ml, los de la CI₅₀ de 3,8 a 4,3 y los de las CFM, de 5 y 10 µg/ml (fig. 1B y tabla 1).

El diluyente utilizado (DMSO) no ejerció ningún efecto sobre el crecimiento fúngico.

Análisis estadístico

No hubo diferencias significativas al analizar cada uno de los aislamientos con respecto al Tg, EF, CMI, CI₅₀ y CFM ni al comparar ambos medios de cultivo ($p > 0,05$).

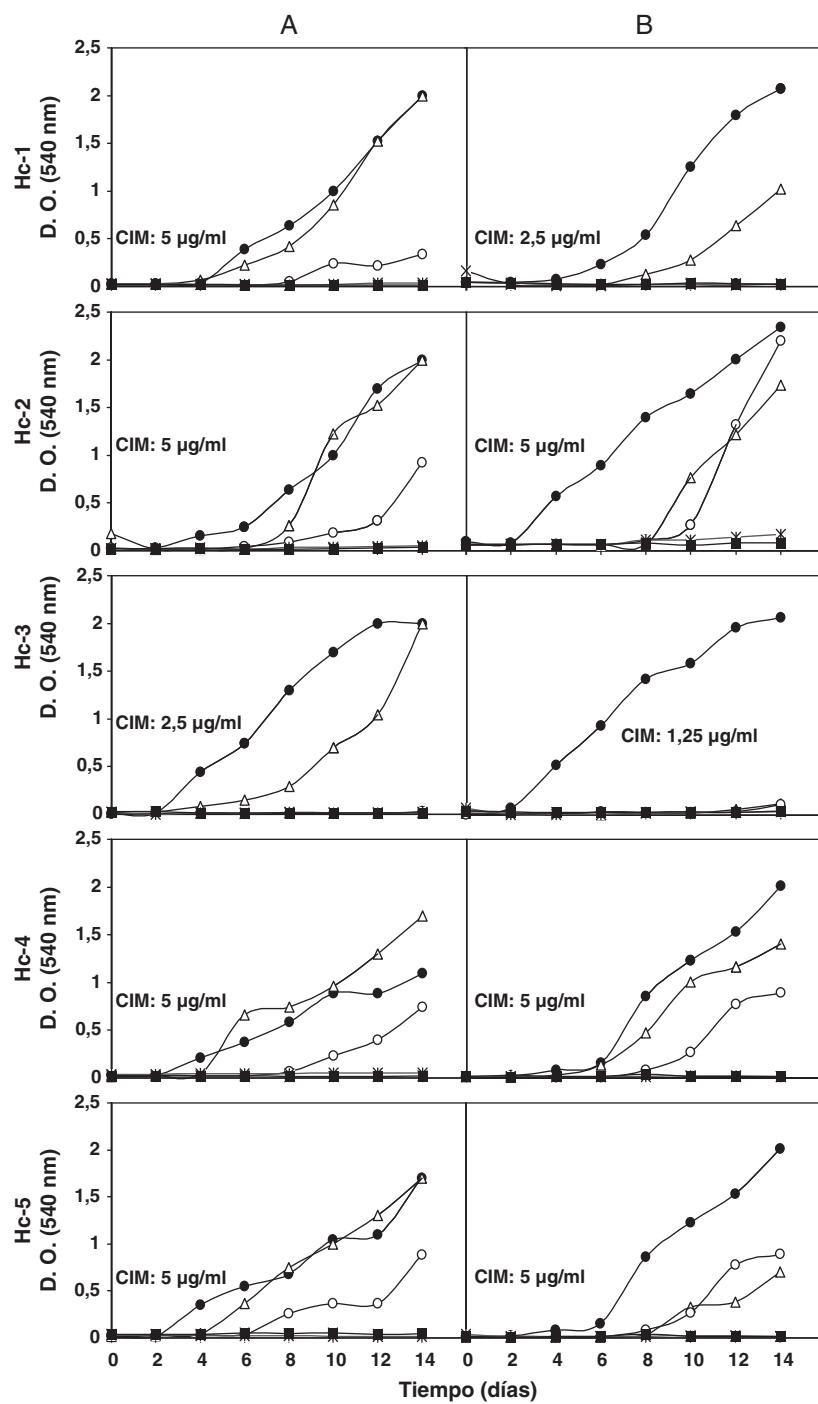


Figura 1. Efecto inhibitorio del ajoeno sobre 5 aislamientos de *H. capsulatum* (fase micelial) en CSD (panel A) y RPMI-1640 (panel B). ● Curva de crecimiento; △ 1,25 µg/ml; ○ 2,5 µg/ml; ✗ 5 µg/ml; ■ 10 µg/ml.

Tabla 1

Parámetros obtenidos en el estudio de la sensibilidad de *H. capsulatum* al ajoeno

Aislamientos	Tg (h)		EF (µg/ml)		Cl ₅₀ (µg/ml)		CFM (µg/ml)	
	SDA	RPMI	SDA	RPMI	SDA	RPMI	SDA	RPMI
Hc1	48	48	2,5	1,25	2,0	3,8	5	10
Hc2	48	43,2	2,5	2,5	2,6	3,9	10	10
Hc3	48	67,2	1,25	0,0	1,9	4,3	5	5
Hc4	48	50,4	2,5	2,5	2,3	3,8	5	10
Hc5	55,2	43,2	2,5	2,5	2,3	3,8	5	10

CFM: concentración fungicida mínima; Cl₅₀: concentración inhibitoria 50%; EF: efecto fungistático; Tg: tiempo de generación.

Discusión

En un reporte previo se informó acerca del efecto inhibitorio del ajoeno sobre un aislamiento clínico de *H. capsulatum* en fase micelial. En base a los resultados que presenta dicho estudio, y conscientes de la necesidad de disponer de nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de la histoplasmosis, el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad inhibitoria del ajoeno en cinco aislamientos clínicos de *H. capsulatum*, en fase micelial, utilizando dos medios de cultivo.

Con relación a las curvas de crecimiento, los Tg obtenidos en ambos medios de cultivo fueron consistentes con los informados previamente²⁵.

El efecto inhibitorio del ajoeno fue dosis dependiente, mostrando un EF y valores de CMI y de Cl₅₀ similares a los observados por Romero et al., al utilizar un solo aislamiento clínico de *H. capsulatum*²⁵, datos que además coinciden con los obtenidos previamente empleando otras metodologías en hongos como *Cryptococcus neoformans*, *Microsporum canis*, *Cladophialophora carrionii*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Scedosporium prolificans* y diferentes especies de *Candida*^{4,14,19,26,29,30,33,35}. Es interesante resaltar que los valores de las CMI fueron considerablemente menores que los obtenidos en otros estudios con *Aspergillus niger*, *Alternaria spp.*, *Fusarium spp.*, *Curvularia spp.* y la fase filamentosa de *Paracoccidioides brasiliensis* y de *Coccidioides immitis*^{27,29,31}. El ajoeno igualmente reveló actividad fungicida (CFM) con valores muy inferiores a los reportados previamente en ensayos con *Alternaria spp.*, *Fusarium spp.*, *Curvularia spp.*, *C. immitis*, *C. carrionii* y *F. pedrosoi*^{29,30,31}.

Los datos aquí recogidos indican que con los medios de cultivo utilizados los resultados fueron similares, puesto que todos los aislamientos presentaron la misma respuesta en relación a los parámetros Tg, EF, CMI, Cl₅₀ y CFM, en ambos medios de cultivo ($p > 0,05$), por lo cual, el CSD podría ser una alternativa para ser usado en ensayos con hongos filamentosos en aquellos laboratorios de escasos recursos, puesto que éste es de menor coste que el RPMI-1640. Por otra parte, se comprueba que el diluente utilizado (DMSO) no ejerció ningún efecto sobre el crecimiento fúngico.

Los resultados que arroja la presente investigación confirman que el ajoeno posee actividad inhibitoria *in vitro* sobre *H. capsulatum*, en fase micelial.

Financiación

Este trabajo se financió por parte del proyecto CDCH-UCV N.º 09-00-7119-2008.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su gratitud a aquellos que de una u otra manera contribuyeron en la realización de este trabajo: al Dr. Axel Santiago, Laboratorio de Micología del Hospital Universitario de Caracas; al Dr. Rafael Apitz-Castro, Laboratorio de Trombosis Experimental-IVIC; a la Profesora Rosaria Ruggiero y al Sr. Pablo Rojas, de la Escuela de Bioanálisis, UCV.

Bibliografía

- Apitz-Castro R, Cabrera S, Cruz MR, Ledezma E, Jain MK. Effects of garlic extract and three pure components isolated from it on human platelet aggregation. *Thromb Res.* 1983;32:155–70.
- Baddley JW, Sankara IR, Rodriguez JM, Pappas PG, Many Jr WJ. Histoplasmosis in HIV infected patients in a southern regional medical center: poor prognosis in the era of highly active antiretroviral therapy. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;62:151–6.
- Block E, Ahmad S, Catalfamo JL, Jain MK, Apitz-Castro R. Antithrombotic organosulfur compounds from garlic: structural, mechanistic and synthetic studies. *J Am Chem Soc.* 1986;108:7045–55.
- Davis SR, Perrie R, Apitz-Castro R. The *in vitro* susceptibility of *Scedosporium prolificans* to ajoene, allitridium and a raw extract of garlic (*Allium sativum*). *J Antimicrob Chemother.* 2003;51:539–97.
- Ellis D. Anfotericina B: spectrum and resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2002;49:7–10.
- González de ME, Mendoza M, Bastardo de AM, Apitz-Castro R. Efectos del ajoeno sobre dermatofitos, *Candida albicans* y *Malassezia furfur*. *Rev Iberoam Micol.* 1998;15:277–81.
- Grupos de Trabajo en Micología. Casuística de las micoses profundas 1984–2008. 24 años de historia. *Bol Inform Las Micosis en Venezuela.* 2009;42: 10–3.
- Kauffman CA. Histoplasmosis. *Clin Chest Med.* 2009;30:217–25.
- Ledeza E, De Sousa L, Jorquerá A, Sánchez J, Lander A, Rodríguez E, et al. Efficacy of ajoene, an organosulphur derived from garlic in short term therapy of *Tinea pedis*. *Mycoses.* 1996;39:393–5.
- Ledeza E, López JC, Marín P, Romero H, Ferrara G, De Sousa L, et al. Ajoene in the topical short-term treatment of *Tinea cruris* and *Tinea corporis* in humans. *Drug Res.* 1999;49:544–7.
- Ledeza E, Maniscalchi MT, Lemos ED. Sinergismo entre ajoeno y ketoconazol en aislamientos de *Microsporum canis*. Un estudio preliminar mediante la determinación de la concentración inhibitoria fraccional (CIF). *Rev Iberoam Micol.* 2008;25:157–62.
- Lemos D, Maniscalchi MT, Ledeza E, Sánchez J, Vivas J, Apitz-Castro R. Susceptibilidad *in vitro* al ajoene de aislados de *Candida albicans*, *C. parapsilopsis* y *C. krusei* obtenidos de pacientes con onicomicosis y su relación con el tratamiento topical. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2004;24:34–9.
- Lumberas C, Lizasoain M, Aguado JM. Antifúngicos de uso sistémico. *Enferm Infect Microbiol Clin.* 2003;21:366–80.
- Maniscalchi MT, Lemos D, Ledeza E, Vivas J, Sánchez L, Apitz-Castro R. Estudio de la susceptibilidad *in vitro* de aislados de *Microsporum canis* al ajoene, terbinafina y griseofulvina, utilizando el método de microdilución. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2004;24:40–5.
- Marcia L, Maluf F, Takahachi G, Terezinha I, Svidzinski E, Xander P, et al. Antifungal activity of ajoene on experimental murine paracoccidioidomycosis. *Rev Iberoam Micol.* 2008;25:163–6.
- Marques SA, Robles AM, Tortorano AM, Tuculet MA, Negroni R, Mendes RP. Mycoses associated with AIDS in the third world. *Med Mycol.* 2000;38:269–79.
- Mocherla S, Wheat LJ. Treatment of histoplasmosis. *Semin Respir Infect.* 2001;16:141–8.
- Mora DJ, Barbosa CT, Silva-Vergara ML. Disseminated histoplasmosis in acquired immunodeficiency syndrome patients in Uberaba, MG, Brazil. *Mycoses.* 2007;51:136–40.
- Oberto-Perdigón L, Romero H, Pérez-Blanco M, Apitz-Castro R. Inmunoanálisis enzimático (ELISA) en la evolución terapéutica de la cromoblastomicosis por *Cladophialophora carrionii* en el área endémica del Estado Falcón, Venezuela. *Rev Iberoam Micol.* 2005;22:39–43.
- Pérez-Blanco M, Hernandez VR, Fernández ZG, Apitz-Castro R. Ajoene and 5-fluorouracil in the topical treatment of *Cladophialophora carrionii* chromoblastomycosis in humans: a comparative open study. *Med Mycol.* 2003;41:517–20.
- Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard. NCCLS document M38-A2. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pensylvania 19087-1898 USA, 2008.
- Restrepo A. Histoplasmosis. En: Restrepo A, Robledo J, Leiderman E, Restrepo M, Botero D, editores. *Enfermedades Infecciosas.* 6.^a ed. Medellín, Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2003. p. 316–26.
- Reviákina V, Panizo M, Dolande M, Selgrad S. Diagnóstico de las micoses sistémicas durante 5 años 2002–2006. *Rev Soc Venez Microbiol.* 2007;27: 112–9.
- Reyes RH, Navarro RP, Sifontes RG, Ríos GK. Micosis como enfermedad del viajero. *Inf Méd.* 2006;8:299–306.
- Romero H, Torres J, Apitz-Castro R. *In vitro* inhibitory effect of ajoene on *Histoplasma capsulatum*. *J Mycol Med.* 2004;14:181–4.
- Romero H, Vivas J, Chalbaud V, Ledeza E, Apitz-Castro R. *In vitro* anti-proliferative effect of ajoene on *Microsporum canis*. *J Mycol Med.* 2000;10: 152–5.
- San-Blas G, San-Blas F, Gil F, Mariño L, Apitz-Castro R. Inhibition of growth of the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by ajoene. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989;33:1641–4.
- San-Blas G, Urbina JA, Marchán E, Contreras LM, Sorais F, San-Blas F. Inhibition of *Paracoccidioides brasiliensis* by ajoene is associated with blockade of phosphatidylcholine biosynthesis. *Microbiology.* 1997;143:1583–6.
- Sánchez-Mirt A, Gil F, Apitz-Castro R. Actividad *in vitro* e *in vivo* del ajoeno sobre *Coccidioides immitis*. *Rev Iberoam Micol.* 1994;11:99–104.
- Sánchez-Mirt A, Gil F, Apitz-Castro R. Efecto inhibitorio y alteraciones ultraestructurales producidas por ajoeno sobre el crecimiento *in vitro* de los hongos dematiáceos: *Cladosporium carrionii* y *Fonsecaea pedrosoi*. *Rev Iberoam Micol.* 1993;10:74–8.
- Singh UP, Pandey VN. Antifungal activity of ajoene, a constituent of garlic (*Allium sativum*). *Can J Bot.* 1980;68:1354–6.
- Thomas L, Apitz-Castro R, Marques AF, Travassos LR, Taborda CP. Experimental paracoccidioidomycosis: alternative therapy with ajoene, compound from

- Allium sativum*, associated with sulfamethoxale/trimethoprim. Med Mycol. 2008;46:113–8.
33. Torres J, Romero H, Apitz-Castro R. Susceptibilidad *in vitro* de *Histoplasma capsulatum* al ajoene usando los métodos de difusión en discos y pozos. Rev Soc Ven Microbiol. 2006;26:42–7.
34. Urbina JA, Marchan E, Lazardi K, Visbal G, Apitz-Castro R, Gil F, et al. Inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis and cell proliferation in *Trypanosoma cruzi* by ajoene, an antiplatelet compound isolated from garlic. Biochem Pharmacol. 1993;22:2381–7.
35. Vivas J, Romero H, Herrmann G, Ledezma E, Apitz-Castro R. *In vitro* antiproliferative effect of Ajoene on *Cryptococcus neoformans*. J Mycol Med. 2002;12:149–51.
36. Wheat LJ, Connolly P, Smedema M, Brizendine E, Hafner R. Emergence of resistance to fluconazole as a cause of failure during treatment of histoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency disease syndrome. Clin Infect Dis. 2001;33:1910–3.
37. Yoshida S, Kasuga S, Hayashi N, Ushiroguchi T, Matsura H, Nakagawa S. Antifungal activity of ajoene derived from garlic. Appl Environ Microbiol. 1987;53:615–7.