

Estudio *in vitro* de la Actividad Antifúngica de un Nuevo Extracto Natural

In vitro Study of the Antifungal Activity from a New Natural Extract

Álvaro Ruiz y Elena Marín

Tutoras:

Carmina Rodríguez y Beatriz C. Conde

Universidad Complutense de Madrid

Resumen

Las infecciones micóticas son actualmente uno de los principales problemas en terapéutica, así como las resistencias emergentes frente a los antifúngicos que han sido efectivos durante las últimas décadas. Los últimos estudios de vigilancia epidemiológica muestran un aumento del aislamiento de otras especies de *Candida* (además de *C. albicans*) en infecciones fúngicas invasoras. Por tanto, es necesario descubrir y desarrollar nuevos antifúngicos selectivos. La búsqueda de nuevos extractos naturales con actividad antifúngica podría constituir una novedosa alternativa terapéutica dada la importancia sanitaria de las candidiasis multirresistentes. En este trabajo se estudia, por primera vez, la actividad antifúngica de un nuevo extracto natural de plantas (EN-06), frente a distintas especies de *Candida* y otros dermatofitos. La potente actividad antifúngica de dicho extracto podría ser utilizada en infecciones mucocutáneas y terapias combinadas.

Palabras clave: extractos naturales, *C. albicans*, dermatofitos, micosis, antifúngicos.

Abstract

Mycotic infections are currently one of the main problems in therapeutics, as well as the emerging resistance to antifungal drugs that have been effective during the last decades. Recent epidemiological surveillance studies show increased isolation of other *Candida* species (in addition to *C. albicans*) in invasive fungal infections. It is therefore necessary to discover and develop new selective antifungal agents. Searching for new natural extracts with antifungal activity, could constitute a new therapeutic alternative due to the health importance of multidrug resistant candidiasis. In this research project we study, for the first time, the antifungal activity of a new natural extract (EN-06), against different species of *Candida* and other dermatophytes. The potent antifungal activity of this extract could be used in mucocutaneous infections and combined therapies..

Keywords: natural extracts, *C. albicans*, dermatophytes, mycoses, antifungal drugs.

Introducción

El hongo dimórfico *Candida albicans* es uno de los patógenos oportunistas de mayor prevalencia e incidencia en pacientes inmunocomprometidos, en los cuales produce tanto infecciones superficiales como sistémicas. Infecta piel, uñas y mucosa orofaríngea y gastrointestinal, además de ser la principal causa de la vaginitis (De la Calle-Rodríguez, 2012). Este microorganismo comensal coloniza las mucosas gastrointestinal y vaginal del 30-70% de los individuos sanos, en los que su crecimiento está controlado por el sistema inmunitario innato (no produciendo enfermedad). Sin embargo, en pacientes con factores predisponentes, infecta los tejidos y mucosas, siendo el responsable de infecciones graves (400.000 casos por año), con una tasa de mortalidad superior al 30% (Hernández-Solís, 2014).

A pesar de la existencia de antifúngicos efectivos, como el Fluconazol para la candidiasis vaginal, orofaríngea y urinaria o el Itraconazol para las onicomicosis (Mensa *et al*, 2016), la mayoría tienen elevado coste, toxicidad o farmacocinética compleja. Por otra parte, la emergencia de cepas resistentes limita en gran medida su utilidad terapéutica o lo hará en un futuro (Organización Mundial de la Salud, 2016). Además de *C. albicans*, otras especies de *Candida* (López-Martínez, 2010) también tienen importancia clínica: *C. glabrata*, *C. parapsilopsis*, *C. krusei* y *C. guilliermondii*, actualmente *Meyerozyma guilliermondii* o *Wick* (Kurtzman y Suzuki, 2010). El aumento de las resistencias puede ser debido al uso excesivo de antifúngicos (azoles, polienos y equinocandinas), lo que favorece el fracaso terapéutico de estas infecciones.

Por tanto, es necesario descubrir y desarrollar nuevos antifúngicos selectivos, aún más teniendo en cuenta que, como microorganismo eucariótico, *Candida* comparte muchas macromoléculas y rutas metabólicas con las células humanas. Todos estos aspectos hacen que las micosis constituyan un problema sanitario grave que ha de ser resuelto.

La búsqueda de nuevos fitocompuestos naturales con actividad antifúngica, podría constituir una novedosa alternativa terapéutica dada la importancia sanitaria de las candidiasis multirresistentes.

Objetivos

Ensayo *in vitro* de la actividad antifúngica de un nuevo extracto natural de plantas, frente a distintas especies de *Candida* y otros hongos filamentosos (*Trichophyton* y *Penicillium*).

Material y métodos

El extracto natural (EN-06) estudiado procede de una planta ampliamente distribuida en zonas templadas y cuyo

origen está protegido por un Acuerdo de Confidencialidad entre los grupos de trabajo implicados en la investigación.

Las cepas fúngicas utilizadas fueron: *Candida albicans* SC5314, *Candida parapsilopsis* ATCC22019, *Candida glabrata* ATCC2001, *Candida krusei* ATCC6258, *Meyerozyma guilliermondii* 43L1-BEA+, *Trichophyton mentagrophytes* (aislamiento clínico) y *Penicillium spp.*

La actividad antifúngica, tiempo de letalidad (mortalidad-tiempo), (Cantón, Pemán, Sastre, Romero, y Espinel-Ingroff, 2006) y viabilidad e integridad celular se confirmaron por recuento en placa. Mediante microscopía óptica, fluorescencia con calcoflúor White M2R, electrónica de barrido (MEB) y de transmisión (MET), se estudiaron las alteraciones morfológicas de necrosis celular.

Resultados y discusión

La actividad antifúngica del EN-06 se evaluó *in vitro* mediante ensayos de macrodilución con distintas concentraciones del extracto natural, en medio Müeller-Hinton, y posterior subcultivo de diluciones 1:6 de los matraces iniciales en matraces con medio fresco. La determinación de la concentración mínima fungicida (CMF) se realizó además mediante ensayo en gotas. No se observó crecimiento de *Candida spp.* a partir del 0,25% del extracto (CMF). El tiempo de letalidad $t_{99,99}=1h$ con 25% extracto y 15 min al 1%, para todos los microorganismos ensayados. Por razones metodológicas y de escalado de los ensayos, éstos se realizaron con EN-06 al 1%.

El estudio de letalidad mostró que el EN-06 presenta una potente actividad antifúngica a los 5 minutos. *C. albicans* desciende 5 unidades logarítmicas (a 5 min de tratamiento) (Figuras 1 y 2; Tabla 1). Análogos resultados se observaron con las especies *C. glabrata* y *C. krusei* (Tabla 1). El EN-06 tiene mayor efecto sobre *C. parapsilopsis* (5 uds. log) y *M. guilliermondii* (6 uds. log) (Tabla 1), siendo esta última la especie más sensible. Es de señalar que esta última especie está descrita como más resistente a antifúngicos (Pappas *et al.*, 2004).

Tabla 1
Actividad antifúngica del extracto (1%), en 5 minutos, expresado como disminución en el número de células viables (en unidades logarítmicas).

Microorganismo	Disminución de la viabilidad (uds. log)
<i>Candida albicans</i>	4,8
<i>Candida krusei</i>	4,6
<i>Candida glabrata</i>	4,3
<i>Candida parapsilopsis</i>	4,9
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	6

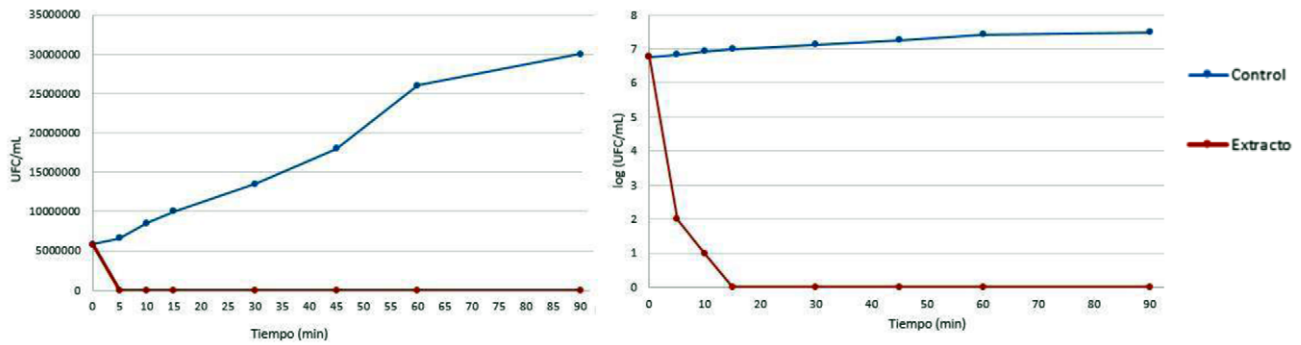


Figura 1. Curva de letalidad para *C. albicans* en presencia del extracto 1%, representando el crecimiento en función del tiempo de ausencia y presencia de EN-06.

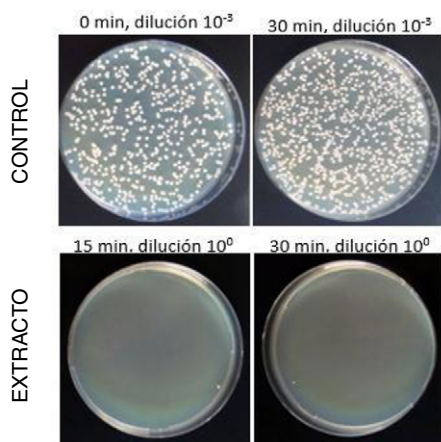


Figura 2. Actividad antifúngica del extracto (1%), sobre *C. albicans*.

Tomando como índice de actividad fungicida la reducción en 3 unidades logarítmicas en el recuento de células viables (Gradelski *et al*, 2001) el EN-06 posee una potente actividad fungicida en cinco minutos (Tabla 1).

El tratamiento con EN-06 (1%, 15 min), produjo una reducción significativa del tamaño celular, así como la clara alteración de la integridad de la pared celular de todas las especies, como se observó al MEB (Figura 4) y al MET (resultados no mostrados). A tiempos superiores se produjo necrosis y lisis celular, tanto en levaduras como en micelio.

Conclusiones

- El nuevo extracto natural tiene una potente y rápida actividad fungicida frente a *Candida spp*, *Trichopyton mentagrophytes* y *Penicillium spp*.
- La acción antifúngica es independiente de la morfología de la levadura-hifa.
- El extracto parece afectar a la ultraestructura de la pared celular, produciendo rápida necrosis y lisis celular.
- La potente actividad fungicida y la ausencia de citotoxicidad, hacen de este nuevo extracto un buen antifúngico natural con potencial aplicación en el tratamiento de candidiasis y otras dermatofitosis.

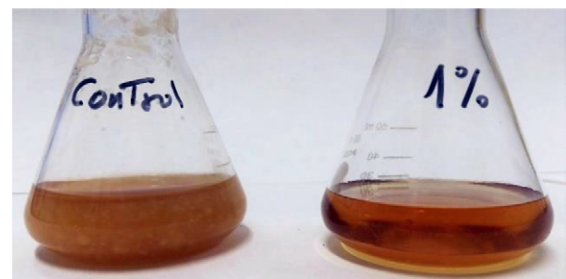


Figura 3. Actividad antifúngica. Macrodilución en medio YPD de *Trichopyton mentagrophytes*; Control y Extracto 1%.

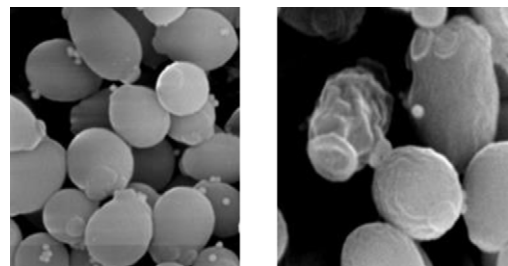


Figura 4. Acción del EN-06 sobre la morfología de *C. albicans*. Micrografía al MEB de *C. albicans*: Control (izq) y Extracto 1%.

Referencias

- Cantón, E., Pemán, J., Sastre, M., Romero, M., & Espinel-Ingroff, A. (2006). Killing kinetics of Caspofungin, Micafungin and Amphotericin B against *Candida guilliermondii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 2829-2832. <http://doi.org/10.1128/AAC.00524-06>
- De la Calle-Rodríguez, N., Santa-Vélez, C., & Cardona-Castro N. (2012). Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *Candida albicans* y hongos dermatofitos. *Revista CES Medicina*, 26, 43-55.

- Hernández-Solís, S. E., Rueda-Gordillo, F., & Rojas-Herrera, R. A. (2014). Actividad de la proteinasa en cepas de *Candida albicans* aisladas de la cavidad oral de pacientes inmunodeprimidos, con candidiasis oral y sujetos sanos. *Revista Iberoamericana de Micología*, *31*, 137-140. <http://doi.org/10.1016/j.riam.2013.09.003>
- Kurtzman, C. P., & Suzuki, M. (2010). Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*. *Mycoscience*, *51*, 2-14. <https://doi.org/10.1007/S10267-009-0011-5>
- López-Martínez, R. (2010). Candidosis, a new challenge. *Clinics in Dermatology*, *28*, 178-184. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2009.12.014>
- Mensa, J., Gatell, J. M., García-Sánchez, J. E., Letang, E., López-Suñé, E., & Marco, F. (2016). Guía de terapéutica antimicrobiana. Barcelona, España: Antares.
- Organización Mundial de la Salud (2016). *Resistencia a los antimicrobianos*. Recuperado de www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/
- Pappas, P. G., Rex, J. H., Sobel, J. D., Filler, S. G., Dismukes, W. E., Walsh, T. J., & Edwards, J. E. (2004). Guidelines for treatment of Candidiasis. *Clinical Infectious Diseases*, *38*, 161-189. <https://doi.org/10.1086/380796>