



Artículo original

Susceptibilidad *in vitro* de *Histoplasma capsulatum* al ajoene usando los métodos de difusión en agar con discos y pozos

Joel Torres^{a,*}, Hilda Romero^a, Axel Santiago^b, Rafael Apitz Castro^c

^aCátedra de Micología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela

^bLaboratorio de Micología, Hospital Universitario de Caracas

^cLaboratorio de Trombosis Experimental, Centro de Biofísica y Bioquímica, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas Caracas - Venezuela.

Recibido 24 de octubre de 2005; aceptado 12 de febrero de 2006

Resumen: Se evaluó la actividad antifúngica de ajoene sobre *Histoplasma capsulatum*, mediante los métodos de difusión en agar con discos (MDD) y pozos (MDP), usando agar Sabouraud dextrosa (SDA) y Müeller-Hinton modificado (MHM). El inóculo fúngico, obtenido de la fase exponencial y ajustado a 0,5 Mac-Farland, se distribuyó (0,2 ml) sobre las placas de agar. Para el MDD, se siguió el protocolo M44-A-NCCLS, con modificaciones; para el MDP, se abrieron pozos de 4 mm y se procedió como en MDD. Se usaron concentraciones de ajoene de 3,75 a 120 µg. Las placas se incubaron a temperatura ambiente y la inhibición se leyó al séptimo y al 16° día. Los ensayos se realizaron por duplicado. El MDD, al séptimo día, reveló inhibición del crecimiento desde 15 µg de ajoene en SDA y desde 30 µg en MHM. Con el MDP, se observó este efecto a partir de 7,5 y 30 µg en SDA y MHM, respectivamente. La disminución de las zonas de inhibición, al 16° día, en ambos métodos, evidenció efecto fungistático de ajoene sobre *H. capsulatum*. Con los resultados obtenidos, se podría considerar que *H. capsulatum* (fase micelial) es sensible a 15 µg de ajoene usando ambos métodos con SDA, y con MHM, a 30 (MDD) y 60 µg (MDP). Ambas metodologías demostraron ser válidas para realizar pruebas de susceptibilidad en *H. capsulatum* utilizando SDA o MHM. Estos resultados abren las puertas para estudios futuros con el fin de ratificar estos hallazgos.

Palabras claves: Ajoene, *Histoplasma capsulatum*, Histoplasmosis, Antifúngicos, Difusión en Agar

In vitro susceptibility of *Histoplasma capsulatum* to ajoene using disk and holes diffusion methods

Abstract: The sensibility of *Histoplasma capsulatum* to ajoene was evaluated through disk (DDM) and holes (HDM) diffusion methods, using Sabouraud dextrose (SDA) and modified Mueller-Hinton (MHM) agars. The fungal inoculum, obtained from the exponential growth phase, was adjusted to 0.5 Mc-Farland and seeded (0,2 ml) on the plates. For DDM, the protocol M44A-NCCLS was followed, with some modifications; for HDM, 4 mm-holes were punched and proceeded as for DDM. Ajoene was used at concentrations from 3.75 to 120 µg. The plates were kept at room temperature and the inhibition was recorded at days seven and 16. All the assays were run by duplicate. On day seven, the DDM using SDA revealed inhibition zones from 15 µg of ajoene and when using MHM, the inhibition was observed from 30µg. With HDM, ajoene inhibited fungal growth from 7.5 µg when using SDA and with MHM, this effect was noticed from 30 µg. Day 16 showed a considerably decrease of the inhibition zones, by both methods, with the two media, which demonstrates a fungistatic effect of ajoene on this fungus. Taking in account these results, it could be considered that *H.capsulatum* (mycelial phase) is susceptible to 15 µg of ajoene by both methods, with SDA and with MHM, to 30 (DDM) and 60 µg (HDM). Both methodologies demonstrated validity to perform sensibility tests with *H.capsulatum*, using both culture media. These promising results justify further research to confirm the findings of the present work.

Keywords: *Histoplasma capsulatum*, Histoplasmosis, Antifungal drugs, Ajoene, Agar diffusion methods

* Correspondencia:
E-mail: joeltorr@yahoo.es

Introducción

El ajoene [(E,Z)-4,5,9-tritriadodeca-1,6,11-trieno-9-oxido], es un compuesto organosulfurado obtenido originalmente del ajo (*Allium sativum*) [1,2]. Su mecanismo de acción está relacionado con la inhibición selectiva de la síntesis de fosfatidilcolina en eucariotes inferiores, conduciendo a la alteración de la composición de la bicapa lipídica, con aumento de la permeabilidad de la membrana citoplasmática y en consecuencia, la muerte celular [3,4,5]. A este compuesto se le ha demostrado, entre otras, actividad antifúngica *in vitro* [5,6,7,8,9,10,11,12,13,14] e *in vivo* [5,6,7,15,16,17,18] y recientemente, Romero y col., [19] reportaron resultados muy prometedores acerca del efecto inhibitorio de ajoene sobre un aislado de *Histoplasma capsulatum*, en medio líquido.

Los métodos de difusión en agar, usados para determinar la sensibilidad de bacterias y levaduras a los agentes antimicrobianos [20,21], constituyen una metodología sencilla, cuyos resultados son fáciles de leer e interpretar y de factible implementación en los laboratorios de rutina en micología, por lo cual sería conveniente contar con herramientas como estas para estudiar la sensibilidad antifúngica de hongos filamentosos.

Debido a que el número de casos de histoplasmosis se ha incrementado considerablemente en pacientes inmunocomprometidos, la relativa ineficacia del tratamiento disponible (anfotericina B y/o azoles), su alto costo y la inexistencia de metodologías estandarizadas para el estudio de la sensibilidad antifúngica de *H. capsulatum* [22,23,24,25,26,27,28], el objetivo de este trabajo fue evaluar, por primera vez, la actividad inhibitoria, *in vitro*, de ajoene sobre *H. capsulatum*, en fase micelial, mediante los métodos de difusión en agar con discos y pozos.

Materiales y Métodos

Microorganismo

Se usó un aislado clínico de *H. capsulatum* (Hc-1206), proveniente de médula ósea de una paciente VIH/SIDA, del Hospital Universitario de Caracas, el cual fue mantenido en fase micelial, en medio mycosel, a temperatura ambiente (TA) hasta el momento del ensayo.

Antifúngico

El ajoene fue sintetizado y purificado según lo reportado previamente [1,2]. De una solución madre (SM) de 8 mg/ml, en dimetil-sulfóxido (DMSO), se prepararon soluciones de trabajo de 250, 500, 1000, 2000 y 4000 µg/ml, en DMSO.

Medios de cultivo

Se emplearon los medios agar Müller-Hinton Modificado (MHM), según lo recomendado por el NCCLS en el documento M44-A [21] y agar Sabouraud dextrosa

(SDA). Se dispensó 20 ml de cada medio en placas de petri de 9 cms de diámetro.

Estandarización del inóculo fúngico

Se siguió la metodología descrita por Romero y col. [19]. Se tomó un trozo del aislado y se transfirió a una fiola que contenía 30 ml de caldo Sabouraud dextrosa (CSD), incubándola por tres días a TA en agitación mecánica constante (80 rpm). Luego se realizaron dos subcultivos en CSD con intervalos de tres días cada uno, utilizando 5 ml del cultivo e incubándolos en las condiciones ya descritas. Al quinto día, el tercer subcultivo se homogeneizó (homogeneizador de tejidos IKA-WERK) y diluyó lo suficiente, con el medio de cultivo, para obtener una turbiedad equivalente al patrón 0,5 en la escala de Mc Farland (94,6% Transmitancia a 540 nm).

Método de difusión con discos (MDD)

Se siguieron las recomendaciones del documento M44-A, NCCLS [21], con las siguientes modificaciones: se distribuyó 0,2 ml del inóculo fúngico estandarizado, en la superficie de las placas de SDA y MHM, con una varilla de vidrio estéril. Transcurridos cinco minutos, se prepararon y colocaron discos de papel de filtro estériles de 4 mm de diámetro (uno en cada placa) y se añadió sobre éstos, 15 µl de cada una de las soluciones de trabajo de ajoene. De esta manera, las concentraciones de ajoene en cada disco fueron de 3.75, 7.5, 15, 30, 60 y 120 µg. En un disco se colocó 15 µl de DMSO sin la droga.

Método de difusión en pozos (MDP)

Las placas de SDA y MHM se sembraron con el inóculo fúngico como lo descrito en el MDD. Luego se abrieron pozos de 4 mm de diámetro (uno en cada placa) y se añadió 15 µl de cada una de las soluciones de trabajo de ajoene. En un pozo se colocó 15 µl de DMSO, sin la droga. Las placas se incubaron por 16 días a TA y los halos de inhibición se leyeron al séptimo y 16° día. Todos los ensayos se realizaron por duplicado. Como control se incluyó una placa de MHM y otra de SDA sembrada con el inóculo fúngico únicamente.

Análisis estadístico

Para comparar los métodos y medios de cultivo se utilizó la prueba de U-Mann-Whitney y para comparar el efecto de las diferentes concentraciones de la droga, se usó la prueba de Kruskal-Wallis, ambas con un nivel de significación $p > 0.05$. Para analizar el efecto de las diferentes concentraciones de la droga, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis con un nivel de significación $p < 0.05$.

Resultados

El efecto inhibitorio de ajoene sobre *H. capsulatum*, usando el MDD en SDA, se evidenció a partir de 15 μg , al séptimo día de incubación, con halos de inhibición de 20 hasta 54 mm de diámetro. Al 16° día, la inhibición del crecimiento fúngico comenzó con 30 μg , con halos de 14 a 28 mm. En el medio MHM, al séptimo día, la inhibición

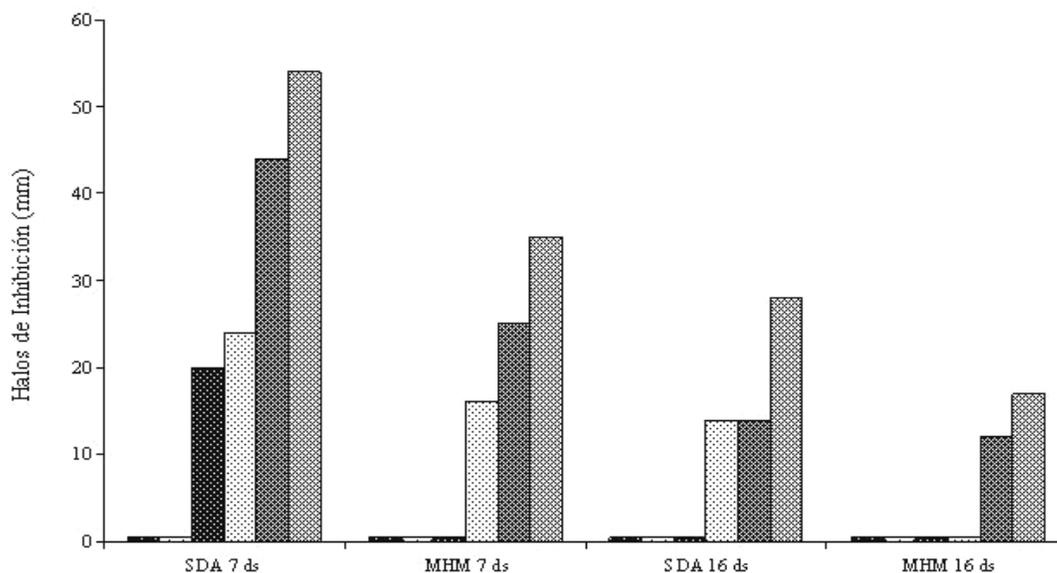


Figura 1. Efecto inhibitorio de ajoene sobre *H. capsulatum*. Método de difusión con discos (DD) en los medios SDA y MHM. ■ 3,75 μg ; □ 7,5 μg ; ▨ 15 μg ; ▩ 60 μg ; ▤ 120 μg .

mostrando halos de 19 a 53 mm de diámetro y al 16° día, la actividad antifúngica fue desde 60 μg , con zonas de inhibición de 16 y 29 mm. En MHM, la lectura del séptimo día evidenció el efecto antifúngico desde 30 μg , con halos de 20 a 58 mm y al 16° día, la actividad antifúngica se observó desde 60 μg de la droga, con zonas de inhibición de 26 y 34 mm (Figura 2).

Como se observa en la figura 3, con el MDD y usando SDA, la inhibición se evidenció a partir de 15 μg de ajoene, mientras que con el MDP fue desde 7,5 μg .

Al usar MHM, tanto en el MDD como en el MDP, el efecto inhibitorio comenzó con 30 μg de ajoene, notando pequeñas diferencias en el tamaño de las zonas de inhibición, de 16 a 35 (MDD) y de 20 a 58 mm (MDP). Al aplicar la prueba de U-Mann-Whitney para comparar los métodos empleados, con ambos medios de cultivo, ésta demostró que no existen diferencias significativas entre ellos ($p > 0.05$). Las figuras 4A y 4B son ejemplos de los resultados obtenidos.

El efecto inhibitorio de la droga fue directamente proporcional a la concentración de la misma, tal como lo demuestra el análisis estadístico Kruskal-Wallis ($p < 0.05$). El DMSO, sin ajoene, colocado tanto en los discos como en los pozos, no ejerció ningún efecto sobre el crecimiento fúngico.

del crecimiento del hongo se observó a partir de 30 μg , con halos de 16 a 35 mm y al 16° día de incubación, la inhibición fue desde 60 μg , con halos de 12 y 17 mm de diámetro (Figura 1).

Al usar el MDP, con SDA, al séptimo día de incubación, ajoene inhibió el crecimiento fúngico a partir de 7,5 μg ,

Discusión

En la búsqueda de alternativas terapéuticas para la histoplasmosis y de una metodología sencilla, reproducible y económica en ensayos de sensibilidad antifúngica *in vitro*, el propósito de este trabajo fue evaluar, por primera vez, la actividad inhibitoria *in vitro* de ajoene sobre *H. capsulatum* en fase micelial, usando los métodos de MDD y MDP en dos medios de cultivos.

Debido a que los métodos de difusión en agar representan una metodología sencilla, cuyos resultados son fáciles de leer e interpretar [20] y de factible implementación en los laboratorios de rutina en micología, en el presente trabajo se ensayó el protocolo descrito en el documento M44-A del NCCLS para levaduras [21], con modificaciones en cuanto a la preparación del inóculo fúngico, el cual se obtuvo de un homogeneizado de la fase exponencial de crecimiento y ajustado al patrón 0,5 Mc Farland, según lo reportado previamente para hongos filamentosos, con resultados altamente satisfactorios [5,9,11,19].

Puesto que los reportes de sensibilidad al ajoene han sido realizados en medios líquidos [4,5,6,8,9,10,11,12,13,14,19], se desconocía si el compuesto difunde en medios sólidos. En el presente trabajo se constató que ajoene difunde en los medios sólidos MHM y SDA, requisito indispensable para la realización de estas pruebas [29].

El efecto de ajoene sobre el crecimiento del hongo fue dosis-dependiente, de acuerdo al análisis estadístico, coincidiendo con lo reportado previamente en pruebas de sensibilidad al ajoene en medios líquidos [5,7,8,9,11,13,19].

El efecto de ajoene sobre el crecimiento del hongo fue dosis-dependiente, de acuerdo al análisis estadístico, coincidiendo con lo reportado previamente en pruebas de sensibilidad al ajoene en medios líquidos [5,7,8,9,11,13,19].

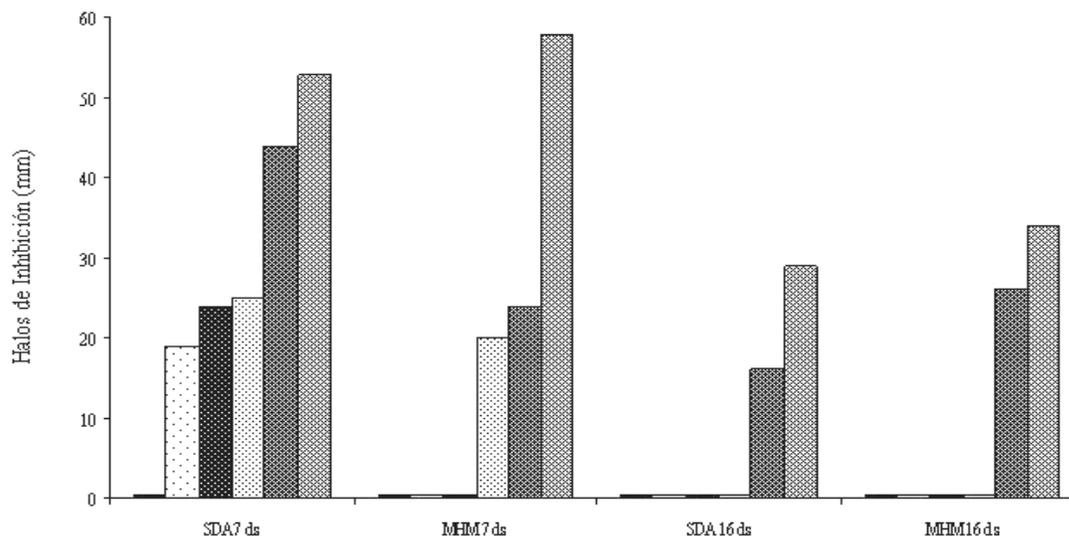


Figura 2. Efecto inhibitorio de ajoene sobre *H. capsulatum*. Método de difusión con pozos (DP) en los medios SDA y MHM.

■ 3,75 µg; ■ 7,5 µg; ■ 15 µg; ■ 30 µg; ■ 60 µg; ■ 120 µg.

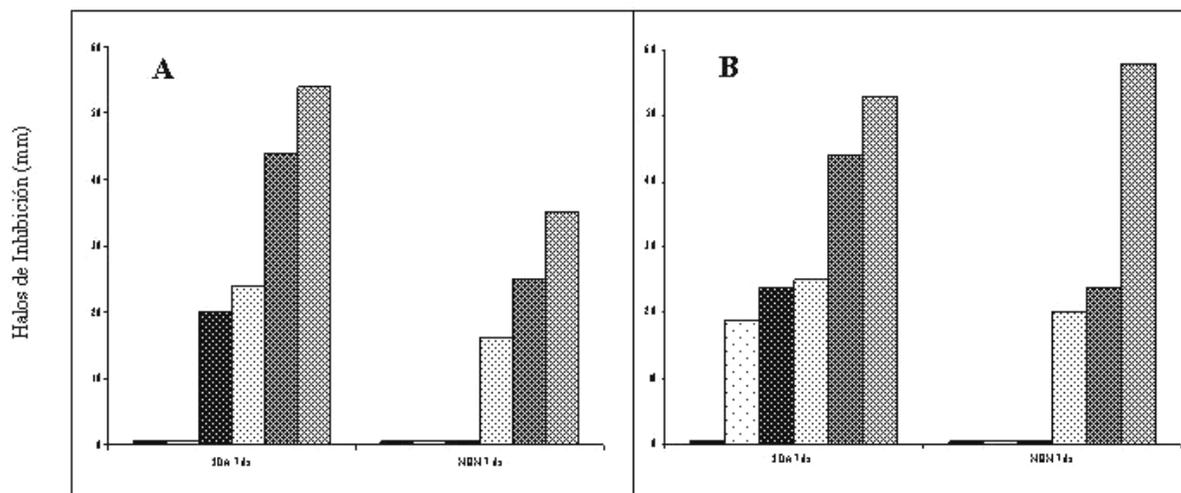


Figura 3.- Efecto inhibitorio de ajoene sobre *H. capsulatum* en los medios SDA y MHM. A) Método de difusión con discos. B) Método de difusión con pozos: ■ 3,75 µg, ■ 7,5 µg, ■ 15 µg, ■ 30 µg, ■ 60 µg, ■ 120 µg.

De acuerdo a los resultados obtenidos y en vista de la inexistencia de una metodología estandarizada para el estudio de la susceptibilidad antifúngica de hongos filamentosos en medios sólidos, se podría considerar que *H. capsulatum* (fase micelial) es sensible (halos de inhibición > 19 mm) a 15 µg de ajoene con ambos métodos, usando SDA como medio de cultivo y a 30 y 60 µg cuando se usa MHM, con los MDD y MDP, respectivamente, demostrando que el efecto inhibitorio de ajoene es mayor cuando se usa SDA, posiblemente debido a una mejor difusión de la droga en este medio.

Las lecturas realizadas al 16° día de incubación mostraron una disminución considerable del diámetro de las zonas de inhibición, independientemente del medio de cultivo utilizado, lo cual indica una actividad fungistática de ajoene sobre *H. capsulatum*, efecto que corrobora lo reportado previamente, usando medios líquidos [19].

En este trabajo solo fue evaluada la fase micelial del hongo y sería interesante estudiar su forma parasitaria, puesto que se ha reportado que la forma de crecimiento utilizada puede influir en los resultados de los ensayos de susceptibilidad antifúngica en hongos dimórficos [30].

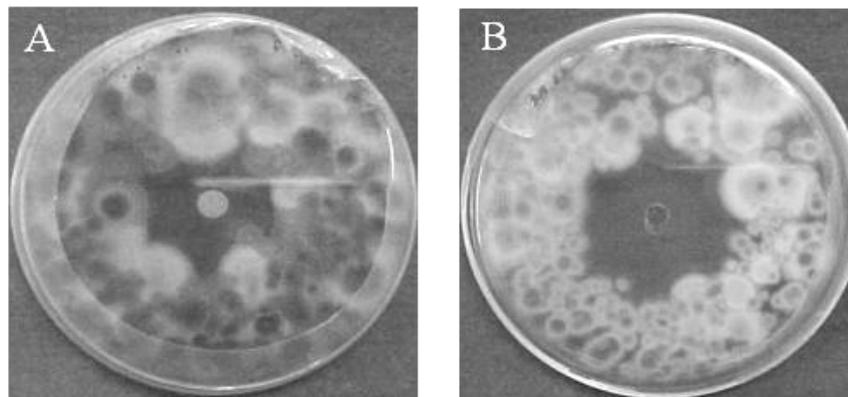


Figura 4.- Efecto inhibitorio de ajoene sobre *H. capsulatum*. Ajoene 30µg. A) Método de difusión con discos. Medio MHM. B) Método de difusión con pozos. Medio SDA.

En conclusión, el análisis estadístico reveló que ambas metodologías demostraron ser válidas para realizar pruebas de sensibilidad de *H. capsulatum* utilizando tanto SDA como MHM, sin embargo, por ser más sencillo y reducir considerablemente los riesgos biológicos a los cuales están expuestos el personal de laboratorio, recomendamos la utilización del MDD.

Finalmente, los resultados de esta investigación son lo suficientemente estimulantes y abren las puertas para estudios futuros incluyendo un número mayor de aislados con el fin de ratificar los hallazgos del presente estudio.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su sincera gratitud al personal de la Cátedra de Micología, a la Prof. Rosaria Ruggiero, de la Cátedra de Matemática y Estadística de la Escuela de Bioanálisis de la UCV y a la Lic. Verónica Marea, por su colaboración en la realización de esta investigación. Trabajo financiado parcialmente por el proyecto CDCH-UCV N° 0912-4911-04.

Referencias

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] Urbina JA, Marchán 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.
- [4] San-Blas G, Urbina J, Marchán E, Contreras L, Sorais F, San-Blas F. Inhibition of *Paracoccidioides brasiliensis* by ajoene is associated with blockade of phosphatidylcholine biosynthesis. *Microbiology* 1997;143: 1583-6.
- [5] Sánchez-Mirt A, Gil F, Apitz-Castro R. Actividad *in vitro* e *in vivo* del ajoene sobre *Coccidioides immitis*. *Rev Iberoam Micol* 1994; 11: 99-104.
- [6] González de ME, Mendoza M, Bastardo de AM, Apitz-Castro R. Efectos del ajoene sobre dermatofitos, *Candida albicans* y *Malassezia furfur*. *Rev Iberoam Micol* 1998; 15: 277-81.
- [7] Lemus D, Maniscalchi MT, Ledezma E, Sánchez J, Vivas J, Apitz-Castro R. Susceptibilidad *in vitro* al ajoene de aislados de *Cándida albicans*, *C. parapsilopsis* y *C. krusei* obtenidos de pacientes con onicomicosis y su relación con el tratamiento tópico. *Rev Soc Ven Microbiol* 2004; 24: 34-9.
- [8] Maniscalchi MT, Lemus D, Ledezma E, Vivas J, Sánchez L, Apitz-Castro R. Estudio de la susceptibilidad *in vitro* de aislados de *Microsporium canis* al ajoene, terbinafina y griseofulvina, utilizando el método de microdilución. *Rev Soc Ven Microbiol* 2004; 24: 40-5.
- [9] Romero H, Vivas J, Chalbaud V, Ledezma E, Apitz-Castro R. *In vitro* antiproliferative effect of ajoene on *Microsporium canis*. *J Mycol Med* 2000; 10: 152-5.
- [10] 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.
- [11] Sanchez-Mirt A, Gil F, Apitz-Castro R. Efecto inhibitorio y alteraciones ultraestructurales producidas por ajoene sobre el crecimiento *in vitro* de los hongos dematiáceos: *Cladosporium carrionii* y *Fonsecaea pedrosoi*. *Rev Iberoam Micol* 1993; 10: 74-8.
- [12] Singh UP and Pandey VN. Antifungal activity of ajoene, a constituent of garlic (*Allium sativum*). *Can J Bot* 1980; 68: 1354- 6.
- [13] 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.
- [14] Yoshida S, Kasuga S, Hayashi N, Ushiroguchi T, Matsura H and Nakagawa S. Antifungal activity of ajoene derived from garlic. *Appl Environ Microbiol* 1987; 53: 615-7.
- [15] 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.
- [16] Ledezma E, De Sousa L, Jorquera A, Sánchez J, Lander A, Rodríguez E *et al*. Efficacy of ajoene, an organosulphur de-

- rived from garlic in short term therapy of Tinea pedis. Mycoses 1996; 39: 393-5.
- [17] Ledezma 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.
- [18] 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.
- [19] Romero H, Torres J, Apitz-Castro R. *In vitro* inhibitory effect of ajoene on *Histoplasma capsulatum*. J Mycol Med 2004; 14: 181-4.
- [20] Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test; Approved standard. 8^o edition. NCCLS document M2-A8. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne. Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
- [21] Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline. NCCLS document M44-A. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne. Pennsylvania 19087-1898 USA, 2004.
- [22] Espinel-Ingroff A, Warnock DW, Vazquez JA, Arthington-Skaggs BA. *In vitro* antifungal susceptibility methods and clinical implications of antifungal resistance. Med Mycol 2000; 38 (supp 1): 293-304.
- [23] Grupos de Trabajo en Micología. Casuística de las micosis profundas 2000-2001. Bol Inform las Micosis en Venezuela 2002:6.
- [24] 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.
- [25] Pabón R, Rivas G, Santiago AR. Casuística de micología (enero 1993 – junio 1998). Sección de Micología, Departamento de Bioanálisis, Hospital Universitario de Caracas (HUC), Caracas, Venezuela. Bol Soc Venez Microbiol 1997; 17: 46.
- [26] Restrepo A. Histoplasmosis. En: Enfermedades Infecciosas 6^o Edición. Restrepo A, Robledo J, Leiderman E, Restrepo M y Botero D (ed). Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín, Colombia. 2003, pp. 316-326.
- [27] Reviákina V, Panizo M, Dolande M, Maldonado B. Micosis profundas sistémicas: casuística del Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" durante 5 Años (1997-2001). Rev Soc Ven Microbiol 2002; 22: 164-8.
- [28] Tewari R, Wheat LJ, Ajello L. Agents of Histoplasmosis. En: Topley & Wilson Microbiology and Microbial Infections. Vol. 4. Medical Mycology. Editado por: Ajello L and Hary RJ. Arnold, Londres 1998. pp 373-393.
- [29] Rodríguez-Tudela J, Rodero L, Cuenca M, Córdoba S. Determinación de la resistencia a los antifúngicos en el laboratorio. IV Curso Hispano-Argentino de Micología Médica. Argentina 2001.
- [30] Nakai T, Uno J, Ikeda F, Tawara S, Nishimura K, Miyaji M. *In vitro* antifungal activity of micafungin (FK463) against dimorphic fungi: comparison of yeast-like and mycelial forms. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 1376-81.