

ALTERACIONES MORFOMÉTRICAS EN CÉLULAS DE *Microsporium canis* EXPUESTAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AJOENE

MORPHOMETRIC ALTERATIONS IN CELLS FROM EXPOSED *Microsporium canis* TO DIFFERENT AJOENE CONCENTRATIONS

DRUVIC LEMUS-ESPINOZA, MARÍA T. MANISCALCHI BADAOLI, ELIADES LEDEZMA

Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui, Escuela de Ciencias de la Salud, Grupo de Investigación de
Micología, Barcelona, Venezuela

E-mail: lemud@yahoo.com / mteresa23@yahoo.com / ledezmae@gmail.com

RESUMEN

De tres cepas de *Microsporium canis* provenientes de pacientes con *Tinea capitis* se extrajeron macroconidias que fueron expuestas durante 13 días consecutivos a concentraciones crecientes de ajoene, entre 1 y 300 μ M, usando el método de microdilución en placa CLSI M38-A2. Las estructuras fueron evaluadas morfológicamente para observar el efecto de este compuesto sobre el hongo. La comparación entre las conidias normales y las expuestas mostraron diferencias morfológicas. Los efectos *in vitro* de ajoene fueron tiempo dependiente, capaces de provocar en los fragoconidios cambios morfológicos drásticos e irreversibles, evidenciados en el notable aumento del espesor de la membrana citoplasmática y en la pérdida de la proporción de los espacios interseptales de las conidias. El ajoene, como agente antimicótico, inhibió el crecimiento conidial, reconocido en microscopia por la deformación de la arquitectura normal de las células. La pérdida de la funcionalidad y viabilidad de las conidias, que se tornaron irregulares, probablemente se encuentran asociadas a alteración de la síntesis de la membrana plasmática e interconidial.

PALABRAS CLAVE: Análisis morfológico, microdilución, *Tinea capitis*.

ABSTRACT

From three strains of *Microsporium canis* isolated from patients with *Tinea capitis*, macroconidia were extracted. These were exposed during 13 consecutive days to growing concentrations of ajoene, between 1-300 μ M, using the microdilution method in plate M38-A2. The structures were monitored morphometrically to observe the effect of this compound on the fungus. The comparison between the normal conidia and those exposed to the compound showed morphologic differences. The *in vitro* effects were time dependent, able to induce drastic and irreversible morphologic changes in the fragoconidia, evidenced in the noticeable increase of thickness of cytoplasmic membrane and in the loss of proportion of the interseptal spaces of conidia. Ajoene, as antimicrobial agent, inhibited conidial growth, which is evidenced under the microscope by the deformation of the normal architecture of cells. The loss of function and viability of conidia, which became irregular, is probably associated to alteration of the synthesis of plasmic and interconidial membrane.

KEY WORDS: Morphometric analysis, microdilution, *Tinea capitis*.

INTRODUCCIÓN

El ajoene tiene efecto antifúngico en diversos géneros de hongos. Esta propiedad farmacológica de este *novo* agente, es capaz de inhibir tanto *in vitro* como *in vivo* el crecimiento y la proliferación de una amplia variedad de hongos vinculados con producción de micosis superficiales, subcutáneas, profundas granulomatosas y sistémicas (Sánchez-Mirt *et al.* 1993, San-Blas *et al.* 1997, González *et al.* 1998, Lemus *et al.* 2004, 2010). *Tinea capitis* es una entidad clínica que se manifiesta con cierta frecuencia en la infancia, *Microsporium canis* es una especie ampliamente descrita como agente causal de esta micosis (Maldonado *et al.* 2003, GTMM 2010). Cuando las muestras de esta patología se observan microscópicamente pueden distinguirse con frecuencia hifas y numerosas macroconidias verrugosas,

fusiformes, de pared gruesa, formando en sus extremos puntiagudos anteriores una curvatura leve hacia un lado, con abundantes tabiques transversales (5 y 7), pudiendo inclusive llegar hasta 15 tabiques. Las microconidias presentes tienden a la forma piriforme, pero pueden faltar, y son de exiguo o nulo valor diagnóstico.

Microsporium (hongo queratinolítico) logra, producir su acción por factores químicos y mecánicos a saber: la deaminación, creando un medio alcalino que prepara el sustrato para la invasión del cabello infectado; adicionalmente se inicia la sulfitolisis que desnaturaliza la superficie, remueve los puentes disulfuro adyacentes y finalmente genera proteólisis, que libera en el epitelio invadido los productos solubles para el hongo (Filipello 2000, Kunert 2000). En la erosión de la superficie del cabello se observará destrucción gradual desde afuera

hacia el centro de la vaina, con la introducción de las hifas por debajo de la capa cuticular. Esta modalidad de invasión de *M. canis* se limita con ajoene. El efecto antiproliferativo ha sido medido *in vitro* e *in vivo* (Maniscalchi *et al.* 2011). Sin embargo, en esos estudios no se destaca la variabilidad en los elementos germinativos. En este trabajo se planteó como objetivo captar el impacto directo en la célula y describir los cambios morfológicos en el hongo sometido a diferentes concentraciones de ajoene.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ajoene se preparó a concentraciones de trabajo de 1, 30, 100 y 300 μM . Las tres cepas de *M. canis* fueron obtenidas de pacientes con diagnóstico clínico y micológico de *Tinea capitis*. Los cultivos se realizaron en agar Sabouraud (BBL, Becton Dickinson) y agar Lactrimel, ambos con cloranfenicol, incubados a temperatura ambiente, por treinta días. Las características de cultivo y la disposición de las estructuras y características de las conidias se usaron para establecer la identificación definitiva. En el cotejo taxonómico se utilizó la clave dicotómica de Hoog *et al.* (2000) confirmado hasta género y especie.

En la preparación del inóculo y las pruebas de microdilución se siguieron los procedimientos recomendados por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI [M38-A2] 2008) para hongos filamentosos, con algunas modificaciones sugeridas por Maniscalchi *et al.* (2004, 2011) y Ledezma *et al.* (2008). El recuento de macroconidios se realizó en cámara hemocitómetro (Brand-0,100 mm) para garantizar la representatividad del inóculo. Se emplearon placas de Elisa fondo plano (Falcon®) con RPMI 1640 suplementado con 2% de glucosa, hasta obtener una concentración entre 1×10^4 y 2×10^4 células/mL. La observación sistemática de las conidias sometidas a crecimiento con ajoene fueron verificadas mediante el empleo de micrómetro digital, Celera Scope®. Se calcularon las medidas de longitud, ancho y área de conidias, junto con mediciones del ancho de pared, en el día cero, cuarto, noveno y decimotercero de incubación. Fueron realizadas también las mismas valoraciones en cepas controles que crecieron sin antifúngico. La fase logarítmica de crecimiento correspondió al día nueve de incubación. Adicionalmente se obtuvo el promedio aritmético de 20 unidades de crecimiento para las medidas, por cepa y los datos fueron tabulados mediante el uso del paquete estadístico SPSS versión

11.0 para Windows, el estadístico *t* de student, en caso de concentraciones y características morfológicas.

RESULTADOS

Las cepas de *M. canis* aisladas mostraron macroconidias entre 55,62 y 69,51 μm de largo y entre 8,44 y 10,39 μm de ancho, todas presentaron cinco lóculos transversales. El diámetro de la pared celular de la conidia en promedio fue de 0,96 μm . Destacaron las células en forma en huso, de doble pared, ligeramente dobladas hacia su porción proximal, con terminación afilada, todas exhibían escasa ornamentación con espículas equinuladas recubriendo parte de la gruesa pared celular. Las concentraciones de ajoene comenzaron a tener acción sobre las conidias alrededor del cuarto día de incubación, el primer cambio notorio se generó con 30 μM , el cual consistió en leve incremento del grosor de la membrana plasmática. Ajoene a 100 μM y 300 μM , al noveno y décimo tercer día de incubación, produjeron efectos sobre el largo y ancho de la conidia, así como también se observó variaciones en el número de septos, grosor de la membrana citoplasmática y de la pared celular. En la Tabla 1, se presentan los valores medios con sus desviaciones estándar. Se infiere que las variaciones dimensionales obtenidas en la estructura fúngica empleando ajoene a concentraciones de 1 μM fueron poco significativas ($p > 0,05$) y similares a las del control, inclusive hasta el octavo día de incubación.

Al cuarto día, con ajoene a 30 μM , se observó marcada afectación del aparato conidial. En este caso las esporas exhibieron múltiples puntos de iniciación polar (no cuantificadas), tipo inclusiones a nivel de los compartimientos septales, así como pérdida en la proporción normal de éstos. En las conidias se demostró marcado desorden en la periferia de la pared celular. En las concentraciones más altas de ajoene (100 y 300 μM), se observó disminución del largo de las conidias, aumento del diámetro de la célula y engrosamiento de la pared celular (Fig. 1). Al noveno día de incubación con ajoene 30 μM se pudo observar moderado número de conidias ligeramente hinchadas. En el caso de ajoene 100 y 300 μM , para este día de incubación, se demostró ausencia de proliferación micelial y en las escasas células presentes se duplicó el grosor inicial de la membrana citoplasmática con respecto al día cero, hasta hacerse notoria una fractura que propicia la lisis de las paredes adyacentes, en células ya apreciablemente degeneradas. Se constató, además, que los septos dejan de ser unidades individuales sólidas.

Tabla 1. Alteraciones morfométricas en conidias de tres cepas de *Microsporium canis* sometidas a diferentes concentraciones de Ajoene.

Conidias	Día 1, Ajoene [µM]				Día 4, Ajoene [µM]				Día 9, Ajoene [µM]				Día 13, Ajoene [µM]				
	1	30	100	300	1	30	100	300	1	30	100	300	1	30	100	300	
Largo †	55,62 ± 8,07	49,34 ± 9,63	48,65 ± 0,42	49,36 ± 9,62	56,92 ± 9,57	52,45 ± 9,76	48,34 ± 10,31	49,65 ± 8,92	49,61 ± 9,73	65,15 ± 5,91	63,25 ± 3,09	54,53 ± 7,17	49,04 ± 8,72	48,33 ± 9,82	69,51 ± 4,91	68,25 ± 11,15	58,25 ± -
Ancho †	10,39 ± 0,68	10,02 ± 0,99	10,29 ± 0,67	9,93 ± 1,16	10,29 ± 0,65	11,09 ± 0,63	11,15 ± 0,95	11,49 ± 0,87	10,59 ± 1,01	9,81 ± 0,70	9,98 ± 0,79	10,39 ± 0,42	12,87 ± 1,52	13,25 ± 0,83	8,44 ± 0,95	8,64 ± 1,05	10,83 ± 2,31
Espesor de la pared †	0,95 ± 0,07	0,93 ± 0,05	1,00 ± 0,06	0,99 ± 0,07	0,97 ± 0,05	1,01 ± 0,04	0,99 ± 0,06	1,12 ± 0,06	1,11 ± 0,05	0,96 ± 0,06	0,97 ± 0,06	1,01 ± 0,05	1,81 ± 0,13	2,13 ± 0,24	0,99 ± 0,05	1,03 ± 0,25	1,52 ± 0,43
Número de septos ‡	5 ± 2	5 ± 2	5 ± 2	5 ± 2	5 ± 2	5 ± 2	5 ± 2	5 ± 2	5 ± 2	5 ± 2	5 ± 2	5 ± 1	4 ± 1	3 ± 2	6 ± 1	6 ± 1	4 ± 2

[0]: Medio RPMI sin ajoene; †, Valores de media (medidas en µm) ± desviación estándar; ‡, Valores de media ± desviación estándar

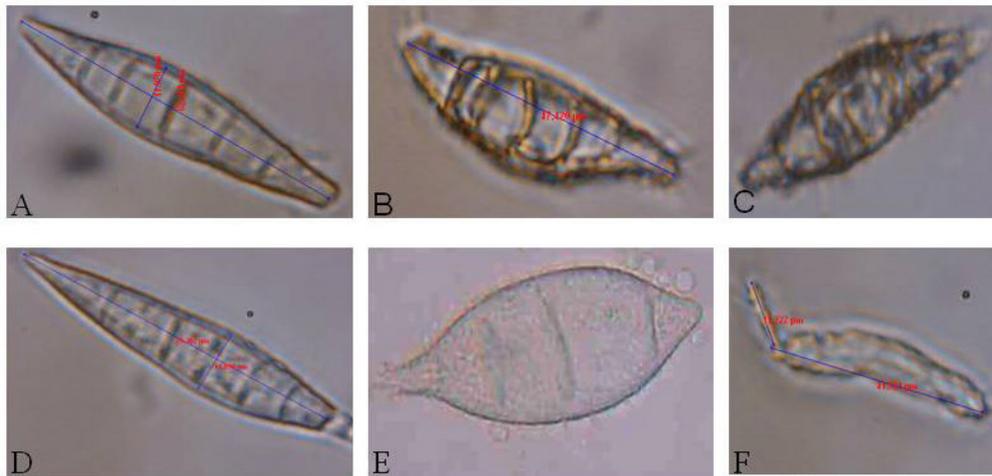


Figura 1. Microfotografías 400X. Evolución de cambios morfométricos control, 100 μM y 300 μM de ajoene. Panel superior (A-C) Macroconidias de *Microsporium canis* al día 9 de incubación. (D-F). Macroconidias de *Microsporium canis* al día 13 de incubación. Día 9: (A) Pozo control sin antifúngico, (B) ajoene 100 μM , (C) ajoene 300 μM . Día 13: (D) Pozo control sin antifúngico, (E) ajoene 100 μM , (F) ajoene 300 μM .

Para el treceavo día, se observó ligero engrosamiento de la pared celular (0,10 μm). Por el contrario, al comparar la concentración con 30 μM , 100 μM y 300 μM , durante todo el periodo de exposición al ajoene, se evidenciaron variaciones considerables, en cuanto al ancho de la pared celular y los espacios interseptales de las células. Todos los cambios fueron irreversibles en las estructuras. Las evidencias ópticas de las macroconidias *in vitro* de *M. canis* sin tratamiento demostraron que son gruesas, equinuladas y bien desarrolladas. Ajoene provocó alteración en la forma normal del conidio, alterando la pared (hacia la zona media basal) dando una estructura relativamente angosta con rugosidades, fuertemente refringentes y con aspecto granuloso. En la adyacencia de la pared se observó acúmulo de material deformando en el cuerpo de la macroconidia. La forma de la conidia, en las células controles, era fusiforme. Con ajoene, en la estructura angular se observó protuberancia en forma de bulbo vesiculoso con dehiscencia localizada. En los pozos con ajoene 100 y 300 μM , no se encontraron células fúngicas formadas, observándose restos que, presumiblemente, correspondían con macroconidias degeneradas.

DISCUSIÓN

En el estudio realizado, se observaron efectos tiempo y dosis-dependiente, a medida que la concentración de ajoene aumentó, provocando cambios morfométricos drásticos en el hongo. La disminución gradual de la turbidez en función del tiempo, en los pozos que contenían concentraciones ascendentes de ajoene, fue

indicativo del efecto antiproliferativo. Es bien conocido que ajoene, sustancia secundaria de la alicina, tiene actividad biológica eficaz contra hongos *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida* sp, y *Paracoccidioides brasiliensis*, entre otros. El mecanismo de acción parece inducir alteración ultra estructural en la membrana plasmática asociadas con modificación drástica en la composición fosfolipídica con incremento en el contenido relativo de los esteroides. La inhibición de la biosíntesis de fosfatidilcolina, por actividad del ajoene, provoca alteración eficaz de los ácidos grasos esterificados en la membrana por exceso de lípidos libres. Aunado al mecanismo anterior, parece probable que ajoene causa inhibición de la enzima glutatión reductasa, fundamental en la regulación de la carga oxidativa de la célula (Ledezma *et al.* 1998, Romero *et al.* 2000).

Concentraciones superiores a 30 μM sobre las conidias de las cepas de *M. canis* evaluadas, reflejaron cambios en los septos, inicialmente gruesos; con tendencia a desaparecer por ruptura de la lámina interna. Esta alteración en su naturaleza posiblemente modificó la semi permeabilidad y la función de compartimientos de estas estructuras; que en principio pudiera interpretarse como la entrada irregular del contenido citoplasmático en los espacios septales, en respuesta al marcado cambio de presión sufrido en las capas interna y externa que forman el septo modificado por el ajoene. Los fragmoconidios, así afectados por ajoene, se transforman en células amorfas de aspecto cristaloides, generadas probablemente por la precipitación de algunas proteínas cuando ajoene interfiere en el metabolismo redox del hongo (Ledezma

y Apitz-Castro 1998, Ledezma *et al.* 2008). En este sentido, en microscopía óptica se han citado cambios en las levaduras del género *Candida*, con concentraciones de ajoene entre 30 y 300 μ M; documentándose alteración de hifas y blastoconidias y con protuberancias e hinchamientos, en apariencia granular, sugestiva de colapso localizado (Lemus *et al.* 2004). Esa apariencia granular en *Candida* fue semejante a la evidenciada en estas cepas de *M. canis*.

Las rugosidades refringentes observadas se asocian con desorganización del material fibrilar en la membrana plasmática que forma parte de los septos, y una ondulación por cambio de presión osmótica en el sistema de membranas que articulan la pared celular. Este fenómeno concuerda con otros hallazgos en levaduras e inclusive en hongos dematiáceos (*Cladosphialophora carrionii* y *Fonsecaea pedrosoi*) donde se evidenció respuesta similar a la aquí presentada (Sánchez-Mirt *et al.* 1993). En estudios ultraestructurales de hongos patógenos donde fue aplicado ajoene (San Blas *et al.* 1991), los resultados son consistentes al señalar que este compuesto modifica la fluidez de la membrana citoplasmática y como consecuencia de ello, inducen alteraciones de la pared celular. Los antimicóticos como anfotericina B y los azoles, actúan a nivel de la membrana, sin seleccionar entre el ergosterol característico de la membrana fúngica y el colesterol de los mamíferos, lo cual produce severos problemas de toxicidad para los pacientes. El mecanismo de acción de ajoene parece ser más selectivo (Sánchez-Mirt *et al.* 1993). Considerando estos aspectos, ajoene resulta fundamentalmente tóxico en *M. canis*, ya que actúa de manera estricta en la ruta metabólica de Greemberg, que es, predominante en la síntesis de fosfatidilcolina de estos eucariotes inferiores; sin afectar a los eucariotes superiores, asegurando de esta manera la ausencia de efectos adversos que limiten su utilidad. Esta característica favorece el desarrollo de nuevas formulaciones para ser aplicadas en el tratamiento de este tipo de dermatofitosis (Ledezma *et al.* 2008).

CONCLUSIONES

Ajoene inhibió significativamente el crecimiento del hongo. La máxima inhibición ocurrió a los 13 días de exposición. El compuesto mostró potente actividad antiproliferativa y fungicida en la fase logarítmica contra todos los aislados autóctonos de *M. canis*. Las alteraciones observadas *in vitro* produjeron células irreversiblemente irregulares en forma y tamaño. Se demuestra que las alteraciones morfológicas son anomalías resultantes de la desorganización excesiva y lisis celular inducida por el mecanismo de acción selectivo de ajoene.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CLSI (CLINICAL LABORATORY STANDARD INSTITUTE). 2008. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of filamentous fungi. Approved Standard-Second Edition. Document M38-A2. Wayne, Pennsylvania, USA.
- FILIPELLO V. 2000. Keratinophilic fungi: their role in nature and degradation of keratinic substrates. *En: Kushwaha RKS, Guarro J. Eds. Biology of dermatophytes and others keratinophilic fungi.* Bilbao, Rev. Iberoam. Micol. 86-92.
- GONZÁLEZ M, MENDOZA M, ALBORNOZ M, APITZ-CASTRO R. 1998. Efectos del ajoeno sobre dermatofitos, *Candida albicans* y *Malassezia furfur*. *Rev. Iberoam. Micol.* 15(4):277-281.
- GTMM (GRUPOS DE TRABAJO EN MICOLOGÍA MÉDICA). 2010. Casuística nacional de las micosis superficiales y profundas. *Bol. Inf. Micosis Venez.* 36:4-5.
- KUNERT J. 2000. Physiology of keratinophilic fungi. *En: Kushwaha RKS, Guarro J. Eds. Biology of dermatophytes and others keratinophilic fungi.* Bilbao, Rev. Iberoam. Micol. 77-85.
- HOOG G, GUARRO J, GENE J, FIGUERAS M. 2000. Atlas of clinical fungi. 2^{da} edition, Universitat Rovira. Barcelona, España, 1126 pp
- LEDEZMA E, APITZ-CASTRO R. 1998. Del folklore al mecanismo molecular: el ejemplo del ajoene. *Interciencia.* 23(4):227-231.
- LEDEZMA E, MANISCALCHI MT, LEMUS-ESPINOZA D. 2008. Sinergismo entre ajoene y ketoconazol en aislamientos de *Microsporium canis*. Un estudio preliminar mediante la determinación de la concentración inhibitoria fraccional. *Rev. Iberoam. Micol.* 25(3):157-162.
- LEMUS-ESPINOZA D, MANISCALCHI MT, LEDEZMA E, SÁNCHEZ J, VIVAS J, APITZ-CASTRO R. 2004. Susceptibilidad *in vitro* al ajoene de aislados de *Candida albicans*, *C. parapsilosis* y *C. krusei* obtenidos de pacientes con onicomicosis y su relación con el tratamiento tópico. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 24(1-2):26-28.
- LEMUS-ESPINOZA D, MANISCALCHI MT, LEDEZMA E,

- SÁNCHEZ J, APITZ-CASTRO R. 2010. Ajoene más itraconazol en la terapia combinada de un caso de onicomiosis. *Saber*. 21(3):108-113.
- MALDONADO B, DOLANDE M, PANIZO M, REVIKINA V. 2003. Casuística de micosis superficiales en seis años (1996-2001) en el Dpto. de Micología del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". *Bol. Venez. Infectol.* 14(1):46-48.
- MANISCALCHI MT, LEMUS-ESPINOZA D, LEDEZMA E, VIVAS J, SÁNCHEZ J, APITZ-CASTRO R. 2004. 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.* 24(1-2):40-45.
- MANISCALCHI MT, LEDEZMA E, LEMUS-ESPINOZA D. 2011. *Tinea capitis*: ajoene, una alternativa de terapia tópica en micosis superficiales. Editorial Académica Española. Barcelona. Primera edición. pp. 33-35.
- ROMERO H, VIVAS J, CHALBAUD V, LEDEZMA E, APITZ-CASTRO R. 2000. *In vitro* antiproliferative effect of ajoene on *Microsporum canis*. *J. Mycol. Med.* 10(3):152-155.
- SAN-BLAS G. 1991. Antibióticos antifúngicos: Hacia la búsqueda de antibióticos selectivos. *Rev. Ibero. Micol.* 8:24-34.
- SAN-BLAS G, URBINA JA, MARCHAN E, CONTRERAS LM, SORAIS F, SAN-BLAS F. 1997. Inhibition of *Paracoccidioides brasiliensis* by ajoene is associated with blockade of phosphatidylcholine biosynthesis. *Microbiology*. 143(Pt 5):1583-1586.
- SÁNCHEZ-MIRT A, GIL F, APITZ-CASTRO R. 1993. 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.* 10:74-78.