

ACTIVIDAD CONTRA HONGOS CAUSANTES DE MICOSIS SUBCUTÁNEAS (*Sporothrix schenckii* y *Fonsecaea pedrosoi*) DE 12 ESPECIES VEGETALES DE USO MEDICINAL EN GUATEMALA

Isabel Gaitán, Nancy Del Cid, Ana Margarita Paz y Armando Cáceres
Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia,
Universidad de San Carlos de Guatemala.

RESUMEN

Las micosis subcutáneas son afecciones que se adquieren por un traumatismo en la piel con material infectado, produciéndose una lesión en el sitio de inoculación, como en el caso de la cromoblastomicosis producida por *Fonsecaea pedrosoi* o bien, se disemina por vía linfática como la esporotricosis producida por *Sporothrix schenckii*. El diagnóstico se lleva a cabo mediante el examen en fresco del material de la lesión y se confirma con cultivo. Los tratamientos difieren enormemente, para la primera, consiste en procedimientos quirúrgicos invasivos y en drogas poco selectivas y tóxicas; para la segunda se utiliza el yoduro de potasio y la anfotericina B, los cuales, a pesar de su efectividad, producen efectos secundarios severos que son a veces irreversibles. Por lo tanto la búsqueda de actividad antifúngica en productos naturales es una alternativa para el desarrollo de nuevos tratamientos contra estas micosis.

Se investigó la actividad antifúngica de 17 extractos, de 12 plantas usadas medicinalmente en Guatemala, principalmente para el tratamiento de afecciones dérmicas. Cepas de ambos hongos se cultivaron y luego se estableció un bioensayo *in vitro*, adaptando el método para hongos filamentosos descrito por Brancato & Golding modificado por MacRae *et al.*, estandarizado para una prueba de tamizaje (1 mg/mL) y para determinar la concentración inhibitoria mínima.

Se demostró actividad en concentraciones <1 mg/mL en 12 especies, sobresaliendo *Lippia graveolens* quien demostró actividad contra ambos hongos y *Valeriana prionophylla* con una actividad de 0.025 mg/mL. Mediante procedimientos de fraccionamiento biodirigido corresponde ahora aislar y caracterizar las moléculas responsables de la actividad, para iniciar sus estudios farmacodinámicos y mecanísticos que permitan proponer un tratamiento útil contra estas patologías poco estudiadas.

INTRODUCCIÓN

Las micosis subcutáneas son enfermedades infecciosas crónicas cuyos tratamientos disponibles no son tan efectivos como se quisiera.

La esporotricosis es una micosis que puede afectar tejido cutáneo o subcutáneo, diseminarse a vasos linfáticos adyacentes y afectar distintos órganos internos. Es causada por el hongo dimórfico *Sporothrix schenckii*, el cual se encuentra distribuido ampliamente en la naturaleza, con focos endémicos alrededor del mundo (1). (Figura 1) En Guatemala es la micosis subcutánea más importante (2-5). Los medicamentos de elección utilizados para su tratamiento son el yoduro de potasio en esporotricosis cutánea y la anfotericina B en los casos de esporotricosis pulmonar y diseminada. Aunque son muy efectivos, dichos fármacos provocan efectos secundarios muy agresivos y pueden llegar a dañar otros órganos por su prolongado tiempo de administración (6-11).

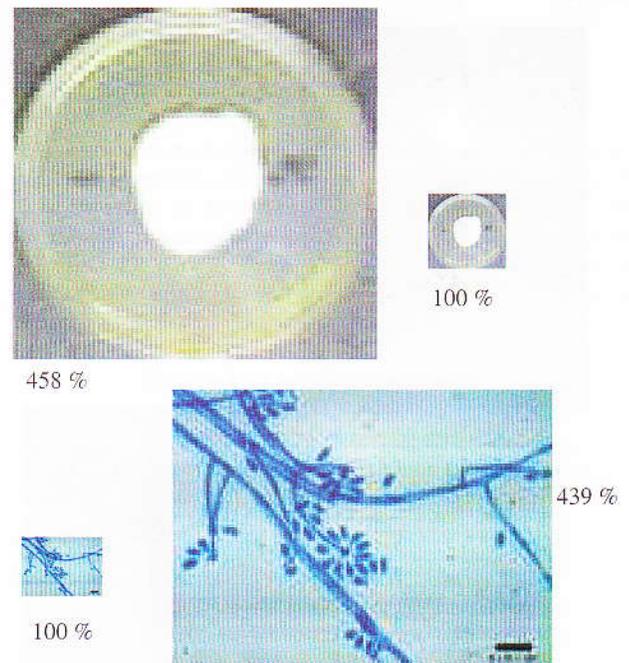


Figura 1. Crecimiento *in vitro* de *Sporothrix schenckii*

La cromoblastomicosis es una micosis subcutánea que resulta de la implantación traumática del hongo en la piel. También se le conoce como dermatitis verrucosa por el aspecto de sus lesiones y está limitada al tejido cutáneo y subcutáneo. Presenta una hiperplasia caracterizada por la formación de verrugas y nódulos cutáneos. Está confinada especialmente a piernas y pies, pero puede presentarse en manos, orejas, pecho, abdomen y otras superficies. Es causada por hongos saprófitos del suelo (1,6), en Guatemala el único agente descrito es *Fonsecaea pedrosoi* (4). Su diagnóstico se basa en las características clínicas de la lesión y en el análisis micológico (1). El tratamiento consiste en procedimientos invasivos quirúrgicos y en drogas poco selectivas como la anfotericina B, sola o en combinación con 5-fluorocitosina y otras drogas que están siendo estudiadas actualmente (1,12-22).

Como las enfermedades fúngicas han ido en aumento y los fármacos no son completamente efectivos, aparte de ser tóxicos, se requiere una intensa búsqueda en la naturaleza de nuevas alternativas de tratamiento. El uso de plantas medicinales para el tratamiento de ciertas enfermedades ha sido una práctica desarrollada a lo largo de la historia. En la actualidad se busca que las plantas no sólo sean materia prima para el tratamiento de enfermedades, sino que sirvan como modelo para la producción de medicamentos sintéticos con la identificación estructural de sus componentes químicos activos que le confieren su propiedad curativa. Estudios previos realizados por nosotros han demostrado la actividad contra dermatofitos causantes de micosis cutáneas (23-24).

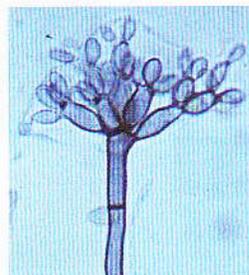


Figura 2: Crecimiento *in vitro* de *Fonsecaea pedrosoi*

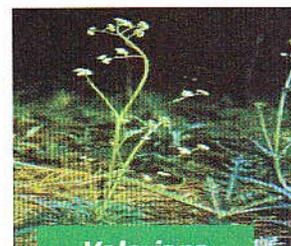
El objetivo del estudio fue la búsqueda de actividad contra los hongos subcutáneos, aprovechando la amplia diversidad botánica de la región y usando un bioensayo estandarizado con hongos no estudiados previamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de las plantas

La selección de las plantas se realizó con base en los criterios: primero, plantas de uso medicinal reportado con enfermedades cutáneas sugestivas de micosis; y segundo, plantas de las cuales no se tiene registro de actividad antifúngica, pero que poseen propiedades antibacterianas o antiparasitarias que hacen efectivas en el tratamiento de otras afecciones.

Las plantas seleccionadas fueron: hoja de *Cornus pyramidata* L (flor lila); hierba de *Hypericum uliginosum* H (mil flores); hoja de *Lippia graveolens* HBK (orégano); tallo de hoja de *Quercus crispifolia* Trelease (encino); hoja/flor de *Salvia lavanduloides* HBK (salvia de monte); hoja de *Senna alata* L (barajillo); hoja, tallo, raíz y fruto de *Smilax domingensis* W (zarzaparrilla); hoja de *Solanum americanum* Miller (macuy); y corteza de *Sterculia apetala* Jacq (castaño); hoja de *Tabernaemontana rosea* Bertol (matilisguate); tallo de *Tithonia diversifolia* H (mirasol) y raíz de *Valeriana prionophylla* Standl (valeriana) (Figura 3).



**Valeriana
prionophylla**



**Lippia
graveolens**

Figura 3: Plantas con actividad biocida

Obtención de extractos

Los extractos etanólicos fueron proporcionados por el Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología, los cuales se obtuvieron por percolación y concentración en rotavapor de material de la planta seca.

Establecimiento de los bioensayos

Se utilizaron tres aislamientos de ambos hongos provenientes de muestras clínicas de pacientes, los cuales fueron proporcionados por el Servicio de Micología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos. Se evaluaron las curvas de crecimiento de ambos hongos a 25°C y en vista que las tres cepas tuvieron un crecimiento similar y un mismo patrón de antibióticos, se escogió la cepa de cada especie que tuvo mejor desarrollo.

Evaluación de la actividad antifúngica

Para la evaluación de la actividad antifúngica se adaptó el método para hongos filamentosos descrito por Brancato y Golding (23) modificado por MacRae *et al.* (24). El procedimiento brevemente consiste en preparar cajas de Petri con una concentración de 1 mg/mL del extracto en agar Sabouraud, perforar cuatro agujeros equidistantes, inocular una suspensión de 3×10^4 esporas obtenida en medio Takashio e incubar a 25°C (25).

En el ensayo se utilizó como control positivo agar Sabouraud con anfotericina B (1 mg/mL) y como control negativo agar Sabouraud con etanol al 50%. Para cada ensayo se realizaron ocho repeticiones (25-26). Para la CIM se hicieron ensayos similares pero usando concentraciones decrecientes del extracto a partir de 1 mg/mL (Figura 4).

La concentración inicial para el tamizaje de la actividad fue una concentración de 1 mg/mL. Se determinó como actividad positiva aquellos extractos en los que hubo ausencia de crecimiento del hongo y se consideraron negativos aquellos en los que se presentó crecimiento. Los datos fueron tabulados y analizados. Fue aplicada la prueba de hipótesis binomial tanto en el tamizaje inicial, como en la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) ($p=0.038$; 96.2% de confiabilidad).

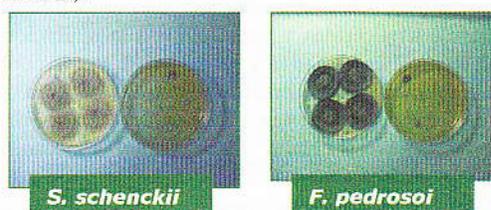


Figura 4: Control positivo y negativo del bioensayo antifúngico.

RESULTADOS

Obtención de extractos

El porcentaje de rendimiento fue calculado con base en los gramos de extracto obtenidos y el peso del material vegetal seco, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Extractos de plantas seleccionadas para el tamizaje antifúngico contra *Sporothrix schenckii* y *Fonsecaea pedrosoi*

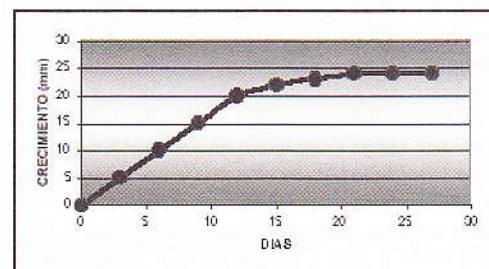
Procedencia	Parte	Procedencia	*Herbario	Rendimiento
<i>C. pyramidata</i>	hoja	Cobán	724	15.60
<i>H. uliginosum</i>	hierba	Tacaná	970	19.50
<i>L. graveolens</i>	hoja	Las Minas	604	9.20
<i>Q. crispifolia</i>	hoja	Las Minas	754	5.60
<i>Q. crispifolia</i>	tallo	Las Minas	754	16.80
<i>S. lavanduloides</i>	hoja-flor	Tacaná	735	17.70
<i>S. alata</i>	hoja	Samayac	154	17.77
<i>S. domingensis</i>	hoja	Samayac	662	34.1
<i>S. domingensis</i>	tallo	Samayac	662	40.4
<i>S. domingensis</i>	raíz	Samayac	662	21.50
<i>S. domingensis</i>	flor	Samayac	662	57.52
<i>S. americanum</i>	hoja	Samayac	294	6.72
<i>S. apetala</i>	hoja	Petén	280	10.22
<i>S. apetala</i>	corteza	Petén	280	23.56
<i>T. rosea</i>	hoja	Jalapa	343	10.1
<i>T. diversifolia</i>	tallo	Samayac	684	11.39
<i>V. prionophylla</i>	raíz	Nebaj	906	37.00

* Número en el Herbario de Laboratorio FARMAYA

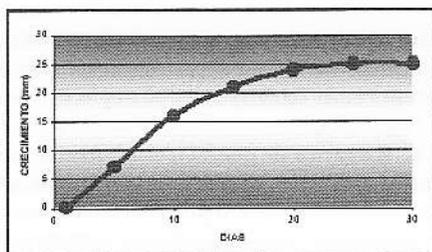
Validación de la metodología

El método para hongos filamentosos descrito por Brancato y Golding y modificado por MacRae *et al.*, fue adaptado para la fase miceliar de *S. schenckii*, obteniéndose su curva de crecimiento con un desarrollo máximo a los 21 días de incubación (Gráfica 1); para *F. pedrosoi* se observó que la curva de crecimiento era más lenta, por lo que su desarrollo máximo se alcanzó a los 23 días (Gráfica 2).

Gráfica 1. Curva de crecimiento de *Sporothrix schenckii*



Gráfica 2. Curva de crecimiento de *Fonsecaea pedrosoi*



Actividad antifúngica

El tamizaje antifúngico de la fase miceliar de ambos hongos demostró actividad con la hoja de *L. graveolens* y únicamente para *S. schenckii* la raíz de *V. prionophylla* a una concentración de 1 mg/mL como punto de corte. La determinación de la CIM de los extractos positivos demostró actividad de 0.1 mg/mL con *L. graveolens* y de 0.025 mg/mL para *V. prionophylla* (Tabla 2). En el tamizaje de los extractos contra la fase levaduriforme de *S. schenckii* se obtuvo actividad de 0.25 mg/mL para hierba de *H. uliginosum* y tallo de *S. domingensis*; y de 0.5 mg/mL para hoja de *L. graveolens*, hoja-flor de *S. lavanduloides*, hoja de *S. alata* y raíz de *V. prionophylla* (Tabla 2).

Tabla 2 Tamizaje antifúngico de los 17 extractos seleccionados contra la fase miceliar de *S. schenckii* y *F. pedrosoi* y la fase levaduriforme de *S. schenckii* (mg/mL)

Especie	Parte	<i>S. schenckii</i> (micelio)	<i>F. pedrosoi</i> (micelio)	<i>S. schenckii</i> (levadura)
<i>C. pyramidata</i>	Hoja	-	-	-
<i>H. uliginosum</i>	Hierba	-	-	0.25
<i>L. graveolens</i>	Hoja	1	1	0.5
<i>Q. crispifolia</i>	Hoja	-	-	-
<i>Q. crispifolia</i>	Tallo	-	-	-
<i>S. lavanduloides</i>	Hoja/flor	-	-	0.5
<i>S. alata</i>	Hoja	-	-	0.5
<i>S. domingensis</i>	Hoja	-	-	-
<i>S. domingensis</i>	Tallo	-	-	0.25
<i>S. domingensis</i>	Raíz	-	-	-
<i>S. domingensis</i>	Flor	-	-	-
<i>S. americanum</i>	Hoja	-	-	-
<i>S. apetala</i>	Hoja	-	-	-
<i>S. apetala</i>	Corteza	-	-	-
<i>T. rosea</i>	Hoja	-	-	-
<i>T. diversifolia</i>	Tallo	-	-	-
<i>V. prionophylla</i>	Raíz	0.025	-	0.5

(-) Actividad negativa a una concentración de 1 mg/mL

DISCUSIÓN

Las Gráficas 1 y 2 muestran las curvas de crecimiento de ambos hongos utilizando la metodología de Brancato y Goldin para hongos filamentosos. *S. schenckii* se adaptó al medio de esporulación y desarrolló la colonia según lo descrito en la literatura, obteniéndose un crecimiento máximo a los 21 días de incubación; mientras que *F. pedrosoi* alcanzó su máximo crecimiento a los 23 días, razón por la que se fijaron estos tiempos de incubación para cada bioensayo.

Los 17 extractos de las plantas seleccionadas para el tamizaje antifúngico contra *S. schenckii* y *F. pedrosoi* se detallan en la Tabla 1, con sus respectivos números de herbario y porcentaje de rendimiento.

Las Tablas 2 y 3 presentan los resultados del tamizaje de la actividad antifúngica de los extractos, considerando como punto de corte una concentración de 1 mg/mL. La fase miceliar de *F. pedrosoi* fue susceptible a un extracto (hoja de *L. graveolens*), la de *S. schenckii* a dos (hoja de *L. graveolens* y raíz de *V. prionophylla*). La fase levaduriforme de *S. schenckii* fue inhibida por seis extractos (hoja de *L. graveolens*, hoja de *S. alata*, hierba de *H. uliginosum*, hoja-flor de *S. lavanduloides*, tallo de *S. domingensis* y raíz de *V. prionophylla*).

A los extractos con actividad antifúngica se les determinó la CIM, haciendo diluciones seriadas del extracto. Se obtuvo para la fase miceliar una concentración de 0.1 mg/mL con la hoja de *L. graveolens* en ambos hongos y de 0.025 mg/mL con la raíz de *V. prionophylla* únicamente para *S. schenckii*.

La actividad contra la fase levaduriforme de *S. schenckii* fue de 0.25 mg/mL para los extractos de hoja de *L. graveolens*, hoja-flor de *S. lavanduloides*, hoja de *S. alata* y raíz de *V. prionophylla* y de 0.25 mg/mL para hierba de *H. uliginosum* y tallo de *S. domingensis*.

Basándose en la literatura, se supone que la susceptibilidad a los extractos podría deberse a que los compuestos presentes en los extractos de las plantas inhiben la biosíntesis de ergosterol y de otros esteroides, lesionando la pared celular fúngica y alterando su permeabilidad; como consecuencia se produce la pérdida de elementos intracelulares esenciales.

Otro posible mecanismo antifúngico es la inhibición de la biosíntesis de triglicéridos y fosfolípidos o la inhibición de la actividad enzimática oxidativa y peroxidativa, lo que conlleva a la acumulación de concentraciones tóxicas de peróxido de hidrógeno, que contribuyen al deterioro de los orgánulos subcelulares y necrosis celular. Sin embargo, el mecanismo de acción de los extractos activos no puede ser definido ya que no se cuenta aún con el compuesto puro responsable de la actividad, ni con los bioensayos específicos que lo comprueben.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero de los proyectos Flora Regional financiado por la Organización de Estados Americanos (OEA) y Antifúngicos del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED), así como a Laboratorio Farmaya que proporcionó los materiales vegetales, el Servicio de Micología de la Facultad de CCQQ y Farmacia que proporcionó las cepas de los hongos y al Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Cito-histología de la Facultad de CCQQ y Farmacia donde se llevó a cabo el trabajo experimental.

REFERENCIAS

1. Rippon JW. Micología Médica; Hongos y Actinomicetos patógenos. 3ed. México: Interamericana, McGraw Hill, S.A. de C.V, 1990. 854p.
2. Zamarripa A. *Sporothrix schenckii*, aspectos bioquímicos y morfológicos. IV Congreso de Micología: Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de México (UNAM), Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Guanajuato. México D.F.
3. Mesa AC. *et al.* Tipificación de aislados clínicos de *Sporothrix schenckii* de diferentes orígenes geográficos. IV Congreso Nacional de Micología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de México (UNAM). México, D.F.
4. Logemann HE. Manual Práctico de Micología Médica. Guatemala: Bayer, 1995. 227p.
5. Ortíz JL. Prevalencia de Micetomas, esporotricosis y cromomicosis en el Hospital Nacional Pedro Betancourth de la Antigua Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Médicas) 1992. 25p.
6. Anaissi EJ. *et al.* Clinical Mycology. USA: Churchill Livingstone, 2003. 608p.
7. Donabedian H. *et al.* Disseminated cutaneous and meningeal Sporotricosis in an AIDS patient. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1994. 18:111-115.
8. Smith CM., Reyard AM. Farmacología. Argentina: Médico Panamericano, 1995. 1135p.
9. Torres BM. *et al.* Efecto del yoduro de potasio sobre la respuesta inmune en la esporotricosis. *Iberoamericana Micol* 1997. 14:98-100.
10. Teixidor JR. *et al.* Medicina Interna. Barcelona: Masson, S.A., 1998. 1938p.
11. Datzung BG. Farmacología básica y clínica. 8ed. México: El Manual Moderno, 2002. 1346p.
12. Gupta AK. *et al.* Alternate web and combination itraconazole and terbinafine therapy for chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* in Brazil. *Med Mycol*. 2002; 40(5):529-534.
13. Bonifaz A. *et al.* Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases. *Mycoses*. 2001; 44(1-2):1-7.
14. Physicians GenRx. The Complete drug reference. USA: Mosby, 1996. 2130p.
15. Alio AB. *et al.* Chromomycosis: Uso del tratamiento combinado de Itraconazol y 5-fluorouracilo en *Fonsecaea pedrosoi* e Itraconazol y Criospray en *Exophiala jeanselmei* var. *Lecanii-Corni*. *Derm. Venez*, 2001; 39:11-15.
16. Sevigny GM, Ramos-Caro FA. Treatment of chromoblastomycosis due to *Fonsecaea pedrosoi* with low-dose terbinafine. *Cutis*. 2000; 66(1):45-46.
17. Esterre P. *et al.* Humoral immune response in chromoblastomycosis during and after therapy. *Lab Inmuno*. 2000; 7(3):497-500.
18. Perez A. Terbinafine: broad new spectrum of indications in several subcutaneous and systemic and parasitic diseases. *Mycoses*. 1999; 42:111-114.
19. Tahoma H. *et al.* Case report. A case of chromoblastomycosis effectively treated with terbinafine. *Mycoses*. 2000; 43(1-2):79-83.
20. Wiley J. Antifungal Chemotherapy Dep. of Bacteriology. USA: D.C.E. Speller, 1980. 446p.
21. Cáceres A. *et al.* Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 2. Evaluation of antifungal activity of seven American plants. *J. Ethnopharmacol*. 1993; 40:207-213.
22. Cáceres A. *et al.* Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. *J. Ethnopharmacol*. 1998; 62:195-202.
23. Brancato FP, Golding NS. The diameter of the mold colony as a reliable measure of growth. *J. Mycol*. 1953 45:848-863.

24. MacRae WD. *et al.* Studies of the pharmacological activity of Amazonian euphorbiaceae. *J. Ethnopharmacol.* 1988; 22:147-172.
25. Vanbreuseghem R. *et al.* Production of macroconidias from *Microsporum ferrugineum*. *Sabouroudia* 1970; 7:252-256.
26. Cáceres A. *et al.* Manual de Procedimientos del proyecto Biodiversidad tropical Centroamericana (OEA). Guatemala: Facultad de CCQQ y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. 1999. 17p.