

Estudio de *Tagetes minuta* L. como fuente de moléculas fotosensibilizantes para aplicación en quimioterapia antifúngica fotodinámica.

Giacone, Lucía; Cordisco, Estefanía; Sortino, Maximiliano
lugiacone@hotmail.com; estefania.cordisco@hotmail.com.ar;
msortino@fbioyf.unr.edu.ar

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
Universidad Nacional de Rosario

Resumen

Las infecciones fúngicas, como la candidiasis, se han vuelto frecuentes en pacientes inmunocomprometidos y su tratamiento se dificulta debido al bajo número de antifúngicos disponibles y sus desventajas: toxicidad, generación de resistencia y alto costo. Una de las alternativas es la Quimioterapia Fotodinámica Antimicrobiana (QTFA), que utiliza compuestos fotosensibilizantes (CF) y luz de una determinada longitud de onda para inducir un daño oxidativo en patógenos microbianos. Debido a que se ha reportado la presencia de CF en las especies del género *Tagetes*, se postuló como objetivo de este trabajo, obtener distintos extractos de *Tagetes minuta* para evaluar su actividad antifúngica frente a cinco especies del género *Candida*. Se evaluaron 17 extractos, de los cuales 10 resultaron activos, detectándose Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIMs) en luz de entre 250 y 0,49 µg/mL. Los extractos más activos fueron los de raíz, los cuales se seleccionaron para evaluar su acción frente a los factores de virulencia de *Candida*. Se observó inhibición de la formación de tubo germinativo y disminución en la adherencia a células epiteliales, como también acción antifúngica contra *biofilm*. La baja concentración de los extractos seleccionados que se requiere tanto para matar como para reducir el efecto de los factores de virulencia, tan importantes en la colonización e invasión del huésped, proporcionan evidencia de potenciales antifúngicos naturales que podrían constituir una alternativa interesante para los tratamientos de candidiasis utilizando la terapia fotodinámica.

Palabras clave: *Tagetes minuta*, terapia fotodinámica, antifúngicos, virulencia, *biofilm*

Introducción

La terapia fotodinámica, es una alternativa terapéutica para el tratamiento de micosis que utiliza CF y luz para inducir un daño oxidativo en microorganismos y posee ventajas frente a los tratamientos convencionales, tales como amplio espectro de acción, baja probabilidad de generación de cepas fotorresistentes, mínimo daño a tejidos sanos del hospedero, compatibilidad con terapias antifúngicas convencionales y bajo costo. (Meckes-Lozoya & Gaspar, 1993). Un ejemplo de CF de origen natural son los tiofenos, cuya presencia ha sido reportada en especies del género *Tagetes* (dos Santos, Schneider, da Silva Barboza, Campos & Lund, 2017). Además, se ha descrito que la QTFA puede afectar a factores de virulencia de *Candida* como la emisión de tubo germinativo, la adherencia a células epiteliales y la formación de *biofilms*. El tubo germinativo se considera uno de los factores de virulencia más importantes de *C. albicans*. Se forma durante la transición hacia su forma filamentosa y a través de esta estructura invade los tejidos huéspedes. Éste cambio le provee flexibilidad para adaptarse no sólo al organismo huésped sino también al tratamiento aplicado para combatirla. La adherencia juega un papel significativo en el proceso de infección, ya que interviene en la colonización del hongo en el tejido humano y permite a las levaduras

persistir más tiempo en el huésped. Otro factor de virulencia importante de *C. albicans* es su capacidad para formar *biofilms* o biopelículas, comunidades de células densamente unidas adheridas a una superficie, generalmente inerte. Estas biopelículas son intrínsecamente resistentes a la terapia antifúngica convencional, el sistema inmunitario del huésped y otros factores ambientales, lo que hace que las infecciones asociadas a ellas representen un desafío en cuanto a su tratamiento clínico (Gulati & Nobile, 2016). Estos hallazgos demuestran que es promisorio estudiar las propiedades de los extractos de *Tagetes minuta* para su aplicación en QTFA.

Objetivos

1. Realizar extractos de *T. minuta* y obtener su aceite esencial.
2. Evaluar la actividad antifúngica fotosensibilizante contra 5 especies del género *Candida* en su forma planctónica y en *biofilm*.
3. Evaluar la capacidad inhibitoria de factores de virulencia fúngicos

Materiales y métodos

1. Realización de extractos: el material vegetal se secó al aire y se separaron los distintos órganos (hoja, tallo, flor y raíz), los cuales fueron molidos y sujetos a extracción con solventes de distinta polaridad (hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol) por maceraciones (3 x 24h). Se filtró con vacío y se evaporó el

solvente a presión reducida hasta sequedad. El aceite esencial se obtuvo por hidrodestilación en un aparato tipo Clevenger.

2. Evaluación de la actividad antifúngica fotosensibilizante: se utilizó el método de microdilución en caldo de acuerdo con el documento M27-A3 de CLSI (CLSI, 2008) con una modificación, la irradiación con luz UVA durante 1 hora previamente a la incubación. A fin de detectar actividad antifúngica fotosensibilizante, las determinaciones se realizaron paralelamente en dos microplacas: una de ellas se mantuvo en oscuridad y la otra se irradió con luz UV-A, previo a la incubación. Para el ensayo, se prepararon dos placas idénticas de la siguiente manera: se prepararon diluciones al medio en forma seriada de los extractos en RPMI-1640, que se colocaron en cada pocillo de las microplacas, de modo de obtener concentraciones finales en el rango desde 1000-0,49 $\mu\text{g/mL}$. Cada concentración fue ensayada por duplicado. Se utilizaron también pocillos para el control de crecimiento (CC, se agregó medio de cultivo sin extracto con inóculo), el control de esterilidad (CE, se agregó medio de cultivo sin extracto con agua destilada estéril en lugar del inóculo) y el control de la muestra (CM, se agregó medio de cultivo con muestra con agua destilada estéril en lugar del inóculo). Luego a cada pocillo se agregó un volumen de 100 μL de suspensión de

inóculo. Una de ellas se expuso a luz UV-A antes de la incubación, y la otra fue incubada sin irradiación previa. Se agregaron como controles positivos los antifúngicos comerciales anfotericina B, itraconazol y fluconazol. Se consideraron fotoactivos aquellos extractos que mostraron $\text{CIM} < 1000 \mu\text{g/mL}$ solamente bajo irradiación. Se evaluaron 5 especies patógenas del género *Candida* como células planctónicas y *biofilms*. Para ensayar la actividad antifúngica sobre *biofilms* se formó el *biofilm* (Ramage, Walle, Wickes, López-Ribot, 2001), en dos microplacas (una para irradiar bajo luz UV y otra para oscuridad). En otra microplaca se realizaron diluciones sucesivas al medio de los extractos para obtener el rango de concentraciones a evaluar (1000-1.95 $\mu\text{g/ml}$) y se transfirieron a la placa donde se formó el *biofilm*. Se realizaron controles de esterilidad y de crecimiento. Luego de la irradiación se vaciaron las microplacas y se procedió a evaluar la actividad antifúngica mediante dos métodos: revelado con MTT y recuento de colonias. El método de revelado con MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) permite determinar la cantidad de células vivas, que es proporcional a la cantidad de formazán producido. Éste es un compuesto coloreado cuya reducción metabólica es realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial

de las células tratadas. Para realizar el recuento de UFC (unidades formadoras de colonias) se resuspendió cada pocillo con 200µl de PBS y se sembró de cada uno 20µl en una placa de Petri con Sabourad agar que se incubó a 28° C durante 24 h

Como control se evaluó con los mismos métodos la actividad sobre el *biofilm* de antifúngicos comerciales como Anfotericina B y fluconazol.

3. Inhibición de factores de virulencia: se seleccionaron los extractos más activos para evaluar su capacidad de inhibición de los factores de virulencia a concentraciones sub-inhedorias (<0,98 µg/mL)

a) Capacidad de adherencia a células epiteliales: las células epiteliales fueron obtenidas de mucosa oral de individuos sanos del sexo femenino. Se incubaron a 37°C durante 1 hora con las levaduras tratadas con concentraciones iguales a la CIM, CIM/2 y CIM/4. Como control también se incubaron con levaduras sin tratar con el extracto. Se realizaron los ensayos en luz y oscuridad para evaluar el efecto de la irradiación sobre la capacidad de adherencia de las levaduras. Luego de la incubación se cuantificó el número de levaduras adheridas a 100 células epiteliales por microscopía óptica utilizando la técnica de tinción de Gram Nicolle. (Soares, da Silva, Sousa, Amorim, de Resende, Cisalpino, 2009).

b) Emisión de tubo germinativo: se incubaron las levaduras tratadas en suero fetal bobino durante 2 h a 37 °C. Se evaluaron concentraciones seriadas de los extractos (7,81-0,03µg/mL) y un control sin tratar. Los ensayos se realizaron con y sin irradiación para evaluar si la luz UV-A afecta a la producción de tubo germinativo. Posteriormente se cuantificó el número de levaduras que emitieron tubo germinativo sobre un total de 100 levaduras. (Munin, Giroldo, Alves, Costa, 2007).

En otro ensayo, se evaluó la acción antifúngica de los extractos frente a levaduras con tubo germinativo. En este caso, se incubaron las células con suero fetal bovino a 37°C durante 2 horas y se utilizaron como inóculo para ensayar la actividad antifúngica de acuerdo al método de microdilución en caldo descrito anteriormente. Se realizaron dos placas, una fue irradiada durante una hora y la otra se incubó sin irradiación previa. Se realizó un control de crecimiento y la CIM se determinó por el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC), sembrando alícuotas de cada pocillo en una placa con Sabourad agar.

Resultados y discusión

Los extractos de *T. minuta* (Figura 1) se prepararon por maceración de sus partes secas y molidas con solventes de

polaridad creciente, como se indica en Materiales y Métodos. En la Tabla 1 se indican los rendimientos obtenidos.

Figura 1: *Tagetes minuta*



Tabla 1: Rendimiento en % de los extractos de hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol de las distintas partes de la planta

Hoja			
Hexano	Diclorometano	Acetato de etilo	Metanol
1,75	2,23	1,77	6,20
Raíz			
Hexano	Diclorometano	Acetato de etilo	Metanol
0,75	0,71	2,68	4,10
Tallo			
Hexano	Diclorometano	Acetato de etilo	Metanol
1,70	0,56	0,92	8,93
Flor			
Hexano	Diclorometano	Acetato de etilo	Metanol
3,29	4,74	2,05	9,74

De los 17 extractos evaluados, 10 mostraron fotoactividad y ninguno fue activo en oscuridad. Todos los extractos de metanol y acetato de etilo fueron inactivos, excepto el obtenido de raíz con acetato de etilo. En contraste, todos los extractos hexánicos y diclorometánicos fueron activos luego de la irradiación. En la tabla 2 se muestran los valores de CIM de los extractos fotoactivos frente las distintas especies de *Candida* en su forma planctónica. Se puede observar que los valores de CIMs del aceite esencial fueron los más altos para todas

las especies de *Candida*, mientras que las CIMs de los demás extractos varían entre 62,5 y 0,49 µg/mL. Los extractos más activos (menores valores de CIM) fueron los obtenidos de raíz, hexánico (RH) y diclorometánico (RD), sugiriendo que en este órgano se concentran los CF. Estos extractos fueron utilizados para evaluar la inhibición de factores de virulencia.

Tabla 2: Valores de CIM (µg/mL) de los extractos fotoactivos y de los antifúngicos comerciales frente las distintas especies de *Candida* en su forma planctónica

Extracto	Ca	Cp	Ck	Ct	Cg
Tallo Hexano	1,95	3,91	1,95	3,91	15,63
Tallo DCM	15,63	15,63	7,81	31,25	31,25
Hoja Hexano	7,81	15,63	7,81	31,25	31,25
Hoja DCM	3,91	15,63	31,25	7,81	62,5
Raíz Hexano	0,49	1,95	1,95	0,49	1,95
Raíz DCM	0,49	1,95	1,95	3,91	3,91
Raíz AcEt	62,5	62,5	500	62,5	125
Flor Hexano	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25
Flor DCM	31,25	31,25	31,25	31,25	62,5
Ac. esencial	500	250	125	250	500
Itraconazol	0,0012	0,0012	0,0012	0,0012	0,0012
Fluconazol	0,25	1	0,125	8	8
Anfotericina B	0,5	2	0,25	0,5	1
Anfotericina B (Luz)	4	8	2	8	4

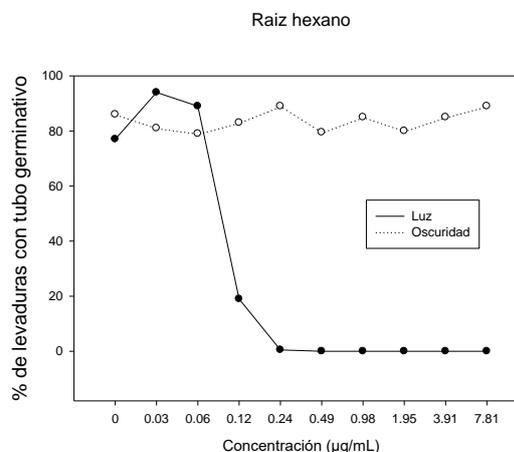
Ca=*C. albicans*, Cp= *C. parapsilopsis*, Ck= *C. krusei*, Ct=*C. tropicalis*, Cg=*C. glabrata*. DCM=diclorometano. AcEt= acetato de etilo, Ac=aceite

La **formación de tubo germinativo** es un factor de virulencia de *C. albicans* que le permite invadir tejidos y evitar la fagocitosis. En la tabla 3 y en la figura 2 se muestran los resultados obtenidos para los extractos más fotoactivos

expresados en porcentaje de levaduras que formaron tubo germinativo en función de la concentración. En condiciones de oscuridad no se observan cambios en el porcentaje de tubo germinativo formado con respecto al control sin tratar (79-90%). La levadura, sometida bajo luz UV-A a concentraciones sub-inhedoras de los extractos fotoactivos (< 0.98 µg/mL), disminuye significativamente su capacidad de producirlo (0,5-19%), haciéndose nula a concentraciones ≥ CIM/4 (Figura 2). Los extractos también fueron activos frente levaduras con tubo germinativo (CIMs= 1,95µg/mL).

Figura 2: porcentaje de levaduras con tubo germinativo obtenidos a distintas concentraciones, en oscuridad y luego de la irradiación con luz UV-A durante 1 hora: A) extracto de raíz hexánico B) Extracto de raíz diclorometánico

A)



B)

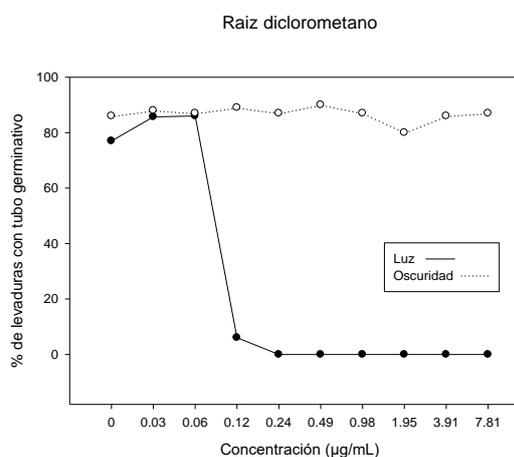
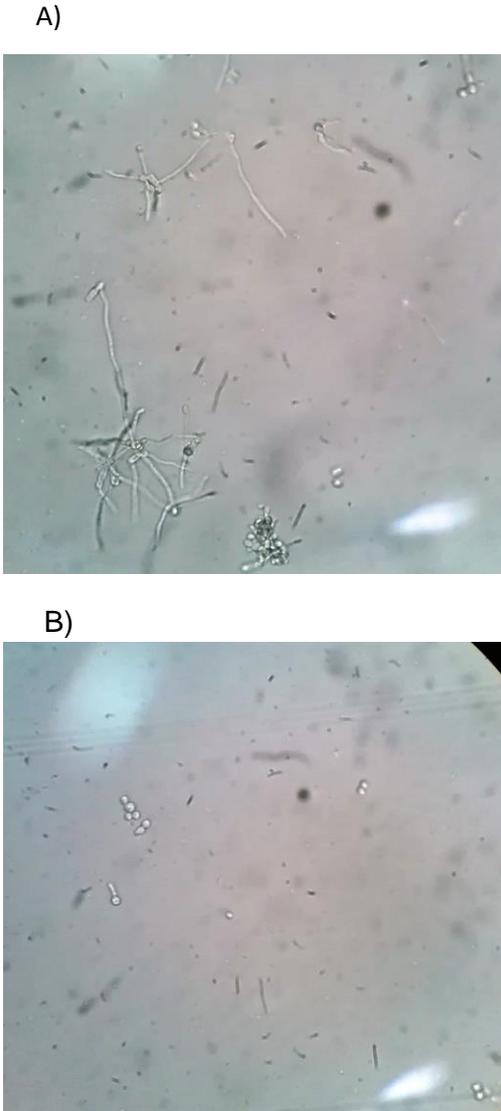


Tabla 3: porcentaje de levaduras con tubo germinativo en condiciones de luz y oscuridad a diluciones sucesivas de los extractos

Concentración (µg/ml)	RD		RH	
	Luz	Oscuridad	Luz	Oscuridad
7,81	0	87	0	88
3,90	0	86	0	80
1,95	0	80	0	87
0,98	0	87	0	85
0,49	0	90	0	79,5
0,24	0	87	0,5	89
0,12	6,1	89	19	83
0,06	86	87	89	79
0,03	85,7	88	94	81
Control sin tratar	77	86	77	86

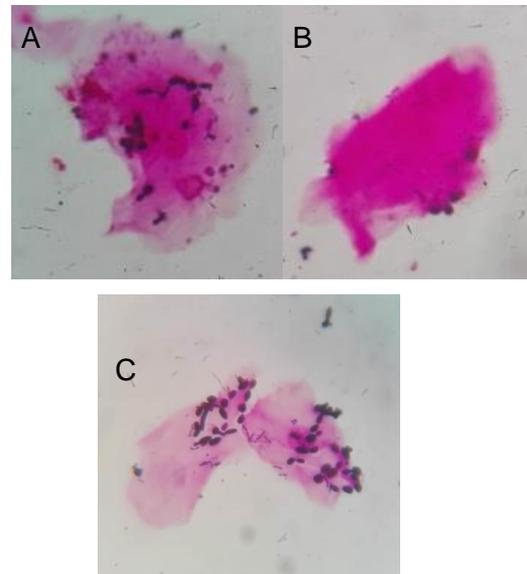
RD: raíz diclorometano, RH: raíz hexano

Figura 3: imágenes de *C. albicans* A) Tratamiento CIM/4 en oscuridad (se observan levaduras con tubos germinativos, B) Tratamiento CIM/4 con luz UV-A (se observan levaduras sin tubo germinativo)



La **adherencia a células epiteliales** es el primer paso para la colonización y posterior infección. El tratamiento con los extractos a concentraciones iguales a CIM/2 disminuye la capacidad de adherencia de todas las especies hasta un 65 % con respecto al control sin tratar. En condiciones de oscuridad no se modifica el porcentaje de células adheridas (Figura 3)

Figura 3: *C. albicans* tratadas con el extracto de raíz hexánico, adheridas a células epiteliales, técnica de tinción Gram 1000X A) Tratamiento CIM/2 en oscuridad (se observan levaduras adheridas), B) Tratamiento CIM/2 con luz UV-A (no se observan levaduras adheridas). C) Control sin tratar (se observan levaduras adheridas)



Los **Biofilms** son estructuras formadas por los microorganismos sobre superficies inertes con alta resistencia a los antifúngicos convencionales. Los extractos más activos mostraron fotoactividad antifúngica sobre los *biofilms* formados por *C. parapsilopsis*. Se obtuvieron los valores de CIM por dos métodos diferentes: revelado con MTT y recuento de UFC. De esta manera se determinaron una CIM = 7.81 µg/mL para RH y de 3.91 µg/mL para RD. En la figura 3 se muestran los resultados obtenidos tratando los *biofilms* formados por *C. parapsilopsis* con el extracto RD. Se puede observar que en condiciones de oscuridad (Figura 3a) no se ve afectado el crecimiento celular, lo que se evidencia por la formación de formazán (violeta).

Mientras que cuando la placa es irradiada (Figura 3b) disminuye la absorbancia (no se genera formazán) a concentraciones menores a 3,91 µg/mL. El mismo patrón de crecimiento se obtuvo cuando se evaluó la viabilidad del *biofilm* utilizando recuento de UFC. (Figura 3c).

Figura 3: Determinación de la CIM del extracto RD sobre *biofilms* formados por *C. parapsilopsis* a) Revelado con MTT, tratamiento en oscuridad. b) Revelado con MTT, tratamiento con luz. c) recuento de UFC (luz)

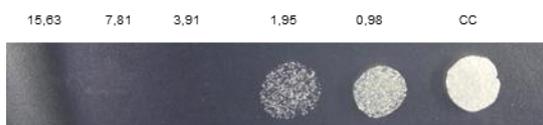
a)



b)



c)



Es importante destacar que antifúngicos comerciales como fluconazol y la anfotericina B no resultaron activos frente a este *biofilm*, por lo que esta terapia podría ser una alternativa para estos casos de resistencia.

Conclusión

Los resultados permiten afirmar que los extractos de *T. minuta* exhiben actividad

antifúngica foto-sensibilizante, frente a las especies de *Candida* más frecuentes, con bajos valores de CIM. Además mostraron capacidad inhibitoria de factores de virulencia, como adherencia y tubo germinativo de vital importancia en los procesos de colonización e infección y sobre *biofilms*, estructuras resistentes a los antifúngicos comerciales, responsables en muchos casos del fracaso terapéutico. Estos hallazgos demuestran la potencialidad de los extractos de raíz de *T. minuta* para ser usados en QTAF para el tratamiento de candidiasis.

Bibliografía

1. Meckes-Lozoya, M., & Gaspar, I. (1993). Phototoxic effect of *Porophyllum macrocephalum* and *Tagetes erecta*. *Fitoterapia*, 64, 35-41.
2. dos Santos, D. C., Schneider, L. R., da Silva Barboza, A., Campos, Â. D., & Lund, R. G. (2017). Systematic review and technological overview of the antimicrobial activity of *Tagetes minuta* and future perspectives. *Journal of ethnopharmacology*, 208, 8-15.
3. Gulati, M., & Nobile, C. J. (2016). *Candida albicans* *biofilms*: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and infection*, 18(5), 310-321.
4. CLSI. Reference Method for Broth Dilution. Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; M27-A3, 19087, 2008

5. Ramage, G., Walle, K., Wickes, B., López-Ribot, J. (2001). Standardized method for *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(9), 2475-2479.
6. Soares, B., da Silva, D., Sousa, G., Amorim, J., de Resende, M., Cisalpino, P. (2009). In vitro photodynamic inactivation of *Candida spp* growth and adhesion to buccal epithelial cells. *J. Photochem. Photobiol., B: Biology*, 94(1), 65-70.
7. Munin, E., Giroldo, L., Alves, L., Costa, M. (2007). Study of germ tube formation by *Candida albicans* after photodynamic antimicrobial chemotherapy. *J. Photochem Photobiol, B: Biology*, 88(1), 16-20.