

ACCION ANTIFUNGICA DE CLORPROMACINA, KETOCONAZOL Y CICLOHEXIMIDA SOBRE DOS CEPAS DE PYCNOPORUS CINNABARINUS (JACQ. EX FR.) KARST.

Victor Cifuentes

Waldo Lazo

Departamento de Ciencias Ecológicas,
Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
Las Palmeras 3425, Santiago, Chile.

Palabras claves: Antifúngico, *Pycnoporus*, Clorpromacina, Ketoconazol, Cicloheximida.

Key Words: Antifungic, *Pycnoporus*, Chlorpromacine, Ketoconazole, Cycloheximide.

RESUMEN

El desarrollo de dos cepas de *Pycnoporus cinnabarinus* (Jacq. ex Fr.) Karst, fue inhibido durante 72 horas al agregar al medio de cultivo clorpromacina, ketoconazol o cicloheximida respectivamente. La cepa Pc58 fue inhibida por 33 ug/ml de clorpromacina y la cepa Pc470.6 por 40 ug/ml. Cicloheximida inhibió el crecimiento de la cepa Pc58 a una concentración de 3 ug/ml y a la cepa Pc470.6 a 5 ug/ml. El agente más eficaz para inhibir el crecimiento de estas cepas de *P. cinnabarinus* fue el ketoconazol, que actuó a concentraciones menores de 0.5 ug/ml en la cepa Pc58 y a 0.9 ug/ml en la cepa Pc470.6.

SUMMARY

[Antifungic action chlorpromacine, ketoconazole and cycloheximide on two *Pycnoporus cinnabarinus* (Jacq. ex Fr.) Karst. strains.]

The growth of *P. cinnabarinus* strains Pc58 and Pc470.6, was inhibited during 72 hours by the addition to the culture medium of chlorpromacine, ketoconazole or cycloheximide respectively. For chlorpromacine the strain Pc58 is inhibited by 33 ug/ml and the strain Pc470.6 is inhibited by 40 ug/ml. Cycloheximide inhibits the growth at a concentration of 3 ug/ml for Pc58 and 5 ug/ml for the strain Pc470.6. The most powerful inhibitor of the growth of these *P. cinnabarinus* strains is ketoconazole which inhibits the growth of Pc58 at a concentration at less than 0.5 ug/ml and 0.9 ug/ml for Pc470.6 strain.

INTRODUCCION

Los basidiomicetes constituyen una clase importante de hongos, algunos de los cuales participan en procesos biodegradativos en la naturaleza. Dentro de estos últimos hay un grupo denominado hongos de la "pudrición blanca", caracterizado por su capacidad de biodegradar todos los principales componentes de la madera. Hasta ahora, son considerados los degradadores más eficientes de la lignina en la naturaleza. En la actualidad no se tiene un conocimiento básico de la genética de estos hongos, debido principalmente a que son organismos con ciclos de

vida complejos y de difícil manipulación. Sin embargo, recientemente se están realizando esfuerzos dirigidos a los aspectos genéticos del proceso de biodegradación de la lignina (Alic y col, 1989; Tien y col, 1984), en un claro reconocimiento a la necesidad de determinar el número, disposición e interacción de los genes que controlan la síntesis y funcionamiento de las enzimas que participan en dichos procesos. Además, dada la evidente necesidad de alcanzar un conocimiento básico de la genética de estos hongos, se está comenzando a estudiar la organización genética de algunos de ellos (Alic y col, 1989, Boda y col. 1986).

En Chile existen algunos hongos de pudrición blanca que son degradadores eficientes de residuos

orgánicos en nuestro ecosistema. Uno de ellos es *P. cinnabarinus*, el cual es común en bosques nativos del sur de Chile. Se han aislado ejemplares de esta especie en bosques de *Nothofagus dombeyi* Blume. En el laboratorio, *P. cinnabarinus* muestra un crecimiento rápido y además posee capacidad de fructificar y producir basidiosporas. Estas propiedades lo convierten en un organismo adecuado para estudiar su genética y extenderlo como modelo para otros basidiomicetes nativos de nuestro país, principalmente.

Dentro de estos estudios está la determinación de los niveles de sensibilidad de cepas nativas de *P. cinnabarinus* a diferentes agentes antifúngicos, lo cual permitirá en el futuro, realizar experimentos tendientes a obtener mutantes resistentes a dichos antibióticos que puedan ser utilizados como marcadores genéticos.

MATERIALES Y METODOS

Cepas:

En este estudio se usó las cepas Pc58 y Pc470.6 de *P. cinnabarinus*, que fueron aisladas a partir de carpóforos colectados en bosques de *N. dombeyi* de Chile austral. Ambas cepas están ingresadas a la colección de hongos del laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Condiciones de cultivo: Las cepas de *P. cinnabarinus* fueron cultivadas a 30° C. en medio PC que básicamente consiste de medio Vogel (Vogel, 1956), que ha sido modificado bajando la concentración de nitrógeno a 1/3 de la composición estándar y suplementado con 0.2% extracto de malta, 0.1% extracto de levadura, 10mg/ml de tiamina, 0.4% de glucosa (Cifuentes y col, 1990). Cuando fue necesario, el medio se solidificó agregándole agar al 2%.

Para obtener esporas, las cepas Pc58 y Pc470.6 fueron sembradas en placas Petri con medio PC sólido e incubadas durante 8 días a 30° C. Para recolectar las esporas se añadió 5ml de agua destilada estéril a la superficie del cultivo y luego se las resuspendió utilizando un rastrillo de vidrio. Los restos de micelio fueron removidos pasando la suspensión de esporas por un filtro de tres capas de gasa estéril. Posteriormente las esporas fueron observadas al microscopio óptico y contadas utilizando una cámara de Neubauer.

Experimentos de inhibición del crecimiento: Los estudios de inhibición del crecimiento con antibióticos fueron realizados en matraces Erlenmayer de 250 ml con 100 ml de medio PC. A

los matraces con medio, se les agregó los fármacos respectivos (cicloheximida o ketoconazol o clorpromacina) y fueron inoculados con 1 ml de una suspensión de 10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) /ml de agua, para dejar a una concentración final de 10^4 UFC/ml de medio de cultivo.

Los matraces inoculados fueron incubados a 30° C. durante 48 a 72 horas (Lazo 1988).

La determinación de crecimiento se realizó mediante inspección ocular y en algunos casos mediante determinación de peso seco. Para ello, el micelio fue colectado por filtración a través de papel Whatman N° 1 y luego secado a 65° C. durante 18 a 24 horas en horno Pasteur.

RESULTADOS

La Tabla 1 muestra los resultados de los estudios de inhibición de crecimiento de las cepas Pc58 y Pc470.6 de *P. cinnabarinus* cuando crecen en presencia de clorpromacina. Como se puede observar, en ambas cepas hay un claro efecto inhibitorio del crecimiento a concentraciones que están en el rango de 30 a 40 ug de clorpromacina por ml de cultivo. Las determinaciones del crecimiento se realizaron a las 48 y 72 horas de incubación del hongo en el medio de cultivo. La cuantificación del peso seco se realizó con cultivos de 72 horas de incubación a 30° C en medio con el antibiótico.

La Tabla 2, muestra los resultados de los estudios de la inhibición del crecimiento de las cepas Pc58 y Pc470.6 cuando se cultivan en un medio con ketoconazol. La cepa Pc58 es incapaz de desarrollarse a una concentración mayor o igual a 0.5 ug/ml de ketoconazol. La cepa Pc470.6 mostró ser algo más resistente a este antibiótico, siendo su concentración inhibitoria de 0.9 ug/ml. En esta última cepa una concentración de ketoconazol de 0.5 ug/ml provoca una disminución del crecimiento, llegando este a solo el 71% del control (crecimiento de la misma cepa en ausencia del fármaco) y a 0.8 ug/ml solo se logra un 17% de crecimiento, esto es, hay una inhibición de aproximadamente 5.7 veces en relación al control.

La Tabla 3 muestra el efecto de cicloheximida en el crecimiento de las cepas en estudio. Se puede observar que el desarrollo de la cepa Pc58 es inhibida por una concentración de 3 ug/ml y el de la cepa Pc470.6 por una concentración de 5ug/ml de cicloheximida. En ambos casos las determinaciones definitivas fueron realizadas en cultivos de 72 horas de incubación a 30° C. en medio líquido. Finalmente, la Tabla 4 muestra un cuadro resumen

del efecto de cada uno de los fármacos en las cepas en estudio. La comparación de los resultados en términos globales nos indica que en todos los casos, la cepa Pc470.6 es ligeramente mas resistente a los

antibióticos utilizados. Sin embargo, en todos ellos, las concentraciones inhibitorias caen en el mismo orden de magnitud.

Tabla 1.

Inhibición del crecimiento de *P. cinnabarinus* por clorpromacina.

A. Cepa Pc58

Concentración ug/ml	Horas de crecimiento		Peso seco miligramos	Porcentaje	Inhibición veces
	48	72			
0	+++	+++	30.6	100	1.0
5	+++	+++	29.8	97.4	1.0
10	++	++	20.3	66.3	1.5
15	+	+	13.7	44.8	2.2
20	+	+	12.9	42.2	2.4
26	+	+	12.7	41.5	2.4
28	+/-	+/-	nd	--	--
30	+/-	+/-	nd	--	--
33	-	+/-	1.7	5.6	18.0

B. cepa Pc470.6

Concentración ug/ml	Horas de crecimiento		Peso seco miligramos	Porcentaje	Inhibición veces
	48	72			
0	+++	+++	25.1	100	1.0
10	++	++	17.3	68.9	1.4
30	+	++	17.4	69.0	1.4
33	+/-	+	10.1	40.2	2.5
36	+/-	+	9.6	38.2	2.6
40	-	-	nd	--	--

+ = Crecimiento, +/- = poco crecimiento, - = no crece.

nd= no se puede cuantificar.

Peso seco fue determinado a las 72 horas de cultivo.

Tabla 2.
Inhibición del crecimiento de *P. cinnabarinus* por ketoconazol.

A. Cepa Pc58

Concentración ug/ml	Horas de crecimiento		Peso seco miligramos	Porcentaje	Inhibición veces
	48	72			
0	++	+++	29.4	100	1.0
0.5	-	-	0	--	--
1.0	-	-	0	--	--
5.0	-	-	0	--	--

B. cepa Pc470.6

Concentración ug/ml	Horas de crecimiento		Peso seco miligramos	Porcentaje	Inhibición veces
	48	72			
0	+++	+++	19.9	100	1.0
0.2	++	+++	18.1	90.9	1.1
0.5	+	++	14.3	71.8	1.4
0.8	+/-	+	3.5	17.6	5.7
1.0	-	-	0	--	--
5.0	-	-	--	--	--

+ = Crecimiento, +/- = poco crecimiento, - = no crece. nd= no se puede cuantificar.
Peso seco fue determinado a las 72 horas de cultivo.

Tabla 3.
Inhibición del crecimiento de *P. cinnabarinus* por cicloheximida.

A. Cepa Pc58

Concentración ug/ml	Horas de crecimiento		Peso seco miligramos	Porcentaje	Inhibición veces
	48	72			
0	++	+++	29.4	100	1.0
0.5	+	++	20.1	68.4	1.5
1.0	+/-	+	12.9	43.9	2.3
2.0	+/-	+	7.3	24.8	4.0
4.0	-	-	0	--	--
5.0	-	-	0	--	--

B. cepa Pc470.6

Concentración ug/ml	Horas de crecimiento		Peso seco miligramos	Porcentaje	Inhibición veces
	48	72			
0	++	+++	37.4	100	1.0
1.0	+	++	20.9	55.9	1.8
2.0	+/-	+	16.3	43.6	2.3
3.0	+/-	+	15.2	40.6	2.5
4.0	-	+/-	2.0	5.3	18.7
5.0	-	-	--	--	--
10.0	-	-	--	--	--

+ = Crecimiento, +/- = poco crecimiento, - = no crece. nd= no se puede cuantificar.
Peso seco fue determinado a las 72 horas de cultivo.

Tabla 4.

Cuadro comparativo de las concentraciones inhibitorias del crecimiento de las cepas Pc58 y Pc470.6 de *P. cinnabarinus* a los fármacos clorpromacina, ketoconazol y cicloheximida.

Fármaco	Cepas	
	Pc58	Pc470.6
Clorpromacina	33 ug/ml	40 ug/ml
Ketoconazol	< 0.5 ug/ml	0.9 ug/ml
Cicloheximida	3.0 ug/ml	5.0 ug/ml

Los valores indican la concentración del antibiótico que inhibe totalmente el crecimiento de *P. cinnabarinus* hasta las 72 horas de incubación.

CONCLUSIONES.

Los resultados que se muestran en el presente estudio, corresponden a experimentos que han permitido determinar los niveles de sensibilidad a antibióticos de dos cepas de *P. cinnabarinus*. Su resumen se muestra en la Tabla 4. Para clorpromacina, la cepa Pc58 es sensible a una concentración de 33 ug/ml y la cepa Pc470.6 es

sensible a 40 ug/ml. Cicloheximida inhibe el desarrollo de *P. cinnabarinus* a una concentración de 3 ug/ml para la cepa Pc58 y a 5 ug/ml para la cepa Pc470.6. De nuestros resultados se deduce que el agente más eficiente para inhibir el crecimiento de *P. cinnabarinus* es ketoconazol, el cual actúa a concentraciones menores de 0.5 ug/ml en la cepa Pc58 y a concentraciones del orden de 0.9 ug/ml en la cepa Pc470.6. Cabe destacar que en ambas cepas, los efectos de estos antimicóticos caen dentro del mismo rango de concentraciones respectivamente. Sin embargo, es claro que la cepa Pc470.6 es mas resistente que la cepa Pc58 a los tres fármacos examinados. Se debe señalar, que estas cepas se han originado de aislados distintos del mismo carpóforo. Respecto a ello, en el micelio de la cepa Pc58 se comprueba la presencia de fibulas lo que nos indica que se trata de una cepa dicarionte. La cepa Pc470.6 es una cepa haploide que corresponde a un cultivo monospórico que se origina a partir de una basidiospora aislada proveniente de la cepa 470. Esta última, es otro aislado diferente de *Pycnoporus*, proveniente del mismo carpóforo del que se originó la cepa Pc58.

Estos estudios entregan información que será utilizada junto con otros resultados obtenidos en nuestro laboratorio para conocer la organización genética de *P. cinnabarinus* y adentrarse en el estudio de la genética de basidiomicetes. Posteriormente estos datos serán de utilidad en el análisis genético de *P. cinnabarinus*, donde los niveles de sensibilidad a estos antimicóticos serán utilizados como marcadores selectivos para completar la caracterización genética de este hongo.

REFERENCIAS

- Alic, M.; Kornegay, J.R.; D. and Gold, M.H. (1989). Transformation by complementation of a Adenine auxotroph of lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 55: 406-411.
- Broda, P.; Raeder, U.; Schrank, A.; Brown, A. Thomson, W. and Sims, P. (1986). Development of classical and molecular genetics of the ligninolytic white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Fifth International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms. pp. 289-302
- Cifuentes, V. Martínez, C. and Pincheira, G. (1990). A method for the preparation of intact chromosomal DNA of *Pycnoporus cinnabarinus*. Fungal Genet. Newslett. 37: 12-13.
- Lazo, W. (1988). Acción antifúngica de las asociaciones de sulfametoxazol o ketoconazol con etosuccimida, fenilbutazona, ibuprofeno, gentamicina, metamizol, yoduro de potasio y otros fármacos. Bol. Micol. 4: 41-45.
- Tien, M. and Tu, C. D. (1987). Cloning and sequencing of a cDNA for a ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*. nature 326: 520-523.
- Vogel, H.J. (1956). A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). Microbiol. Genet. Bull. 13: 42-43