

32. Salud humana

**Efecto inhibitorio del tamoxifeno sobre el crecimiento de cepas clínicas de
Candida albicans sensible y resistente a azoles**

Muthular, Milagros; Passero, Pablo

milagrosmuthular@gmail.com; passero.pablo@gmail.com

Farmacología, Facultad de Odontología

Universidad de Buenos Aires

Lista completa de autores e instituciones:

Milagros Muthular¹, Pablo Passero¹, Fernanda Bálsamo², Virginia Jewtuchowicz⁴, Valeria Miozza¹, María Isabel Brusca³, Cristina Pérez^{1*}

^{1*}Farmacología. ²Radiología. ³Microbiología. Facultad de Odontología. Universidad de Buenos Aires. M. T. de Alvear 2142. Buenos Aires. Argentina. ⁴Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. Paraguay 2155. Buenos Aires, Argentina.

Directora y autora para correspondencia: Dra. Cristina Pérez^{1*}
cristina.perez@odontologia.uba.ar

Resumen

- **Introducción.** *Candida albicans* es uno de los microorganismos más frecuentemente involucrados en diversas infecciones y podría provenir de la cavidad bucal del paciente, tanto de nichos de caries como de enfermedad periodontal. El desarrollo de resistencia a los medicamentos disponibles y otros factores justifican la búsqueda de nuevas alternativas antimicóticas.
- **Objetivo.** Estudiar en forma comparativa los efectos *in vitro* del medicamento antitumoral tamoxifeno (Tx) y del fluconazol (Flz) sobre el crecimiento de cepas clínicas de *Candida albicans* aisladas de la boca de pacientes con patologías odontológicas y médicas.
- **Materiales y métodos.** Se emplearon siete cepas de *C. albicans*: a) una estándar ATCC 90028 sensible a Flz (ATCC); b) cuatro bucales de sendas pacientes oncológicas con enfermedad periodontal (period 8, 9, 10 y 11); c) dos bucales de un paciente con SIDA y candidiasis orofaríngea: c1) una sensible a Flz (2-76) y c2) una resistente a Flz (12-99). Se evaluó el crecimiento celular y la concentración inhibitoria mínima (CIM) por técnicas del M27-A3, CLSI. Se calculó la concentración inhibitoria 50 % (CI₅₀) por análisis informático de funciones.
- **Resultados.** El tamoxifeno inhibió el crecimiento de *Candida albicans*, tanto sensible como resistente al fluconazol. Los datos se ajustan adecuadamente a curvas teóricas saturables de tipo concentración del inhibidor *versus* respuesta. La

- potencia del tamoxifeno con respecto al tamoxifeno es 31 veces mayor sobre la cepa resistente y menor que 1 en las sensibles.
- **Conclusiones.** El tamoxifeno tiene actividad antimicótica sobre cepas bucales aisladas de pacientes con patologías odontológicas y médicas. Reviste particular interés su potencia sobre la cepa resistente al fluconazol.

Palabras clave: antimicóticos, *Candida albicans*, tamoxifeno, azoles

Abreviaturas: Flz (fluconazol), Tx (tamoxifeno)

Introducción

La cavidad bucal puede actuar como un reservorio de ciertos microorganismos patógenos que pueden causar infecciones locales y sistémicas, entre ellas la enfermedad periodontal.

El hongo oportunista *Candida albicans* tiene un papel preponderante entre otras especies de su género en la enfermedad periodontal. En efecto, la presencia de sus hifas ha sido demostrada en tejido conectivo de pacientes periodontales, en asociación con bacterias anaerobias altamente invasivas como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Aggregatibacter*

actinomycetemcomitans. *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* podrían formar parte de la placa microbiana periodontal, jugar un papel fundamental en la adherencia de la misma a los tejidos y de esta forma propiciar la invasión en profundidad (Reynaud et al, 2001; Jewtuchowicz et al., 2008; Rubio et al, 2015).

Las patologías periodontales son influenciadas por las hormonas esteroideas, que inducen también cambios microbiológicos al alterar el microambiente y al actuar como nutrientes para los microorganismos. (Shapiro y Freeman, 2014).

Entre los antagonistas de las hormonas esteroideas figura el tamoxifeno, medicamento de elección en el tratamiento del cáncer de mama desde hace más de 20 años. En efecto, este compuesto no esteroide sintético inhibe la unión del estrógeno natural a sus receptores y de esta forma inhibe la proliferación de células tumorales dependientes de él. Su efecto es específico y no presenta afinidad por el receptor de progesterona ni de otros esteroides; de ahí su uso como antitumoral y citostático (Levin et al., 2003).

En 1993 y 1995 Beggs propone que el tamoxifeno podría tener un efecto antifúngico, incluso más letal que los

imidazoles, sobre *Candida albicans* (Beggs, 1993y 1995). Resultados similares reportaron Dolan y col. en 2009, cuando propusieron los siguientes mecanismos de acción sobre *C. albicans* sensible a azoles: alteración de la membrana plasmática e integridad celular, de la homeostasis del calcio e inhibición de la formación del tubo germinal. Además, demostraron su efecto fungicida *in vitro* y su actividad *in vivo* sobre animales de laboratorio.

Sin embargo, no se habían reportado datos de estudios en la cavidad bucal ni en cepas resistentes a azoles, excepto uno preliminar realizado en nuestros laboratorios (Passero y col., 2016). En función de lo expuesto, en este trabajo se propone lo siguiente.

Objetivo

Estudiar en forma comparativa los efectos *in vitro* del tamoxifeno sobre el crecimiento de distintas cepas bucales de interés odontológico y médico de *Candida albicans*, tanto sensible como resistente a azoles.

Materiales y Métodos

Microorganismos

Como microorganismo de referencia, se usó la cepa estándar de *C. albicans* ATCC 90028, sensible a azoles y aquí abreviada como ATCC.

Como pacientes que cursan patologías odontogénicas y

complicaciones médicas, se seleccionaron cuatro mujeres inmunocompetentes mayores de 18 años, con enfermedad periodontal no agresiva tratada mecánicamente y diagnóstico reciente de cáncer de mama. Las pacientes, numeradas como 8, 9, 10 y 11, concurrían al Centro Médico Austral para su terapia. De sus surcos gingivales se aislaron sendas cepas de *Candida albicans*, las cuales fueron abreviadas como period 8, 9, 10 y 11.

También se evaluaron dos cepas bucales aisladas de un paciente que tenía SIDA y episodios recurrentes de candidiasis orofaríngea. Tal persona requería dosis de fluconazol cada vez mayores para controlar la infección hasta que finalmente no respondió a 800 mg de fluconazol por día. Las dos cepas habían sido caracterizadas (White, 2002) y donadas gentilmente por el Dr. T. White (Universidad de Washington, Seattle, EE.UU.). De ellas, 2-76 es sensible a azoles, mientras 12-99 es resistente a través de la sobreexpresión de los transportadores ABC *cdr1*, *cdr2* y *mdr1*. Aquí se numeran de la misma forma en que se hizo originalmente (White, 2002).

Compuestos

El tamoxifeno fue adquirido de Laboratorio Gobbi Novag S.A. (Wilde, Provincia de Buenos Aires, Argentina).

El fluconazol (98 % pureza) fue comprado a Sigma Aldrich (Saint-Louis, MO; USA).

Crecimiento de *Candida albicans*

El crecimiento celular se evaluó por las técnicas de espectrofotometría estandarizadas M27-A3 del CLSI (2008) descritas por Barceló *et al.* (2017). Se utilizó un inóculo inicial de 10^3 UFC/ml. Se incluyeron concentraciones de tamoxifeno y fluconazol comprendidas entre 0 y 1.000 μ M. Se midió la absorbancia a 540 nm, tras 24 h de incubación a 35 °C en microplacas de 96 cavidades.

Graficación y análisis estadístico

Se utilizó un programa GraphPad Prism versión 5.00 software (GraphPad Software San Diego; CA, USA) para construir los gráficos y calcular los promedios y error estándar de resultados provenientes de experimentos independientes realizados al menos por duplicado.

Resultados y Discusión

Partiendo de una solución 20 mM de tamoxifeno en dimetilsulfóxido (DMSO) y a los efectos de lograr las mínimas

proporciones posibles del solvente orgánico, se probó la dilución del compuesto en distintas combinaciones de dimetilsulfóxido/agua. Se utilizaron los controles pertinentes en los experimentos.

Al igual que el fluconazol, el tamoxifeno inhibió el crecimiento de las distintas cepas de *Candida albicans* en forma no lineal dependiente de la concentración. Los datos se ajustan a curvas teóricas del tipo log de la concentración de inhibidor *versus* respuesta. Se obtuvieron los gráficos de saturación y los valores de concentración inhibitoria 50 % (CI_{50}), equivalente a la concentración inhibitoria mínima (CIM) en las condiciones experimentales respetadas. Se muestran resultados obtenidos con dos cepas de *Candida albicans*, una sensible y otra resistente a azoles, provenientes de una paciente que presenta enfermedad periodontal (**period 8, figura 1.**) y de otro careciente de ella (**12-99, figura 2.**), respectivamente.

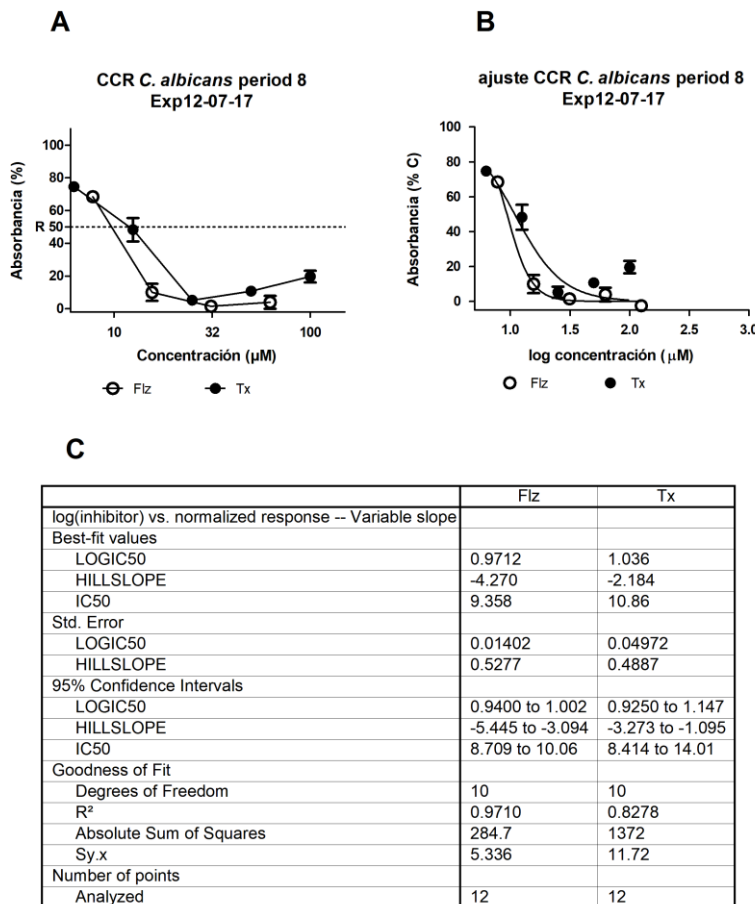


Fig. 1. Efectos del Tx y Flz sobre el crecimiento de *C. albicans* sensible a azoles aislada de la paciente con enfermedad periodontal n° 8 (period 8). Curvas concentración-respuesta, con abscisa en escala logarítmica (A). Ajuste a funciones no lineales “log [Inhibidor] versus normalized response variable slope” y tabla con parámetros de ajuste (B y C). Se muestran resultados provenientes de un experimento tipo realizado por triplicado o sextuplicado según la concentración utilizada.

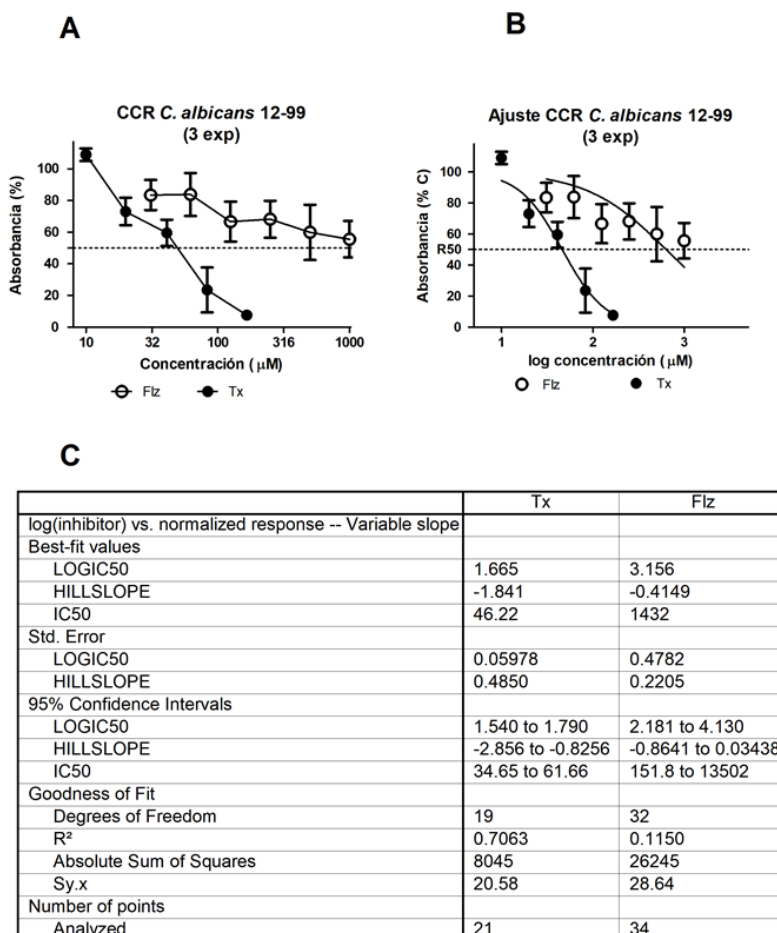


Fig. 2. Efectos delTx y Flz sobre el crecimiento de *C. albicans* resistente a azoles 12-99 aislada de un paciente careciente de enfermedad periodontal. Curvas concentración-respuesta con abscisa en escala logarítmica (A). Gráfico de ajuste a funciones no lineales “log [Inhibidor] versus normalized response variable slope” y tabla con parámetros de ajuste (B y C). Se muestran datos de 3 experimentos independientes realizados por triplicado.

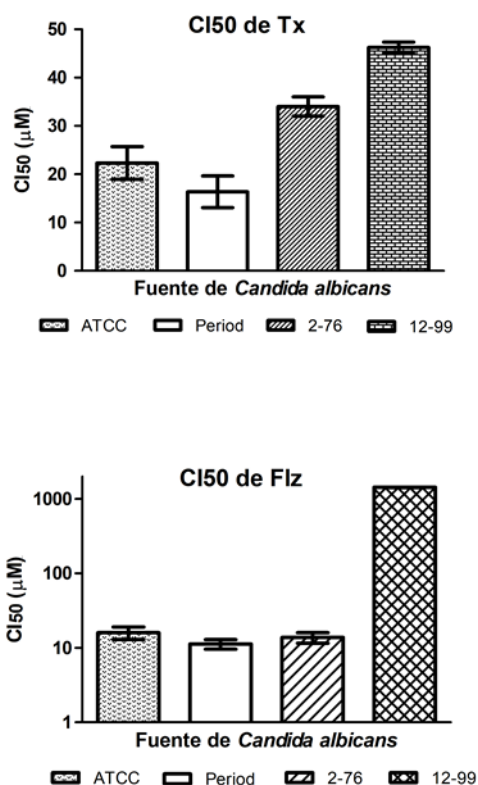


Fig. 3. Concentración inhibitoria 50% (CI₅₀) del tamoxifeno y fluconazol sobre distintas cepas de *C. albicans* de distinto origen: estándar sensible a azoles ATCC 90028 y clínicas con distinta sensibilidad a fluconazol, consignadas en Materiales y métodos. En el caso de las cepas periodontales (8, 9,10 y 11), se presenta el promedio de datos de las cuatro. Los datos corresponden a promedios y error estándar de 2 a 6 experimentos independientes realizados al menos por triplicado.

Como puede observarse, el tamoxifeno tiene actividad inhibitoria sobre todas las cepas de *Candida albicans*, tanto testigo de colección como aisladas clínicamente. El fluconazol, utilizado como droga de referencia, presenta similares características, con una CIM de $16 \pm 3 \mu\text{M}$ en ATCC 90028 y $1432 \pm 3 \mu\text{M}$ en la cepa resistente, en concordancia con trabajos anteriores de parte de nuestro equipo (Muthular *et al.*, 2018; Peralta *et al.*, 2012).

Los datos experimentales se ajustan adecuadamente a curvas teóricas de tipo concentración de inhibidor *versus* respuesta, según se infiere de los valores de los parámetros obtenidos

tras aplicación del programa Graph Pad para funciones matemáticas no lineales. Los datos obtenidos permiten estimar con mayor confiabilidad y precisión las curvas de saturación y los valores de concentración inhibitoria 50 % (CI₅₀), equivalente a la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los compuestos en las condiciones experimentales.

Nuestros resultados indican que el tamoxifeno inhibe el crecimiento de cepas bucales de *Candida albicans* aislada de pacientes que cursan patologías odontogénicas y médicas severas. En efecto, cuatro pacientes presentaban periodontitis y cáncer de

mama, mientras el quinto padecía de SIDA y candidiasis recurrentes resistentes al fluconazol. La actividad del Tx contra la cepa de *Candida albicans* 12 99 proveniente del quinto paciente reviste particular relevancia debido a su resistencia mediada por bombas de eflujo, las cuales están involucradas en el 85 % de los pacientes infectados con VIH (White et al., 1997).

Cabe destacar que el tamoxifeno tiene una potencia 31 veces mayor que el fluconazol sobre la cepa resistente, mientras que en las cepas sensibles la potencia es menor que 1. Lo primero podría convertirlo en una alternativa para candidiasis resistentes a azoles.

Los resultados amplían el abanico de efectos farmacológicos del tamoxifeno, en consonancia con otros compuestos que comparten propiedades antimicrobianas y antitumorales, como el dietilestilbestrol (Muthular y col., 2018) y el flavonoide 2',4'-dihidroxi-5'-

Bibliografía

- Barceló, S., Peralta, M., Calise, M., Finck, S., Ortega, G., Diez, R., Cabrera, J.L., Pérez, C. (2017). Interactions of a prenylated flavonoid from *Dalea elegans* with fluconazole against azole-resistant *Candida albicans*. En

(1''',1'''-dimetilalil) - 8-prenilpinocembrina (8PP), previamente estudiado por parte del equipo de investigación (Pérez et al., 2003; Elingold et al., 2008).

Esto revestiría importancia clínica debido a la creciente emergencia de resistencia y de complicaciones por interacciones con otros medicamentos que esté recibiendo el paciente. Los resultados ameritarían la continuación de diversos estudios farmacológicos, a efectos de evaluar su potencialidad terapéutica como antimicótico, habida cuenta de que está aprobado como medicamento con otros objetivos.

Conclusiones

El tamoxifeno inhibe el crecimiento de distintas cepas clínicas bucales de *Candida albicans*, provenientes de pacientes con distintas patologías odontológicas y médicas. Su actividad abarca *Candida* sensible y resistente al fluconazol, si bien cabe destacar que su potencia sobre la segunda es 31 veces mayor que la del fluconazol.

Phytomedicine. 32, 24-29; DOI: 10.1016/j.phymed.2017:05.001.

- Beggs, W.H. (1993, April). Anti-Candida activity of the anti-cancer drug tamoxifen. En *Res Común Chem Pathol. Pharmacol.* 80(1), 125-8.

- Beggs, W.H. (1995 April). Growth phase in relation to the lethal acción of tamoxifen on *Candida albicans*. En *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 88(1), 115-8.
- Clínical and laboratory standards institute. (2008). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-73; 3rd ed. Clínical and Laboratory standards institute, Wayne, PA.
- Dolan, K., Montgomery, S., Buckheit, B., Didone, L., Wellington, M., Kryson, D. (2009). Antifungal activity of tamoxifen: *in vitro* and *in vivo* activities and mechanistic characterization. En *Antimicrobial agent and chemogherapy; 53(8)*, 3337-3346.
- Elingold, I., Isollabella, M.P., Casanova, M., Celenyano, A.M., Pérez, C., Cabrera, J.L., Diez, R.A., Dubin, M. (2008). Mitochondrial toxicity and antioxidant activity of a prenylated flavonoid isolated from *Dalea elegans*. En *Chem. Biol. Interact.*, 171, 294-305.
- Jewtuchowicz, V.M., Mujica M.T., Brusca M.I., Sordelli, N., Malzone, M.C., Pola, S.J., Iovannitti, C.A., Rosa, A.C. (2008 December). Phenotypic and genotypic identification of *Candida dubliniensis* from subgingival sites in immunocompetent subjects in Argentina. En *Oral Microbiol Immunol.*, 23(6), 505-9.
- Levin, E., Levin, R., Actis, A. (2003). Clave en el tratamiento del cáncer de mama. Ed. Fundación oncológica Encuentro. pp. 71
- Muthular, M., Passero, P., Bálsamo, F., Jewtuchowicz, V., Miozza, V., Brusca M.I., Pérez, C. Efecto inhibitorio del dietilestilbestrol sobre cepas clínicas de *Candida albicans* sensible y resistente a azoles. En revisión en *Rev Iberoamericana de Micología.*
- Passero, P., Barcelona, S., Bálsamo, F., Jewtuchowicz, V., Brusca, M.I., Pérez, C. (22-25 de Noviembre de 2016). El tamoxifeno inhibe el crecimiento de *Candida albicans* resistente a azoles. En IX international symposium on natural products chemistry and applications. Termas de Chillán, Chile.
- Peralta, M.A., Calise, M., Fornari, M.C., Ortega, M.G., Diez, R.A., Cabrera, J.L., Pérez, C. (2012). A prenylated flavanone from *Dalea elegans* inhibits rhodamine 6G efflux and reverses fluconazole resistance in *Candida albicans*. En *Planta Med.*, 78,981-987.
- Pérez, C., Tiraboschi, I.N., Ortega, M.G., Agnese, A.A., Cabecera, J.L. (2003). Further antimicrobial studies of 2',4'-dihidroxy-5'-(1'''-1'''-

- dimethylallyl-6-geranylgeranyl pyrophosphate from *Dalea elegans*. En *Pharm. Biol.*, 41, 171.
- Reynaud, A.H, Nygaard-Ostly, B., Boygard, G.K., Eribe, E.R., Olsen, I., Gjermo, P. (2001). Yeasts in periodontal pockets. En *J. Clin. Periodontol.*, 28(11), 860-4.
- Rubio, N.A., Puia, S., Toranzo, S., Brusca, M.I. (2015) Invasión fúngica en tejido conectivo en pacientes con enfermedad gingivo-periodontal. En *Rev. Iberoamericana de Micología*, 32(1), 20-24.
- Shafiro, L.F., Freeman, K. (2014, April). The relationship between estrogens, estrogens receptors and periodontal disease in adult women: a review of the literature. (2014, April). En *NY State Dent Journal*, 80(3)30-4.
- White, T.C., Pfaller, M.A., Rinaldi, M.G., Smith, J., Redding, S.W. (1997) Stable azole drug resistance associated with a substrain of *Candida albicans* from an HIV-infected patient. En *Oral Dis.*, 3(1), 102-109.
- White, T., Holleman, S., Dy, F., Mirels, L., Stevens, D. (2002). Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. En *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46, 1704-1713.

Agradecimientos

Agradecemos al Prof. Titular Dr. J. C. Elverdin por el préstamo del espectrofotómetro de la Cátedra de Fisiología de la FOUBA.

Financiamiento

Universidad de Buenos Aires, Facultades de Odontología y de Medicina.