

STUDIO DEL MECCANISMO DI AZIONE DEL *TEA TREE OIL* SU CEPPI DI *CANDIDA SPP.*

Marisa Colone (a), Nicolina Mastrangelo (a), Laura Toccaceli (a), Francesca Mondello (b), Antonietta Girolamo (b), Giuseppe Arancia (a), Antonio Cassone (b), Annarita Stringaro (a)

(a) Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Le infezioni fungine opportunistiche rappresentano un'importante causa di morbilità e mortalità nei pazienti immunocompromessi e rimangono, a tutt'oggi, una sfida aperta per i clinici infettivologi. Il frequente impiego di trattamenti chemioterapici aggressivi, di dispositivi medici intravascolari e, non da ultimo, il sempre crescente numero di pazienti affetti da HIV, rende conto in larga parte del drammatico incremento delle infezioni fungine nell'ultimo decennio e della loro attesa espansione negli anni a venire. Un'alta percentuale dei pazienti infettati dal virus HIV sviluppa infezioni fungine durante il decorso della malattia; di tali infezioni una delle più ricorrenti è la candidiasi orofaringea. L'agente eziologico maggiormente implicato è *Candida albicans*. Nonostante i recenti progressi ottenuti con la terapia antivirale basata sulla combinazione fra inibitori della trascrittasi virale e inibitore della proteasi (*Highly Active Antiretroviral Therapy*, HAART), tali infezioni opportunistiche continuano ad essere un problema rilevante nella patologia AIDS. Tra gli agenti antifungini utilmente impiegati nel trattamento delle infezioni da *Candida* vi sono i polieni (Amfotericina B) e i derivati azolici (fluconazolo, chetoconazolo, voriconazolo, itraconazolo). Come conseguenza dell'AIDS epidemico, durante gli ultimi dieci anni è stato riscontrato un notevole aumento delle infezioni delle mucose causate dalla specie di *Candida* associate con un notevole aumento della resistenza agli azoli. In particolare, il fluconazolo è diventato l'agente anti-micotico di scelta nel trattamento e nella profilassi della candidiasi orofaringea dall'inizio del 1990, con conseguente induzione di resistenza agli azoli, descritta negli anni seguenti, in circa il 41% dei pazienti (1). A livello molecolare sono stati evidenziati diversi meccanismi cellulari coinvolti nell'insorgenza della resistenza agli azoli. Probabilmente, una delle cause maggiormente importanti nella farmacoresistenza di ceppi di *Candida* isolati da pazienti AIDS è l'alterato accumulo ed efflusso dei farmaci dovuto all'attivazione dei geni codificanti alcune proteine trasportatrici. Sono state individuate due importanti classi di proteine trasportatrici coinvolte nella farmacoresistenza di *Candida*: i trasportatori ABC (ATP-binding cassette) e i trasportatori appartenenti alla superfamiglia dei *major facilitators* (MF). Queste proteine hanno la capacità di trasportare contemporaneamente più farmaci, conferendo quindi il fenotipo polifarmacoresistente alle cellule fungine che li sovra-esprimono. È stata infatti dimostrata la presenza di una molecola simil-P-glicoproteina (P-gp) umana, nota molecola di trasporto dei farmaci fortemente coinvolta nella polifarmacoresistenza delle cellule tumorali, in ceppi di *Candida albicans*, la cui espressione è correlata al grado di resistenza agli azolici. Tale risultato è stato ottenuto sia su ceppi farmacoresistenti isolati da pazienti HIV positivi, sia su ceppi isolati da pazienti con vaginite ricorrente, resi resistenti *in vitro* mediante ripetuti passaggi in presenza di concentrazioni crescenti di fluconazolo (2).

Nuove strategie terapeutiche per il trattamento delle micosi resistenti

L'aumento di incidenza delle infezioni fungine invasive nella popolazione è proprio dovuto all'uso sempre più intensivo di terapie immunosoppressive e antibiotiche ad ampio spettro. Per questo motivo, negli ultimi anni l'interesse per le proprietà terapeutiche delle sostanze di origine naturale è risultato in progressiva crescita. In questo contesto è apparsa evidente la necessità di sviluppare dei modelli *in vitro* e di applicare le indagini biochimiche e ultrastrutturali per ottenere indicazioni utili sul meccanismo di azione e quindi sulla reale attività farmacologica delle sostanze naturali di maggiore impiego empirico. I risultati ottenuti potranno avere un impatto importante sulla salute pubblica offrendo indicazioni utili per l'ottimizzazione dell'impiego terapeutico di alcuni "farmaci naturali". Infatti, per la sperimentazione di nuove sostanze, consistente nell'identificazione dei principi attivi e degli eventuali componenti caratteristici, nella valutazione dell'attività antimicrobica e antitumorale se usate da sole o in combinazione con farmaci già impiegati in terapia, potrà migliorarne l'efficacia e/o diminuire gli effetti collaterali negativi.

Risultati sperimentali

Numerosi studi *in vitro* hanno dimostrato che l'olio essenziale distillato dalle foglie di *Melaleuca alternifolia*, noto come *Tea Tree Oil* (TTO) o come olio di *Melaleuca*, possiede proprietà antibatteriche, antifungine, antivirali, antinfiammatorie e antitumorali. Sebbene le attività antimicrobiche siano già state ampiamente indagate, a tutt'oggi il meccanismo di azione del TTO è poco conosciuto (3,4). Nell'ambito della ricerca da noi condotta abbiamo analizzato gli effetti antifungini del trattamento con il TTO sul fungo diploide *Candida albicans* (Figura 1).

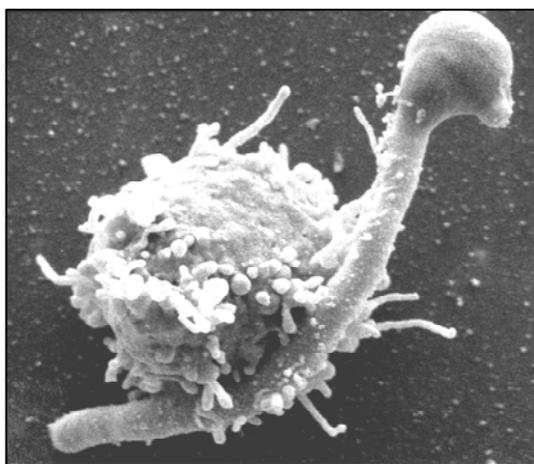


Figura 1. Micrografia ottenuta al microscopio elettronico a scansione (SEM) di un coniugato formato da un cellula di *Candida albicans* e una cellula Natural Killer (NK) (15.000 x)

Studi di proliferazione cellulare hanno dimostrato che il TTO è in grado di inibire la crescita sia di un ceppo sensibile al fluconazolo di *Candida albicans* (3153) sia di un ceppo resistente (AIDS68), isolato da un paziente HIV+ (Figura 2).

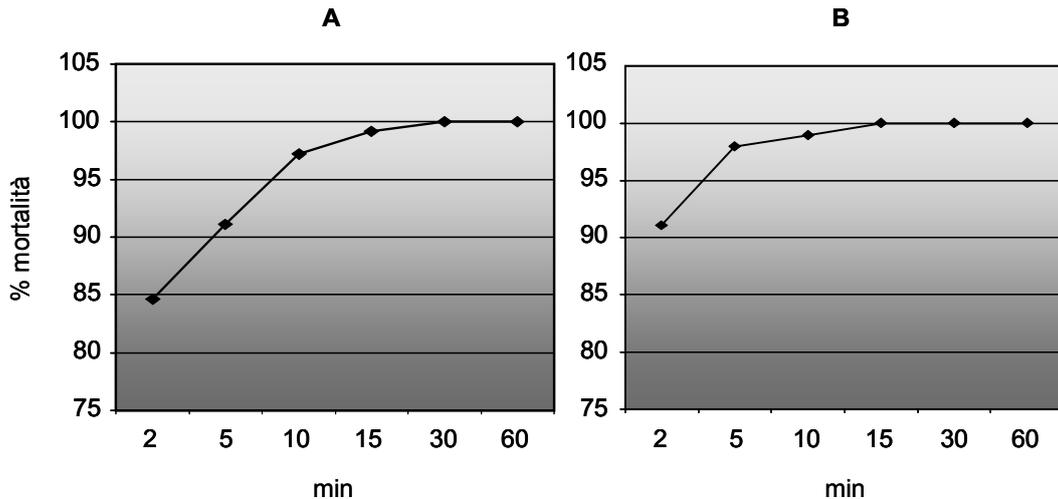


Figura 2 Attività *in vitro* del TTO su due ceppi di *C. albicans*. Il grafico A mostra l'attività inibitoria sul ceppo 3153, sensibile al fluconazolo, mentre il grafico B si riferisce a quella osservata sul ceppo resistente AIDS68

Le osservazioni condotte mediante microscopia confocale sulle cellule fungine dei due ceppi 3153 e AIDS68, incubate con Hoechst dopo trattamento con 1% di TTO a tempi crescenti (2 min→1h) hanno rivelato che il ceppo 3153 dopo solo 2 min di trattamento con l'olio essenziale presenta delle alterazioni della cromatina; questa, infatti, appare modificata e più addensata. Tali alterazioni non sono visibili nel ceppo resistente AIDS68 trattato per 2 min ma compaiono solo a tempi più lunghi di trattamento (30 e 60 min).

L'analisi del ciclo cellulare, mediante citometria a flusso (FACS), ha rivelato che il trattamento con 1% TTO a tempi crescenti (2 min→48h) causa alterazioni del ciclo cellulare probabilmente associate ad un rallentamento della crescita microbica. A 48h di trattamento, una minore frazione di cellule di entrambi i ceppi è nelle fasi S e G2/M, rispetto al rispettivo campione di controllo. Parallelamente, è stato valutato anche l'effetto del TTO sulle membrane analizzando al FACS l'*uptake* di ioduro di propidio. Le letture sono stati eseguite su cellule vitali di entrambi i ceppi trattate con il TTO (1%), a tempi crescenti (2 min→48h). I risultati ottenuti indicano che l'alterazione della permeabilità di membrana possa essere un fenomeno che si verifica precocemente durante il trattamento, al quale però non segue la morte cellulare ma bensì un rallentamento della crescita associato alle alterazioni morfologiche della cromatina.

Conclusioni

I dati sperimentali da noi ottenuti dimostrano che il TTO è un agente antimicotico in grado di esercitare la sua azione fungicida mediante un complesso meccanismo di azione, al quale partecipano numerose proteine citoplasmatiche fungine implicate nella trasduzione di segnali che regolano l'omeostasi cellulare. Obiettivo del nostro lavoro futuro sarà proprio quello di identificare queste molecole responsabili dei fenomeni biologici osservati, allo scopo di valutare la reale possibilità di mettere a punto una nuova strategia terapeutica per il trattamento delle micosi resistenti alle attuali terapie farmacologiche.

Bibliografia

1. Brawer DL, Havan AJ. Oral candidiasis in HIV patients. *Curr Top Med Mycol* 1995;6:113-25.
2. Stringaro A, Molinari A, Calcabrini A, Arancia G, Ceddia GP, Cianfriglia M, Poloni F, Mondello F, Angiolella L, De Bernardis F, Cassone A. Detection of human P-glycoprotein-like molecule in azole-resistant *Candida albicans* from HIV+ patients. *Microbial Drug Resistance* 2002;8:235-44.
3. Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin Microbiol Rev* 2006;19(1):50-62.
4. Calcabrini A, Stringaro A, Toccaceli L, Meschini S, Marra M, Colone M, Salvatore G, Mondello F, Arancia G, Molinari A. Terpinen-4-ol, the main component of *Melaleuca Alternifolia* (Tea tree) oil inhibits *in vitro* growth of human melanoma cells. *J Invest Dermatol* 2004;122:349-60.