

ULTRAESTRUCTURA DE *Microsporum canis*: UN CASO DE *Tinea Capitis* TRATADO TÓPICAMENTE CON AJOENE**ULTRAESTRUCTURE OF *Microsporum canis*: A CASE OF *Tinea Capitis* TREATED TOPICALLY WITH AJOENE**DRUVIC LEMUS-ESPINOZA¹, MARÍA TERESA MANISCALCHI BADAOU¹, ELIADES LEDEZMA¹,
DWIGHT ARRIECHE²*Universidad de Oriente, ¹Núcleo de Anzoátegui, Escuela de Ciencias de la Salud, Departamento de Microbiología y Parasitología, Grupo de Investigación en Microbiología Aplicada, Barcelona, Venezuela,**²Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas "Dra. Susan Tai", Departamento de Biomedicina, Laboratorio de Histología, Cumaná, Venezuela.**E-mail: lemusd@yahoo.com***RESUMEN**

En este estudio se usó ajoene (0,4%) tópico para evaluar sus efectos en un caso de tiña de la cabeza por *Microsporum canis*, un dermatofito con reconocida actividad queratinofílica. El crecimiento del hongo se evaluó por microscopía electrónica de transmisión, en muestras extraídas antes de iniciar el tratamiento y luego de 45 días de tratamiento. Los cambios más importantes fueron alteración de la membrana citoplasmática, desintegración del citoplasma y deterioro de organelas. Esta nueva evidencia en los estudios *in vivo* muestra la degeneración sufrida en conidias e hifas del hongo comprometiendo la integridad celular con el tratamiento por vía tópica con ajoene. Los cultivos, a los 30 días, demostraron ausencia de las estructuras fúngicas manteniéndose esta condición hasta 45 días después del tratamiento. El estudio muestra ultraestructuralmente la invasión endo-ectotrix de *M. canis* en cabello humano y el efecto antifúngico propio de ajoene con su destacada y potente bioactividad antiproliferativa en el proceso micótico evaluado.

PALABRAS CLAVE: Actividad fungicida, dermatomicosis, hifas, microscopía electrónica de transmisión.**ABSTRACT**

In this study, topic ajoene was used (0.4%) to evaluate its effects in a case of a fungal infection of the scalp caused by *Microsporum canis*, a dermatophytes with a known keratinophilic activity. The activity of the fungus was evaluated by transmission electron microscopy, in samples extracted before the beginning and 45 days after the treatment. The most important changes were alteration of the cytoplasmic membrane, disintegration of the cytoplasm and organelles deterioration. This new evidence in the studies *in vivo* shows the degeneration suffered by conidia and hyphae of the fungus, compromising the cellular integrity with the topical treatment with ajoene. The cultures, 30 days after treatment, demonstrated the absence of the fungal structures maintaining this condition up to 45 days after the treatment. The study shows ultrastructurally the invasion endo-ectotrix of *M. canis* in human hair and the antifungal effect characteristic of ajoene with its outstanding and potent bioactivity antiproliferative bioactive in the evaluated micotic process.

KEY WORDS: Fungicidal activity, dermatomycosis, hypha, transmission electron microscopy.**INTRODUCCIÓN**

Tinea capitis por *Microsporum canis* se caracteriza por presentar en sus lesiones erosión de la superficie del cabello e invasión endotrix-ectotrix de las hifas hacia la capa cuticular del cabello. Esta micosis es frecuente en niños y rara en adultos, debido a que luego de la pubertad se produce una modificación química de los ácidos grasos no saturados del cuero cabelludo secundarias a la acción hormonal, con efecto fungistático. El tratamiento en las tiñas suele ser sistémico, de elección griseofulvina, y considerándose la terapia tópica solo como un coadyuvante, con imidazoles y triazoles (Maniscalchi *et al.* 2011).

Es conocido el potente efecto antifúngico que tiene ajoene *in vivo* sobre las micosis superficiales, a saber: *Tinea corporis*, *Tinea cruris* (Ledezma *et al.* 1999), *Tinea capitis* (Maniscalchi *et al.* 2004) y onicomycosis (Lemus-Espinoza *et al.* 2004, 2010), así como también su buena respuesta con menores efectos indeseados durante la aplicación de su uso tópico. Evidencias morfométricas observadas en material fúngico *in vitro* han demostrado el daño que produce ajoene en las células fúngicas sometidas a tratamiento tópico, donde la curación clínica se ha hecho notoria junto con la ausencia de crecimiento del hongo en los cultivos, lográndose la involución de la micosis (Ledezma *et al.* 1999, Lemus-Espinoza *et al.* 2004, 2013).

El objetivo de este trabajo fue describir un caso clínico de *tiña capitis*, causada por *M. canis*, con énfasis en los cambios ultraestructurales de las conidias e hifas del cabello infectado, tratadas *in vivo* con ajoene (0,4%), con el fin de elucidar la actividad antimicótica de este potente modulador de la integridad de la membrana citoplasmática fúngica. Se presenta el caso de un paciente escolar de 7 años de edad, masculino, proveniente de Barcelona, estado Anzoátegui, previamente sano, con tiña microspórica, que consultó por presencia de área alopecica, en la región temporal derecha de aproximadamente tres meses de evolución. El niño refirió prurito y dolor al tacto. Se evidenciaron placas eritematosas, descamativas, redondas u ovales, que se extendieron periféricamente, entre las cuales los cabellos perdieron el lustre, se volvieron quebradizos y algunos estaban debilitados en su base, produciendo tonsura. La inflamación aflojó las hebras de cabello permitiendo una fácil depilación. Previamente fue evaluado y tratado con antibióticos tópicos, sin resolución de las lesiones.

MATERIALES Y MÉTODOS

La participación del menor en el estudio fue voluntaria, el consentimiento informado lo otorgó la madre del niño como su representante legal.

Muestras

La muestra del paciente fue obtenida por depilación, previa limpieza de la zona afectada, con alcohol isopropílico al 70% v/v. Se separaron los cabellos en placas de Petri para cada tipo de estudio. Se examinaron por microscopía de luz con solución de KOH al 20%, para determinar el tipo de invasión al cabello, las otras porciones de las muestras se utilizaron en estudios *in vitro* (identificación por cultivo micológico) para obtener su morfo-fisiología y microcultivos, por el método de Ridell, empleándose claves dicotómicas en la identificación de géneros según De Hoog *et al.* (2000). Estos estudios fueron realizados en el laboratorio de Grupo de Investigación de Microbiología Aplicada de la Escuela de Ciencias de la Salud, Núcleo de Anzoátegui, Universidad de Oriente.

Estudio de ultraestructura

Para la evaluación *in vivo* por ultraestructura, mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), las muestras se fijaron con glutaraldeído al 2% en buffer cacodilato de sodio 0,2 M y pH 6,8; se lavaron tres veces, con el mismo buffer, luego se post-fijaron con

tetraóxido de osmio al 1% y después de tres lavados con agua bidestilada-desionizada, se deshidrataron en una serie ascendente de alcoholes. Las muestras se incluyeron en EPON 812, se hicieron cortes ultrafinos en ultramicrotomo Reicher Jung Ultra Cut E (Dupón, división productos biomédicos USA). Se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo según el método descrito por Hayat (2000). Las muestras se observaron en microscopio electrónico de transmisión (Hitachi H-600, Japón). Esta parte del estudio se realizó en el Laboratorio de Histología del Departamento de Biomedicina, Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas “Dra. Susan Tai”, Universidad de Oriente, Cumaná, estado Sucre.

RESULTADOS

Las lesiones iniciales caracterizadas por ruptura del cabello, redondeadas, con áreas de descamación y alopecia se pueden observar en la Figura 1a, el estudio micológico directo de las muestras del paciente permitió confirmar el proceso fúngico por hifas y arthroconidias. Las hifas estaban alrededor y en la médula del cabello (Fig. 2a, 2b). Se pudo observar la cutícula del filamento corneo desintegrado, irregular y alterada a lo largo del cabello. Así como también la presencia de fluorescencia positiva en la lesión inicial, sugestiva de actividad por el hongo queratinofílico *Microsporum canis* (Fig. 2c). Los microcultivos y el estudio taxonómico, corroboraron a *M. canis* como el patógeno involucrado en la queratomycosis. Después de recibir tratamiento con ajoene (0,4%), por cuatro semanas, hubo cambios en la lesión, disminución del prurito y descamación (Fig. 1b, 1c). Ultraestructuralmente en las muestras de cabello sin tratar, se pudieron observar estructuras fúngicas unidas y próximas al material corneo (Fig. 3a, panel superior). Muchos organismos en fase patógena perforando profundamente el cuerpo del cabello, llenando la médula infectada, también se pudo evidenciar y se destacó en ellos la pared celular, membrana celular y organelas de aspecto y disposición normales (Fig. 3b-c, panel superior).

El desarrollo de *M. canis* fue fuertemente inhibido por la concentración de ajoene (0,4%) durante el primer mes de tratamiento. Las evidencias ultraestructurales de las muestras tomadas *in vivo* post tratamiento, revelaron en general alteraciones citomorfológicas en la hifa, aumento de la vacuolización con la consecuente reducción del citoplasma y la pared celular con evidente daño de la membrana citoplasmática del hongo (Fig. 3a, panel inferior). Otros cambios morfológico-estructurales

observados fueron deterioro considerable de las paredes, plegamientos irregulares, disminución del grosor e invaginaciones en los restos distorsionados del hongo (Fig. 3b, panel inferior). En algunas células se observó ausencia parcial o total del contenido citoplasmático. En la gran mayoría de las imágenes las alteraciones de las

membranas se observaron tanto en células fúngicas libres como en aquellas que se encontraban en el interior del cabello. Se evidenciaron agregados, semejantes a lo que probablemente fueron las paredes celulares externas, con gran desorganización intracitoplasmática junto con el deterioro de las organelas (Fig. 3c, panel inferior).

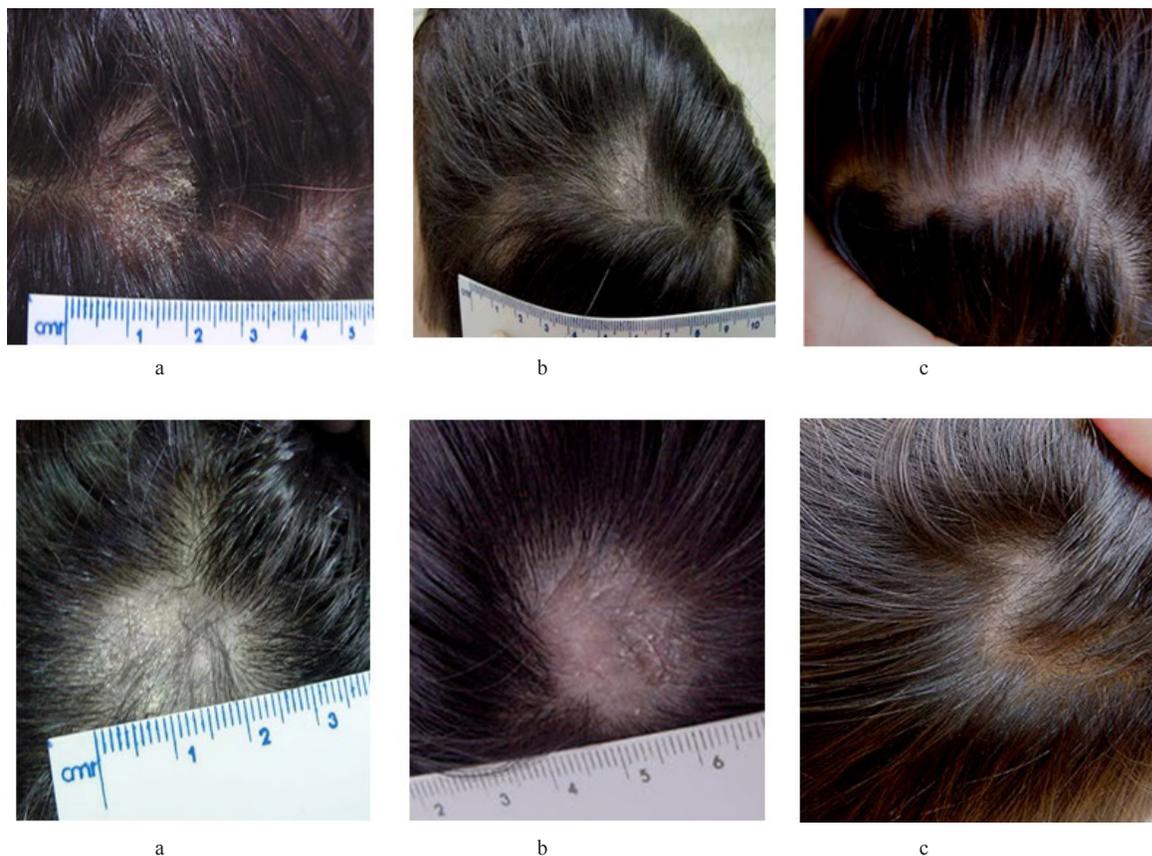


Figura 1. Evolución de la lesión. *a)* Placas confluentes eritematoescamosas con cabellos cortos y quebradizos de aspecto seboreico a nivel de vértex. *b)* Con cuatro semanas de tratamiento con ajoene (0,4%), se alcanzó la cura micológica con el cese de proceso descamativo del cabello. *c)* Remisión de las lesiones a las ocho semanas de tratamiento con ajoene (0,4%).

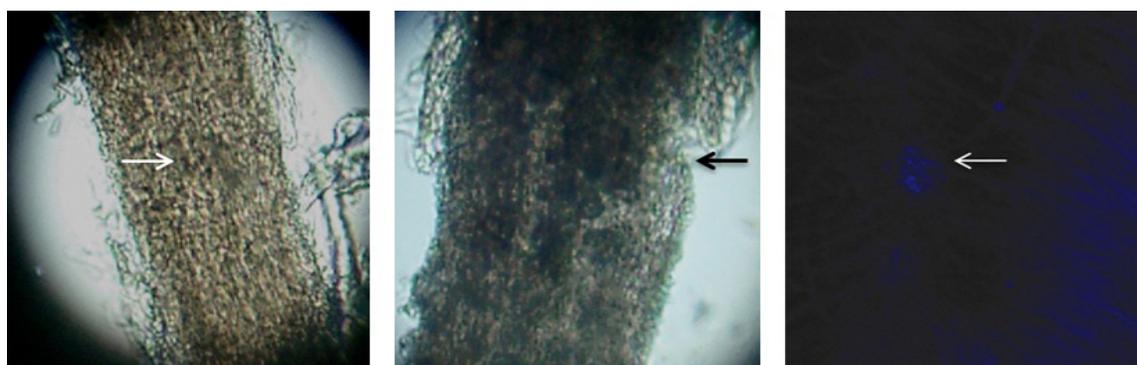


Figura 2. Microscopía óptica de cabellos sin tratamiento. *a)* Cabello donde se muestra fractura en la superficie por acción de las hifas disolviendo la integridad de la cutícula. *b)* Parasitación de tipo endoectotrix con invasión interna de artroconidias subesféricas que comprometen la cutícula (este tipo de parasitación ectoendotrix es poco común para *Microsporium canis*) (400X). *c)* Fluorescencia positiva de la lesión (flecha blanca).

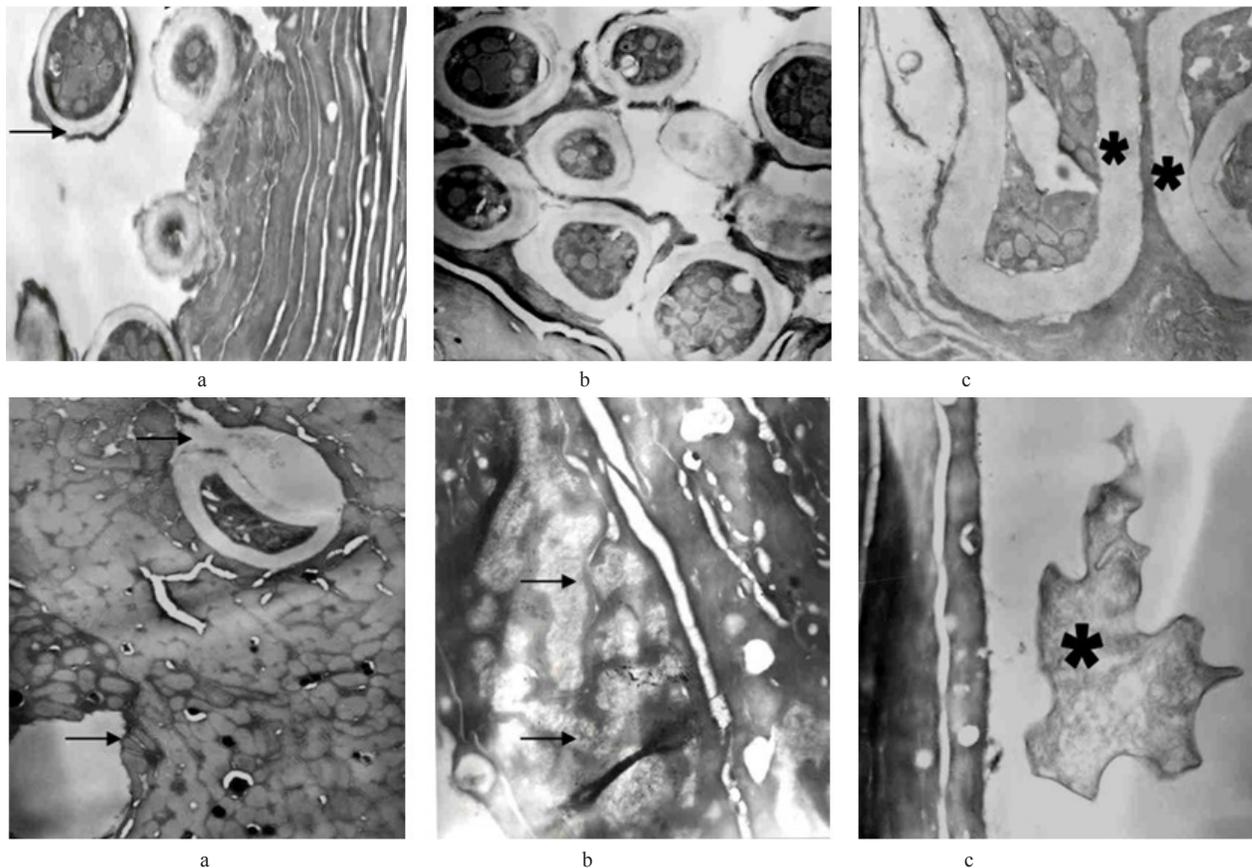


Figura 3. Panel superior. Microscopía electrónica de transmisión (MET) de cabellos parasitados antes de tratamiento tópico con ajoene (0,4%). *a*) MET de sección transversal de cabellos con estructuras fúngicas adheridas alrededor del cabello (flechas negras) (12.000X). *b*) MET transversal de cabello infectado, se observa invasión de múltiples hifas de *Microsporium canis* en la médula (12.000X). *c*) imagen en aumento de hifa típica de *Microsporium canis* en fase patógena. Se observa la pared celular normal (asterisco) y la integridad de la membrana citoplasmática y organelas (15.000X). Panel inferior. Microfotografía electrónica de muestras de cabello tratado cuatro semanas con ajoene (0,4%). *a*) Hifa anormal, obsérvese la estructura comprimida con respecto al espacio inicialmente ocupado. En la parte inferior, una hifa vacía sin pared celular, membrana plasmática y organelas (8.000X). *b*) Las flechas de color negro indican posibles restos de *Microsporium canis* localizados en el interior de la fibra del cabello (10.000X). *c*) Otro ejemplo de hifa deformada (asterisco) con pérdida total de la pared celular y colapso irreversible intracitoplasmático (15.000X).

DISCUSIÓN

Estudios previos demostraron en las micosis superficiales y profundas que el tratamiento con ajoene causa importantes cambios ultraestructurales en la membrana celular (Ledezma *et al.* 2008). En esta nueva experiencia en tiña de la cabeza, los numerosos microsporos que se ubicaban en la superficie del cabello, dieron origen a la perforación de estos, *in vivo*, probablemente por el desarrollo de “órganos perforantes” como los observados aquí, donde las formaciones miceliales especiales surgieron durante la fase patógena del hongo queratinofílico.

El tratamiento de la dermomicosis con ajoene (0,4%),

demonstró que es capaz de afectar al dermatofito en su estructura, en la biogénesis de la membrana plasmática y la pared celular. Por lo tanto, limitando la extensión de la colonización al tejido sano. Es posible que este fármaco interfiera con el metabolismo redox reaccionando con los grupos sulfhidrilos de las proteínas, en las membranas celulares afectándose la adhesión del hongo (Ledezma y Apitz-Castro 1998). Esta es la primera descripción de la actividad de ajoene *in vivo* en tiña de la cabeza. Aparentemente las estructuras fúngicas durante la invasión del cabello, especialmente del material cornificado, produce la destrucción de la vaina del cabello. La acción tópica del antifúngico, en concentración suficiente, limita la lesión y por consiguiente evita la proliferación de las conidias. Adicionalmente, esta actividad de ajoene

favoreció el crecimiento progresivo del cabello sano a los 45 días de tratamiento, sin recaídas, y hasta pasadas las 12 semanas. La clara mejoría de los signos de infección, los cultivos negativos de esta especie zoofílica, virulenta, demuestra la efectividad y el efecto antiproliferativo que tiene ajoene en el tratamiento de la tiña de la cabeza producida por *Microsporum canis*.

CONCLUSIONES

Ajoene, en tratamiento tópico al 0,4%, inhibió la germinación de las conidias y el crecimiento micelial *in vivo*, controlando eficazmente la tiña de la cabeza causada por *Microsporum canis*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DE HOOG G, GUARRO J, GENE J, FIGUERAS M. 2000. Atlas of clinical fungi. 2da edition, Universitat Rovira, Barcelona, España, pp. 1126.
- HAYAT MA. 2000. Principles and Techniques of Electron Microscopy: Biological Applications. Cambridge University Press, London, UK, pp. 213.
- LEDEZMA E, APITZ-CASTRO R. 1998. Del folklore al mecanismo molecular: el ejemplo del ajoene. *Interciencia*. 23(4):227-231.
- LEDEZMA E, LÓPEZ J, MARÍN P, ROMERO H, FERRARA G, DE SOUSA L, JORQUERA A, APITZ R. 1999. Ajoene in the tropical short-term treatment of *Tinea cruris* and *Tinea corporis* in humans. *Arzneim-Forsch/ Drug Res*. 49(6):544-547.
- LEDEZMA E, MANISCALCHI MT, LEMUS-ESPINOZA D. 2008. Sinergismo entre ajoene y ketoconazol en aislamiento de *Microsporum canis*. Un estudio preliminar mediante la determinación de la concentración inhibitoria fraccional. *Rev. Iberoam. Micol*. 25(3):157-162.
- LEMUS-ESPINOZA D, MANISCALCHI MT, LEDEZMA E, SÁNCHEZ J, APITZ R, VIVAS J. 2004. Susceptibilidad *in vitro* al ajoene de aislados de *Candida albicans*, *C. parapsilosis* y *C. krusei* obtenidos de pacientes con onicomicosis y su relación con el tratamiento tópico. *Rev. Soc. Ven. Microbiol*. 24(1-2):26-28.
- LEMUS-ESPINOZA D, MANISCALCHI MT, LEDEZMA E, SÁNCHEZ J, APITZ-CASTRO R. 2010. Ajoene más itraconazol en la terapia combinada de un caso de onicomicosis. *Saber*. 21(3):108-113.
- LEMUS-ESPINOZA D, MANISCALCHI MT, LEDEZMA E. 2013. Alteraciones morfométricas en células de *Microsporum canis* expuestas a diferentes concentraciones de ajoene. *Saber*. 25(3):279-284.
- MANISCALCHI MT, LEMUS D, LEDEZMA E, SÁNCHEZ J, VIVAS J, APITZ-CASTRO R. 2004. Estudio de la susceptibilidad *in vitro* de aislados de *Microsporum canis* al ajoene, terbinafina y griseofulvina, utilizando el método de microdilución. *Rev. Soc. Ven. Microbiol*. 24(1-2):40-45.
- MANISCALCHI MT, LEDEZMA E, LEMUS-ESPINOZA D. 2011. *Tinea capitis*: ajoene, una alternativa de terapia tópica. Primera Edición. Editorial Académica Española, Barcelona, España, pp. 33-35.