

Corneofungimetría: un bioensayo en dermatomicrología

Jorge Eduardo Arrese Estrada y Gérald Piérard

Servicio de Dermatopatología, Universidad de Liège, Bélgica

Resumen

La corneofungimetría es un bioensayo en dermatomicrología que consiste en evaluar el efecto antifúngico de medicamentos utilizando la técnica de cultivo de hongos en capa córnea humana obtenida según el método de biopsia de superficie con cianoacrilato.

Con la corneofungimetría hemos establecido una clasificación de los antifúngicos tópicos en función de su espectro de acción y de su fungitoxicidad. También, hemos evaluado la acción de antifúngicos orales en función de su biodisponibilidad a nivel de la capa córnea.

Palabras clave

Capa córnea, Hongos, Antifúngicos

Corneofungimetry: A bioassay for dermatomycology

Summary

Corneofungimetry is a bioassay in dermatomycology evaluating the antifungal effect of drugs. It is based on the method of culture of fungi on human stratum corneum harvested by cyanoacrylate skin surface strippings. Using corneofungimetry, it is possible to establish a classification of topical antifungals according to their spectrum of activity and their fungitoxicity. Similarly, the potency of oral antifungals can be evaluated at the level of the stratum corneum.

Key words

Stratum corneum, Fungi, Antifungals

La capa córnea es la estructura más superficial de la piel, formada de corneocitos separados por láminas conteniendo proteínas, aminoácidos, lípidos, hidratos de carbono, agua y diversos iones. Esta estructura forma un sustrato adecuado para el crecimiento de diferentes hongos.

Las propágulas fúngicas son representadas por las artroconidias de dermatofitos, las levaduras y las esporas de mohos [1]. En una primera etapa, las propágulas deben encontrar un nicho de donde no serán eliminadas mecánicamente; la adhesión a la capa córnea es favorecida por la presencia eventual de ligandos específicos [2,3]. La segunda etapa consiste en la germinación de las propágulas seguida de la invasión de la capa córnea favorecida o no por la acción de proteasas [4]. Los aspectos morfológicos de este mecanismo han sido ilustrados por English [5].

Diversos grupos de investigadores han intentado utilizar la capa córnea como sustrato para el crecimiento de hongos, obteniéndola bien por simple raspado a la cureta o bien de una manera más sofisticada utilizando la técnica de biopsia de superficie con cianoacrilato. El desarrollo de esta técnica ha permitido establecer una vasta gama de aplicaciones, tales como la evaluación de los

estados de xerosis o el diagnóstico de dermatitis inflamatorias, infecciones y parasitosis superficiales, así como de tumores pigmentarios [6-8].

Últimamente han sido propuestas nuevas aplicaciones en el campo de la micología y de la farmacología. La técnica de cultivo de hongos sobre biopsia de superficie aplicada a la evaluación de la capacidad antifúngica de medicamentos utilizando el análisis morfométrico, la hemos llamado corneofungimetría.

METODOLOGÍA EMPLEADA EN LA CORNEOFUNGIMETRÍA

Biopsia de superficie con cianoacrilato. La biopsia de superficie con cianoacrilato es un método no invasivo y no doloroso que permite despegar una capa de corneocitos de espesor uniforme. Utilizamos láminas de polietileno (Melinex O, ICI, Holanda) de 150 µm de espesor, de la talla de un cubreobjetos (1,5 x 6 cm) y un pegamento de tipo cianoacrilato líquido (Superglue, Loctite, Bélgica).

En el momento de tomar la muestra, una gota de cianoacrilato era depositada en una extremidad de la lámina, para aplicar enseguida el conjunto sobre la piel durante 30 seg aproximadamente. Después de este tiempo, la lámina era separada de la piel despegando así la parte más superficial de la capa córnea.

Cultivo de hongos. Los hongos son cultivados en agar glucosado de Sabouraud (glucosa 20 g, peptona 10 g, agar 20 g y agua 1000 ml) solo o con cloranfenicol y cicloheximida (actidiona), para aislar selectivamente dermatofitos y levaduras e inhibir el crecimiento de otros microorganismos.

Dirección para correspondencia:

Dr. Jorge E. Arrese
CHU Sart Tilman, Servicio de Dermatopatología,
4000 Liège, Bélgica.
Tel.: +32 43662429; Fax: +32 43662976
E-mail: J.Arrese@ulg.ac.be

Aceptado para publicación el 2 de julio de 1998

Para el cultivo de hongos utilizamos también láminas de gelosa (Mycoline, BioMérieux, Francia) recubiertas por dos medios de cultivo; una cara contiene agar glucosado de Sabouraud-gentamicina-cloranfenicol que permite aislar levaduras, dermatofitos y mohos, y la otra cara contiene agar glucosado de Sabouraud-cloranfenicol-rojo fenol en donde los dermatofitos que crecen producen una alcalinización y un color rojo del medio de cultivo.

La identificación del hongo, después de algunos días de incubación, es realizada sobre la base de las características morfológicas macroscópicas y microscópicas del aislamiento clínico.

Cultivo de hongos sobre capa córnea. Realizamos biopsias de superficie, preferentemente en antebrazo; sobre estas biopsias, en un medio húmedo y a 27°C, colocamos 250 µl de una suspensión de levaduras o conidias a una concentración aproximada de 10⁶ células/ml. Después de una a dos semanas de incubación, los hongos que han crecido sobre la biopsia de superficie son coloreados con Polychrome Multiple Stain (Dermatologic Laboratory and Supply, Council Bluffs, USA), fluorocromos o coloraciones vitales (Calcofluor, Sigma F6259, Alemania; Fungical, Uvitex 2B Ciba, Francia; Rojo neutro, Sigma N6634, Alemania). Utilizamos un analizador de imagen computarizado (sistema WCUE 2, Olympus, Alemania) para realizar las evaluaciones morfométricas a fin de determinar la variación de la superficie de la suspensión de hongos el primer y último día de incubación.

APLICACIONES

Estudio de la actividad antifúngica. En un primer estudio [9], diez series de 11 voluntarios sanos fueron estudiados. Utilizamos por cada serie dos antifúngicos. En total, fueron utilizados 19 antifúngicos comercialmente disponibles y una crema conteniendo ácido azeláico como control negativo (Tabla 1).

Tabla 1. Antifúngicos tópicos evaluados por corneofungimetría.

Grupo	Agente farmacológico	Grupo	Agente farmacológico	
Polienos	Anfotericina B	Morfolinas	Amorolfina	
	Natamicina			
	Nistatina	Alilaminas		
Azoles	Bifonazol	Otros	Naftifina	
	Clotrimazol		Ácido undecilénico	
	Econazol nitrato		Ciclopirox olamina	
	Isoconazol nitrato		Griseofulvina	
	Ketoconazol	Tolnaftato	Control	Ácido azeláico
	Miconazol nitrato			
	Omoconazol			
	Oxiconazol			
	Sulconazol nitrato			
	Tioconazol			

En este protocolo cada producto utilizado fué aplicado diariamente durante cuatro días consecutivos en el antebrazo de los voluntarios. Se realizaron biosias de superficie con cianoacrilato a partir del primer día siguiente a la última aplicación del producto y con 24 h de intervalo durante los tres días siguientes. Los hongos utilizados provenían de cultivos de muestras de lesiones clínicas cutáneas conteniendo arthroconias y microconidias de *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum* y *Microsporum canis*. También fueron utilizados aislamientos de *Candida albicans* y *Candida krusei*.

Para la evaluación de la actividad antifúngica, fueron realizadas seis biopsias de superficie en cada antebrazo tratados con un producto y seis otras biopsias de otros

lugares del cuerpo no tratados con éstos como control. Cada una de ellas, después de la adición de una suspensión de hongos, fué incubada en un medio húmedo a 27°C durante 15 días. Este material fué coloreado con Polychrome Multiple Stain y examinamos el crecimiento del hongo con un analizador de imagen computarizado. Para ello medimos la superficie recubierta por los micelios y por cada hongo examinado, la inhibición del crecimiento fué expresado en porcentaje de modificación de la superficie del micelio, comparando el territorio tratado con la zona control.

Efecto antifúngico de depósito. Utilizamos la técnica de corneofungimetría para evaluar el efecto antifúngico de depósito de los 19 productos ensayados en la primera parte de nuestro trabajo. Para ello, seis muestras de capa córnea, de lugares tratados con antifúngicos, obtenidas según la técnica de biopsia de superficie fueron realizadas diariamente durante 4 días consecutivos. A estas muestras, se les inoculó una suspensión de hongos incubándolos por 2 días. Enseguida fueron colocadas en un medio de cultivo conteniendo agar glucosado de Sabouraud-gentamicina-cloranfenicol por 15 días. Después de este tiempo examinamos la presencia o ausencia del crecimiento fúngico. La ausencia del crecimiento del hongo en el medio de cultivo lo consideramos como la traducción de un efecto antifúngico potente (efecto fungicida).

En base a estos resultados propusimos una clasificación de los antifúngicos en tres categorías [9]. La primera agruparía a los antifúngicos de amplio espectro con un efecto inhibitor significativo y un efecto antifúngico de depósito de una duración media de 0,8 días. El segundo grupo comprendía a los antifúngicos con las mismas características del primer grupo pero de espectro limitado a un solo hongo y el tercero a aquellos con un espectro aún más limitado (Tabla 2).

Otra aplicación de la corneofungimetría es la de determinar la concentración óptima de antifúngicos tópicos [10].

Tabla 2. Clasificación de antifúngicos tópicos en función a su actividad inhibitora y de depósito contra seis hongos patógenos cutáneos (por orden alfabético en cada clase).

Clase I	Clase II	Clase III
Amorolfina	Clotrimazol	Anfotericina B
Bifonazol	Econazol	Ciclopiroxolamina
Itraconazol	Isoconazol	Griseofulvina
Ketoconazol	Miconazol	Natamicina
Oxiconazol	Naftifina	Nistatina
	Tioconazol	Omoconazol
		Sulconazol
		Tolnaftato
		Ácido undecilénico

Actividad y farmacocinética de antifúngicos orales.

Este estudio tuvo como objetivo comparar la eficacia del itraconazol y de la terbinafina administrados por vía oral. Para ello, fueron estudiadas tres series de 10 voluntarios. Cada participante recibió durante una semana itraconazol 400 mg /día, itraconazol 200 mg /día o terbinafina 250 mg /día. Las biopsias de superficie fueron realizadas en los antebrazos los días 1, 3, 8, 10, 14, 21, 28 y 35. Cada biopsia fué incubada con el hongo seleccionado durante 14 días.

Durante el periodo de la toma del medicamento (Rx) encontramos una actividad fungitóxica para los dermatofitos equivalente para ambos productos. Contrariamente, el efecto antifúngico de depósito (día 7 al día 35), evaluado después de la toma de medicamento, fué

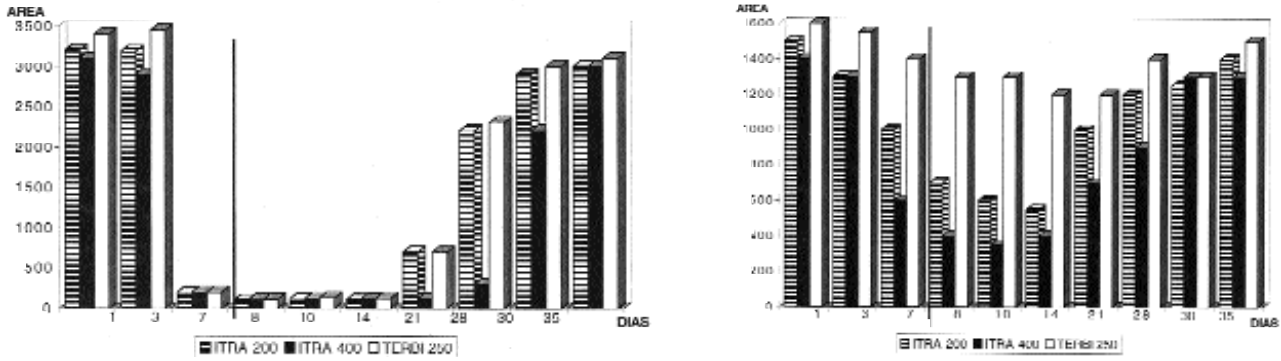


Figura 1. Actividad antifúngica del itraconazol (200 mg/d y 400 mg/d) y de la terbinafina (250 mg/d) en función del grado de inhibición del crecimiento del hongo. 1a: *Trichophyton interdigitale*. 1b: *Candida albicans*. Los valores del área son indicados en unidades arbitrarias

más significativa en el grupo que recibió 400 mg /día de itraconazol (Figura 1a). El efecto antifúngico frente a la *C. albicans* fué más intenso en los dos grupos que recibieron itraconazol en comparación al grupo que recibió terbinafina [11] (Figura 1b).

CONCLUSIONES

La evaluación predictiva de la eficacia de los antifúngicos reposa clásicamente sobre una serie de pruebas *in vitro* y en la utilización de modelos animales. Uno de los principales problemas de interpretación de estos métodos es la falta o débil correlación entre el efecto antifúngico *in vitro* y la eficacia *in vivo* [12]. Esto es particularmente cierto para los derivados de tipo imidazol y triazol. Para una alilamina como la terbinafina, la presencia de suero disminuye sensiblemente el efecto antifúngico.

Han sido propuestos nuevos métodos en estos últimos años. El bioensayo utilizando cultivos fúngicos *ex vivo* sobre capa córnea humana puede ser considerado como un método experimental, no invasivo, de interés para el clínico. Con este método, que hemos llamado corneofungimetría, la naturaleza del hongo testado y su cantidad pueden ser controlados y los resultados no son influidos por la variabilidad de la respuesta del huésped [9,12,13]. Con la corneofungimetría podemos evaluar el efecto de antifúngicos tópicos y orales, determinar el efecto antifúngico de depósito, así como establecer diferencias entre ellos en función a su biodisponibilidad a nivel de la capa córnea.

Bibliografía

1. Hashimoro T. Infectious propagules of dermatophytes. In: Cole GT, Hoch HC (Eds.). The fungal spore and disease initiation in plants and animals. New York, Plenum Press, 1991:181-202.
2. Miyakawa Y, Kuribayashi T, Kagaya K, Suzuki M, Nakase T, Fukazawa Y. Role of specific determinants in mannan of *Candida albicans* serotype A in adherence to human buccal epithelial cells. Infect Immun 1992;60:2493-2499.
3. Calderone R, Diamond R, Senet JM, Warmington J, Filler S, Edwards JE. Host cell-fungal cell interactions. J Med Vet Mycol 1994;32 (Suppl 1):151-168.
4. Sei Y, Ogura Y, Higushi D, Takiuchi I. Biochemical and immunological studies of neutral protease. Localization and extraction *in vivo*. Jap J Med Mycol 1992;33:137-145.
5. English MP. The saprophytic growth of non-keratinophilic fungi on keratinized substrata, and a comparison with keratinophilic fungi. Trans Br Mycol Soc 1965;48:219-235.
6. Piérard-Franchimont C, Piérard GE. Assessment of aging and actinic damages by cyanoacrylate skin surface stripping. Am J Dermatopathol 1987;9:500-509.
7. Rurangirwa A, Piérard-Franchimont C, Piérard GE. Culture of fungi on cyanoacrylate skin surface strippings. A quantitative bioassay for evaluating antifungal drugs. Clin Exp Dermatol 1989;14:425-428.
8. Arrese JE, Piérard GE. La biopsia de superficie en el diagnóstico dermatológico. Rev Mex Dermatol 1990;34:18-23.
9. Piérard GE, Piérard-Franchimont C, Arrese JE. Comparative study of the activity and lingering effect of topical antifungals. Skin Pharmacol 1993; 6:208-214.
10. Arrese JE, Schrooten P, De Doncker P, et al. Fungal cultures on cyanoacrylate skin surface strippings as a dose-finding method for topical antifungals. A placebo-controlled study with itraconazole 0.25% and 0.50% cream. J Med Vet Mycol 1995;33: 127-130.
11. Piérard GE, Arrese JE, De Doncker P. Antifungal activity of itraconazole and terbinafina in human stratum corneum: a comparative study. J Am Acad Dermatol 1995;32:429-435.
12. Odds FC. Personal opinion: Can antifungal sensitivity test predict clinical treatment outcomes? Rev Iberoam Micol 1997;14:83-84.
13. Arrese JE, De Doncker P, Odd FC, Piérard GE. Growth of non-dermatophyte moulds abated by itraconazole. Evaluation with the corneofungimetry bioassay. Mycoses 1998; *in press*.