

2ej  
51



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DEL BIFONAZOL  
TOPICO (BAY h 4502) EN LAS  
DERMATOFITOSIS"



EXAMENES PROFESIONALES<sup>1</sup>  
FAC. DE QUIMICA

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
MISAEL GONZALEZ IBARRA





Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# INDICE

	Páginas
Introducción.....	1
Objetivos.....	3
I - Derivados imidazólicos	
1.0 Generalidades.....	4
1.1 Mecanismo de acción de los derivados imidazólicos	
1.1.1 Cambios bioquímicos.....	5
1.1.2 Cambios enzimáticos.....	7
1.1.3 Cambios morfológicos.....	8
1.1.4 Sinergia entre los derivados imidazoles y las células de defensa del huésped.....	9
1.1.5 Índice terapéutico.....	9
1.1.6 Influencia de los imidazoles sobre la biosíntesis de esteroides .....	10
1.1.7 Modificación de la actividad de las enzimas microsomas .....	10
1.2 Farmacología de los derivados imidazoles.....	12
2.0 Bifonazol	
2.1 Características químicas.....	13
2.2 Características fisicoquímicas.....	13
2.3 Espectro de acción	
2.3.1 Estudios "in vitro".....	14
2.3.2 Estudios "in vivo".....	18
2.3.3 Mecanismo de acción.....	20

2.4	Estudios toxicológicos.....	22
2.5	Estudios embriotóxicos.....	25
2.6	Pruebas de mutagenicidad.....	24
2.7	Estudios farmacocinéticos.....	24
2.8	Biotransformación.....	27
2.9	Eliminación y excreción.....	28
3.0	Evaluación terapéutica en humanos.....	29
3.1	Estudios comparativos.....	31
3.2	Efecto antiflogístico del bifonazol.....	33

### III - Protocolo (Nuestro estudio)

1.0	Metodología.....	54
1.1	Selección de los pacientes.....	54
1.2	Indicaciones.....	35
1.3	Evaluación.....	35
1.4	Valoración del tratamiento.....	36
1.5	Tolerancia.....	37
1.6	Valoración micológica.....	37
1.6.1	Toma de muestra.....	37
1.6.2	Estudio micológico.....	37
2.0	Material.....	40
2.1	Equipo.....	41
2.2	Reactivos.....	41
2.3	Medios de cultivo.....	42
2.4	Fármacos.....	42

## Resultados

1.1 Características de los pacientes.....	43
1.2 Ocupación.....	44
1.3 Diagnósticos clínicos.....	44
1.4 Tratamientos previos y deserciones.....	45
1.5 Agentes etiológicos.....	45
1.6 Evaluación clínica al final del tratamiento.....	47
1.7 Valoración micológica al final del tratamiento.....	49
1.8 Tolerancia.....	50
Conclusiones.....	51
Resumen.....	52
Comentarios.....	53
Apéndice.....	55
Bibliografía.....	58-68

## INTRODUCCION

Las micosis exclusivamente tegumentarias o superficiales, son afecciones cutáneas frecuentes y debido a su alta morbilidad, constituyen un problema de salud pública en la patología dermatológica. Dentro de éstas encontramos las tiñas o dermatofitosis, producidas por un grupo de hongos denominados dermatofitos, que incluyen especies de los géneros Trichophyton, Microsporum y Epidermophyton. Estos causan infecciones a humanos y animales, generalmente invaden y parasitan sólo las capas de queratina de piel, uñas y pelos. Este tipo de entidades clínicas, se encuentran - - - ampliamente distribuidas en toda la República Mexicana, debido a las condiciones climatológicas y socioeconómicas que prevalecen.

Sobre el tratamiento de estas enfermedades se ha contado con un limitado grupo de agentes antimicóticos, y a este respecto la terapia se ha dividido en dos etapas, antes de 1958 con el uso de agentes tópicos como: soluciones yodadas, ácido undecilénico, benzoico y salicílico, y después de esta fecha, en la que aparecen los antimicóticos sistémicos, tales como la griseofulvina y los recién descubiertos imidazoles.

Aunque se han hecho grandes progresos en el tratamiento de las dermatomosis, todavía no existe ningún agente que sea efectivo ciento por ciento, ni que asegure una buena profilaxis.

Justificándose por todas estas razones, la búsqueda de nuevos agentes antimicóticos viene siendo una necesidad urgente. De esta manera los Laboratorios Bayer, A.G. promueve la investigación en este campo, presen-

tando un nuevo derivado imidazólico, denominado genéricamente B I F O N A  
Z O L (BAY h 4502).

El bifonazol (BAY h 4502) ha demostrado tener fuerte actividad anti-  
fúngica "in vitro" contra diversos hongos e "in vivo" contra micosis en --  
animales y en humanos.

Una vez que se han realizado todas las pruebas farmacológicas y toxi-  
cológicas, nuestro objetivo en este estudio es la comparación con el mico-  
nazol, de su eficacia y tolerancia local en pacientes con tiñas o dermato-  
fitosis, en un estudio randomizado, evaluando la actividad de ambos fárma-  
cos sobre dichos padecimientos.

Como se mencionó anteriormente nuestro país, es uno de los que repor-  
ta un número elevado de micosis exclusivamente tegumentarias, a las que -  
no se les ha dado una solución terapéutica adecuada, por eso el desarro-  
llar y evaluar nuevos antimicóticos, nos dá una mayor posibilidad a la --  
problemática.

Este tipo de estudios permite la búsqueda de nuevos antifúngicos, --  
más potentes y con reducidos efectos secundarios.

## OBJETIVOS

- 1) - Demostrar y evaluar la actividad "in vivo" del bifonazol tópico - (BAY h 4502) crema al 1 % vs el miconazol crema al 2 %, en un estudio randomizado, comparativo sobre dermatofitosis.
- 2) - Aislar y tipificar los agentes etiológicos de las dermatofitosis - en estudio.
- 3) - Observar los efectos secundarios de la administración cutánea del bifonazol ( BAY h 4502).

## DERIVADOS IMIDAZOLES

## 1.0) Generalidades

En 1944, Wooley (4) descubre la actividad antimicótica de un imidazol denominado bencimidazol. Este fué el punto de partida en la década de los sesentas, del interés por sintetizar antifúngicos derivados del imidazol.

Algunos de estos derivados, son de gran eficacia en el tratamiento de las micosis, por su amplio espectro de actividad, que cubren la mayoría de hongos patógenos, teniendo incluso actividad contra bacterias y actinomicetos.

De este grupo los más representativos de uso tópico son: miconazol, clotrimazol, econazol e isoconazol, y otros en investigación como el parconazol, terconazol, enilconazol, sulconazol, tioconazol, butoconazol, clormidazol y oxiconazol. El ketoconazol y el intraconazol se administran tanto por vía tópica como sistémica, por su buena absorción y reducidos efectos secundarios, (4, 6, 29, 31, 37, 39, 68, 70, 85).

Antes de estructurar los estudios farmacológicos y toxicológicos del bifonazol, haremos una breve revisión de las propiedades del grupo de los imidazoles.

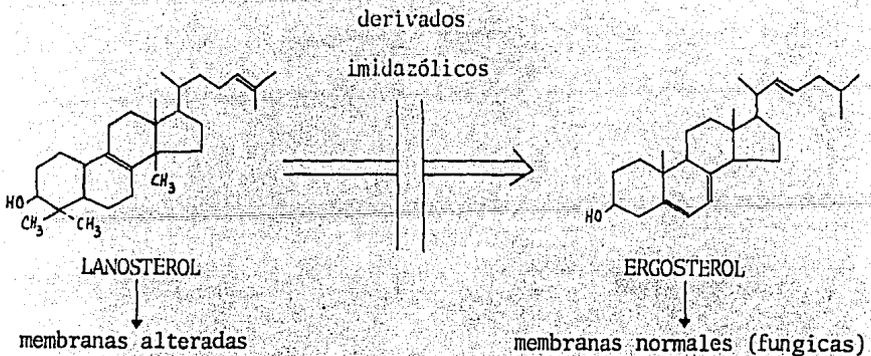
## 1.1) MECANISMO DE ACCION DE LOS DERIVADOS IMIDAZOLES

El mecanismo de acción de estos fármacos se ha investigado tanto a nivel bioquímico como morfológico.

### 1.1.1) Cambios bioquímicos:

En general, los derivados imidazólicos actúan básicamente a nivel de la membrana fúngica, esto es, inhibiendo la biosíntesis de ergosterol que es el principal componente de la membrana, por lo que se afecta la estructura y función celular, finalmente causando la muerte de la célula (fig. 1). (78)

Fig. 1



Miconazol y clotrimazol: los estudios revelan que estos derivados imidazólicos, afectan la permeabilidad de la membrana en células sensibles, lo cual se hace evidente por la liberación de iones potasio y compuestos fosforilados.

A concentraciones bajas de miconazol se inhibe la captación de purinas y glutaminas por C. albicans. (40).

Miconazol y Ketoconazol: los hallazgos más recientes con miconazol y ketoconazol sugieren que dichos cambios en las membranas, son consecuencia de una interferencia con la biosíntesis de lípidos en las células fúngicas, especialmente de los esteroides, componentes de muchas membranas biológicas

Bajas concentraciones de miconazol y ketoconazol inhiben la incorporación de acetato de ergosterol en C. albicans, lo cual coincide con una acumulación de lanosterol, que es el precursor del ergosterol, así la acumulación de C<sub>14</sub> metil esteroides, originan cambios en la permeabilidad de las membranas e inhiben el crecimiento de las células fúngicas. Estos fármacos también actúan sobre la biosíntesis de triglicéridos y fosfolípidos (9).

La fluidez de la membrana está determinada por los esteroides, así como por el grado de saturación y longitud de la cadena de ácidos grasos de la bicapa lipídica. Mientras menos saturada de ácidos grasos esté, hay mayor permeabilidad. La fluidez de una membrana no sólo determina la permeabilidad, sino también la actividad de enzimas unidas a ésta. Por esto las membranas tratadas con miconazol son más rígidas que los controles y su multiplicación es más lenta (78).

Se han comparado estos efectos en bacterias y flagelados, cuyas membranas carecen de esteroides y a pesar de esto, se observó sensibilidad al miconazol y ketoconazol, probablemente esto se debe a que dependen nutricionalmente de esteroides en su medio ambiente. Se menciona también que puede haber relación entre estos sucesos y la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelu-

lar, lo que contribuye a la necrosis celular (9, 40).

Ketoconazol: a dosis de 50 microgramos por mililitro ocurre necrosis celular, y se observan cantidades moderadas de ácidos grasos libres, triglicéridos y fosfolípidos (79).

#### 1.1.2) Cambios enzimáticos

La conducta de las enzimas oxidativas y peroxidativas son esenciales para la función celular. Estas incluyen enzimas (oxidadas) sensibles al cianuro (citocromo oxidasa) y aquellas que son insensibles (oxidasa NADH dependiente). Las vías oxidativas llevan a la producción de  $H_2O_2$ , que de no ser degradado, resulta tóxico. La célula normal, posee una citocromo C peroxidasa y una catalasa, dos enzimas que inmediatamente desdoblan el  $H_2O_2$  y aseguran la viabilidad celular.

Miconazol: el tratamiento de C. albicans con bajas dosis de miconazol (fungistático) ocasiona un aumento de  $H_2O_2$ , y de la oxidasa NADH dependiente en las mitocondrias y vacuolas centrales. Como reacción de defensa celular, la actividad de la catalasa aumenta para mantener niveles bajos de  $H_2O_2$  intracelular.

A dosis más elevadas de miconazol (fungicidas a más de 5 microgramos/ml.), la producción de  $H_2O_2$  del NADH dependiente continúa, mientras que la actividad de las peroxidases y catalasas se ven totalmente inhibidas. De esta manera la producción intracelular de  $H_2O_2$  en concentraciones tóxicas pueden contribuir a la muerte celular (9, 78).

Ketoconazol: resultados similares se han observado con este imidazol (32).

Itraconazol: el citocromo P-450 es un componente del sistema enzimático, requerido para iniciar la oxidación del grupo 14-alfametil del lanosterol en los microsomas de levaduras. El itraconazol (R 51 211), resulta ser un potente inhibidor del citocromo P-450 en células de C. albicans (4).

### 1.1.3) Cambios morfológicos

La mayoría de los trabajos publicados, se han realizado en base a los cambios estructurales provocados por los imidazoles en las células de C. albicans en fase levaduriforme.

Miconazol y clotrimazol: estos causan cambios en la membrana, división y volumen celular. A concentraciones altas (5-50 microgramos/ml.), ocurre involución de organelos internos, la vacuola central se alarga al ser llena con material citoplásmico degradado y glóbulos lipídicos. A dosis por arriba de 50 microgramos/ml. de miconazol ocurre necrosis celular, a estas concentraciones con otros imidazoles se ha observado lo mismo en otras especies como T. mentagrophytes y Aspergillus nidulans (9, 40, 78).

Miconazol y Ketoconazol: alteraciones de la membrana celular y degeneración citoplásmica, así como la lisis de organelos subcelulares se ha observado en dermatofitos, C. immitis, H. capsulatum, P. brasiliensis, C. neoformans, y B. dermatitidis tratados con ambos antimicóticos (4, 9, 15).

Econazol: se reportan cambios primarios en las membranas celulares y mitocondrias, con aparición de cuerpos de inclusión de contenido lipídico,

en T. mentagrophytes y C. albicans tratados con este imidazol. El econazol ocasiona aumento en la permeabilidad de la membrana celular, lo que permite la penetración del fármaco, el cual interfiere en la síntesis de proteínas, RNA y lípidos, provocando finalmente la necrosis celular. Las concentraciones equivalentes de clotrimazol fallan en la inducción de la muerte celular. En base al criterio morfológico se hace una distinción entre los imidazoles con actividad fungistática o fungicida (9).

#### 1.1.4) Sinergia entre los derivados imidazoles y las células de defensa del huésped:

Los experimentos con cultivos mixtos de C. albicans y leucocitos revelan una acción sinérgica entre las defensas celulares y los imidazoles. Cuando los leucocitos polimorfonucleares y los macrófagos son añadidos a los cultivos con C. albicans, se observa una supresión temporal del crecimiento micelial, después de unos días de incubación aparece de nuevo. Al incorporar el ketoconazol a una dosis de 0.01 microgramos/ml. se erradica el hongo. Este hallazgo indica interacción sinérgica entre el Ketoconazol y las células de defensa del huésped. El tratamiento antifúngico altera el crecimiento micelial (forma invasiva y patógena) (9, 78).

#### 1.1.5) Índice terapéutico

Los diferentes efectos de los derivados imidazólicos en células humanas y fúngicas, han sido investigados "in vitro" con fibroblastos humanos y Candida albicans, T. mentagrophytes y M. canis en cultivos mixtos. Con

dosis de 10 nanogramos/ml de ketoconazol, se inhibe el crecimiento de estos hongos y sólo a concentraciones mayores de 100 microgramos/ml resulta tóxico para los fibroblastos. Por lo que el índice terapéutico del ketoconazol es de  $10^4$ , mientras que para otros imidazoles es de  $10^2$ , (9, 15, 32).

#### 1.1.6) Influencia de los imidazoles sobre la biosíntesis de esteroides

La síntesis de esteroides por las células mamíferas, es inhibida a -- concentraciones de ketoconazol y miconazol que son de 600 y 20 veces más -- altas respectivamente, que las concentraciones necesarias para inhibir la síntesis de esteroides en *C. albicans*. No se obtiene colesterol anormal -- en las células humanas con dosis de 200 mg/día de ketoconazol, por periodos hasta de siete meses (14, 31, 32).

#### 1.1.7) Modificación en la actividad de enzimas microsomiales

Diversos estudios comparativos sobre la inducción e inhibición de -- enzimas microsomiales del hígado, por los imidazoles, han sido realizados -- usando metohexital en la prueba de hipnosis.

Inhibición: el miconazol, clotrimazol, econazol y ketoconazol inhiben la -- producción de enzimas con dosis orales de 7.6, 7.9, 11.4 y 58.8 mg/kg, -- respectivamente. Para el ketoconazol esto es 20 veces la dosis terapéu-- tica.

Inducción: este efecto se observa con dosis orales diarias de 65.5, 7.0, --

47.3 y 160 mg/kg con miconazol, clotrimazol, econazol y ketoconazol respectivamente. La dosis de 160 mg/kg del ketoconazol, es cercana a la dosis tóxica en ratas (9).

## 1.2) Farmacología de los derivados imidazoles

Los cuatro principales imidazoles para uso terapéutico, miconazol, clotrimazol, econazol y ketoconazol, son sólo ligeramente absorbidos en el epitelio y en la superficie de las mucosas. Todos ellos son absorbidos en el tracto gastrointestinal, aunque muchas veces causan náuseas y vómitos. El miconazol y el econazol pueden ser dados intravenosamente, el in conveniente es que causan flebitis. Entre el 90 y 99 % del compuesto activo es unido a las proteínas plasmáticas. La distribución a otros com-partimientos del cuerpo es pobre. El metabolismo de estos compuestos, se efectúa en el hígado, y sólo los metabolitos son excretados por la orina. Se sabe que los metabolitos del miconazol y clotrimazol, son conjugados con ácido glucorónico.

El clotrimazol suministrado oralmente eleva los niveles de transaminasas y fosfatasa alcalina, no así el miconazol. No han sido reportados cambios renales ni óseos con ninguno de estos imidazoles.

Ocasionalmente se ha reportado hipersensibilidad oral a estos com-puestos, pero generalmente las preparaciones tópicas de éstos sobre la piel y vagina es buena, por lo que se consideran no tóxicos. Trastornos en el sistema nervioso central, como depresión y desorientación, han sido reportados en pacientes tratados con clotrimazol y miconazol oralmente.

Ninguno de estos imidazoles es teratógeno. Hasta la fecha el ketoconazol e itraconazol, son los únicos que se administran oralmente, todos los demás sólo tópicamente (4, 11, 30, 31, 32).

I I

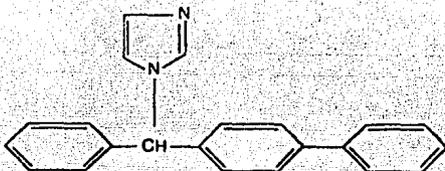
2.0)

B I F O N A Z O L

( B A Y h 4502 )

2.1) Características químicas

- Nomenclatura: 1 - ( ( 4 - bifenil ) - fenilmetil ) - 1 H - imidazol.
- Fórmula condensada:  $C_{22} H_{18} N_2$
- Nombre genérico: B I F O N A Z O L
- Fórmula estructural:



2.2) Características fisicoquímicas

- Descripción: polvo blanco, inodoro.
- Solubilidad: levemente soluble en agua  
soluble en dimetilformamida y sulfoxido de dimetilo.
- Estabilidad: estable a pH fisiológico, hidrolizado levemente a pH alcalino.  
estable durante la exposición a la luz y frente al oxígeno

estable frente al calor.

- Peso molecular: 310.4 gramos/mol.
- Punto de fusión: variable.
- Formas de presentación: éste se encuentra en las siguientes presentaciones:

Crema al 1 %

Solución al 1 %

Gel al 1 %

Polvo al 1 %.

## 2.5) Espectro de acción

Pruebas "in vitro" e "in vivo" demostraron que el bifonazol (BAY h - 4502) presenta amplio espectro de actividad antimicótica, sobre los dermatofitos más frecuentes, así como: levaduras, hongos filamentosos, dimórficos, dematiáceos, cocos Gram positivos y corinebacterias (35, 59, 61, - 73, 74).

### 2.3.1) Estudios "in vitro"

a) Se probó la actividad del bifonazol "in vitro" sobre tres diferentes medios: agar de kimmig (KA); Agar de Sabouraud (SAB) y caseína extracto de leadura glucosa agar (CYG). Se evaluaron 126 aislamientos, 59 de dermatofitos y otros hongos filamentosos, y 67 de levaduras. Cuarenta y cinco

de 7 especies de dermatofitos, 14 de diversos hongos patógenos, 6 de Scopulariopsis sp., 3 de Aspergillus sp., 3 de Fusarium sp., una Curvularia sp. y una Dreschlera sp. Los resultados obtenidos muestran que los rangos de concentración inhibitoria mínima (CIM), son uniformes en términos de especie e independientes del medio usado, las CIM varían desde 0.25 a 32.0 microgramos/ml. Siendo los dermatofitos, los más sensibles a concentraciones de tan sólo 0.5 microgramos/ml. y los hongos filamentosos (diferentes a dermatofitos), a concentraciones de 0.25 a 32.0 microgramos/ml. De los 67 aislamientos de levaduras, 25 correspondieron a C. albicans, 14 a C. tropicalis y 14 a T. glabrata, los valores de CIM fueron de 0.25 a 64.0 microgramos/ml, valores que dependieron del pH del medio utilizado. No hubo diferencias significativas en tamaño del inóculo. Torulopsis glabrata, fué la más sensible a concentraciones de 0.25 a 2.0 microgramos/ml, (73).

b) 1033 cepas de hongos, fueron probadas mediante dilución en serie y pruebas de difusión en agar, con bifonazol, clotrimazol y miconazol. Las CIM para el bifonazol, son ligeramente mayores que para el clotrimazol y miconazol. El bifonazol tiene efecto fungicida en los micelios, pero no sobre las micro y macroconidias de T. mentagrophytes y T. rubrum en el medio de kimming a concentraciones de 5 microgramos/ml. Mientras que para el clotrimazol y miconazol esto ocurre a 10-20 microgramos/ml, en las mismas condiciones de prueba. De 3 a 6 nanogramos de bifonazol dan 7 mg de micelio en peso seco, para otros imidazoles con 6 nanogramos se obtiene más de 50 mg. 0.062 mg de bifonazol en medio de Eagle, suprimen el creci-

miento de pseudomicelio. El efecto del bifonazol es óptimo a pH 6.5 a 7.4 "in vitro", a pH de 3 - 5 se requieren 10 veces más de bifonazol para - - inhibir dermatofitos y levaduras.

Finalmente se concluye que esta actividad depende de la composición y pH del medio de prueba utilizado, tipo de acción fungistática primaria, fase de crecimiento exponencial (fase logarítmica), tamaño del inóculo, periodo de incubación y condiciones fisiológicas de las células fúngicas (61).

c) 168 aislamientos se probaron con 4 nuevos antimicóticos, dos tópicos - (BAY h-4502) bifonazol y Ro 14-4767/002, comparados contra miconazol, y - dos orales, el BAY n 7133 e ICI 153,066 comparados contra ketoconazol. El bifonazol fue levemente menos activo "in vitro" que el miconazol (los valores dependieron del tipo de medio utilizado y del pH), el bifonazol fué igual de activo que el miconazol contra C. neoformans y B. dermatitidis - (74).

d) Se realizó un estudio comparativo del bifonazol (BAY h 4502) contra el clotrimazol "in vitro" con 102 cepas de dermatofitos, hongos filamentosos y levaduras, utilizando 4 medios de cultivo; SD agar, SD caldo, BHI y PYG. Se evaluaron los siguientes parámetros:

Susceptibilidad: el bifonazol es menos potente que el clotrimazol en términos de CIM para las levaduras del género Candida, valores iguales para los dermatofitos y concentraciones mucho menores para los dematiáceos P. verrucosa y Fonseca compactum.

Rango de actividad antifúngica: las CIM varían en un rango de 0.04 a 10.0 microgramos/ml, para hongos filamentosos y levaduras.

Actividad fungicida: se probaron 2 cepas de C. albicans (MTU-12011 y MTU-12012), y una de C. neoformans para determinar si el bifonazol era fungistático o fungicida a concentraciones de (6.25, 25 y 100 microgramos/ml) a 27-37 °C por 24 horas, sobre caldo SD en agitación. El bifonazol sólo -- mostró efecto fungistático en ambas cepas, mientras que el clotrimazol -- originó un efecto fungicida a 100 microgramos por mililitro.

Comparación de la actividad fungicida en diversos medios nutricionales: - se determinó usando una cepa de C. neoformans cultivado en varios medios nutricionales, mostrando efecto fungicida a 25 microgramos/ml en el medio más enriquecido.

Influencia del tamaño del inóculo y tiempo de incubación sobre la actividad "in vitro" : se probaron inóculos de  $10^4$ ,  $10^5$  y  $10^6$  de C. neoformans (MTU-13001) y T. mentagrophytes (MTU-19029) en diferentes tiempos, el bifonazol sólo mostró un efecto fungistático. Los valores de CIM, no fueron afectados por el tamaño del inóculo ni por el tiempo de incubación.

El bifonazol parece ser más activo en la fase exponencial del crecimiento, presentando un efecto fungicida a concentraciones de 25 microgramos/ml. El efecto de la sangre humana total incorporada al medio SD agar, aumenta marcadamente los valores de CIM en las cepas de Candida albicans y Cryptococcus neoformans con bifonazol (35).

c) Otros experimentos "in vitro" llevados a cabo con células de C. albicans pre-tratadas con bifonazol (de 2 a 4 microgramos/ml) se observan los siguientes efectos:

- formación de pronunciado conglomerado
- se inhibió el crecimiento y la formación de tubo germinativo (59).

### 2.3.2) Estudios "in vivo"

a) Se experimentó el uso del bifonazol (BAY h 4502), en 20 cobayos albinos machos, infectados por vía tópica con dos cepas de T. mentagrophytes (43.26 patógeno natural de animales y 45.28 patógeno de roedores), a los cuales se les administró bifonazol crema y loción al 0.1 y 1.0 %, observando - - efectividad terapéutica en ambas preparaciones y negativización de los -- cultivos entre el 5º y 15avo días de tratamiento. Se concluyó que el bifo-azol es de potencial valor terapéutico en el modelo de infecciones por - dermatofitos, y con posibilidad de aplicarlo en humanos (73).

b) En otro experimento se evaluó el bifonazol crema al 0.1 % en cobayos - infectados con T. mentagrophytes, observándose curación de las lesiones - al 12avo día de tratamiento.

Una propiedad farmacológica interesante encontrada en este estudio, - fué la presencia prolongada de bifonazol en la piel, comparado con clotri- mazol y miconazol durante un periodo de prueba de 50 a 72 horas: (47, 61).

antimicótico

persistencia en la piel (horas)

clotrimazol	36
miconazol	32
bifonazol	50 - 60

c) Cobayos infectados con T. mentagrophytes tratados con bifonazol crema y solución al 1 %, solución al 1 % más polietilenglicol, comparado con -- clotrimazol (mismas formulaciones) a dosis de 0.3 gramos/día, durante 14-21 días, presentaron los siguientes resultados:

- el tratamiento con la preparación de bifonazol produjo significativa mejoría de los síntomas a los 6 a 10 días, y de los 14 a 21 días produjo -- negativización de los cultivos de las escamas infectadas.

- la efectividad terapéutica del bifonazol, parece depender de la duración del tratamiento. El tratamiento durante 21 días fué más efectivo que el tratamiento durante 10 a 14 días, a semejanza de lo observado con clotrimazol independientemente del tipo de preparación.

Estos resultados demuestran claramente la eficacia terapéutica de cada preparación del bifonazol, en el modelo de las dermatofitosis en cobayos infectados (91).

d) Células de C. albicans tratadas con concentraciones subinibitorias (4 microgramos/ml), y después inoculadas por vía intravenosa en ratones. Mostraron que después de 8 días de la infección experimental, hubo del 5 al 10 % de mortalidad en los animales inoculados con C. albicans, pre-tratados con bifonazol, y el 100 % de mortalidad en los animales inyectados --

con C. albicans no pre-tratadas. Se concluyó que el bifonazol además de suprimir la virulencia "in vitro", también la suprime "in vivo" (59).

### 2.3.3) Mecanismo de acción

#### a) Consideraciones morfológicas

La inoculación de C. albicans en fase levaduriforme en medio de Eagle, induce a la formación de pseudomicelio, el bifonazol suprime esta transformación a una dosis de 0.062 ng/ml, entonces las células proliferan como levaduras y se observan adematizadas y agrupadas (61).

#### b) Consideraciones ultraestructurales

Los cambios morfológicos en el crecimiento de las hifas de T. mentagrophytes, tratadas con bifonazol, se estudiaron por microscopía electrónica de barrido (alta resolución), en un rango de concentraciones de 1-10 ng/ml. (que fueron mucho más bajos que los valores de CIM para esta cepa, 630 ng/ml) causaron una profunda inhibición sobre el crecimiento de las hifas. Esto fué caracterizado por diversos hallazgos:

- desarrollo de ondulación o rizado de las hifas,
- edema celular,
- exfoliación parcial de la pared de las hifas, y
- excreción del material fibrilar.

Estos cambios fueron más prominentes al incrementar las concentra-

ciones de bifonazol hasta 500 ng/ml., a los cuales las hifas se colapsaron y distorcionaron. Estos resultados sugieren que a concentraciones subinhibitorias, se afecta marcadamente el crecimiento normal y se inducen cambios degenerativos sobre las hifas de T. mentagrophytes, probablemente por la afección de algún metabolito o estructura esencial de la célula fúngica (55).

### c) Consideraciones bioquímicas

El mecanismo de acción a nivel bioquímico del bifonazol (BAY h 4502), es similar a los demás derivados imidazólicos, esto es a nivel de la síntesis de esteroides de la membrana celular de los hongos. Esto se debe a un acúmulo de esteroides metilados en  $C_{14}$ , que originan cambios en la permeabilidad de las membranas e inhibe el crecimiento de las células fúngicas.

Comparado con el clotrimazol, el bifonazol inhibe primeramente el citocromo P-450 responsable de la desmetilación de trimetilesteroides, inhibiendo directamente la HGM-COA reductasa, enzima reguladora en la biosíntesis de terpenoides, a concentraciones de 1 microgramo/ml, mientras que el clotrimazol inhibe esta enzima con 2 microgramos/ml, (8).

Como conclusión, el bifonazol actúa como cualquier otro imidazol suprimiendo la síntesis de ergosterol, produciendo grave daño en la membrana fúngica.

#### 2.4.0) Estudios toxicológicos

##### a) Irritación dérmica ocular:

Se valoró el bifonazol crema y solución al 1 % en piel y ojos de - - conejos, y no se produjo irritación dérmica ocular por periodos prolongados (72).

##### b) Toxicidad dérmica subaguda:

Esta se evaluó en 24 conejos (12 hembras y 12 machos), a los cuales se les aplicó crema y solución de bifonazol al 1 % a dosis de 3 mg/kg. -- durante 5 días cada semana, por 3 semanas. Durante la primera semana de tratamiento se produjo ligero eritema y edema de piel, los cuales fueron\_\_ atribuidos a la presencia de 2-octildodecanol en la crema y al isopropil miristato en la solución, al realizarse pruebas testigo sin el fármaco y con dicho vehículo.

Se sabe que estas sustancias irritan la piel de conejo, pero no la humana. Los estudios hematológicos, bioquímicos, histológicos y anatomopatológicos, no revelaron ninguna evidencia de daño atribuible al tratamiento con bifonazol en ningún órgano (72).

##### c) Administración oral:

Se realizaron pruebas en ratas y perros, con los siguientes efectos:

Ratas: el bifonazol se administró a dosis de 0, 2, 10 y 50 mg/kg, en 20 - ratas macho y 20 ratas hembra de raza Wistar, durante 6 meses. Estudios\_\_

clínicos, hematológicos, químico-clínicos e histopatológicos demostraron que a dosis de 10 mg/kg, no se presentó daño detectable. A dosis de 50 mg/kg, el crecimiento fué temporalmente retardado en animales macho. Los valores de hemoglobina disminuyeron y los reticulocitos aumentaron en ambos sexos (72).

Perros: dos grupos de perros raza Beagle se trataron con bifonazol oralmente:

Grupo 1: ocho perros fueron tratados con bifonazol en cápsulas de gelatina a dosis de 0, 3, 10 y 30 mg/kg, durante 6 meses.

Grupo 2: cuatro perros fueron tratados igualmente con bifonazol a dosis de 0.3 y 1.0 mg/kg, durante 3 meses.

Las dosis altas no fueron toleradas, los perros del grupo 1 con dosis de 30 mg/kg, se les sacrificó por la alta toxicidad. En la cuarta semana de tratamiento, los estudios químico-clínicos e histopatológicos revelaron que dosis de 3 mg/kg o más, causaron daños en las células hepáticas. No hubo efecto a la dosis de 1 mg/kg, (72).

#### 2.5.0) Estudios embriotóxicos

Los efectos del bifonazol administrado oralmente, sobre la fertilidad, el embrión y el desarrollo peri y post-natal, han sido estudiados en ratas y conejos.

#### Ratas:

- Fertilidad y reproducción: no hubo efectos adversos en la segunda ni en la tercera generación de estos animales, a dosis de 10-40 mg/kg.
- Embriotoxicidad: no se observaron daños en el embrión, ni efectos teratogénicos, incluyendo dosis orales de 30 mg/kg. La dosis de 100 mg/kg -- fué tóxica en animales madres, causando retardo fetal (del esqueleto en particular), considerados como secundarios a la toxicidad materna.
- Desarrollo peri y post-natal: dosis de 20 mg/kg no presentaron efectos detrimentes. 40 mg/kg fueron claramente tóxicos en los animales después de sólo 5 dosis orales, como resultado hubo un aumento en la incidencia de abortos. Subsecuentes apareamientos no indican daños en la fertilidad.

#### Conejos:

- Embriotoxicidad: con dosis de 10 mg/kg no hubo reacciones adversas, a dosis de 30 mg/kg condujo a un efecto embriotóxico, los embriones fueron completamente absorbidos (72).

#### 2.6.0) Pruebas de mutagenicidad

Los hallazgos en la prueba de Ames en Salmonella sp. no presentaron cambios mutagénicos, con bifonazol (72).

#### 2.7.0) Estudios farmacocinéticos

Se sintetizó el bifonazol marcado con carbono 14, para realizar estos

estudios. Los niveles del bifonazol en el plasma, siguiendo la administración oral, se han estudiado en ratas, conejos, perros sabuesos, monos rhesus y hombres.

#### a) Distribución sistémica:

Tras la inyección intravenosa o absorción enteral, la sustancia marcada con  $C_{14}$  se distribuye en las ratas rápidamente por todos los tejidos. Inicialmente, las concentraciones máximas se encuentran en el hígado, riñones, cerebro y cortezas suprarrenales, y se mantienen por períodos prolongados en el hígado, las suprarrenales y el tejido conjuntivo. No se reconocieron tejidos de concentración.

La barrera placentaria es permeable para el bifonazol y sus metabolitos en ratas preñadas. Las concentraciones en los fetos fueron menores que en los animales madres.

Las declinaciones de las concentraciones del bifonazol después de la administración oral de 5 mg/kg, fueron estudiadas en 2 voluntarios sanos, encontrando que la vida media de éste fué de 1.1 y 1.7 horas. Menos del 1 % del fármaco se elimina como tal.

#### b) Distribución en la piel

En 3 voluntarios sanos se aplicó sobre 20 cm<sup>2</sup> de piel de la región abdominal, 0.15 gramos de solución de bifonazol marcado con  $C_{14}$ . A las 12 horas después de la aplicación, se determinó la radioactividad en biopsias de piel.

Los resultados muestran una caída de las concentraciones de sustancia activa en forma logarítmica, de la siguiente manera:

- Capa córnea: esta actúa como barrera primaria alcanzando concentraciones de sustancia activa de 200-1000 microgramos/cm<sup>3</sup>.
- Epidermis: actúa como barrera secundaria para la penetración, se encuentran concentraciones de 20-150 microgramos/cm<sup>3</sup>.
- Corion central (extracto reticular): de 2-3 microgramos/cm<sup>3</sup>.
- Folículos pilosos: se mantienen concentraciones superiores a los 20 microgramos por cm<sup>3</sup>.

El bifonazol se considera con un alto poder de penetración sobre la piel exterior intacta. A pesar de este efecto, es mínimo el porcentaje de sustancia activa absorbida por la piel. La aplicación tópica no conduce a una absorción sistemática importante.

Suponiendo que en la piel no tiene lugar ninguna biotransformación importante de la sustancia activa, todas las concentraciones medidas se encuentran en un rango cuya acción es, con seguridad, antimicótica. (fig. 2).

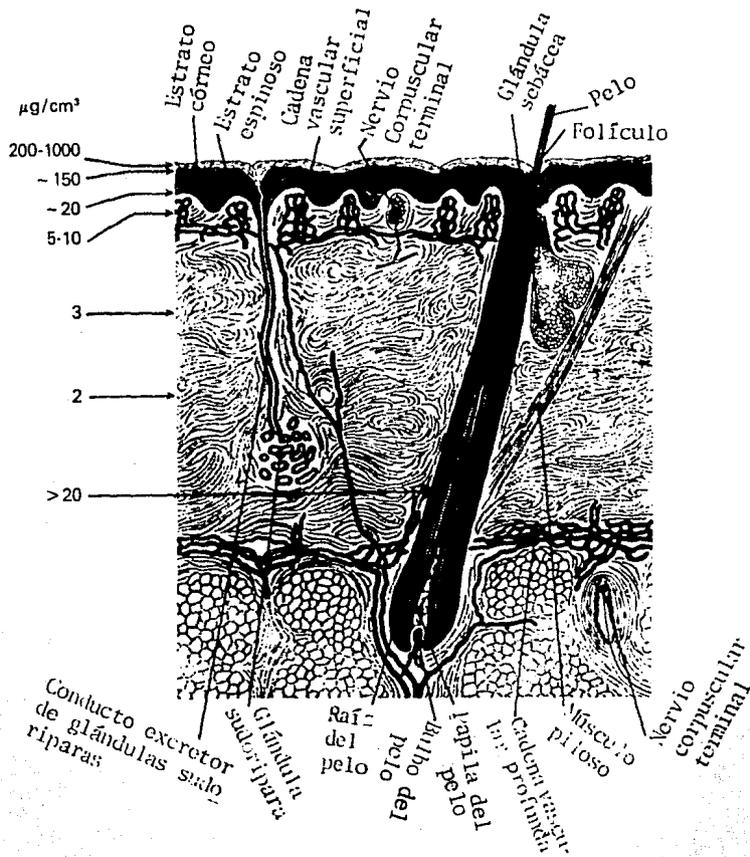


fig. 2: Esquema de sección transversal de piel humana, mostrando concentraciones de bifonazol en varias capas.

### 2.8.0) Biotransformación

En los experimentos comparativos hechos sobre la biotransformación en el mono, perro, conejo y rata, las muestras de metabolitos de los extractos del plasma e hígado, muestran desde el punto de vista cualitativo, una amplia concordancia entre las especies. Desde el punto de vista cuantitativo, sólo el perro muestra 2/3 de la actividad del bifonazol inal-

terada. Parece ser que este metaboliza más lentamente que las otras especies.

El análisis hecho en el plasma humano tras la inyección intravenosa del bifonazol marcado con  $C_{14}$ , da como resultado una muestra de metabolitos semejantes a los de otras especies desde el punto de vista cualitativo.

Como producto principal se aisló un metabolito microbiológicamente activo, el cual corresponde a una oxidación del bifonazol en el sistema bifenilo.

La vida media de éste fué de 1.3 horas. No se sabe con exactitud la ubicación de esta oxidación (fig. 3).

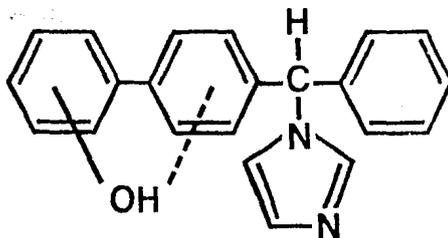


fig. 3: metabolito microbiológicamente activo.

#### 2.9.0) Eliminación y excreción

La gran cantidad de productos de biotransformación y las bajas con--

centraciones de la sustancia inalterada en la sangre, se muestran en favor de una eliminación rápida y exclusivamente metabólica del bifonazol.

En la rata, la eliminación de los metabolitos) tiene lugar, preferentemente (95 %), después de la secreción biliar o de la secreción de la mucosa intestinal con las heces.

En el hombre, la eliminación se reparte en la mitad por la secreción biliar y la otra mitad por la renal (72).

### 3.0.0) Evaluación terapéutica en humanos

Diversos estudios se han realizado en algunos países del mundo con el bifonazol (BAY h 4502), de entre las publicaciones revisadas se reporta:

T. corporis/ t. cruris: de 9 estudios revisados con un total de 7,525 pacientes tratados con bifonazol crema, solución, polvo y gel al 1 %, con aplicación de una vez al día durante 15 días, se han obtenido excelentes resultados con curación del 92 al 100 % y sin efectos secundarios, (16, 18, 34, 54, 66, 67, 88, 92).

T. manuum: se reporta un estudio de 12 casos tratados con bifonazol crema al 1 %, durante 10-70 días, con muy buenos resultados en 11 de 12 pacientes (49).

T. pedis: de 3 estudios que incluyeron 552 pacientes tratados con solución, polvo y gel de bifonazol al 1 %, durante 3 semanas, se reportan --

muy buenos resultados con curaciones de entre el 95 y 100 %, (17, 23, 25).

T. unguium: a más de 86 pacientes a los que se les trató previamente con unguento de bifonazol al 1 % más urea al 40 %, durante 12 días para remover los desperdicios de las uñas afectadas, se les trató posteriormente con crema o gel de bifonazol al 1 % por oclusión, durante 1-12 meses. Con esta terapia se obtuvieron resultados del 89 al 95 % de mejoría clínica y micológica. Se recomienda este tratamiento en combinación con terapia sistémica, (44, 52, 53).

Pitiriasis versicolor: resultados de casi el 100 % de curación, se obtuvieron en 150 pacientes tratados con bifonazol crema y solución al 1 %, durante 14 días de terapia, en 5 estudios revisados. (5, 33, 38, 50, 87).

Candidosis cutánea: 30 casos de candidosis submamaria e interdigitalis fueron tratados durante 2 semanas con bifonazol crema al 1 %, con efectividad clínica y micológica en el 89 % de los casos (83).

Otomycosis: muy buenos resultados (no reportan porcentajes), se obtuvieron en el tratamiento de 40 casos de esta entidad clínica, causada por varias especies de los géneros Candida y Aspergillus, primeramente con solución y posteriormente con crema de bifonazol al 1 %, respectivamente, durante 5 días, (22).

Dermatitis seborreica: un estudio realizado en 15 pacientes tratados con bifonazol gel al 1 % durante 4 semanas, reporta buenos resultados, similares a los obtenidos con otros derivados imidazólicos, (65).

Sebopsoriasis: en esta dermatosis en la que se encuentra asociada Candida sp. Pityrosporum sp. y bacterias Gram positivas, se trataron 11 pacientes con crema y gel de bifonazol al 1 %, con eficacia en 10 pacientes. (19, - 20).

También se reportan muy buenos resultados en los tratamientos de dermatitis del pañal asociada con Candida sp. y en eritrasma, (19, 51).

### 3.1.0) Estudios comparativos

a) Bifonazol crema o gel al 1 % (1 vez al día) vs miconazol crema al 2 % (2 veces al día):

T. corporis/ t. cruris: en 2 estudios, 50 pacientes se trataron con crema o gel de bifonazol y 65 con crema de miconazol, durante 2 semanas. Los síntomas persistieron más, en pacientes tratados con miconazol que con bifonazol.

La curación clínica y micológica fué del 86 % al 100 % para el bifonazol y del 70.3 al 85 % para el miconazol, no se presentaron efectos secundarios con ninguna de las preparaciones (42, 87).

T. pedis interdigitalis: 30 pacientes (15/15) tratados con ambas cremas durante 21 días, presentaron excelentes resultados (81).

Candidosis cutánea: 40 pacientes (20/20) manejados con ambos antimicóticos, durante 15 días, presentaron curación clínica y micológica en un 90 %, (con los dos antifúngicos), (42).

b) Bifonazol crema o solución al 1 % (1 vez/día) vs econazol crema o solución al 2 % (2 veces/día):

T. corporis/ t. cruris: en 2 estudios donde se involucraron 60 casos (30-30) tratados con ambos antimicóticos durante 2 semanas, reportan que el bifonazol fué efectivo en cerca del 100 % y el econazol arriba del 90 % (18, 23).

T. pedis: 90 casos (45/45) tratados con ambas cremas, produjeron curación clínica y micológica en un 95 % con bifonazol y 80 % con econazol, (23, 55, 62).

Candidosis cutánea y pitiriasis versicolor: se trataron 130 pacientes (65-65) con ambas cremas por 2 semanas, obteniéndose curación clínica y micológica del 80-95 % con bifonazol y del 75-90 % con econazol, (23, 56, 62).

c) Bifonazol crema al 1 % (1 vez/día) vs clotrimazol crema al 1 % (2 veces por día):

Candidosis cutánea: este reporte incluye 263 casos de 4 países, presentan muy buenos resultados clínicos y micológicos con ambos antimicóticos (41).

d) Bifonazol gel al 1 % (1 vez/día) vs sulconazol crema (2 veces/día):

T. cruris/ t. pedis: 106 pacientes fueron evaluados con ambas preparaciones durante 3 semanas, la curación micológica fué del 87.5 % para el bifonazol y del 70 % para el sulconazol, la respuesta clínica al trata-

miento fué del 100 % para el bifonazol y del 90.9 % para el sulconazol -- (80).

e) Bifonazol crema al 1 % (1 vez/día) vs oxiconazol y naftidina cremas\_ (1 vez/día):

Candidosis cutánea: de un grupo de 90 pacientes tratados con ambas cremas, sólo se reportan buenos resultados (43).

f) Bifonazol solución al 1 % vs sulfuro de selenio shampoo al 2.5 %:

Pitiriasis versicolor: 20 pacientes fueron tratados con solución de bifonazol al 1 % una vez al día, durante 2 semanas (aplicándolo sólo en el -- día), y 18 pacientes tratados con sulfuro de selenio shampoo al 2.5 % por 7 semanas (durante 5 minutos por día), al final del tratamiento el 5 % de casos con bifonazol y 22 % con sulfuro de selenio shampoo, presentaron -- examen directo positivo, (12).

### 3.2.0) Efecto antiflogístico del bifonazol

En esta investigación fué usada la histamina para inducir una reac-- ción alérgica, en 10 sujetos pre-tratados por 2 y 12 horas con bifonazol\_ crema, hidrocortisona y crema básica de bifonazol, sobre 28 cm<sup>2</sup> de piel. Después de 15 y 30 minutos de aplicada la histamina, el bifonazol suprimió este efecto al igual que la hidrocortisona, (58).

I I I  
P R O T O C O L O  
( NUESTRO ESTUDIO )

1.0) Metodología

Se evaluó el uso del bifonazol (BAY h 4502) crema al 1 % (randomizado), con una sola aplicación al día, con control micológico, comparativo contra miconazol crema al 2 % (randomizado) con dos aplicaciones al día, sobre pacientes de tinea corporis y tinea cruris.

1.1) Selección de los pacientes

Se seleccionó a 60 pacientes, 30 para el bifonazol y 30 para el miconazol, con tinea corporis y/o tinea cruris, que cumplan con los siguientes criterios:

a) Criterios de inclusión:

- Pacientes de cualquier edad y sexo
- Hallazgo clínico positivo
- Hallazgo micológico positivo en la preparación en fresco (con KOH al 20 % P/V en solución acuosa), a partir del material obtenido antes de iniciar el tratamiento
- Confirmación del hallazgo microscópico mediante cultivo con identificación del agente causal

- Consentimiento por anticipado del paciente y estar de acuerdo hasta su terminación.

b) Criterios de exclusión:

- Hallazgo micológico negativo o dudoso, con hallazgo clínico positivo
- Tratamiento antimicótico local dentro de las 2 semanas anteriores al inicio del estudio
- Tratamiento antimicótico sistémico dentro de las 4 semanas anteriores al inicio del estudio
- No se efectuó ningún otro tratamiento antimicótico, local o sistémico.

1.2) Indicaciones

El bifonazol (BAY h 4502) crema al 1 % se administró una vez al día, preferentemente por las noches. El miconazol crema al 2 % se aplicó dos veces al día, en la mañana y en la noche. Ambos medicamentos se aplicaron en capa delgada y uniforme dando un ligero masaje, sobre la piel enferma. La duración del tratamiento fué de 2 semanas.

1.3) Evaluación

Se evaluaron clínica y micológicamente (examen directo con KOH al 20 % P/V en solución acuosa), a todos los pacientes, en cada una de las siguientes citas:

- Antes de iniciar el tratamiento

- Una semana después de iniciar el tratamiento
- Dos semanas después de iniciar el tratamiento (3 días después)
- Quince días después de finalizado el tratamiento.

Se tomaron fotografías para constatar la evolución clínica, con la misma luz, en la misma posición, en la primera y última visita.

#### 1.4) Valoración del tratamiento

Se investigaron tratamientos previos al antimicótico en estudio y/o tratamientos concomitantes para otras enfermedades. Se hizo una evaluación clínica en cada cita tomando en cuenta, los síntomas ocasionados por las micosis como: enrojecimiento, descamación, maceración y prurito. Al final del tratamiento, mediante una correlación de los hallazgos clínicos y micológicos, se realizó una valoración de acuerdo a los siguientes parámetros:

- Muy bueno      Curación clínica y micológica (examen directo con KOH al 20 % P/V en solución acuosa y cultivos negativos)
- Bueno            Mejoría clínica y curación micológica (examen directo con KOH al 20 % P/V en solución acuosa y cultivos negativos)
- Regular        Mejoría clínica sin curación micológica (examen directo con KOH al 20 % P/V en solución acuosa, y cultivos positivos)
- Malo            Ningún cambio, ni clínico ni micológico.

### 1.5) Tolerancia

Durante el estudio cuando algún paciente presentó irritación local o algún otro efecto, se le suspendió el tratamiento.

### 1.6) Valoración micológica

#### 1.6.1) Toma de muestra:

Una vez que se seleccionó al paciente por las manifestaciones clínicas que presentó, y que estas concordaron con las de una tinea corporis y/o cruris, se tomó la muestra de la siguiente manera:

Se recolectaron las escamas del borde de la lesión, por ser la parte donde hay mayor actividad micótica, haciendo un raspado con dos portaobjetos previamente esterilizados; el raspado se hizo colocando un portaobjetos de manera horizontal para recoger el material, y otro vertical para realizar el raspado, tratando de quitar la mayor parte de escamas sueltas. Se tomó otra muestra con un pedazo de tapíz, frotando éste sobre las lesiones y depositándolo posteriormente sobre un medio de cultivo Micosel en caja Petri, para que en dicho medio se obtuviera el desarrollo de los hongos patógenos (3).

#### 1.6.2) Estudio micológico

##### a) Examen directo:

El material obtenido (escamas) se fragmentó con un bisturí, tratando

de que quedaran pedazos pequeños, luego se le agregó una gota de KOH al 20 % (P/V en solución acuosa), se colocó encima un cubreobjetos y se flameó directamente sobre el mechero, aproximadamente 10 segundos, con el fin de acelerar la degradación de la queratina y obtener mejor clarificación.

Después de realizar la técnica se observó la muestra en el microscopio óptico, recorriendo todos los campos, primero a 10X y luego a 40X para la identificación de filamentos y en algunos casos, se observó la presencia de blastosporas y/o pseudofilamentos.

b) Cultivo del material:

El sobrante de las escamas que se recolectaron, se sembraron en dos tubos:

- Un tubo de Sabouraud glucosa agar (medio inclinado)
- Un tubo de Micosel agar (para evitar contaminaciones de bacterias y hongos saprófitos, también medio inclinado)
- Caja de Petri con Micosel agar (mencionada en 6.1.1)

c) Examen macroscópico de las colonias:

Este se realizó una vez que se logró el crecimiento del dermatofito, que requirió en promedio 15 días, se tomaron en cuenta las siguientes características:

- Aspecto de la colonia:

anverso: para observar desarrollo y características especiales

reverso: para observar la presencia de pigmentos.

d) Examen microscópico de las colonias:

Para llegar a la tipificación completa de género y especie de la cepa en estudio, se realizaron exámenes directos con azul de algodón de lactofenol a diversos periodos de crecimiento. Cuando las cepas no dieron las suficientes formas de reproducción, se utilizó el medio de papa-zanahoria (PZ), y en algunos casos para estimular la formación de pigmentos, se utilizó el medio de harina de maíz (corn meal) más glucosa al 1 % (pH = 7.8).

## 2.0) Material

- Agujas de disección
- Algodón absorbente
- Asa micológica con porta-asa de platino
- Bisturí
- Cajas Petri desechables 100 x 10 mm.
- Cinta adhesiva (scotch)
- Espátula de aluminio
- Gasas
- Gradillas para 40 tubos
- Lápiz graso
- Matraces Erlenmeyer de 250 y 500 ml.
- Mecheros Bunsen
- Papel engomado
- Papel de estrasa y papel copia (para envolturas)
- Pipetas graduadas de 5 y 10 ml.
- Pintura de uñas
- Pinzas planas y de depilar
- Pinzas quirúrgicas de gancho
- Probetas de 250 y 500 ml.

- Tapiz en fragmentos de 10 x 10 cm.
- Telas de asbesto
- Tubos de ensayo de 16 x 150
- Varillas de vidrio
- Vasos de precipitados de 100 y 250 ml.

#### 2.1.0) Equipo

- Autoclave
- Balanza analítica
- Balanza granataria
- Campana de siembra (con extractor)
- Estufa
- Horno
- Incubadora de 28 °C
- Refrigerador
- Microscopio óptico.

#### 2.2.0) Reactivos

- Agua destilada
- Azul algodón de lactofenol
- Ciclohexitida (actidione)

- Cloranfenicol
- Glucosa (dextrosa)
- KOH al 20 % (sol. acuosa).

#### 2.3.0) Medios de cultivo

- Agar-agar
- Agar glucosa de Sabouraud
- Agar harina de maíz (corn meal) más glucosa al 1 %
- Agar de Micosel
- Agar papa-zanahoria (PZ).

#### 2.4.0) Fármacos

- Bifonazol (BAY h 4502) crema al 1 %, en tubos de 20 gramos.
- Nitrato de miconazol (Daktarin) crema al 2 %, en tubos de 30 gramos.

## 1.0 RESULTADOS

Se evaluaron 60 pacientes con las siguientes características:

### 1.1.

Sexo:

Masculino	42	pacientes	70 %
Femenino	18	"	30 %
	<hr/>		<hr/>
	60		100 %

Edad:

Mínima	1.7 años	
Máxima	75.0 "	Edad promedio 30.82 años

Peso:

Mínimo	13.0 kgs	
Máximo	95.0 "	Peso promedio 64.10 kgs.

Estatura:

Mínima	0.44 m	
Máxima	1.86 m	Estatura promedio 1.62 metros.

## 1.2 Ocupación

Ocupación	No. de pacientes	%
- Estudiantes	15	25.0
- Empleados	13	21.7
- Hogar	10	16.6
- Profesionistas	9	15.0
- Comerciantes	4	6.7
- Choferes	2	3.3
- Otros	7	11.7
	<hr/> 60	<hr/> 100.0 %

## 1.3 Diagnósticos clínicos

Tipos de tineas	No.	Por ciento (%)
- Corporis	21	35
- Cruris	33	55
- Corporis/cruris	6	10
	<hr/> 60 casos	<hr/> 100 %

Los diferentes tipos de tineas estuvieron distribuidas para cada fármaco de la siguiente manera:

	Bifonazol		Miconazol	
	No.	Por ciento (%)	No.	Por ciento (%)
T. corporis	10	33.3	11	36.7
T. cruris	18	60.0	15	50.0
T. corporis/cruris	2	6.7	4	13.3
	30 casos	100.0 %	30 casos	100.0 %

#### 1.4 Tratamientos previos y deserciones

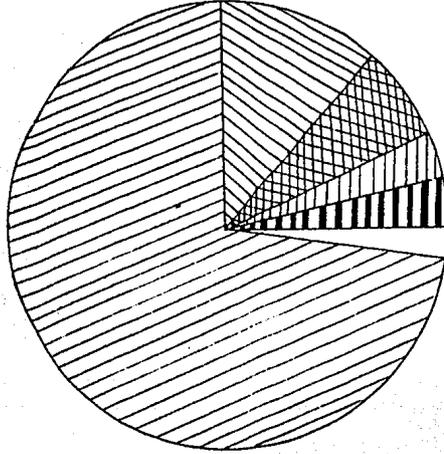
- Esteroides tópicos	5 pacientes	8.3 %
- Antimicóticos tópicos	5 "	5.0 %
- Deserciones	5 "	8.3 %

#### 1.5 Agentes etiológicos aislados

	No.	Por ciento (%)
<u>T. rubrum</u>	44	73.3
<u>T. mentagrophytes</u>	4	6.7
<u>T. tonsurans</u>	2	3.3
<u>M. canis</u>	7	11.7
<u>E. floccosum</u>	1	1.7
Cultivos mixtos: (*)	2	3.3
	60 casos	100.0 %

(\*) ( T. rubrum/T. tonsurans y T. rubrum/M. canis. )

A continuación se muestra la gráfica en porcentajes de los dermatofitos aislados.



73.3 %  - T. rubrum

M. canis  11.7 %

6.7 %  - T. mentag.

E. floccosum  1.7 %

3.3 %  - T. tonsurans

mixtos: (T. rubrum/M. can.)

 3.3 %

(T. rubrum/T. tonsurans)

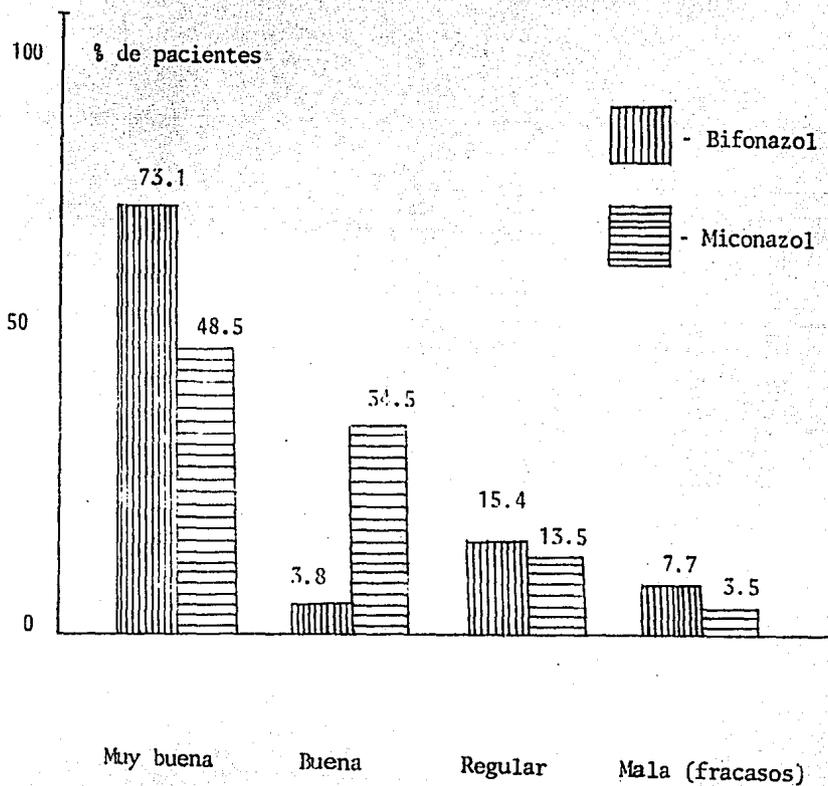
Distribución de dermatofitos para cada fármaco:

	Miconazol		Bifonazol	
	No.	%	No.	%
<u>T. rubrum</u>	22	73.3	22	73.3
<u>T. mentagrophytes</u>	2	6.7	2	6.75
<u>T. tonsurans</u>	-	-	2	6.75
<u>M. canis</u>	6	20.0	1	3.3
<u>E. floccosum</u>	-	-	1	3.3
<u>T. rubrum/T. tonsurans</u>	-	-	1	3.3
<u>T. rubrum/M. canis</u>	-	-	1	3.3
	30 casos	100.0 %	30 casos	100.0 %

1.6 Evaluación clínica al final del tratamiento con bifonazol (BAY h 4502) crema al 1 % contra miconazol crema al 2 %.

Valoración	Bifonazol		Miconazol	
	No. de pacientes	%	No. de pacientes	%
- Muy buena	19	73.1	14	48.5
- Buena	1	3.8	10	34.5
- Regular	4	15.4	4	13.5
- Malo (fracasos)	2	7.7	1	3.5
	26 casos	100.0 %	29 casos	100.0 %

Porcentaje de la valoración clínica al final del tratamiento:



1.7 Valoración micológica al final del tratamiento con bifonazol (BAY h 4502) crema al 1 % contra miconazol al 2 %.

Bifonazol								Miconazol								
A		B		C		D		A		B		C		D		
+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
- Ex.	30	0	12	14	3	23	2	23	30	0	10	19	5	23	1	24
dto.																
- Cul-																
tivos	30	0	4	22	2	22	2	23	30	0	4	25	4	25	1	24

A = Al inicio del tratamiento

+ = positivo

B = Una semana después de iniciar el tratamiento

- = negativo

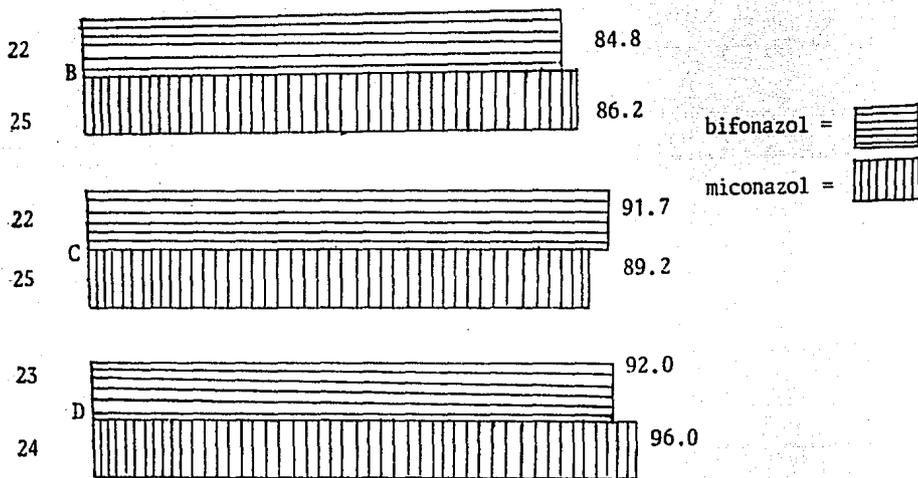
C = Tres días después de terminar el tratamiento

D = Dos semanas después de terminar el tratamiento.

Gráfica: porcentaje de muestras negativizadas al cultivo:

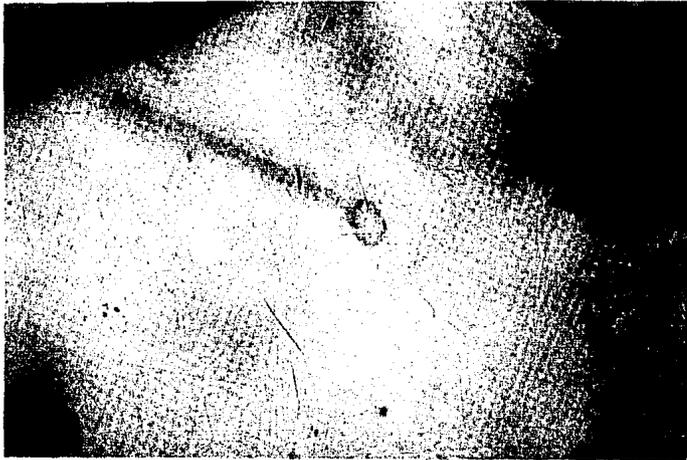
Casos idóneos para la  
evaluación micológica

% de muestras negativiza  
das.

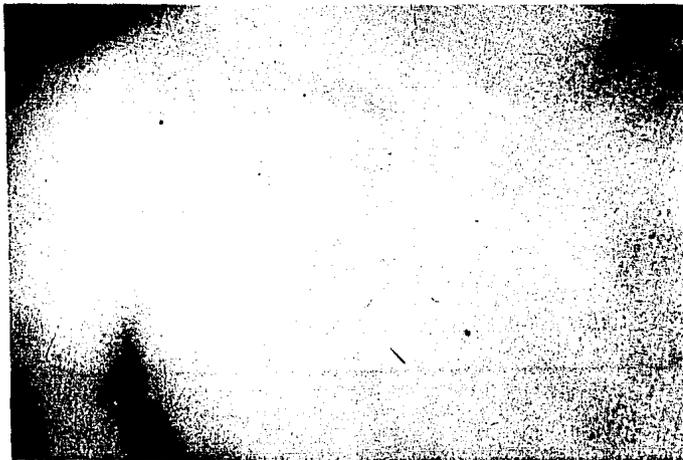


### 1.8 Tolerancia

Ningún paciente reportó efectos secundarios, con ambas cremas. En la evaluación final, estos informaron que las cremas fueron de fácil aplicación, no grasosas y que no mancharon sus ropas.



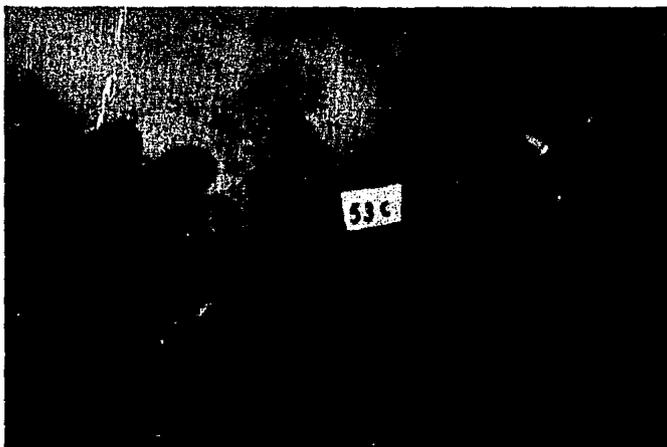
Tiña del cuerpo (antes de tratamiento)



Evolución a los 15 días de tratamiento con Bifonazol (BAY h 45 crema al 1 %, una vez al día. Mejoría evidente.



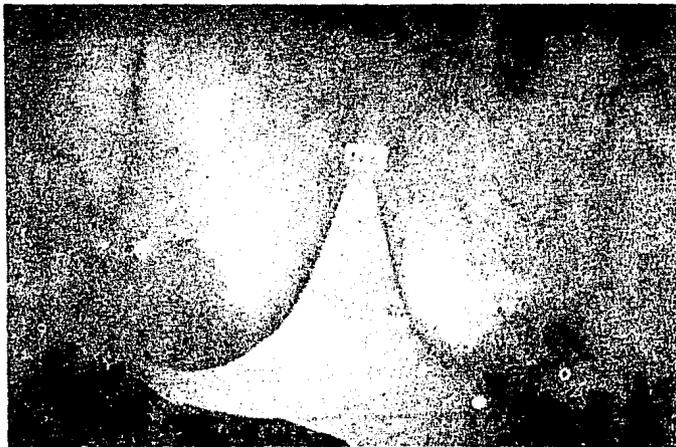
Tiña del cuerpo: región submamaria (antes de tratamiento).



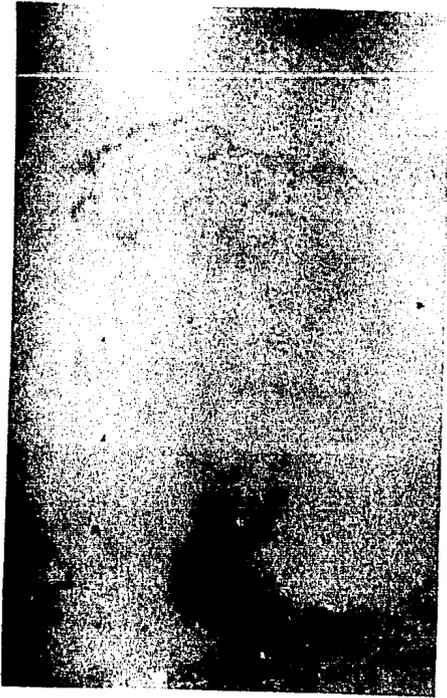
Evolución a los 15 días de tratamiento con Miconazol crema al 2%, 2 veces al día. Mejoría evidente.



Tiña del cuerpo: región mamaria (antes de tratamiento).

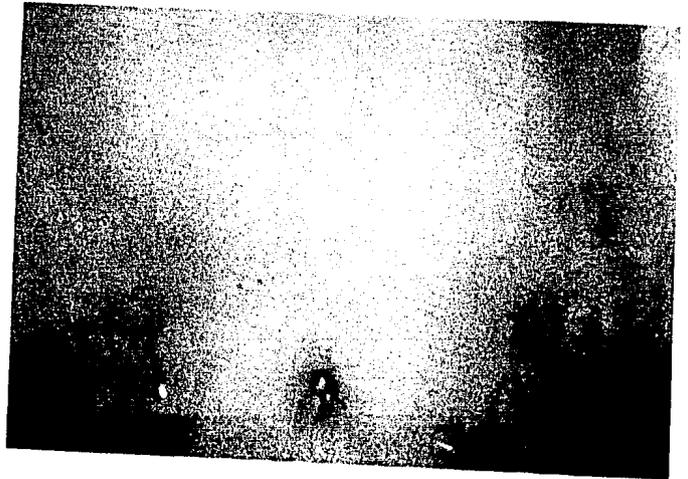


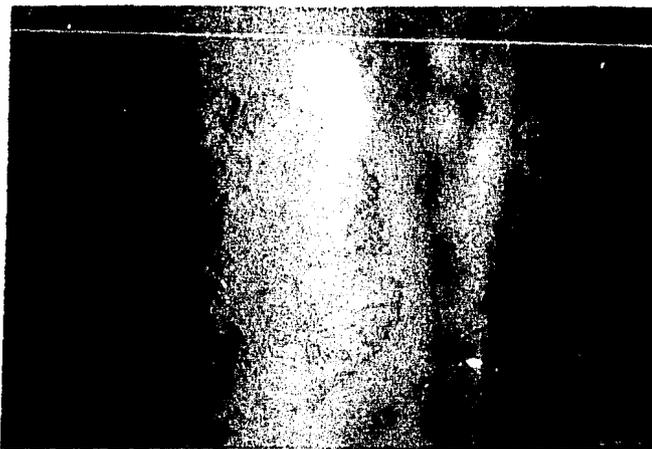
15 días después del tratamiento con crema de Bifonazol al 1%,  
Curación completa.



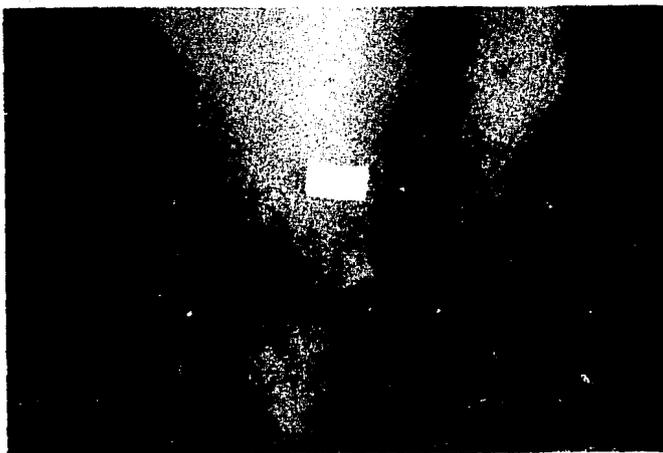
Tiña del cuerpo (tronco)  
antes de tratamiento.

Curación completa, 15 días  
después de tratamiento con  
Miconazol crema. Sólo que-  
do ligera hipocromia.

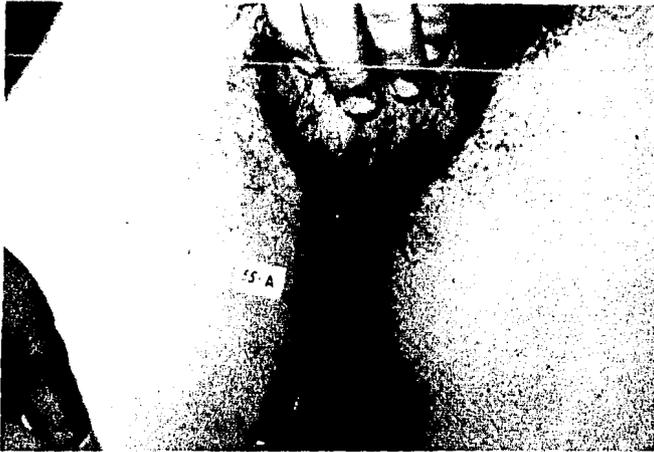




Tiña del cuerpo (tronco), antes de tratamiento.



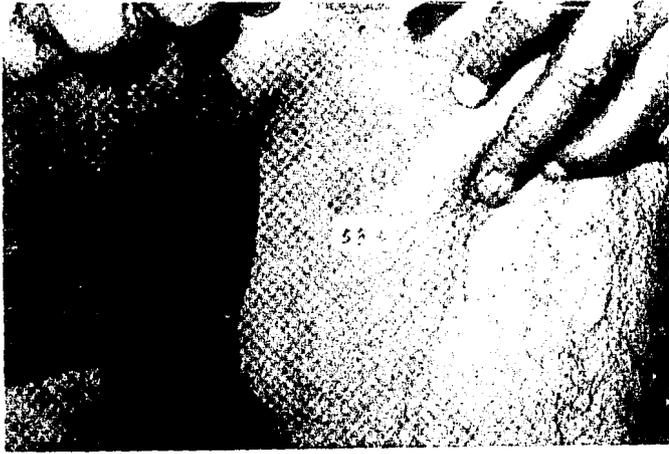
15 días después del tratamiento con Bifonazol crema al 1%.  
Curación completa.



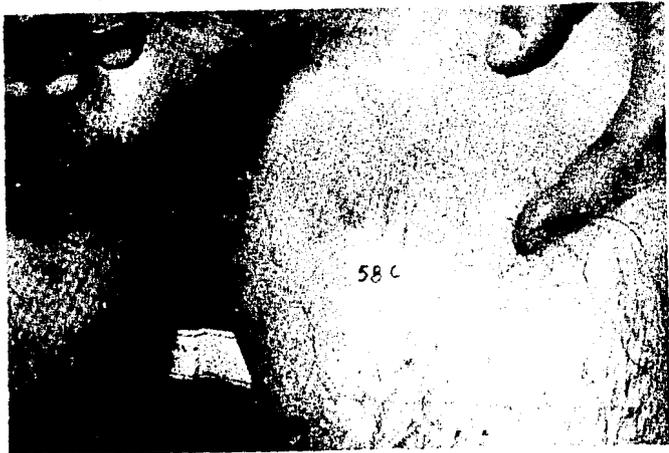
Tiña de la ingle (antes de tratamiento)



Mejoría evidente, 15 días después de ser tratada con crema de Miconazol al 2%, 2 veces al día.



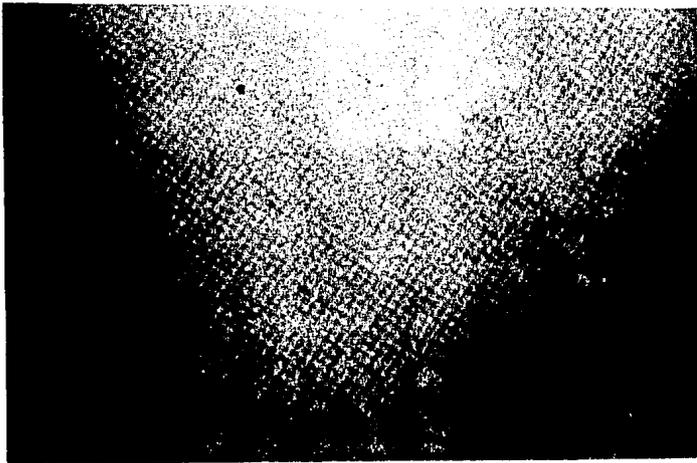
Tiña de la ingle (antes de tratamiento)



Mejoría evidente, 15 días después de ser tratada con crema de Bifonazol al 1%, aplicada una vez al día.



Tiña del cuerpo (muslo), antes de tratamiento.



Evolución a los 15 días de tratamiento con crema de Miconazol. Mejoría evidente.

## Conclusiones

- 1.- El bifonazol tiene muy buena acción antimicótica aplicado en humanos.
- 2.- Clínica y micológicamente el bifonazol a la mitad de concentración -- (1 %) que el miconazol (2 %) y con una sola aplicación al día en lugar de dos (miconazol) demostró superioridad.
- 3.- Clínica y micológicamente una aplicación con crema al 1 % al día (1 x 1 = 1) de bifonazol es superior a dos aplicaciones con crema al 2 % al día (2 x 2 = 4) de miconazol, es decir con diagnóstico idéntico, a igualdad de área de piel enferma ( $\text{cm}^2$ ) y de cantidad de crema exprimida del tubo y aplicada, el paciente tratado con bifonazol recibe 1/4 parte de sustancia activa en comparación con un paciente tratado con miconazol.
- 4.- No se presentó intolerancia tópica, ni efectos secundarios.
- 5.- El bifonazol tópico fué bien aceptado por ser:  
incoloro, inodoro y no graso.

## RESUMEN

Bifonazol (BAY h 4502) en el tratamiento de tinea corporis y cruris. Estudio sencillo comparativo de la crema al 1 % contra miconazol crema al 2 %.

El bifonazol es un nuevo derivado imidazólico, con un amplio espectro antifúngico "in vitro" contra dermatofitos, diversas levaduras y otros hongos patógenos.

Se trataron 57 tiñas de las cuales 55 % fueron tiña de la ingle, 35 % de tiña del cuerpo y 10 % de ambas. En el estudio se utilizó el bifonazol en muestra randomizada, con presentación de crema al 1 % con una sola aplicación por día, contra el miconazol al 2 % con dos aplicaciones por día, ambos durante 15 días de tratamiento. Se realizaron valoraciones tanto clínicas como micológicas, en los siguientes intervalos: al inicio del tratamiento; a la semana; 3 días después de finalizar y 15 días posteriores. De acuerdo con lo anterior se obtuvieron los siguientes resultados: del bifonazol 73.1 % muy buenos; 3.8 % buenos; 15.4 % regulares y 7.7 % de fracasos. Por lo que respecta al miconazol: 48.5 % muy buenos; 34.5 % buenos; 13.5 % regulares y 3.5 % de fracasos. En todos los pacientes se observó buena tolerancia local y excelente absorción. Concluimos que en este estudio, el bifonazol es superior al miconazol con una sola aplicación.

## COMENTARIOS

Consideramos que en este trabajo, el bifonazol demostró buena actividad antifúngica y superioridad sobre el miconazol, en el mismo período de tiempo, debido a que el primero fue aplicado 1 X 24 horas y a una concentración de 1%, mientras que el miconazol fue aplicado 2X24 horas y a una concentración del 2%. Esto nos indica que el bifonazol se aplicó en 1/4 parte con respecto al miconazol, y los resultados demuestran muy buena respuesta en 73.1% contra 48.5% respectivamente. Si analizamos el porcentaje de fracasos se consideraría lo contrario, pues el bifonazol dió 7.7% contra 3.5% del miconazol; los dos fracasos del bifonazol (7.7%) que continuaron con actividad micológica, fueron excepcionales ya que uno presentó doble agente etiológico (T. rubrum y M. canis), y el otro paciente previamente fue multitratado con esteroides tópicos.

Por lo que respecta a la negativización de los cultivos, los consideramos equivalentes, tomando en cuenta que el mayor índice de deserción estaba en pacientes con bifonazol.

Desde el punto de vista micológico el estudio es significativo, ya que fueron aislados básicamente todos los dermatofitos reportados en nuestro medio, e inclusive casos mixtos (dermatofitos) así como levaduras oportunistas (C. albicans), aunque no fueron reportadas, debido a que no estaba dentro de nuestro protocolo de estudio. Curiosamente todas las especies de dermatofitos más comunes, le correspondieron al bifonazol.

El estudio presentó un bajo porcentaje de deserciones (8.3 %), por lo que no fue necesario aumentar el número de pacientes.

Los 60 pacientes (100 %) en todas sus evaluaciones demostraron buena tolerancia al medicamento, y ninguno presentó efectos secundarios; consideramos que el bifonazol tiene mayor persistencia dérmica que el miconazol, debido a esto la aplicación única del fármaco.

Este estudio ha sido comparado con otros (42 y 87) y los resultados los consideramos bastante similares, por lo que raza e idiosincrasia de nuestros pacientes, así como la etiología no son un factor de importancia contra la acción de éste fármaco.

Nuestro estudio es el pionero en México, por lo que creemos que sería una pauta, para estudios posteriores sobre dermatofitosis u otras enfermedades micóticas, lo que completaría un perfil lo suficientemente adecuado del bifonazol.

## A P E N D I C E

Preparación de medios de cultivo:

a) Medio de agar dextrosa (glucosa) de Sabouraud.

Fórmula:

Dextrosa (glucosa) .....	40 gr.
Peptona .....	10 gr.
Agar .....	20 gr.
Agua destilada .....	1000 ml.

Se hierve el medio hasta disolución completa, después se distribuye en tubos de 16 x 150 (con 7 ml cada uno, aproximadamente), éstos se cubren con tapones de algodón y se esterilizan en autoclave, a 121 °C durante 15 minutos (15 libras de presión), posteriormente se sacan y se inclinan.

b) Medio de agar Micosel

La fórmula de éste es exactamente igual que el medio de Sabouraud, la diferencia es que se le agregan antibióticos en la siguiente proporción:

Actidione (cicloheximida) .....	400 mg/lt.
Cloranfenicol .....	50 mg/lt.

El primero se disuelve en 5 ml de acetona y el segundo en 5 ml de --

etanol, se agregan una vez que el medio ha hervido, y se esteriliza de la misma manera que el medio de Sabouraud.

c) Medio de agar papa-zanahoria (PZ)

Fórmula:

Pulpa de papa .....	20 gr.
Pulpa de zanahoria .....	20 gr.
Agar-agar .....	10 gr.
Agua destilada .....	1000 ml.

Se extraen las pulpas de papa y zanahoria completando el peso indicado, se fragmenta en pequeñas proporciones y se cuelean, se agrega el agar y el agua, hasta ebullición; (se reparte también en tubos como en el inciso (a) ), se esteriliza en autoclave a 121 °C, durante 15 minutos.

d) Medio de agar harina de maíz más glucosa al 1 %

(corn meal más dextrosa 1 %)

Fórmula:

Infusión harina de maíz agar .....	21 gr.
Glucosa (dextrosa) .....	10 gr.
Agua destilada .....	1000 ml.

Se suspenden 21 gramos del material deshidratado en un litro de agua destilada, se calienta suavemente (se le agrega la glucosa) hasta ebullición.

ción durante 1 o 2 minutos, o hasta disolución completa. Posteriormente se distribuye en tubos de 16 x 150, y se esteriliza en autoclave de 118 a 121 °C, ( no más de 15 libras de presión) durante 15 minutos.

e) Preparación del tapíz para toma de muestra

Se recortan pedazos de tapíz (alfombra) de 10 x 10 cm aproximadamente, se lavan y se envuelven en papel estrasa o papel copia, después se esterilizan en autoclave a 121 °C, durante 15 minutos.

f) Preparación de portaobjetos

Se hacen paquetes de 2 portaobjetos, envueltos en pedazos de papel copia de 6 x 12 cm aproximadamente, se esterilizan en autoclave a 121 °C, por 15 minutos.

## B I B L I O G R A F I A

- 1.- Abbink, J.: Expression of keratinolytic activity of T. mentagrophytes. Advances in Topical Antifungal Therapy. Eur. Sym. Sif. Frankfurt, -- Germ, 1986.
- 2.- Ahumada, P.M.: Dermatofitosis o tiñas., Desarrollo y estado actual - de la Micología Médica en México. Simposio Sintex; México, D.F. 1980.
- 3.- Arenas, R., Fuentes, J.L. y Reynoso, S.: Utilidad del terciopelo sin tético en el aislamiento de dermatofitos. Rev. Méx. Derm., 26(1): - 7-11, 1982.
- 4.- Arias, G.I.: Tratamiento de micosis superficiales con itraconazol (R 51 211). Tesis de Postgrado., Hosp. Gral. Méx. S.S., 1985.
- 5.- Aronis, E., Braziotis, A. and Kafouros, K.: Bifonazole solution in - pityriasis versicolor. Int. Antif. Sym. Bif., Excerpta Medica. To-- kio, Japam. 1982.
- 6.- Arreaza de Arreaza, F., et al.: Estudio comparativo doble ciego de - RO-13 8996 con miconazole en relación a su eficacia y tolerancia lo- cal en pacientes con dermatomicosis. Med. Cut. Ib. Lat. Am., 12: -- 57-61, 1984.
- 7.- Ashton, R.E.: Comparative clinical trial: bifonazole vs miconazole - in dermatomycosis. Adv. Top. Antif. Th., Eur. Sym. Bif. Frankfurt, - Germ. 1986.
- 8.- Berg, D. and Plempel, M.: Bifonazole, A Biochemist's View. Int. Sym. Bif. Dermatologica 169: suppl. 1: 3-10, 1984.

- 9.- Borgers, M.: Mechanism of Action of Antifungal Drugs, with Special Reference to the Imidazole Derivatives. Rev. Inf. Dis., 2(4), 1980.
- 10.- Brugmans, J.P., et al.: Treatment of long-term tinea pedis with Miconazole. Arch. Dermatol. 102: 428, 1970.
- 11.- Cartwright, R.Y.: Pharmacology of imidazole derivatives with antimycotic activity. Mykosen, 1: 298-303, 1978.
- 12.- Chu, A.C.: Comparative Clinical Trial of Bifonazole Solution versus Selenium Sulphide Shampoo in the Treatment of Pityriasis versicolor. Int. Sym. Bif. Dermatologica 169: suppl. 1: 81-86, 1984.
- 13.- Conant, F.N., et al.: Micología. 5a. edición., Ed. Interamericana, S.A. México, D.F., 1972. pp. 426-491.
- 14.- Cox, F.W., et al.: Ketoconazole for dermatophyte infections. J. Am. Derm. 6(4): 30-36, 1982.
- 15.- Degreef, H., et al.: Ketoconazole (R 41 400) in the treatment of dermatophyte infections., Int. J. Derm. 20(10): 662-669, 1981.
- 16.- Del Palacio, H.A., et al.: Bifonazol crema 1% (BAY h 4502) en el tratamiento de tinea corporis y tinea cruris. Act. Dermo-Sif. 76(5-6): 295-298, 1985.
- 17.- Del Palacio, H.A., et al.: Tratamiento de tinea pedis interdigitalis con solución de bifonazole al 1 por 100 (BAY h 4502)., Med. Cut. Ib. Lat. Am., 13: 183-186, 1985.
- 18.- Düring, H.F. and Stettendorf, S.: Bifonazole - a new agent for the treatment of dermatomycoses. Int. Antif. Sym. Bif., Excerpta Medica,

Tokio, Japam., 1982.

- 19.- Döring, H.F.: Experiences with the topical therapy with bifonazole - in unusual indications. Adv. Top. Antif. Th., Eur. Sym. Bif. Frankfurt, Germ. 1986.
- 20.- Döring, H.F.: Treatment of Seborrheic Dermatitis. A Clinical Trial and Etiological Approach., Int. Sym. Bif. Dermatologica 169: Suppl. 1: 125-134, 1984.
- 21.- Emmons, C.H.W., et al: Medical Mycology. Third Ed. Lea and Febinger, London, 1977. pp. 117-167.
- 22.- Falser, N.: Fungal infection of the ear. Etiology and therapy with Bifonazole cream or solution. Int. Sym. Bif., Dermatologica 169: -- suppl. 1: 135-140, 1984.
- 23.- Fredriksson, T. and Faergemann, J.: Comparative study of the therapeutic effect of bifonazole and econazole in the treatment of dermatomycoses. Int. Sym. Bif., Excerpta Medica. Tokio, Japam., 1982.
- 24.- Galimberti, R., et al: Tratamiento oral con ketoconazol en micosis superficiales., Rev. Arg. Derm., 64 (4): 442-447, 1983.
- 25.- Galimberti, R.L., et al.: Treatment of tinea pedis interdigitalis - with Bifonazole 1 % Gel., Int. Sym. Bif. Dermatologica 169: suppl. 1 : 107-110, 1984.
- 26.- Galimberti, R.L., et al: Prophylaxis of Tinea pedis interdigitalis with Bifonazole, 1 % Power., Int. Sym. Bif. Dermatologica 169: suppl, 1: 111-116, 1984.

- 27.- Gip, L.: Bifonazole - Catch-Test Trials on local Tolerance., Int. -  
Sym. Bif. Dermatologica 169: suppl. 1: 77-80, 1984.
- 28.- Gip, L.: Some Reasons for Therapeutic Failure in the treatment of -  
Dermatomycoses., Mykosen, suppl. 1: 171-174, 1978.
- 29.- Gip, L. and Forsström, S.: A Double-Blind Parallel Study of Sulconazole Nitrate 1% cream Compared with Miconazole Nitrate 2% Cream in -  
Dermatophytoses. Mykosen 26(5): 231-241, 1983.
- 30.- Goodman y Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica. 6a. --  
edición, Ed. Panamericana, S.A., México, D.F. 1981, pp. 967-970.
- 31.- Hanifin, J.M.: Ketoconazole - an oral antifungal with activity - -  
against superficial and deep mycoses., Int. Sym. Medellin, Colombia.  
Nov. 28 and 29, 1979.
- 32.- Heel, R.C., et al.: Ketoconazole - a review of its therapeutic Efficacy in superficial and Systemic fungal Infections., Drugs 23: 1-12,  
1982.
- 33.- Hernández-Pérez, E.: A comparison between one and two week's treatment with bifonazole in pityriasis versicolor., J. Am. Acad. Derm., -  
14 (4): 561-563, 1986.
- 34.- Hernández-Pérez, E.: Bifonazole Cream; Once-a-Day Application Every -  
Second Day in tinea cruris and tinea corporis., Int. Sym. Bif. Dermatologica 169: suppl. 1: 93-98, 1984.
- 35.- Iwata, K. and Yamamoto, Y.: In-Vitro antifungal activity of bifonazole: a preliminary report., Int. Sym. Bif., Excerpta Medica. Tokio, -

Japam, 1982.

- 36.- Jones, H.E., et al.: Oral ketoconazole. An Effective and Safe Treatment for Dermatophytoses., Arch. Dermatol., 117(3): 129-134., 1981.
- 37.- Kamalam, A. and Thambiah, A.S.: Clotrimazole and Econazole in Dermatophytoses (A double Blind Study)., Mykosen 23 (12): 707-710, 1980.
- 38.- King Jr, L.E. and Rosin, M.A.: Efficacy of a new topical antifungal agent bifonazole, in tinea versicolor., Int. Sym. Bif., Excerpta Medica. Tokio, Japam., 1982.
- 39.- Kuokkanen, K.: Topical Tioconazole in Dermatomycosis., Mykosen 25 (5): 274-280, 1982.
- 40.- Label, M.G. y Khaski, S.V.: Estudio comparativo entre clotrimazol y miconazol en crema en dermatomicosis., Rev. Arg. Derm. 66(3): 234-238, 1985.
- 41.- Lalosević, J., et al.: Bifonazole Cream in the Treatment of Superficial Candidosis. A Double-Blind Comparative Study., Int. Sym. Bif. - Dermatologica 169: suppl. 1: 99-106, 1984.
- 42.- Lalosević, J.: Comparative trial of bifonazole and miconazole in superficial candidosis, tinea corporis and tinea cruris., Int. Antif.-Sym. Bif. Excerpta Medica, Tokio, Japam., 1982.
- 43.- Lalosević, J.: Double-blind comparative trial with three new antimycotic cream formulations in superficial candidosis., Adv. Top. Antif. Th., Eur. Sym. Bif. Frankfurt, Germ., 1986.

- 44.- Lalosević, J. and Stettendorf, S.: Results of a new therapeutic regimen in the treatment of onychomycosis., Adv. Top. Antif. Th., Eur. - Sym. Bif. Frankfurt, Germ., 1986.
- 45.- Latapi, F.: Breve visión histórica de las micosis., Rev. Mex. Derm.- 25(2): 167-171., 1981.
- 46.- Lavalle, P.: Inmunología de las micosis., Memorias del 7o. Congreso Mexicano de Dermatología, 3a. sesión científica. 1973, pp. 229-235.
- 47.- Uicker, P.W., et al.: Retention Time and Concentration in Human Skin of Bifonazole and Clotrimazole., Int. Sym. Bif., Dermatologica 169: - suppl. 1 51-56, 1984.
- 48.- Macotela, R, E.: Inmunología en micología médica. Alergia e inmunología en la clínica. Ed. Clínicas de alergia S.A. México, D.F. 1979.- pp. 439-454.
- 49.- Meisel, C.: Treatment of Tinea palmaris with Mycospor., Int. Sym. -- Bif. Dermatologica 169: suppl. 1: 121-124, 1984.
- 50.- Mora, R.G. and Greer, D.L.: Comparative Efficacy and Tolerance of 1% Bifonazole Cream and Bifonazole Cream Vehicle in Patients with Tinea versicolor., Int. Sym. Bif. Dermatologica 169: suppl. 1: 21-23, 1984.
- 51.- Muscardin, L., et al.: About the use of Bifonazole in the first two years of life., Adv. Top. Antif. Th., Eur. Sym. Bif. Frankfurt, Germ, 1986.
- 52.- Nolting, S., et al.: New trends in the treatment onychomycosis., Adv. Top. Antif. Th., Eur. Sym. Bif. Frankfurt, Germ., 1986.

- 53.- Nolting, S.: Non-Traumatic Removal of the Nail and Simultaneous Treatment of Onychomycosis., Int. Sym. Bif. Dermatologica 169: suppl. 1: 117-120, 1984.
- 54.- Nolting, S.: Bifonazole - Clinical assessment of a new antifungal agent. Int. Antif. Sym. Bif., Excerpta Medica. Tokio, Japan., 1982.
- 55.- Osumi, M., et al.: The Effect of Bifonazole on the Structure of T. mentagrophytes., Int. Sym. Bif. Dermatologica 169: suppl. 1: 19-32, 1984.
- 56.- Panconesi, E. and Difonzo, E.: Bifonazole in the treatment of superficial candidiasis and tinea pedis., Int. Antif. Sym. Bif. Excerpta Medica. Tokio, Japan., 1982.
- 57.- Panconesi, E. and Difonzo, E.: Bifonazole in the treatment of dermatomycoses., Adv. Top. Antif. Th., Eur. Sym. Bif. Frankfurt, Germ., 1986.
- 58.- Petri, H., Hass, P, and Tronnier, H.: Studies of the antiphlogistic effects of Bifonazole., Adv. Top. Antif. Th., Eur. Sym. Bif. Frankfurt, Germ., 1986.
- 59.- Plempel, M. and Berg, D.: Reduction on the In Vivo Virulence of C. albicans by pre-treatment with Subinhibitory Azole Concentrations In Vitro. Int. Sym. Bif., Dermatologica 169: suppl. 1: 11-18, 1984.
- 60.- Plempel, M., Berg, D. and Ritter, W.: Antimycotic efficacy of Bifonazole in vitro and in vivo - compared with other azoles and naftidine., Adv. Top. Antif. Th., Eur. Sym. Bif. Frankfurt, Germ., 1986.

- 61.- Plömpel, M. and Regel, E.: Antimycotic properties of the topical azole bifonazole in vitro and in vivo., Int. Sym. Bif. Excerpta Medica, Tokio, Japan, 1982.
- 62.- Privat, Y. and Konopka, C.A.: A comparative controlled clinical trial bifonazole vs econazole in superficial mycoses., Int. Antif. Sym. - Bif. Excerpta Medica. Tokio, Japan., 1982.
- 65.- Rippon, J.W.: Medical Mycology: The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycets. Ed. W.S. Saunders. Filadelfia, Londres, Toronto, - Tokio., 1982, pp. 154-241.
- 64.- Ritter, W., Stettendorf, S. and Weber, H.: Pharmacokinetics of bifonazole and their clinical implications., Int. Antif. Sym. Bif. Excerpta Medica. Tokio, Japan., 1982.
- 65.- Roberts, D.T., et al.: Bifonazole in the treatment of seborrhoeic dermatitis., Adv. Top. Antif. Th., Eur. Sym. Bif. Frankfurt, Germ., - 1986.
- 66.- Saffó, F.: Bifonazole in dermatological practice: results of a multi centre study., Adv. Top. Antif. Th., Eur. Sym. Bif. Frankfurt, Germ., 1986.
- 67.- Sampaio, S.A.P., et al.: Clinical and mycological evaluation of bifonazole in superficial mycoses., Int. Antif. Sym. Bif., Excerpta Medica. Tokio, Japan., 1982.
- 68.- Saúl, A.: Tratamiento de algunas micosis superficiales y profundas con ketoconazol. Experiencias del Serv. Derm. Hosp. Gral. Mex., S.S.

- A. Rev. Mex. Derm. 25 (3): 441-455, 1983.
- 69.- Saúl, A.: Lecciones de Dermatología. 10a. edición., Ed. Fco. Méndez\_ C. 1984, pp. 103-125.
- 70.- Saúl, A., Bonifaz, A. and Arias, I.: Itraconazole in the treatment - of superficial mycoses., First-Int. Sym. Itra., Oax. Mex. Rev. Inf.- Dis. 1985 pp. 7-8.
- 71.- Shæfer, H. and Stlittgen, G.: Biopharmaceutical Problems in the - - treatment of Superficial Mycoses., Mykosen, suppl. 1 : 164-170, 1978.
- 72.- Schlüter, G.: Toxicology of Bifonazole., Int. Antif. Sym. Bif. - - Excerpta Medica. Tokio, Japam., 1982.
- 73.- Shadomy, S., et al.: In-Vitro and in-vivo activity of bifonazole., - Int. Antif. Sym. Bif. Excerpta Medica. Tokio, Japam., 1982.
- 74.- Shadomy, S.: In-Vitro studies with four new antifungal agents: BAY n 7133, bifonazole (BAY h 4502), ICI 155,066 and Ro 14-4767/002., Sa-- bouraudia: J. Med. Vet. Micol. 22 (7-15), 1984.
- 75.- Segretain, Drouhet y Mariat.: Diagnóstico de laboratorio en micolo-- gía médica. La Prensa Médica Mexicana, México, D.F., 1977.
- 76.- Stettendorf, S.: Bifonazole - A Synopsis of Clinical Trials Worldwi- de. Status And Outlook., Int. Sym. Bif. Dermatologica 169: suppl. 1: 21-23, 1984.
- 77.- Stettendorf, S. and Sommer, J.: Local and systemic tolerance of bifo- nazole following topical application., Int. Antif. Sym. Bif., Excerpta Medica. Tokio, Japam., 1982.

- 78.- Sud, I.J. and Feingold, D.S.: Mechanisms of action of the antimycotic imidazoles., *J. inv. Dermatol.* 76 (6): 438-441, 1981.
- 79.- Symoens, J. and Cauwenbergh, G.: Ketoconazole, a new step in the management of fungal diseases., Janssen Pharmaceutica. Progress in - - Drugs Research, 27 (38-83), 1983.
- 80.- Thomas, O.J. and Evans, S.: A study in industry of Bifonazole 1 % -- gel and sulconazole cream in tinea pedis and tinea cruris., Adv. - - Top. Antif. Th. Eur. Sym. Bif., Frankfurt, Germ., 1986.
- 81.- Tulli, A., Serri, F. and Gatti, S.: Bifonazole and Miconazole in the treatment of tinea pedis interdigitalis in soldiers under barracks - conditions. *Int. Antif. Sym. Bif. Excerpta Medica. Tokio, Japam.*, - 1982.
- 82.- Uchida, K. and Yamaguchi, H.: Assesment of In Vivo Activity of Bifonazole Against Dermatophytic Infection in Guinea Pigs on the Basis of the Amount of a Specific Fungal Cell Wall Component Chitin in the Infected Skin. *Int. Sym. Bif. Dermatologica* 169: suppl. 1: 47-50, - 1984.
- 83.- Urabe, H., et al.: Clinical results with bifonazole in the treatment of cutaneous candidiasis., *Int. Antif. Sym. Bif. Excerpta Medica. To kio, Japam.* 1982.
- 84.- Vanbreuseghem, R., et al.: *Micosis superficiales.*, Farmitalia, Carlo Erba, S.p.A., 1984. Milano, Italia.

- 85.- Van Crutsem, J., et al.: Terconazole - new broad spectrum antifungal. *Chemotherapy* 29: 332-333, 1983.
- 86.- Velasco, C.O. y Tay, Z.J.: *Nociones de Micología*. 2a. edición., Ed. Fco. Méndez C., 1978. pp. 1-54.
- 87.- Vena, G.A., et al.: Efficacy and Safety of Bifonazole (BAY h 4502) - in patients with pityriasis versicolor and tinea inguinalis., *Mykosen* 26 (8): 415-420, 1983.
- 88.- Watanabe, S.: Clinical evaluation of bifonazole (BAY h 4502) cream - applied once daily in the treatment of dermatomycoses. *Int. Antif. Sym. Bif. Excerpta Medica. Tokio, Japam.*, 1982.
- 89.- Weber, H., et al.: Pharmacokinetic investigations on bifonazole after topical application. *Int. Antif. Sym. Bif. Excerpta Medica. Tokio, Japam.* 1982.
- 90.- Welsch, O. and Rodríguez, M.: Treatment of dermatomycoses with Ketoconazole. *Rev. Inf. Dis.* 2 (4): 582-585, 1980.
- 91.- Yamaguchi, H. and Uchida, K.: In Vivo Activity of Bifonazole in Guinea Pigs.: Its Characteristic Features and Comparison with Clotrimazole. *Int. Sym. Bif. Dermatologica* 169: suppl. 1: 33-46, 1984.
- 92.- Zaias, N., et al.: Treatment of glabrous skin dermatophytosis with - topical 1 % Bifonazole: a double-blind study. *Int. Antif. Sym. Bif., Excerpta Medica. Tokio, Japam.*, 1982.
- 93.- Zapater, R.C.: *Introducción a la Micología Médica*. 2a. edición. Ed. - el Ateneo, S.A. 1970. pp. 84-119.