

479 2e1



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO "in vitro" DEL SAPERCONAZOL
(R 66 905). EFECTO SOBRE DIVERSAS CEPAS
DE HONGOS PATOGENOS Y OPORTUNISTAS

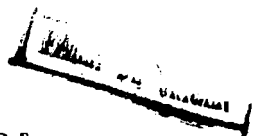
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

ANGELICA ADRIANA GARCIA LEGORRETA





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.

I N D I C E

	PAGINA
1. Introducción	1
2. Objetivos.....	3
3. Generalidades :	
3.1 Antimicóticos.....	4
3.2 Saperconazol (R 66 905) :	
3.2.1 Propiedades generales.....	5
3.2.2 Propiedades fisicoquímicas.....	6
3.2.3 Mecanismo de acción de los triazoles.....	6
3.2.4 Valoración "in vitro".....	10
3.2.5 Valoración "in vivo".....	11
3.2.6 Toxicología.....	11
3.2.7 Farmacocinética.....	14
3.2.8 Embriotoxicidad y teratogenicidad.....	14
3.2.9 Contraindicaciones.....	14
3.2.10 Efectos colaterales.....	14
4. Material.....	15
5. Método.....	18
6. Resultados.....	25
7. Discusión.....	36
8. Conclusión.....	40
9. Bibliografía.....	41

1. INTRODUCCION

La República Mexicana en una buena proporción tiene climas tropicales y subtropicales, esto da origen a que se presente un sinnúmero de enfermedades infecciosas, dentro de éstas son de gran importancia las micosis, por su elevada morbilidad y por las complicaciones que generan a los pacientes, como infuncionalidad de algún miembro, órgano e inclusive la muerte; México por lo tanto es un paraíso micológico. Bajo el punto de vista terapéutico son pocos los productos que existen en el mercado, en especial los sistémicos, se cuenta con apenas 4 ó 5; algunos de ellos son de espectro muy reducido como la griseofulvina, que unicamente sirve para las tiñas; en cambio otros como la anfotericina B tiene un espectro muy grande, pero es extraordinariamente tóxica. A finales de la década de los 70's surgió una nueva clase de antimicóticos, los azoles, de ellos destaca el ketoconazol como un imidazol sistémico de amplio espectro, aunque algunos autores han reportado efectos de irritación gástrica y hepatotoxicidad. Posteriormente aparecieron los triazoles, como el terconazol, fluconazol e itraconazol, con una actividad similar pero sobretodo con menos efectos secundarios. Es importante que surjan nuevos antimicóticos, debido a que con frecuencia se observan cepas resistentes y efectos colaterales. Para tener una idea de la acción y propiedades del principio activo, es necesario completar estudios de: farmacocinética, toxicidad, valoración "in vivo", espectro de acción, entre otros.

El saperconazol (R 66 905) es un nuevo triazol creado en 1988 por Janssen Pharmaceutica R.C., cuyas propiedades han sido

estudiadas por la misma casa, sin embargo muy pocas veces tenemos la oportunidad de investigar un antimicótico en esta fase, con condiciones propias y sobre todo con las cepas aisladas de nuestros pacientes.

El objeto de este trabajo, es determinar la sensibilidad de las cepas patógenas y oportunistas más frecuentes en nuestro medio, frente al saperconazol (R 66 905), para dar un apoyo a los estudios clínicos ("in vivo") que se desarrollarán en la tercera fase de estudio de este medicamento.

2. OBJETIVOS

1) Evaluar la actividad "in vitro", cualitativa y cuantitativamente del saperconazol (R 66 905) en diversas cepas de hongos patógenos y oportunistas.

2) Tipificar las cepas utilizadas en la valoración del fármaco.

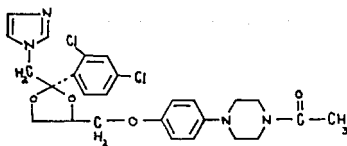
3. GENERALIDADES

3.1 Antimicóticos

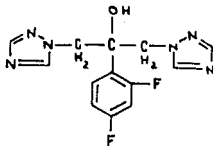
En la actualidad se cuenta con una serie de agentes antifúngicos sistémicos: los azoles, son compuestos activos contra una gran variedad de hongos, incluyendo aquellos que causan infecciones superficiales, así como los que originan micosis profundas o sistémicas. (12, 23) Inicialmente se sintetizaron los derivados de los imidazoles, que se caracterizan por estar formados por un anillo heterocíclico que contiene dos átomos de nitrógeno, de este grupo los más representativos son: clotrimazol, isoconazol, econazol, miconazol, y a fines de los 70's, se creó el ketoconazol, que fue el primero de uso sistémico (oral) con buenos resultados. (6, 12, 19, 23)

Más recientemente se sintetizaron los triazoles, que son derivados heterocíclicos de tres átomos de nitrógeno, y que se caracterizan por tener mayor actividad antifúngica, los primeros fueron: itraconazol y fluconazol. (19)

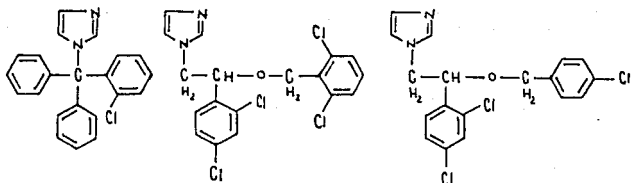
A continuación se ejemplifican las fórmulas de los imidazoles y triazoles más importantes (6, 13, 20, 21, 23, 28):



Ketoconazol



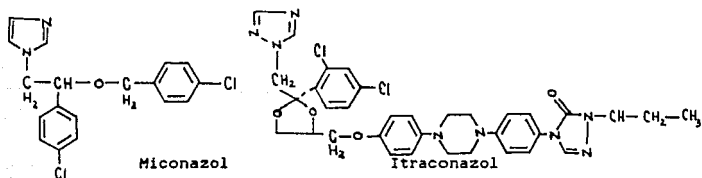
Fluconazol



Clotrimazol

Isoconazol

Econazol



Miconazol

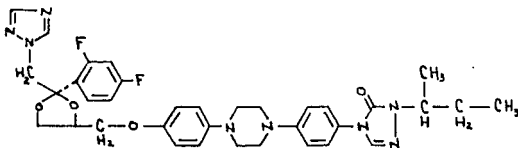
Itraconazol

Fig.1 Estructura química de algunos azoles.

3.2 asperconazol (R 66 905)

3.2.1 Propiedades Generales

Estructura química



Fórmula condensada: C H F N O
35 38 2 8 4

Peso molecular: 673

Nombre químico: (cis)-4-[4-[4-[4-[[2-(2,4-difluorofenil)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)-1,3-dioxolan-4-ilmetoxil]fenil]-1-pipera-

zínil]fenil]-2,4-dihidro-2-(1-metilpropil)-3H-1,2,4-triazol-3-one.

Nombre genérico: saperconazol.

Apariencia visual: Polvo de color blanco.

3.2.2. Propiedades fisicoquímicas.

Solubilidad

Tabla 1. Solubilidad reportada en solventes diversos. Expresada en g/100 ml de solución (1) :

Agua (pH=6.7)	< 0.0001
Etanol	0.061
Acetona	0.68
Dietil éter	0.0043
Polietilenglicol 400	0.6
Dimetilsulfóxido	4.1

Punto de fusión: 189.5 °C

Constante de ionización: pKa=3.7

3.2.3 Mecanismo de acción de los triazoles.

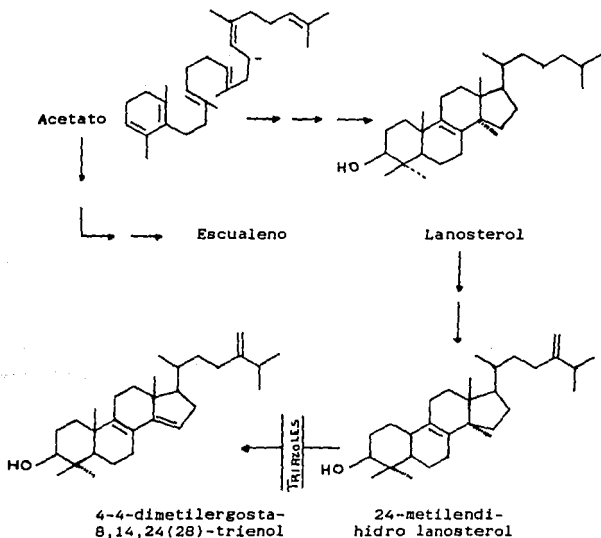
El mecanismo de acción ha sido investigado a nivel bioquímico como morfológico.

Cambios bioquímicos.

El ergosterol es el principal esteroide constitucional de los

hongos, es un componente esencial de la membrana basal. (6, 7, 12, 15, 16, 25, 29, 32).

El mecanismo primario de acción de los triazoles consiste en la inhibición de biosíntesis del ergosterol, por lo tanto los hongos forman posteriormente membranas defectuosas, que ocasionan una serie de fenómenos, como alteración de bomba de sodio, salida de diversos nutrientes, etc. (6, 7, 9, 12, 22, 23, 27, 31, 32, 34).



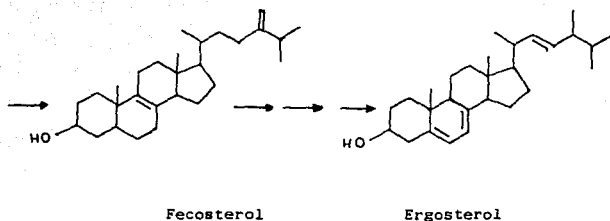


Fig. 2 Síntesis de ergosterol

Esto es, la conversión de 24-metilendihidrolanosterol a 4,4-dimetil-ergosta-8,14,24(28)-trienol, es una reacción que implica los siguientes pasos: (2, 3, 14, 30)

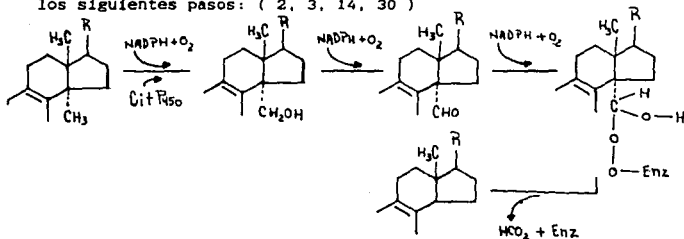


Fig 3. Reacción de 14 α -dimetilación.

Se trata de una reacción oxidativa 14 α -dimetilación, la enzima que lleva a cabo esto es una mono-oxigenasa, la cual es dependiente del P-450, a nivel molecular uno de los átomos de nitrógeno, el N-4 de los triazoles capta al átomo de Fe del grupo hemo del citocromo P-450, así excluye el oxígeno requerido para

la reacción de oxidación y bloquea la 14α -dimetilación con la consecuente acumulación de 14 -metilesteroles, y alteración de la permeabilidad de la membrana, además existe pérdida de K^+ , escape de aminoácidos y compuestos fosforados intracelulares. (4, 6, 8, 18, 19, 23, 31, 32, 33, 34) En comparación, los derivados de los imidazoles con los triazoles es que éstos últimos atrapan débilmente el citocromo P-450 de mamíferos, mientras que muestra alta afinidad por enzimas citocromo P-450 del hongo, por lo que no interfiere procesos bioquímicos en células de mamífero. (23)

Cambios morfológicos y enzimáticos.

- Acumulación geométrica incorrecta de precursores de ergosterol en la membrana. (6)
- Afecta la actividad de enzimas en la membrana: citocromo oxidasa, citocromo peroxidasa y oxidasa dependiente de NADH, ocasionando un acúmulo de peróxido de hidrógeno intracelular (tóxico para la célula). (23, 31)
- Alteración de la periferia de la célula y vacuolas citoplásmicas. (8)
- División celular defectuosa. (8)
- Incremento de volumen celular. (8)
- Hifa abortiva. (8)
- Alargamiento de la vacuola central. (8)
- Plasmólisis. (8, 11)

Otras alteraciones.

- Afecta síntesis de fosfolípidos, repercutiendo en la fluidez de la membrana. (31)
- Incremento en la susceptibilidad a las células del sistema de defensa del huésped. (8, 10, 33)
- Interacción directa con lípidos de membrana, afecta enzimas mitocondriales. (31)

3.2.4. Valoración "in vitro".

La actividad " in vitro" del saperconazol (R 66 905) se evaluó utilizando 942 cepas de 171 especies diferentes, se encontró que el saperconazol (R 66 905) a una concentración de 0.1 µg/ml a 100 µg/ml tiene un potente espectro antifúngico, activo en contra de la mayoría de dermatofitos, Candida sp., Cryptococcus sp., Pityrosporum sp., Aspergillus sp. hongos dimórficos, hifomicetos y varios hongos más. (1)

La mayoría de cepas de Fusarium sp. zigomicetos y actinomicetos fueron poco sensibles al saperconazol (R 66 905) (1) ; en cambio Prototheca wickerhamii, aunque es un alga fue sensible a una concentración de 1 µg/ml. (1)

El saperconazol (R 66 905) "in vitro" es más activo que el ketoconazol en contra de varios hongos, especialmente en contra de dermatofitos, C. albicans, Candida sp., Torulopsis sp., Cr neoformans, A. fumigatus, Aspergillus sp. hifomicetos y otros; además tiene actividad en contra de hongos a los cuales el fluconazol no es activo, tales como : S. schenckii, Aspergillus sp

y algunos hifomicetos. (1)

3.2.5. Valoración "in vivo"

Se evaluó la actividad " in vivo " del saperconazol (R 66 905) en diferentes modelos animales, en donde se observó eficacia terapéutica. En la actualidad está por iniciar la fase clínica de este fármaco. (1)

3.2.6. Toxicología

1. Administración oral.

El saperconazol(R 66 905) fue administrado oralmente a ratones Swiss, 10 machos y 10 hembras a una dosis de 300 mg/Kg; a perros Mongrel, 4 machos y 4 hembras a una dosis de 640 mg/Kg; y a conejos blancos Nueva Zelanda, 10 hembras y 10 machos a una dosis de 187 mg/Kg respectivamente. No se observó mortalidad en ninguno de los tres grupos. Consecuentemente, la LD₅₀ después de la administración oral es 300 mg/Kg en ratón, 640 mg/Kg en perro, 187 mg/Kg en machos y 194 mg/Kg en hembras en conejos. (1)

Estudio piloto en ratas durante un mes.

En este estudio se emplearon ratas Wistar, las cuales recibieron dosis diarias de 5, 20, y 80 mg/Kg de saperconazol (R 66 905) durante un mes (1). Los parámetros evaluados y los resultados obtenidos se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 2. Parámetros evaluados en estudio piloto realizado en ratas Wistar.

	mg saperconazol (R 66 905)/ Kg			
	Control	5	20	80
Mortalidad	-	-	-	-
Observación clínica	-	-	-	-
Peso	-	-	+	+
Alimentación	-	-	+	+
Hematología	-	-	-	+
Análisis suero	-	-	+	+
Uroanálisis	-	-	-	+
Histopatología	-	-	+	+

Los resultados indican que una dosis de 5 mg/kg es absolutamente no tóxica, baja toxicidad se encontró a una concentración de 20 mg/Kg y a una dosis de 80 mg/Kg fue moderadamente tóxica a esta concentración. (1)

Estudio piloto en perros durante un mes.

Se administró saperconazol (R 66 905) a perros Beagle a dosis diarias de 2.5, 10 y 40 mg/Kg durante un mes (1), los parámetros estudiados y los resultados obtenidos se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 3. Parámetros evaluados en estudio piloto realizado en
perros Beagle.

	mg saperconazol (R 66 905)/Kg			
	Control	2.5	10	40
Mortalidad	-	-	-	-
Observación clínica	-	-	-	-
Peso	-	-	-	+
Hematología	-	-	-	-
Análisis suero	-	-	-	-
Uroanálisis	-	-	-	-

Según los resultados obtenidos se observa que el fármaco fue bien tolerado, hasta una concentración de 10 mg/Kg no presentó ningún efecto tóxico, mientras que a una concentración de 40 mg/Kg sólo hubo alteración en el peso. (1)

2.Administración intravenosa.

El saperconazol (R 66 905), en hidróxipropil- β -ciclodextrín, fue administrado por vía intravenosa a una dosis de 5 mg/Kg a 10 machos y 10 hembras de ratas adultas Wistar, igual procedimiento se realizó en ratones Swiss, ambos, 14 días después del tratamiento la LD fue de 23.7 mg de saperconazol (R 66 905) por Kg de peso del animal. (1)

3. Prueba de irritación ocular en conejo.

Se valoró saperconazol (R 66 905) aplicándolo en ojos de conejos blancos Nueva Zelanda a dosis de 0.1 ml, se observó irritación ocular mínima. (1)

3.2.7. Farmacocinética.

Estudios realizados en voluntarios sanos que recibieron dosis oral de saperconazol (R 66 905) mostraron que la vida media del fármaco es de alrededor de 17 horas. (1)

3.2.8. Embriotoxicidad y teratogenicidad.

Estudios realizados con saperconazol (R 66 905) en hembras embarazadas de conejos blancos Nueva Zelanda no mostraron efectos embriotóxicos ni teratogénicos. (1)

3.2.9. Contraindicaciones.

Se ha reportado como única contraindicación el empleo de saperconazol (R 66 905) durante el embarazo.

3.2.10 Efectos Colaterales.

No se ha reportado ningún caso. (1)

4. MATERIAL

- Algodón.
- Asa micológica.
- Cajas Petri desechables estériles 100 X 10 mm.
- Campanas de fermentación.
- Cinta adhesiva transparente.
- Cubreobjetos.
- Espátula de aluminio.
- Frascos viales.
- Gasas.
- Gradillas para 40 tubos.
- Hisopos de algodón estériles.
- Lápiz graso.
- Matraces aforados 10 y 50 ml.
- Matraces bola fondo plano 500 y 1 000 ml.
- Matraces Erlenmeyer de 250 y 500 ml.
- Mecheros Bunsen.
- Papel filtro Whatman no. 42.
- Pinzas de depilar.
- Pipetas aforadas de 25 ml.
- Pipetas graduadas de 1, 5. y 10 ml.
- Pipetas Pasteur.
- Portaobjetos.
- Probetas graduadas de 50 y 100 ml.
- Tela de asbesto.
- Tubos de ensaye de 13 X 100.
- Tubos de ensaye de 16 X 150.

- Vasos de precipitados de 100 y 250 ml.

Equipo.

- Autoclave.
- Balanza analítica.
- Balanza granataria.
- Campana de siembra (con extractor)
- Estufa.
- Incubadora de 28 y 37 C.
- Refrigerador.
- Microscopio óptico.

Reactivos.

- Acetona.
- Acido acético 1 N.
- Acido clorhídrico.
- Agua destilada.
- Azul de lactofenol
- Benzaldehído.
- Caseína.
- Cloroformo.
- Cloruro de sodio
- Colorantes de Gram
- Etanol.
- Etilenglicol.
- Galactosa.
- Gelatina.
- Glucosa.

- Lactosa.
- Maltosa.
- Peptona de caseína.
- Sacarosa.
- Suero humano.
- Tinta china.
- Tween 80.
- Xantina.

Medios de cultivo.

- Agar de esporulación.
- Agar Biggy.
- Agar corn-meal (harina de maiz)
- Agar levadura-malta.(YM)
- Agar papa-zanahoria. (PZ)
- Agar papa-dextrosa.(PDA)
- Agar Sabouraud.
- Caldo Sabouraud.
- Medio Pagano-Levin.

5. METODO

En este estudio se determinó el efecto " in vitro " del saperconazol (R 66 905). El fármaco se encuentra en forma de polvo cristalino. Durante los estadios iniciales se comprobó su solubilidad en diversos solventes que se señalan en la tabla siguiente :

Tabla 4. Solventes utilizados para comprobar la solubilidad del fármaco.

Agua (pH de 2 a 8)
Etanol
Acetona
Etilenglicol
Ac. acético 1N
Ac. clorhídrico 1 N
Benzaldehido
Agua-etanol 1:1
Agua-acetona 1:1
Etanol-acetona 1:1
Cloroformo

Para evaluar la actividad "in vitro" del saperconazol (R 66 --- 905) se utilizaron un total de 100 cepas, aisladas de casos patológicos.

Las cepas estudiadas se dividieron en cuatro grupos:

- Grupo 1. Hongos levaduriformes -

Candida sp

Cryptococcus sp

- Grupo 2. Hongos filamentosos -

Aspergillus sp

Geotrichum sp

Penicillium sp

- Grupo 3. Patógenos primarios -

Dermatofitos.

Hongos dematiáceos.

S. schenckii

- Grupo 4. Actinomicetos -

Nocardia sp

Las cepas utilizadas en la valoración del fármaco fueron tipificadas de acuerdo al siguiente criterio micológico:

Para el género Candida:

- Tinción de Gram : Se realizó una tinción clásica de Gram con objeto de checar pureza y morfología microscópica.

- Siembra en medio Biggy : El microorganismo se inoculó en este medio, incubándose a 28 ° C durante 24-48 horas, se observaron las características macroscópicas de las colonias, ya que es un medio diferencial para el género Candida el cual produce colonias de color café.

- Prueba de tubos germinativos : En 0.5 ml de suero humano se inoculó una asada del microorganismo, se incubó a 37 ° C durante 3 1/2 horas, posteriormente se observó al microscopio en búsqueda de tubos germinativos; esta prueba únicamente es orientadora para identificar la especie C. albicans.

- Siembra en agar corn-meal + 1 % de tween 80 : El microorganismo se sembró en estria larga, rasgando el agar, incubándose durante 24-48 horas a 28 °C, se observó el crecimiento en el microscopio en búsqueda de producción de pseudomicelio y clamidoconidios.

- Reducción de tetrazolio : En medio Pagano-Levin se inoculó el microorganismo, se incubó a 28 °C durante 24-48 horas, observándose las características macroscópicas de las colonias, tomando en cuenta que C. albicans no reduce las sales de tetrazolio lo que forma colonias de color blanco; otras especies generan tonos rosa o púrpura.

Aquellas cepas en las que se observó producción de clamidoconidios, formación de tubos germinativos y nula reducción de tetrazolio, se identificaron como C. albicans, al resto se le realizó zimograma.

- Zimograma : Cada una de las cepas se inoculó en medios de cultivo conteniendo diferente fuente de carbono, los carbohidratos empleados fueron : galactosa, glucosa, lactosa, maltosa, sacarosa, e incubó a 28 °C durante 48-72 horas, se detectó producción de acidez y gas.

Para el género Cryptosporidium:

- Tinción de cápsula : Se realizó un frotis del microorganismo secando al aire, se tiñó con fucsina fenicada durante un minuto, posteriormente se eliminó el exceso de colorante y se hizo

contraste con tinta china, se observó al microscopio.

- Sensibilidad a la temperatura : C. neoformans se diferenció de otras especies por su sensibilidad a la temperatura. Se inoculó el microorganismo en dos tubos con medio de agar Sabouraud, uno de ellos se incubó a 37 ° C y otro a 40-42 ° C; C. neoformans no desarrolla a 40-42 ° C pero sí a 37 ° C.

Las variedades y subtipos de C. neoformans se tipificaron por serología (en el servicio de Micología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM)

Para hongos filamentosos y patógenos primarios

- Se observaron las características macroscópicas de la colonias de cada una de las cepas.

- Se realizó un examen directo utilizando azul de lactofenol, con objeto de observar las características microscópicas.

Para actinomicetos

- Se observaron las características macroscópicas de las colonias de cada una de las cepas.

- Tinción de Gram : Se realizó tinción de Gram con objeto de observar las características microscópicas.

- Prueba de utilización de caseína, gelatina y xantina : A cada una de las cepas se realizó prueba de utilización de caseína, gelatina y xantina, ya que esas pruebas proporcionan la capacidad de diferenciar a las diversas especies.

Una vez tipificadas las cepas se procedió a realizar la valoración "in vitro" del saperconazol (R 66 905).

Debido a la elevada solubilidad y amplia difusión que le proporciona al fármaco, además que no afecta de ninguna manera el desarrollo de los microorganismos utilizados, se empleó cloroformo como solvente.

- Se prepararon diversas concentraciones del saperconazol (R 66 905) en cloroformo, que fueron las siguientes ($\mu\text{g/ml}$) : 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100, +100.

Los niveles séricos fluctúan aproximadamente entre 0.01 y 0.1 $\mu\text{g/ml}$, por esta razón las concentraciones del fármaco utilizadas fueron las antes mencionadas.

- Para la valoración se realizaron diversas siembras masivas en medios sólidos (en placa) de cada una de las cepas. Los microorganismos que regularmente forman colonias de consistencia cremosa se sembraron con hisopos de algodón estériles, y aquellos que son esporulados o forman colonias de consistencia dura, se inocularon previamente en medio líquido e incubaron hasta obtener una suspensión uniforme de esporas.

- Cada caja se inoculó con 0.8 ml de la suspensión de esporas, extendiéndose mediante movimiento circular hasta cubrir la superficie del medio.

- Se utilizaron los medios de cultivo que permitieron observar un desarrollo óptimo de cada microorganismo (tabla 5).

Tabla 5. Medios de cultivo empleados para cada microorganismo.

MICROORGANISMO	MEDIO DE CULTIVO
<u>Aspergillus</u> sp., <u>Penicillium</u> sp	PDA
<u>Candida</u> sp., <u>Cryptococcus</u> sp	Sabouraud o YM
<u>E. floccosum</u>	PZ
<u>E. werneckii</u>	Sabouraud o PDA
<u>F. pedrosoi</u> , <u>F. verrucosa</u>	PDA
<u>M. canis</u>	PZ+1 % peptona de caseína + almidón
<u>M. gypseum</u>	PZ+1 % peptona de caseína
<u>Nocardia</u> sp	Agar de esporulación
<u>T. rubrum</u> , <u>T. mentagrophytes</u>	PZ+1 % dextrosa
<u>T. tonsurans</u>	PDA+0.1 % peptona de caseína
<u>S. schenckii</u>	Agar Sabouraud.

PDA = Agar papa-dextrosa

YM = Agar levadura-malta

PZ = Agar papa-zanahoria

- Una vez realizadas las siembras masivas de empleó el método de sensi-discos de papel filtro de 0.6 cm. de diámetro, los cuales se impregnaron con cada concentración, incluyendo un disco control impregnado únicamente con cloroformo.

- Se colocaron sobre el agar, se refrigeró durante 30 minutos.

- A excepción de S. schenckii que se incubó a 37 ° C los demás microorganismos se incubaron a 28 ° C el tiempo necesario para observar su desarrollo.

- Concentración mínima inhibitoria (CMI) es el término empleado

Para expresar los resultados.

- Se consideró CMI a la mínima concentración de fármaco, en la cual se observó la formación de un halo de inhibición. Por consiguiente, todos los discos impregnados con soluciones cuya concentración es mayor a la CMI se observaron halos de inhibición.

- En los discos impregnados únicamente con el solvente (discos control) no se observó la formación de halos de inhibición.

6. RESULTADOS

De acuerdo a las pruebas de solubilidad realizadas, los resultados son los siguientes:

Tabla 6. Solubilidad del saperconazol (R 66 905) en diversos solventes

Agua (pH de 2 a 8)	Insoluble
Etanol	Insoluble
Acetona	Insoluble
Etilenglicol	Soluble
Ac. acético 1 N	Insoluble
Ac. clorhídrico 1 N	Soluble
Benzaldehído	Poco soluble
Agua-etanol 1:1	Insoluble
Agua-acetona 1:1	Insoluble
Etanol-acetona 1:1	Insoluble
Cloroformo	Soluble

A continuación se presentan los resultados que corresponden a la tipificación de cepas:

Tabla 7. Identificación de diversas especies de Candida

Microorganismo	Medio Biggy	Pseudo-micelio	Clamidoporas	Tubos germinativos	Reducción Tetrazolio
<u>C.albicans</u>	Colonias café	+	+	+	-
<u>C.tropicalis</u>	"	+	-	-	++
<u>C.parapsilosis</u>	"	+	-	-	+
<u>C.krusei</u>	"	+	-	-	+

Tabla 8. Zimograma

Microorganismo	Gal	Glu	Lac	Mal	Sac
<u>C.tropicalis</u>	+	+	-	+	+
<u>C.parapsilosis</u>	-	+	-	-	-
<u>C.krusei</u>	-	+	-	-	-

Tabla 9. Identificación de Criptococcus neoformans

Tinción de Cápsula	Sensibilidad a la temperatura	Serología
Se observaron levaduras con cápsula.	No desarrolló a 40-42oC Buen crecimiento a 37oC	Se identificó <u>C.neoformans</u> con las siguientes variedades y serotipos: -var. <u>neoformans</u> -var. <u>gatti</u> -serotipo D

Tabla 10. Tipificación de hongos filamentosos y patógenos primarios.

HONGOS FILAMENTOSOS Y PATOGENOS PRIMARIOS

Aspergillus flavus

Macroscopia: Colonia diseminada, aspecto vellosa-pulverulento color amarillo o amarillo-verde.

Microscopia: Micelio macrosifonado, septado, reproducción: microconidios, vesícula redonda y una serie de esterigmas.

Aspergillus niger

Macroscopia: Colonia diseminada, de color negro, aspecto pulverulento.

Microscopia: Micelio macrosifonado, septado, reproducción: microconidios, vesícula esférica, esporulación en toda la superficie, doble serie de esterigmas.

Aspergillus terreus

Macroscopia: Colonias de color beige, diseminada, aspecto vellosa-pulverulento.

Microscopia: Micelio macrosifonado, septado, reproducción: microconidios, vesícula redonda, y una serie de esterigmas.

Geotrichum candidum

Macroscopia: Colonia diseminada, aspecto vellosa, plano, de color blanco-amarillento.

Microscopia: Micelio macrosifonado, septado, reproducción: artroconidios.

Penicillium sp

Macroscopia: Colonias habitualmente verdes o verde-azul, diseminada, aterciopelada a pulverulenta, a menudo forma pliegues radiales.

Microscopia: Micelio macrosifonado, septado, reproducción: microconidios, ramificación de los conidióforos en forma de mano y esterigmas.

Epidermophyton floccosum

Macroscopia: Colonia de aspecto veloso, de color amarillo-verde de limón, el pigmento difunde al reverso de la colonia.

Microscopia: Micelio macrosifonado, septado, no se observan microconidios, presenta macroconidios grandes, suelen agruparse de 2 ó 3.

Microporum sabii

Macroscopia: Colonia ilimitada, vellosa, blanca, presenta pigmento color amarillo-naranja en la periferia, también se observa el pigmento al reverso de la colonia.

Microscopia: Micelio macrosifonado, septado, presenta pocos microconidios, abundantes macroconidios con más de 6 septos, modalidad: raquetas.

Microporum myrae

Macroscopia: Colonia polvosa, de color beige, aspecto térreo.

Microscopia: Micelio macrosifonado, septado, pocos microconidios, presenta macroconidios de menos de 6 septos.

Trichosporum concentricum

Macroscopia: Colonia vellosa o pulverulenta, blanca, ilimitada puede desarrollar pigmento rojo.

Microscopia: Micelio macrosifonado, septado, abundantes microconidios redondos, también microconidios alternos, escasos macroconidios en forma de puro, modalidad: zarcillos y espirales.

Trichosporum rubrum

Macroscopia: Colonia vellosa o pulverulenta, blanca, ilimitada micelio un poco más esponjoso.

Microscopia: Micelio macrosifonado, septado, presenta microconidios alternas, pocos macroconidios en forma de puro.

Trichobryten longicane

Macroscopia: Colonia limitada, cerosa, de aspecto cerebriforme de color beige.

Microscopia: Micelio macrosifonado, septado, presenta abundantes microconidios en forma de cruz de Lorena, pocos macroconidios en forma de puro, modalidad : clamidoconidios.

Exophiala wernneckii

Macroscopia: Colonia limitada, al inicio (4-5 días) produce colonias cremosas, negras, posteriormente se forman de aspecto vellosa, color negro, hongo dematiáceo.

Microscopia: Micelio macrosifonado, septado, reproducción : en las colonias jóvenes presenta formas levaduriformes (blastoconidios largos), posteriormente presenta micelio macrosifonado, tabicado, se reproducen en forma de hormodendrum.

Fonsecaea pedrosai

Macroscopia: Colonia limitada, color negro, aspecto aterciopelado, hongo dematiáceo.

Microscopia: Micelio macrosifonado, septado, reproducción: hormodendrum principalmente (presenta además escasas acotecas y fiálides).

Phialophora verrucosa

Macroscopia: Colonia de color negro, aspecto aterciopelado, limitada, hongo dematiáceo.

Microscopia: Micelio macrosifonado, septado, reproducción: fiálides.

Sporothrix schenckii

Macroscopia: Colonia limitada, color blanca, aspecto membranoso adherido al medio.

Microscopia: Hongo dimórfico, incubándose a 37°C se observan levaduras y a 28°C, se observa micelio macrosifonado, septado, microconidios dispuestos en flor de margarita, otros que nacen

directamente del micelio.
Tabla 11. Identificación de actinomicetos.

ACTINOMICETOS

Macroscopía:

Nocardia asteroides

Colonia acuminada, limitada, consistencia dura, color naranja.

Nocardia brasiliensis

Colonia limitada, no muy elevada, blanca, asemeja "palomitas de maíz".

Nocardia caviae(otitis-caviarum)

Colonia limitada, blanca, consistencia yesosa y dura.

Microscopía:

En todos los casos se observó micelio microsifonado, el cual se fragmenta en estructuras bacilares y cocoides.

Tabla 12. PRUEBAS DE UTILIZACION

	Caseína	Gelatina	Xantina
<u>N. asteroides</u>	-	-	-
<u>N. brasiliensis</u>	+	+	-
<u>N. caviae(otitis-caviarum)</u>	-	-	+

Los resultados de la valoración "in vitro" de acuerdo a las pruebas realizadas, se resumen en la tabla y gráfica siguiente:

Tabla 11. Identificación de actinomicetos.

ACTINOMICETOS

Macroscopía:

Nocardia asteroides

Colonia acuminada, limitada, consistencia dura, color naranja.

Nocardia brasiliensis

Colonia limitada, no muy elevada, blanca, asemeja "palomitas de maíz".

Nocardia caviae (otitis-caviarum)

Colonia limitada, blanca, consistencia yesosa y dura.

Microscopía:

En todos los casos se observó micelio microsifonado, el cual se fragmenta en estructuras bacilares y cocoides.

Tabla 12. PRUEBAS DE UTILIZACION

	Caseína	Gelatina	Xantina
<u>N. asteroides</u>	-	-	-
<u>N. brasiliensis</u>	+	+	-
<u>N. caviae (otitis-caviarum)</u>	-	-	+

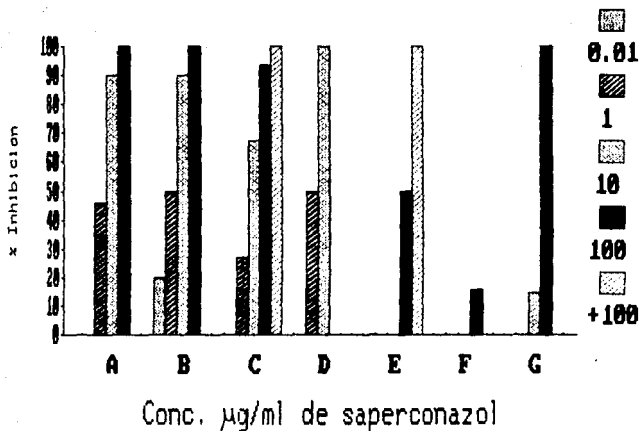
Los resultados de la valoración "in vitro" de acuerdo a las pruebas realizadas, se resumen en la tabla y gráfica siguiente:

Tabla 13. Sensibilidad de diversas cepas al saperconazol (R 66 905)

MICROORGANISMO	# CEPAS	No. DE CEPAS SENSIBLES A LA CONC.					
		($\mu\text{g/ml}$) (CMI)					
		0.001	0.01	0.1	1	10	100 +100
Hongos levaduriformes							
<u>C.albicans</u>	40				20	19	1
<u>C.krusei</u>	3				2		1
<u>C.parapsilosis</u>	3					2	1
<u>Cr. neoformans</u>	1			1			
<u>Cr. neoformans</u> <u>var. neoformans</u>	1			1			
<u>Cr. neoformans</u> <u>serotipo D</u>	2					2	
<u>Cr. neoformans</u> <u>var. gatti</u>	6				3	2	1
Hongos filamentosos							
<u>A. flavus</u>	9					2	7
<u>A. niger</u>	1						1
<u>A. terreus</u>	1						1
<u>G. candidum</u>	1						1
<u>Penicillium sp</u>	1						1
Patógenos primarios							
<u>E. floccosum</u>	1				1		
<u>M. canis</u>	3				1	1	1
<u>M. gypseum</u>	2					2	
<u>I. mentagrophytes</u>	3				1	1	1
<u>I. rubrum</u>	3				1	1	1
<u>I. tonsurans</u>	3					1	2

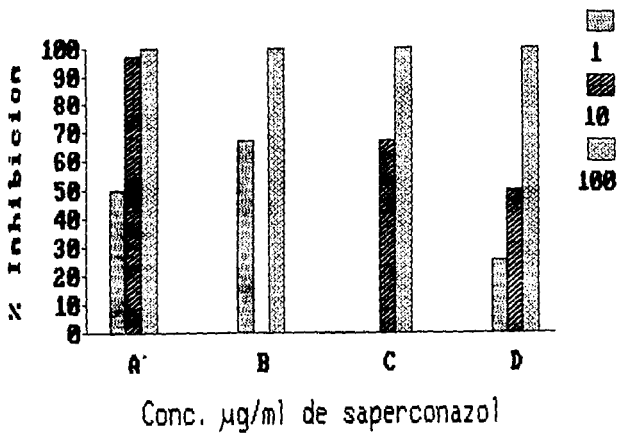
MICROORGANISMO	# CEPAS	No. DE CEPAS SENSIBLES A LA CONC.						
		(μ E/ml) (CMI)						
		0.001	0.01	0.1	1	10	100	+100
<u>E.werneckii</u>	1					1		
<u>F.pedrosoi</u>	2			2				
<u>P.verrucosa</u>	1					1		
<u>S.schenckii</u>	2						1	1
Actinomicetos								
<u>N.asteroides</u>	2							-
<u>N.brasiliensis</u>	3						1	-
<u>N.cavise(otitis-caviarum)</u>	1							-

Fig. 4. Relación entre la concentración de saperconazol (R 66 905) y el porcentaje acumulativo de diferentes microorganismos.



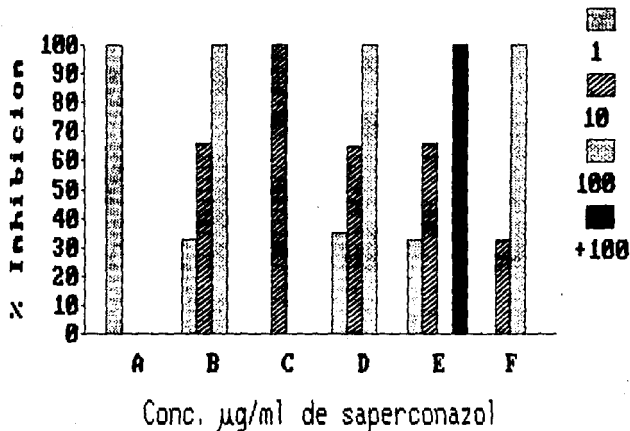
A=Candida sp.
 B=Cryptococcus neoformans
 C=Dermatofitos
 D=Hongos dematiáceos
 E=Sporothrix schenckii
 F=Actinomicetos
 G=Hongos filamentosos

Fig. 5. Porcentaje acumulativo de Candida spp. inhibidas.



A=*Candida albicans*
B=*Candida krusei*
C=*Candida parapsilosis*
D=*Candida tropicalis*

Fig. 6. Porcentaje acumulativo de cepas de dermatofitos inhibidas.



A=*Epidermophyton floccosum*
 B=*Microsporium canis*
 C=*Microsporium gypseum*
 D=*Trichophyton mentagrophytes*
 E=*Trichophyton rubrum*
 F=*Trichophyton tonsurans*

DISCUSION

El saperconazol (R 66 905) es un compuesto netamente lipofilico, lo cual fue comprobado al realizar las pruebas de solubilidad. De acuerdo a dichas pruebas el cloroformo resultó ser el solvente más efectivo. El dimetilsulfoxido (DMS) ha sido reportado como un solvente eficaz (1), el cual solubiliza en su totalidad al fármaco. El cloroformo, en comparación con el DMS, además de solubilizar al saperconazol (R 66 905) completamente, presenta otras ventajas como : su accesibilidad y bajo precio, además, no interfiere en la valoración "in vitro" del fármaco.

Existen diversas técnicas para realizar la valoración "in vitro" de un fármaco. Utilizar cloroformo como solvente es un punto clave para decidir la técnica a emplear en la valoración del fármaco. Inicialmente se intentó la técnica de dilución en tubo tratando de incorporar el fármaco al medio de cultivo, pero el solvente empleado no es miscible en el medio, por consiguiente, en la técnica de dilución en tubo no se obtiene una distribución uniforme del fármaco en el medio y su concentración se desconoce; por otra parte, en esta técnica no se tiene un control en la cantidad de inóculo debido al tipo de crecimiento que presentan los hongos (hifas y esporas). En base a esto resulta muy subjetivo observar los resultados en tubo por simple apreciación visual, asimismo el problema persiste si se utiliza el espectrofotómetro.

En la técnica de sensi-discos se observó que el cloroformo presenta una difusión excelente, en esta técnica no se tiene un control en la cantidad de inóculo, sin embargo, los resultados

son muy evidentes mediante observación de la formación de halos de inhibición. La presencia de un disco control impregnado únicamente con el solvente proporciona mayor confiabilidad a los resultados, descartando la posibilidad de que el microorganismo sea no sensible al fármaco sino al solvente.

Es importante utilizar medios de cultivo óptimos para el desarrollo de cada microorganismo, de lo contrario por el escaso crecimiento no es posible observar la formación de halos de inhibición, o bien, los halos de inhibición parecen ser de mayor tamaño. El empleo de medios de cultivo óptimos incrementa la confiabilidad de los resultados.

Se determinó que las diversas especies de dermatofitos y Candida sp. son las más sensibles al saperconazol (R 66 905), a una CMI entre 1-10 $\mu\text{g/ml}$, aunque se presentan algunas excepciones, tal es el caso de una cepa de T. rubrum, la cual es sensible a una concentración muy alta (+ 100 $\mu\text{g/ml}$), se sabe que este es un microorganismo que desarrolla resistencia a diversos compuestos antifúngicos (5); otra excepción son algunas especies de Candida sp., las cuales presentan una CMI de 100 $\mu\text{g/ml}$.

Algunas cepas de Cr. neoformans son sumamente sensibles al saperconazol (R 66 905) (0.01 $\mu\text{g/ml}$). Es importante investigar si el fármaco atraviesa la barrera meníngea alcanzando los niveles adecuados, de lo contrario el saperconazol (R 66 905) no es útil en el tratamiento de criptococosis meníngea, que es la variedad más frecuente (45 %). Se espera que el saperconazol (R 66 905) sea efectivo en el tratamiento de criptococosis meníngea, debido a que en la estructura química del fármaco se

encuentran radicales fluor, los que le proporcionan mayor penetración; esto es comparable con el fluconazol (triazol sistémico).

La CMI (100 $\mu\text{g/ml}$) determinada en este estudio para las diversas especies de Aspergillus, Geotrichum y Penicillium es mayor a la esperada.

Por lo que respecta a hongos dematiáceos se trabajaron sólo tres cepas productoras de cromomicosis, determinando la CMI de 1 $\mu\text{g/ml}$ para F. pedrosoi.

F. pedrosoi es un microorganismo sumamente resistente, es conveniente valorar "in vitro" el fármaco con mayor número de cepas, para hacer el estudio más representativo, o bien valorar en pacientes con cromomicosis.

E. werneckii y S. schenckii son microorganismos que se incluyeron en este estudio, a pesar de que el uso del saperconazol (R 66 905) en el tratamiento de tiña negra y esporotricosis no resulta adecuado. En el primer caso, la enfermedad es tratada con antimicóticos tópicos, sin necesidad de recurrir a uno sistémico. En el segundo caso, el tratamiento de elección es el KI, que es barato, de fácil administración y en la mayoría de los casos efectivo.

Los actinomicetos son resistentes al saperconazol (R 66 905), esto se debe a que su membrana celular es constitucionalmente diferente a la de los hongos, por lo tanto el producto no puede interrumpir su formación.

El saperconazol (R 66 905) aumenta la suceptibilidad del microorganismo al sistema inmune del huesped, en realidad la

acción conjunta del fármaco y sistema inmune provocan la destrucción íntegra del hongo; si el paciente se encuentra inmunodeprimido, dicha acción conjunta no se lleva a cabo, por lo tanto queda en duda la efectividad del tratamiento en este tipo de condiciones.

Finalmente no es posible afirmar el hecho de que el saperconazol (R 66 905) haya mostrado un amplio espectro "in vitro" suceda lo mismo "in vivo"; por ejemplo la diamino difenil sulfona cuya acción "in vivo" es muy efectiva, "in vitro" carece de efectividad, por esta razón es imprescindible concluir todas las fases de estudio del saperconazol (R 66 905).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CONCLUSION

- La solubilidad y difusión del saperconazol (R 66 905) depende del solvente utilizado, determinando que el cloroformo es el más efectivo.
- Las diversas especies de Candida y dermatofitos son los más sensibles al saperconazol (R 66 905), a una concentración de 1-10 $\mu\text{g/ml}$.
- Los actinomicetos no son sensibles al sapeconazol (R 66 905).
- El saperconazol (R 66 905) es un antifúngico de amplio espectro, activo en contra de hongos patógenos y oportunistas más frecuentes de nuestro medio.

BIBLIOGRAFIA

- 1) R (66 905) Saperconazol. Basic Medical Information Brochure.
2a ed. Beerse, Belgium: Janssen Pharmaceutica, September 1988.
- 2) Akhtar M., et al.. (1969). The intermediary role of a steroid
8,14-dien-3 -ol system in ergosterol biosynthesis. Biochem J
:115:135-137.
- 3) Akhtar M., et al.. (1967). The transfer of hydrogen from C-24 to
C-25 in ergosterol biosynthesis. Biochem J: 103 : 616-622
- 4) Bastide M., et al.. (1982). A comparison of the effects of several
antifungal imidazole derivatives and polyenes of Candida
albicans: an ultrastructural study by scanning electron
microscopy. J Microbiol: 28 : 1119-1126
- 5) Bonifaz A. (1990). Micología médica básica. ed. Méndez-Cervantes,
México, D.F.
- 6) Brian C.B. (1983). Fungicidal inhibitors of ergosterol
biosynthesis. Biochem Soc Trans : 11 : 659-663.
- 7) Borgers M., et al.. (1983). The mechanism of action of the new
antimycotic Ketoconazole. Am J Med : 74 : 2-8.
- 8) Borgers M., et al.. (1987). Degenerative changes in fungi after
Itraconazole treatment. Rev Infect Dis : 9 : S33-S42.
- 9) Cauwenbergh G., et al.. (1987). Itraconazole in the treatment of
human mycoses : Review of three years of clinical experience. :

Rev Infect Dis : 9 : S146-S152.

- 10) DeBrabander M., et al. (1980). The activity of Ketoconazole in mixed cultures of leukocytes and Candida albicans. Sabouraudia : 18 : 197-210.
- 11) De Nollin S., et al. (1975). Scanning electron microscopy of Candida albicans after in vitro treatment with Miconazole. : Antimicrob Agents Chemother : 7 : 704-711.
- 12) Dismukes W.E. (1988). Azole antifungal drugs: old and new. Ann Inter Med. : 109 : 177-179.
- 13) Espinel I.A. et al. (1984). In vitro studies with R 51 211 (Itraconazole). Antimicrob Agents Chemother : 26 : 5-9.
- 14) Gibbons G.F. et al. (1979). Studies on the mechanisms of lanosterol 14 -demethylation. Biochem J : 183 : 309-315.
- 15) Ganer A. et al. (1987). Initial experience in therapy for progressive mycoses with Itraconazole, the first clinically studied triazole. Rev Infect Dis : 9 : S77-S86.
- 16) Johnson E. M., et al. (1984). In-vitro resistance to imidazole antifungals in Candida albicans. J. Chemother : 13 : 547-558
- 17) Koneman R. (1987). Micología. Practica de laboratorio. ed: Médica Panamericana. Buenos Aires.
- 18) Marriott M.S. (1980). Inhibition of biosynthesis in Candida albicans by imidazole-containing antifungals. J Gen Microbiol : 117 : 253-255.
- 19) Mercer E.I. (1983). Inhibition of sterol 14 -demethylase enzymes.

Biochem Soc Trans : 11 : 663-665.

- 20) Odds F.C.(1980).Laboratory evaluation of antifungal - agents:a comparative study of five imidazole derivatives of - clinical importance.J Antimicrob Chemother : 6 : 749-761.
- 21) Odds F.C.,et al.(1984).Antifungal relative inhibition factors: BAY 1-9139, bifonazole, butoconazole, isoconazole, itraconazole (R 51 211), oxiconazole, Ro 14-4767/002, sulconazole, terconazole and vibunazole (BAY n-7133) compared in vitro with nine established antifungal agents. J Antimicrob Chemother : 14 : 105-114.
- 22) Pinto W.J., et al . (1985).Inhibition of sterol biosynthesis by ergosterol and cholesterol in Saccharomyces cerevisiae. Biochim Biophys Acta : 836 : 89-95
- 23) Saag M.S., et al .(1988). Azole antifungal agents: emphasis on new triazoles. Antimicrob Agenst Chemother :32 :1-8.
- 24) Segretain G.,et al .(1966).Diagnóstico de laboratorio en Micología Médica.Ed. La prensa médica mexicana. Francia.
- 25) Sekiya T., et al .(1983).Reorganization of membrane ergosterol during cell fission events of Candida albicans : a freeze-fracture study of distribution of filipin-ergosterol complexes. J Ultrastruct Res : 83 : 48-57.
- 26) Smith K.J., et al .(1986).Azole resistance in Candida albicans. J Med Vet Mycol : 24 : 133-144.
- 27) Sud I.J., et al .(1981).Heterogeneity of action mechanisms among antimycotic imidazoles. Antimicrob Agents Chemother : 20 : 71-74.

- 28) Swamy K., et al .(1974).Studies on the mechanisms of action of Miconazole:effects of Miconazole on respiration and cell permeability of Candida albicans.Antimicrob Agents Chem : 5 : 420-425.
- 29) Takashi S.,et al .(1983).Reorganization of membrane ergosterol during cell fission events of Candida albicans :A freeze-fracture study of distribution of filipin-ergosterol complexes.: J ultrast. research : 83 : 48-57.
- 30) Tavares I., et al .(1977).4,4'-dimethylcholesta-7,9,14-trienol is an intermediate in the demethylation of dihydroergosterol. Biochem J : 166 : 17-20.
- 31) Van den Bossche H.,et al .(1983).Hypothesis on the molecular basis of the antifungal activity of N-substituted imidazole_ and triazoles. Biochem Soc Trans : 11 : 665-667.
- 32) Van den Bossche H., et al .(1978).Biochemical effects of Miconazole on fungi. II. Inhibition of ergosterol biosynthesis in Candida albicans. Chem Biol Interactions : 21 : 59-78.
- 33) Van den Bossche H., et al .(1980).In vitro and in vivo effects of the antimycotic drug Ketoconazol on sterol synthesis. Antimicrob Agents Chemother : 17 : 922-928.
- 34) Yoshida Y.,et al .(1987).Interaction of azole antifungal agents with cytochrome P-450 ^{14 DM} purified from Saccharomyces cerevisiae microsomes. Biochem Pharmacol : 36 : 229-235.