

52
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD in vitro DEL
TERBINAFINE FRENTE A 100 CEPAS DE
Candida sp

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

CLAUDIA MARIA GARIBAY MARTINEZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN





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

	Página
Introducción.	1
Objetivos	2
Antecedentes.	3
1. Terbinafine.	3
1.1. Características físicas	3
1.2. Características químicas.	4
1.3. Mecanismo de acción	4
1.4. Farmacocinetica	8
1.4.1. Absorción.	8
1.4.2. Distribución	9
1.4.3. Biotransformación.	9
1.5. Estudios <u>in vitro</u>	11
1.6. Estudios <u>in vivo</u>	12
1.7. Estudios de embriotoxicidad y teratogenicidad	13
1.8. Evaluación terapéutica en humanos	14
1.9. Efectos colaterales	14
2. Tipificación del género <u>Candida</u>	15
2.1. Pruebas biológicas.	15
2.1.1. Filamentación en suero	16
2.1.2. Producción de pseudomicelio y clausidocnidios.	17
2.2. Pruebas fisiológicas.	18
2.2.1. Pruebas bioquímicas.	18
2.2.2. Reducción de sales de tetrazolio	19
Material (orden alfabético)	20
1. Equipo	21

2. Reactivos y colorantes.	21
3. Medios de cultivo	22
4. Fármacos.	22
Metodología.	23
1. Tipificación de cepas	23
1.1. Filamentación en suero	24
1.2. Formación de pseudomicelio y cleidoconidios	24
1.3. Zimograma.	24
1.4. Reducción de sales de tretazolio	25
2. Valoración del fármaco.	27
2.1. Estudio <u>in vitro</u>	27
2.2. Estudio <u>in vivo</u>	28
2.2.1. Selección de pacientes.	28
2.2.2. Indicaciones.	29
2.2.3. Evaluación.	29
2.2.4. Valoración del tratamiento.	30
Resultados	31
1. Tipificación de cepas	31
2. Valoración del fármaco.	40
2.1. Valoración del fármaco <u>in vitro</u>	40
2.2. Valoración del fármaco <u>in vivo</u>	42
Conclusiones	48
Discusión.	49
Bibliografía	50

INTRODUCCION

Las dermatomicosis superficiales son altamente frecuentes en México, por lo tanto, el diseño de nuevos antimicóticos tiene gran interés por la frecuencia con que los microorganismos adquieren resistencia; por los efectos colaterales y la escasa absorción sistémica o cutánea que los fármacos presentan. Es por ésto que cada vez que se desarrolla un antimicótico es de gran importancia su estudio de espectro in vitro, su actividad in vivo y los efectos colaterales que ocasionen.

En el presente estudio se utilizará el terbinafine, antifúngico nuevo, con una estructura química diferente, clasificada dentro del grupo de las alilaminas, con la propiedad de ser un antimicótico que se puede utilizar por vía sistémica, y que tiene buena acción frente a los dermatofitos, la casa farmacéutica creadora del producto (Sandoz), indica que también puede ser utilizado para la candidosis. Nuestro estudio se enfoca en estas enfermedades cada vez más frecuentes en nuestro medio, y que se pueden presentar prácticamente a todos los niveles de la economía humana, dependiendo de los factores predisponentes a los que se asocian.

Con este estudio se pretende investigar la acción del terbinafine, — frente a distintas cepas de Candida aisladas de casos patológicos y administrar el medicamento en un estudio piloto en 10 casos de candidosis cutánea y de las mucosas.

Con la correlación obtenida de los datos in vitro e in vivo se intenta tener una idea más amplia del efecto que tiene el terbinafine sobre las candidosis, para tratar de concluir si el principio activo se puede utilizar como de amplio espectro.

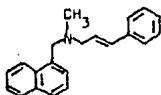
OBJETIVOS

- Tipificar 150 cepas de Candida so aisladas de casos patológicos.
- Valorar la actividad del terbinafine in vitro frente a 150 cepas de Candida aisladas y tipificadas.
- Valorar la actividad del terbinafine in vivo en pacientes con can
didosis cutánea y de mucosas.
- Incorporar las cepas aisladas de los pacientes con candidosis al estudio de sensibilidad in vitro.
- Valorar los probables efectos secundarios que presente el terbi-
nafine en el estudio in vivo.

ANTECEDENTES

1. Terbinafine :

Constantes e intensas investigaciones hicieron posible la síntesis de un nuevo grupo de agentes antifúngicos, las alilaminas, las cuales actúan como inhibidores de la biosíntesis del ergosterol; su primer representante es el naftifine en una presentación tópica, y su fórmula es la siguiente:



El naftifine sirvió como base para dar lugar a muchas otras fórmulas, de entre las cuales fue seleccionado el terbinafine como antimicótico de este nuevo grupo para ser utilizado por vía sistémica, debido a su efectividad, buena absorción y pocos efectos colaterales. (23,24,25)

1.1. Características físicas :

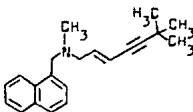
-Descripción:	Polvo blanco
-Peso Molecular:	327.5
-Punto de fusión:	206 - 8°C
-Solubilidad:	En agua 0.5 - 1.0 % a temperatura ambiente (18 - 26°C)
-Formas de presentación:	Cápsulas (de gelatina) 125mg en empaque "blisterpack".

1.2. Características químicas :

-Nomenclatura: (E)-N-(6,6 dimethyl-2 hepten-4-ynyl)-N-methyl-1-naphthalene-methanamine-hydrochloride.

-Fórmula condensada: $C_{21} H_{25} N \cdot HCl$

-Fórmula estructural:



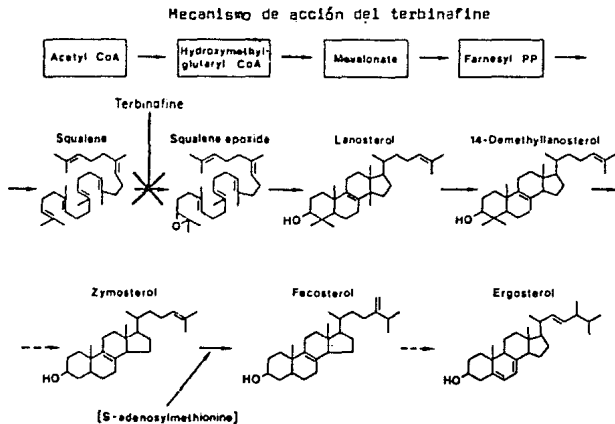
-Nombre comercial: Lamisil

1.3. Mecanismo de acción :

El terbinafine es miembro de una clase de antimicóticos de reciente aparición, las alleminas (cuya fórmula se presenta en seguida) $H_2N-CH_2-CH=CH_2$. Estos productos son señalados como inhibidores de la biosíntesis del ergosterol. Este compuesto es uno de los principales componentes de la membrana celular fúngica, por lo tanto si se interpone su vía metabólica, deja como consecuencia membranas basales defectuosas, que -- conducen finalmente a la muerte del hongo.

Evidencias experimentales indican que la inhibición específica es a nivel de la enzima escualeno-epoxidasa, siendo éste el mecanismo primario de acción del terbinafine.

La escualeno-epoxidasa es una enzima microsomal que cataliza la conversión de escualeno en 2,3-oxidoscualeno, la que es ciclizada por una enzima subsecuente para formar lanosterol producto antecesor del ergosterol. (2,5,6,23)



Tomado de referencia (6)

El mecanismo molecular de la inhibición es aún incierto, se cree que el compuesto interactúa alostéricamente con un sitio de unión a lípidos sobre la enzima. (6)

La biosíntesis del ergosterol fue medida por la incorporación de-

de acetato radiomarcado en células fúngicas completas, y por la integración de mevalonato radiomarcado y otros sustratos en células libres de extractos. La escueleno-epoxidasa ha sido ensayada en preparaciones microsomales de C.albicans en hígado de rata. Para demostrar la inhibición selectiva de la enzima, ésta fue caracterizada de C.albicans y probada con terbinafine, encontrándose que la droga es un potente inhibidor no competitivo en C.albicans y C.parapsilosis; se observó también que no hay efectos significativos en otra enzima que intervenga en la formación del ergosterol; la epoxidasa en hígado de rata es virtualmente inactiva en la ausencia de la fracción S200 (que funciona como cofactor citoplásmico) a diferencia de los estudios realizados con enzimas de Candida.⁽⁴⁾

Respecto a los estudios morfológicos, la bibliografía reporta⁽⁷⁾ que C.albicans fue examinada en tres distintas formas, como levadura, pseudomicelio y pseudomicelio preformado; se observaron los efectos del terbinafine sobre la biosíntesis del esteroles, sugiriéndose que el efecto sobre el contenido de ergosterol, es de mucho más importancia que el incremento de los precursores del esteroles que determinan la forma celular.

La determinación de quimioluminiscencia (QL) con luminol realizado, fue usada para examinar los efectos del terbinafine a concentraciones altas y niveles terapéuticamente bajos, y así demostrar la QL en células esplénicas de ratón.

La reducción en la respuesta a la QL de células fagocíticas, pue

de indicar una inhibición de la respuesta inmune celular, en cambio un incremento en la respuesta a la QL puede indicar un realce o mejora de la capacidad inmune de dichas células.

Los cambios en la respuesta a la QL fueron evaluados en término de pico de intensidad, tiempo para la máxima intensidad y área bajo el tiempo-intensidad, la curva fue comparada con diluyentes apropiados control. (8)

El terbinafine no tuvo efectos sobre el pico de intensidad, causó un descenso significativo en el tiempo de éste en la respuesta a niveles superiores de 5mg/l, lo que puede ser indicativo de un mejoramiento o realce en la capacidad inmune de las células esplénicas del ratón, sin embargo, se señala que la significancia clínica de esta observación falta ser determinada. (8)

Se valoró la inhibición de la biosíntesis de ergosterol con tio-carbamatos (tolnaftato y tolclisto) y alilaminas (naftifine y terbinafine) en C. albicans y células hepáticas libres de rata. En C. albicans se observó inhibición de la escueleno-epoxidasa microsomal, sin que hubiera alguna otra afección en la biosíntesis del ergosterol; por otra parte en las células libres hepáticas de rata, la biosíntesis del colesterol fue menos sensible a la droga. (10)

Otros estudios bioquímicos realizados en células rotas y comple-

tas de C.albicans, demostraron que el tolnaftato inhibió la síntesis de esterol en las células fragmentadas, mientras que en las completas fue - muchos menos potente. Estos resultados sugieren que hay una barrera para penetración en estas levaduras. (13)

1.4. Farmacocinética :

En los estudios realizados con terbinafine se han incorporado drogas radio-marcadas y no radio-marcadas para observar la caracterización, - su estructura, su cuantificación así como sus metabolitos en los fluidos orgánicos. Se han investigado en cobayos, ratones, ratas, conejos, pe- rros y en el hombre. (12,14)

1.4.1. Absorción :

En todas las especies en las que fue probado el terbinafine la -- absorción ha sido buena. Las cifras porcentuales después de la adminia- tración oral fueron las siguientes:

<u>Especie</u>	<u>Porcentaje (%)</u>
Ratas	+ 60
Ratones	+ 85
Perros	+ 46

En el hombre se midió el grado de absorción después de una dosis- oral de 250mg y ésta fue de \pm 70 %, la concentración máxima en plasma --

fue alcanzada 2 horas después de la administración oral. (12,14)

1.4.2. Distribución :

La distribución del terbinafine ha sido ampliamente estudiada en ratas, usando droga radiomarcada (14C) por vía intravenosa, encontrándose se las más altas concentraciones de radioactividad en hígado y páncreas.

La radioactividad declinó rápidamente en todos los tejidos, con sólo huellas de actividad en órganos medidos 24 horas después de su administración, aunque en tejidos grasos la disminución fue más lenta, lo que refleja una alta lipofilia en la droga. (15)

La presencia de terbinafine en sangre y proteínas plasmáticas ha sido estudiada en muestras de voluntarios sanos, encontrándose que se une fuertemente a las proteínas séricas, dicha unión no es específica, ya que están igualmente distribuidas entre las fracciones del plasma incluyendo albúmina, lipoproteínas de alta, baja y muy baja densidad. Sólo -- una fracción menor de la droga total presente es absorbida por las células sanguíneas, calculándose un 80 % aproximadamente. (15)

1.4.3. Biotransformación :

Se ha comprobado que el terbinafine es ampliamente metabolizado, tanto en el hombre como en animales, y se han identificado 15 metabolitos. (15)

En general la biotransformación de la droga se debe a una oxidación en los siguientes pasos:

- 1.- N - demetilación del átomo central de nitrógeno;
- 2.- Oxidación del lado alquil de la cadena (oxidación de cualquiera de los tres grupos metilo); y
- 3.- Una formación de óxido-arena seguida de hidrólisis por la epóxido-hidrolasa que llevan al correspondiente dihidrol.

Los productos iniciales de la biotransformación son oxidados por los correspondientes ácidos carboxílicos o conjugados, y excretados por orina. (15)

La farmacocinética del terbinafine en el hombre ha sido observada en voluntarios sanos, usando drogas radiomarcadas; y después de una serie de estudios se estima que:

La vida-media absorbida del terbinafine es de 0.8-1.5 horas; y la eliminación es de aproximadamente 22 horas.

Es importante señalar que se ha observado una fase adicional de eliminación, de aproximadamente 90 horas al administrar la droga radiomarcada (14C). (17)

Se ha observado que la eliminación del terbinafine en el hombre es lenta, esto se debe probablemente a la fuerte lipofilia de la droga, que resulta al distribuirse en piel y tejido adiposo, desde los cuales es liberado lentamente al torrente sanguíneo. (17)

En pacientes con trastornos hepáticos se encontró que el tiempo, concentración y absorción media fue idéntica a la de voluntarios sanos; sin embargo, la eliminación fue 30 % más lenta en pacientes con disfunción hepática debido al decremento de la biotransformación. (6)

La actividad biológica del terbinafine se valoró en pacientes con insuficiencia renal, encontrándose que la absorción y distribución fue muy similar a las observadas en voluntarios sanos; aunque su eliminación fue más lenta, esto podría explicarse por un cambio en el metabolismo de la droga en pacientes con alteración en la función renal y/o un decremento en la función hepática secundaria a la enfermedad renal. (19)

1.5. Estudios in vitro :

La bibliografía reporta (9) que se han utilizado distintos medios para conocer la susceptibilidad del terbinafine, como: Sabouraud agar, extracto de malta-agar, y Kinning agar; aunque Petronyi et.al (11) encontraron que en agar Sabouraud aparecen grandes zonas de inhibición para el terbinafine en comparación con los medios antes mencionados.

En algunos estudios se demostró pocas diferencias usando medios líquidos o sólidos; sin embargo Shadomy et.al (12) reportaron que la concentración mínima inhibitoria obtenida de diluciones de caldo fue de 4 a 10 veces más baja que la obtenida de diluciones de agar.

Se menciona también que el tamaño del inóculo parece no afectar la actividad in vitro del terbinafine, esto por lo menos en lo que a --

dermatofitos se refiere. (11)

Por otro lado se observó que el pH del medio es un factor que afecta la actividad in vitro del terbinafine, la cual aumenta con un pH--básico. (11)

En muchos de los estudios realizados el terbinafine probó ser altamente efectivo contra los dermatofitos; así como también ejerció buena actividad contra los hongos que causan infecciones subcutáneas como Fonsecaea sp., Phialophora sp y Madurella sp. El tipo de acción contra hongos levaduriformes fue dependiente, ya que Cryptococcus neoformans y Malessezia furfur fueron sensibles in vitro al terbinafine; en cambio para el género Candida el terbinafine mostró ser efectivo contra C.parapsilosis pero inactivo contra C.albicans. (9, 11, 12)

1.6. Estudios in vivo :

En infecciones por C.albicans se usaron cobayos como modelo de infección, con inóculo de 0.1 ml conteniendo 3×10^7 células de dicha levadura, las cuales fueron esparcidas en un área de 4 cm de diámetro (rasurada en espalda) se mantuvo ocluida la zona por 3 días hasta el inicio del tratamiento con terbinafine cada 12 horas durante 5 días, se demostró --eficacia antifúngica dependiente de la concentración (>1 %); a causa de que es básicamente fungistático contra C.albicans hubo que usar altas --concentraciones para curar la infección.

En dermatofitosis por T. mentagrophytes previamente inducidas en cobayos, se inició el tratamiento 48 horas después de la inoculación; -- observándose el rápido inicio de la eficacia fungicida in vivo del terbinafine. (19,23,26)

El terbinafine demostró gran efectividad in vivo contra dermatofitos con una rápida respuesta terapéutica y regresión de la inflamación, -- sin embargo, para levaduras es dependiente de la especie y ameritó aumento de la dosis (concentración) para controlar infecciones. (16,26)

1.7. Estudios de embriotoxicidad y teratogenicidad :

Los estudios de embriotoxicidad fueron realizados en ratas y conejos a dosis de 30, 100 y 300 mg/kg por vía oral, observando que el terbinafine no causó efectos embriofetales o teratogénos. (20)

Un estudio in vitro sobre la teratogenicidad del producto se practicó en embriones de ratas, éstos fueron transferidos en el 9.5 día de gestación a un medio de cultivo contenido 1, 10, 100 y 300 µg/ml de terbinafine; los embriones fueron creciendo extracorporalmente durante un período de 48 horas, tiempo en el que se examinaron rasgos morfológicos, grados de diferenciación y crecimiento, esto fue comparado con embriones control con concentraciones de 100 µg/ml, no se observaron cambios drásticos en la morfología; con 300 µg/ml hubo una marcada inhibición de la circulación sanguínea del saco-yema, acompañado de inhibición del crecimiento y diferenciación de los embriones. (20)

1.8. Evaluación terapéutica en humanos :

El terbinafine se ha evaluado en diferentes micosis que afectan al hombre, su tolerancia es buena, con un amplio margen desde 50 a 750mg. (3)

-Dermatofitosis o tiñas (cuerpo, ingles, pies). Se demostró una buena respuesta desde las 3 semanas, tanto clínica como micológicamente. (3, 15, 21, 22)

-Onicomicosis. Con buenos resultados apreciables desde el primer mes, observándose cura completa después de los 6 meses. (21, 22)

-Candidosis (mucosa y/o cutánea). Con una respuesta favorable 60-70 % por vía oral y un 75-85 % tópica. (21)

-Pitiriasis versicolor. Por vía sistémica es inefectivo (0-5 %) sin embargo, se habla de una buena respuesta 70-90 % con la administración tópica de terbinafine al 1 %. (21)

1.9. Efectos colaterales :

Sistemáticamente el terbinafine presenta pocos efectos colaterales, ya que sus metabolitos son fácilmente eliminables por tracto urinario. En los voluntarios que ha sido administrada la droga, se han presentado pocos efectos adversos (malestar gastrointestinal y cefalea), los cuales no han ameritado suspender el tratamiento, salvo casos muy específicos. (21)

2. Tipificación del género Candida :

Diversas especies oportunistas del género Candida causan candidosis, ésta es una enfermedad cosmopolita y de gran importancia mundial; - su hábitat es el humano desde los primeros días del nacimiento hasta su muerte, teniendo fuerte predilección por las mucosas.

Como prácticamente cualquier especie de Candida sp puede dar los diversos cuadros de candidosis, clínicamente la tipificación del género no es relevante; sin embargo a nivel de laboratorio, y para estudios especiales la tipificación de dicho género se considera de gran importancia, ya que incluye un variado número de especies, y sólo algunas de ellas pueden ser oportunistas sobresaliendo C.albicans (65-85 %).

La morfología de las colonias no es de gran utilidad para diferenciar las distintas especies de Candida, ya que por lo regular son similares, y es por esto, que para su debida clasificación se recurre a pruebas de mayor criterio y confiabilidad. ⁽¹⁾

2.1. Pruebas biológicas :

Se basan en la distinta micromorfología que presentan las levaduras, al someterlas a ciertas condiciones de nutrientes, temperatura y -- tiempo de incubación.

2.1.1. Filamentación en suero :

Esta es una prueba presuntiva y rápida, la cual nos permite identificar a C. albicans aunque no de manera determinante, ya que puede generar falsos (+) y (-) debido a los diversos factores de los que depende, como son: la cepa; la cantidad de inóculo (células en exceso provocan -- falsos (-)); el tiempo de incubación (si se excede de 3 $\frac{1}{2}$ horas la -- formación de tubos germinales será (+) para todas las especies de Candida); y el suero humano (no es un medio de cultivo estandarizado).^(1,28,29)

Zeragoza Hernández y cols.⁽³⁰⁾ realizaron un estudio con el fin de evaluar la eficacia de distintos tipos de suero (normales y con diversas alteraciones), en la formación de tubos germinativos de Candida sp.

Los resultados que obtuvieron indican que el mayor porcentaje de formación de tubos se obtiene empleando suero de personas sanas y en orden decreciente el suero ictérico, suero humano lipémico, suero de caballo, albúmina de huevo y plasma de personas diabéticas.

La prueba se efectúa inoculando una asada de la cepa en 0.5 ml de suero humano, incubando a 37°C durante 3 a 3 $\frac{1}{2}$ horas, transcurrido este tiempo, se realiza un examen en fresco y si se observan numerosos tubos germinativos (estructuras que semejan "espejos de mano") de 5 a 15 μ de largo; se dice que esta prueba es presuntiva de C. albicans.^(1, 29)

2.1.2. Producción de pseudomicelio y clamidoconidios :

La producción de clamidoconidios es una prueba determinante para C. albicans, y sólo en raras ocasiones C. stellatoidea y C. tropicalis pueden llegar a formarlos.

La prueba se lleva a cabo en medios de cultivo pobres adicionados de un tensioactivo, los más utilizados son el agar harina de maíz, agar--arroz, y agar papa zanahoria; a los que se les agrega Tween 80 al 1 %.

Cualquiera de los medios antes mencionados se prepara en cajas de Petri, y se siembra por estria, incubándose a temperatura ambiente de 48 a 72 horas.

Todas las especies del género Candida presentan pseudomicelio largo, ramificado con acúmulos de blastoconidios; y en el caso específico de C. albicans se ven clamidoconidios terminales o intercalares. La observación de dichas estructuras se realiza directamente de la caja, la cual se coloca sobre la platina del microscopio. Los clamidoconidios presentan forma esférica, doble membrana refringente, y miden de 10 a 12 μ de diámetro. Para facilitar su observación puede agregarse sobre la colonia un colorante de contraste (como el azul de lactofenol) y un cubreobjeto. (1, 28, 31)

2.2. Pruebas fisiológicas :

Se basan en la actividad enzimática que presentan las levaduras, al condicionarlas a cierta fuente de carbono.

2.2.1. Pruebas bioquímicas :

Se basan en la fermentación (zimograma) y utilización (auxonograma) de carbohidratos. Existe un perfil bioquímico que identifica a cada una de las especies de Candida.⁽¹⁾

A) Zimograma:

El estudio de la fermentación de carbohidratos se realiza en un medio líquido-base al que se le añade una proporción de azúcar, un indicador de pH ácido, y una campana de fermentación para captar los gases liberados.

Los medios se inoculan a partir de colonias aisladas, y se incuban a temperatura ambiente de 5 a 15 días; es decir hasta observar el virre del indicador y la formación de gas.^(1, 2B)

B) Auxonograma:

Las pruebas de utilización de carbohidratos se efectúan en medio sólido-base peptonado, el cual no contiene azúcares ya que éstos son inoculados en forma de sensibilizadores una vez que la cepa ha sido sembrada. Se incuban a temperatura ambiente durante 5 a 15 días. El desarrollo de la colonia alrededor del cilindro que contiene el carbohidrato, indica una

lectura positiva. (1, 27)

2.2.2. Reducción de sales de tetrazolio :

Esta es una prueba importante cuando hay confusiones entre C. stellatoidea con clamidoconidios y C. albicans.

La cepa se siembra en caja de Petri en forma de estrías; y se utiliza el medio Pagano-Levin, que contiene un indicador biológico lo que permite una simple y rápida diferenciación de C. albicans, ésta se basa en las distintas coloraciones que presentan las colonias en el medio, debido a la capacidad por parte de las levaduras de reducir un compuesto de tetrazolio. C. albicans tiene una capacidad muy limitada o casi nula de reducción, por lo que su coloración va de blanca a un rosa muy pálido. Aunque C. Krusei también puede producir colonias blancas, es fácil su diferenciación, ya que sus colonias aparecen planas, secas, de color mate, en contraste con la textura cremosa de C. albicans. (28)

MATERIAL

- Algodón absorbente
- Asa bacteriológica
- Asa micológica
- Bisturí
- Bulbos de goma
- Cajas de Petri desechables
- Cinta adhesiva (scotch)
- Cubreobjetos
- Embudo de filtración de vástago largo
- Etiquetas
- Frascos viales con tapón de goma
- Gasa
- Gradillas metálicas para 40 tubos
- Hisopos
- Lápiz grueso
- Matraces Erlenmayer de 250, 500 y 1000 ml
- Mechero de Bunsen
- Papel aluminio
- Papel engomado (Masking tape)
- Papel de estraza
- Papel filtro Watman # 20
- Pinzas
- Pipetas graduadas de 0.2, 1.0, 2.0, 5.0 y 10 ml

- Pipetas Pasteur
- Portaobjetos
- Probetas de 50 y 250 ml.
- Soporte universal
- Termómetro de 100°C.
- Tubos de ensayo de 12 x 75, 13 x 100 y 13 x 120
- Vasos de precipitados de 250 y 600 ml.

1. Equipo :

- Autoclave
- Balanza analítica
- Balanza granataria
- Estufa
- Incubadora 28 y 37°C.
- Microscopio óptico
- Refrigerador

2. Reactivos y colorantes :

- Agua destilada (H_2O)
- Azul de bromocresol
- Azul de lactofenol
- Cloruro de sodio ($NaCl$)
- Cloruro de trifenil tetrazolium (TTC)

- Extracto de levadura
- Galactosa
- Glucosa
- Hidróxido de sodio (NaOH) 1N.
- Hidróxido de potasio (KOH) 10 %
- Lactosa
- Maltosa
- Peptona
- Sacarosa
- Tween 80

3. Medios de cultivo :

- Agar bacteriológico
- Agar harina de maíz (corn-meal)
- Agar Sabouraud
- Infusión de cerebro corazón (BHI)
- Suero fisiológico

4. Fármacos :

- Cloramfenicol
- Terbinafina

M E T O D O L O G I A

Se evaluó la actividad del terbinafine, llevando a cabo estudios-tanto in vitro como in vivo; para lo cual fue necesario aislar 150 cepas de Candida sp y tipificarlas, comprobando así su sensibilidad frente al fármaco por medio de la técnica de sensidiscos.

Se seleccionaron además 10 pacientes con diagnóstico clínico y micológico de candidosis cutánea y de mucosas, a los cuales se les adminis

1. Tipificación de cepas :

Se aislaron 150 cepas de Candida sp de casos patológicos de la consulta externa e interna del servicio de Dermatología del Hospital General de México S.S., con diagnóstico clínico de candidosis, confirmado-- con exámenes directos y cultivos.

Los productos recolectados fueron escamas, exudados, esputo, orina y sangre; por lo que la toma de muestra se realizó de manera varia--ble; parte de ella se ocupó para el examen directo, colocándola entre -- porta y cubreobjetos con potasa al 10 % observando así las imágenes para sitarias. El resto de la muestra se sembró en medio de agar Saboursud, - incubándose a 28°C durante 2 ó 3 días.

Una vez aisladas las cepas se procedió a la tipificación de las mismas, utilizando los métodos que a continuación se numeran:

1.1. Filamentación en suero :

Se inoculó una asada de las cepas en tubos de ensaye de 12 x 75, los cuales contenían 0.5 ml de suero humano, y se incubó a 37°C durante 3 horas; tiempo después del cual se realizó un examen en fresco, observando así la formación de tubos germinativos.

1.2. Formación de pseudomicelio y clamidoconidios :

En cajas de Petri desechables con medio harina de maíz (corn-meal) más Tween 80 al 1 %, se sembraron las cepas por estrías, incubándose a temperatura ambiente durante 72 horas.

Posteriormente se colocaron las cajas sobre la platina del microscopio, con el fin de observar la formación de clamidoconidios y/o pseudomicelio.

1.3. Zimograma :

Esta prueba se realizó en tubos de ensaye de 13 x 100 en medio semi-sólido base con 2 % de carbohidratos (glucosa, galactosa, maltosa, sacarosa y lactosa) para cada cepa, agregándole azul de bromocresol como indicador.

Las cepas se sembraron en el medio por picadura, y se incubaron--

a temperatura ambiente durante 15 días.

La lectura se consideró positiva por el viraje del indicador, el cual cambió de morado a amarillo indicando fermentación del carbohidrato.

1.4. Reducción de sales de tetrazolio :

El medio utilizado para efectuar esta prueba se preparó siguiendo la fórmula de Pagano-Levin, la cual consiste en:

-Peptona	10 g.
-Extracto de levadura	1 g.
-Glucose	40 g.
-Agar bacteriológico	15 g.
-Agua destilada	1000 ml.
-Cloruro de trifenil tetrazolium (TTC)	100 mg.
-Cloramfenicol	500 mg.

El medio y el TTC se mezclaron, y se repartieron en tubos de ---- 13 x 120, esterilizando a 10 lb de presión durante 10 minutos.

Las cepas se sembraron por estrías, y se incubaron a temperatura ambiente 72 horas. Dependiendo de la coloración que adquirió la colonia fue el resultado de esta prueba:

-Púrpura	++
-Rosa	+
-Blanca	-

Características Morfológicas y Fisiológicas del género Candida

(Micosis Médica del Instituto Pasteur 1987)

	<u>C.albicans</u>	<u>C.stellatoidea</u>	<u>C.tropicalis</u>	<u>C.parapsilosis</u>	<u>C.krusei</u>	<u>C.quillervondii</u>
<u>Morfología</u>						
Pseudomicelio	+	+	+	+	+	+
Gliavocanidios	+	+,-	-	-	-	-
Filamentación	+	+,-	-	-	-	-
<u>Zimograma</u>						
Glucosa	+	+	+	+	+	+
Galactosa	+	-	+	+,-	-	+
Maltosa	+	+	+	-	-	-
Sacarosa	+,-	-	+	-	-	+
Lactosa	-	-	-	-	-	-
<u>Otras carac.</u>						
TTC	-	+	++	+	+,-	+

2. Valoración del fármaco :

Una vez tipificadas las cepas de Candida sp., se determinó la actividad del terbinafine como a continuación se señala:

2.1. Estudio in vitro :

Para este estudio se empleó aproximadamente 10 mg del terbinafine en forma de polvo cristalino, el cual se disolvió en etanol al 50 % por ser el solvente más eficaz; se prepararon diversas concentraciones ---- (µg/ml), en intervalos de 0.01, 0.1, 1.0, 10, 50 y 100 .

Para valorar la actividad in vitro del terbinafine se realizaron siembras masivas en medio sólido (agar Sabouraud) con cada una de las cepas (150), las cuales se inocularon previamente en medio líquido (BHI)-- incubándose a temperatura ambiente durante 3 días para obtener una suspensión de levaduras.

Cada caja de Petri se inoculó con 0.1 ml de suspensión de levaduras, extendiéndose con ayuda de hisopos estériles hasta cubrir la superficie del medio. Posteriormente los sensibilizadores (hechos con papel filtro Watman #20) de 0.6 cm de diámetro, se impregnaron con cada una de las -- concentraciones, utilizando un disco control por caja, impregnado únicamente con el solvente (etanol al 50 %). Se colocaron sobre el agar 3 sensibilizadores por caja, y se refrigeraron durante 30 minutos para dar tiempo a que el fármaco difundiera en el medio.

Posteriormente se incubaron a temperatura ambiente durante 48 --- horas.

La lectura se realizó por la presencia de un halo de inhibición, considerando que la concentración mínima inhibitoria (CMI) es la menor cantidad del fármaco, que se requiere para no permitir el desarrollo del agente causal (in vitro), controlando además que no hubiera formación de halos en lo que a discos control se refería.

2.2. Estudio in vivo :

Se evaluó el uso del terbinafina en cápsulas de 125 mg, administradas cada 12 horas por vía oral para el tratamiento de candidosis cutánea y de mucosas.

2.2.1. Selección de pacientes :

Previo consentimiento de los enfermos, se tomó un grupo de 10 pacientes con diagnóstico clínico y micológico positivos estableciéndose 3 semanas como tiempo de tratamiento.

A) Criterios de inclusión:

- Edad: Mayores de 18 años.
- Sexo: Cualquier sexo, en caso de mujeres, únicamente no embarazadas o con buen método anticonceptivo.
- Hallazgo clínico positivo.
- Hallazgo micológico positivo (examen directo).

B) Criterios de exclusión:

- Menores de 18 años.
- Embarazadas.
- Hallazgo micológico negativo, aunque clínicamente fuese positivo
- Pacientes que no cooperaran con el estudio.
- Pacientes con tratamiento antifúngico tanto tópico como sistémico por lo menos 4 semanas antes.
- Enfermedades que condicionaran alteración en la absorción o eficacia del medicamento (mala absorción, hepatopatías, nefropatías hemopatías, etc.).
- Tratamientos concomitantes con radioterapia, citostáticos, inmunosupresores, antihelmínticos, antimicrobianos, etc.

2.2.2. Indicaciones :

El terbinafine se administró en cápsulas de 125 mg, una cada 12 horas, durante 3 semanas; se realizaron controles tanto clínicos como micológicos, al inicio, a la mitad, al final y 2 semanas después.

2.2.3. Evaluación :

Se evaluaron las manifestaciones clínicas conforme la siguiente escala: 0=ausente; 1=leve; 2=moderado; 3=severo.

Teniendo en cuenta signos como eritema, descamación, maceración, vesiculación y fisuras; síntomas como prurito y ardor.

2.2.4. Valoración del tratamiento :

Se hizo una evaluación clínica en cada cita, y al final del tratamiento se llevó a cabo una correlación clínica y micológica conforme a los siguientes parámetros:

- EXCELENTE Curación clínica y micológica.
(Evidencia clínica de curación; examen directo y cultivo negativo).
- MUY BUENA Mejoría clínica y curación micológica.
(Evidencia clínica de mejoría; examen directo y cultivo negativo).
- MALA Ningún cambio ni clínico ni micológico.
(Cuadro clínico activo y examen directo y cultivo positivo).
- INTOLERANCIA Presencia de sintomatología adversa atribuible al medicamento o cambios en los exámenes de laboratorio que condicionaran suspensión del tratamiento.

RESULTADOS

1. Tipificación de cepas :

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 1 y 2:

Tabla 1.

no. cepa	Microorganismo	Filamentación en suero	Producción de pseudomicelio	Formación de clamidoconidios
1	<u>C. krusei</u>	-	+	-
2	<u>C. albicans</u>	+	+	+
3	<u>C. albicans</u>	+	+	+
4	<u>C. parapsilosis</u>	-	+	-
5	<u>C. albicans</u>	+	+	+
6	<u>C. albicans</u>	+	+	+
7	<u>C. albicans</u>	-	+	+
8	<u>C. albicans</u>	+	+	+
9	<u>C. albicans</u>	+	+	+
10	<u>C. krusei</u>	-	+	-
11	<u>C. albicans</u>	+	+	+
12	<u>C. albicans</u>	+	+	+
13	<u>C. albicans</u>	+	+	+
14	<u>C. albican</u>	+	+	+
15	<u>C. albicans</u>	+	+	+
16	<u>C. tropicalis</u>	+	+	-
17	<u>C. albicans</u>	+	+	+
18	<u>C. tropicalis</u>	-	+	-
19	<u>C. albicans</u>	+/-	+	+
20	<u>C. albicans</u>	+	+	+
21	<u>C. albicans</u>	+	+	+
22	<u>C. albicans</u>	+	+	+
23	<u>C. albicans</u>	+	+	+
24	<u>C. albicans</u>	+	+	+
25	<u>C. tropicalis</u>	+	+	-
26	<u>C. tropicalis</u>	-	+	-
27	<u>C. albicans</u>	+	+	+
28	<u>C. albicans</u>	+	+	+
29	<u>C. albicans</u>	+	+	+
30	<u>C. albicans</u>	+	+	+
31	<u>C. albicans</u>	+	+	+

No. cepa	Microorganismo	Filamentación en suero	Producción de pseudomicelio	Formación de clamidocónidios
32	<u>C. parapsilosis</u>	+	+	-
33	<u>C. albicans</u>	+	+	+
34	<u>C. albicans</u>	-	+	+
35	<u>C. albicans</u>	-	+	+
36	<u>C. tropicalis</u>	+	+	-
37	<u>C. tropicalis</u>	+	+	-
38	<u>C. stellatoidea</u>	-	+	-
39	<u>C. parapsilosis</u>	-	+	-
40	<u>C. tropicalis</u>	-	+	-
41	<u>C. albicans</u>	+	+	+
42	<u>C. tropicalis</u>	-	+	-
43	<u>C. albicans</u>	+	+	+
44	<u>C. albicans</u>	+	+	+
45	<u>C. albicans</u>	+/-	+	+
46	<u>C. parapsilosis</u>	-	+	-
47	<u>C. tropicalis</u>	-	+	-
48	<u>C. albicans</u>	+	+	+
49	<u>C. albicans</u>	-	+	+
50	<u>C. albicans</u>	+	+	+
51	<u>C. krusei</u>	-	+	-
52	<u>C. stellatoidea</u>	+	+	-
53	<u>C. guilliermondii</u>	-	+	-
54	<u>C. albicans</u>	+	+	+
55	<u>C. tropicalis</u>	-	+	-
56	<u>C. tropicalis</u>	-	+	-
57	<u>C. albicans</u>	+	+	+
58	<u>C. albicans</u>	+	+	+
59	<u>C. albicans</u>	+	+	+
60	<u>C. albicans</u>	+	+	+
61	<u>C. albicans</u>	+	+	+
62	<u>C. krusei</u>	+	+	-
63	<u>C. stellatoidea</u>	-	+	-
64	<u>C. krusei</u>	+	+	-
65	<u>C. stellatoidea</u>	+	+	-
66	<u>C. stellatoidea</u>	+	+	-
67	<u>C. albicans</u>	+	+	+
68	<u>C. krusei</u>	-	+	-
69	<u>C. parapsilosis</u>	-	+	-
70	<u>C. albicans</u>	-	+	+
71	<u>C. tropicalis</u>	+	+	-
72	<u>C. tropicalis</u>	-	+	-

No. cepa	Microorganismo	Filamentación en suero	Producción de pseudomicelio	Formación de cladocanidio
73	<u>C. albicans</u>	+	+	+
74	<u>C. albicans</u>	+	+	+
75	<u>C. parapsilosis</u>	+	+	-
76	<u>C. tropicalis</u>	-	+	-
77	<u>C. krusei</u>	-	+	-
78	<u>C. krusei</u>	-	+	-
79	<u>C. parapsilosis</u>	-	+	-
80	<u>C. albicans</u>	+	+	+
81	<u>C. albicans</u>	+	+	+
82	<u>C. albicans</u>	+	+	+
83	<u>C. albicans</u>	+	+	+
84	<u>C. albicans</u>	+	+	+
85	<u>C. krusei</u>	-	+	-
86	<u>C. albicans</u>	+	+	+
87	<u>C. albicans</u>	+	+	+
88	<u>C. albicans</u>	+	+	+
89	<u>C. albicans</u>	+	+	+
90	<u>C. albicans</u>	+	+	+
91	<u>C. albicans</u>	+	+	+
92	<u>C. albicans</u>	+	+	+
93	<u>C. albicans</u>	+	+	+
94	<u>C. albicans</u>	+	+	+
95	<u>C. albicans</u>	+	+	+
96	<u>C. albicans</u>	+	+	+
97	<u>C. albicans</u>	+	+	+
98	<u>C. tropicalis</u>	-	+	-
99	<u>C. tropicalis</u>	-	+	-
100	<u>C. albicans</u>	+	+	+
101	<u>C. albicans</u>	+	+	+
102	<u>C. albicans</u>	+	+	+
103	<u>C. albicans</u>	+	+	+
104	<u>C. albicans</u>	+	+	+
105	<u>C. parapsilosis</u>	+	+	-
106	<u>C. albicans</u>	+	+	+
107	<u>C. albicans</u>	+	+	+
108	<u>C. albicans</u>	+	+	+
109	<u>C. stellatoidea</u>	-	+	-
110	<u>C. tropicalis</u>	-	+	-
111	<u>C. tropicalis</u>	-	+	-
112	<u>C. parapsilosis</u>	-	+	-
113	<u>C. tropicalis</u>	-	+	-

No. cepa	Microorganismo	Filamentación en suero	Producción de pseudomicelio	Formación de clemidoconidios
114	<u>C. albicans</u>	+	+	+
115	<u>C. tropicalis</u>	-	+	-
116	<u>C. albicans</u>	+	+	+
117	<u>C. albicans</u>	+	+	+
118	<u>C. albicans</u>	+	+	+
119	<u>C. parapsilosis</u>	-	+	-
120	<u>C. tropicalis</u>	-	+	-
121	<u>C. albicans</u>	+	+	+
122	<u>C. albicans</u>	+	+	+
123	<u>C. albicans</u>	+	+	+
124	<u>C. krusei</u>	-	+	-
125	<u>C. stellatoidea</u>	-	+	-
126	<u>C. guillemontii</u>	-	+	-
127	<u>C. albicans</u>	+	+	+
128	<u>C. tropicalis</u>	-	+	-
129	<u>C. tropicalis</u>	-	+	-
130	<u>C. albicans</u>	+	+	+
131	<u>C. albicans</u>	+	+	+
132	<u>C. albicans</u>	+	+	+
133	<u>C. albicans</u>	+	+	+
134	<u>C. albicans</u>	+	+	+
135	<u>C. albicans</u>	+	+	+
136	<u>C. krusei</u>	-	+	-
137	<u>C. stellatoidea</u>	-	+	-
138	<u>C. krusei</u>	-	+	-
139	<u>C. stellatoidea</u>	-	+	-
140	<u>C. stellatoidea</u>	+	+	-
141	<u>C. krusei</u>	-	+	-
142	<u>C. parapsilosis</u>	-	+	-
143	<u>C. tropicalis</u>	-	+	-
144	<u>C. albicans</u>	+	+	+
145	<u>C. albicans</u>	+	+	+
146	<u>C. parapsilosis</u>	-	+	-
147	<u>C. tropicalis</u>	-	+	-
148	<u>C. krusei</u>	-	+	-
149	<u>C. tropicalis</u>	-	+	-
150	<u>C. albicans</u>	+	+	+

Table 2.

No. cepa	Glucosa	Galactosa	Maltosa	Sacarosa	Lactosa	TTC
1	+	-	-	-	-	+
2	+	+	+	-	-	-
3	+	+	+	-	-	-
4	+	+	-	-	-	+
5	+	+	+	-	-	-
6	+	+	+	+	-	-
7	+	+	+	-	-	-
8	+	+	+	-	-	-
9	+	+	+	-	-	-
10	+	-	-	-	-	+
11	+	+	+	-	-	-
12	+	+	+	-	-	-
13	+	+	+	-	-	-
14	+	+	+	-	-	-
15	+	+	+	-	-	-
16	+	+	+	+	-	++
17	+	+	+	-	-	-
18	+	+	+	+	-	++
19	+	+	+	-	-	-
20	+	+	+	-	-	-
21	+	+	+	-	-	-
22	+	+	+	-	-	-
23	+	+	+	-	-	-
24	+	+	+	-	-	-
25	+	+	+	+	-	++
26	+	+	+	+	-	++
27	+	+	+	-	-	-
28	+	+	+	-	-	-
29	+	+	+	-	-	-
30	+	+	+	-	-	-
31	+	+	+	-	-	-
32	+	+	-	-	-	+
33	+	+	+	-	-	-
34	+	+	+	+	-	-
35	+	+	+	-	-	-
36	+	+	+	+	-	++
37	+	+	+	+	-	++
38	+	+	+	-	-	+
39	+	+	-	-	-	+
40	+	+	+	+	-	++
41	+	+	+	-	-	-

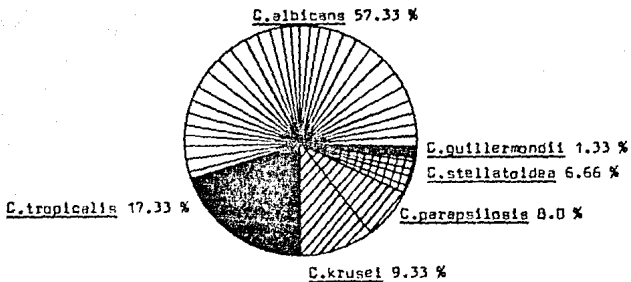
No. cepa	Glucosa	Galactosa	Maltosa	Sacarosa	Lactosa	TTC
42	+	+	+	+	-	++
43	+	+	+	-	-	-
44	+	+	+	-	-	-
45	+	+	+	-	-	-
46	+	+	-	-	-	+
47	+	+	+	+	-	++
48	+	+	+	-	-	-
49	+	+	+	-	-	-
50	+	+	+	-	-	-
51	+	-	-	-	-	+
52	+	-	-	-	-	+
53	+	+	-	+	-	+
54	+	+	+	-	-	-
55	+	+	+	+	-	++
56	+	+	+	+	-	++
57	+	+	+	-	-	-
58	+	+	+	-	-	-
59	+	+	+	-	-	-
60	+	+	+	-	-	-
61	+	+	+	-	-	-
62	+	-	-	-	-	+
63	+	+	+	-	-	+
64	+	-	-	-	-	+
65	+	-	+	-	-	+
66	+	-	+	-	-	+
67	+	+	-	-	-	-
68	+	-	-	-	-	+
69	+	+	-	-	-	+
70	+	+	+	-	-	-
71	+	+	+	+	-	++
72	+	+	+	+	-	++
73	+	+	+	-	-	-
74	+	+	+	+	-	-
75	+	+	-	-	-	+
76	+	+	+	+	-	++
77	+	-	-	-	-	+
78	+	-	-	-	-	+
79	+	+	-	-	-	+
80	+	+	+	-	-	-
81	+	+	+	-	-	-
82	+	+	+	-	-	-
83	+	+	+	-	-	-
84	+	+	+	-	-	-

No. cepa	Glucosa	Galactosa	Maltosa	Sacaroso	Lactosa	TTC
85	+	-	-	-	-	+
86	+	+	+	-	-	-
87	+	+	+	-	-	-
88	+	+	+	-	-	-
89	+	+	+	-	-	-
90	+	+	+	-	-	-
91	+	+	+	-	-	-
92	+	+	+	-	-	-
93	+	+	+	-	-	-
94	+	+	+	-	-	-
95	+	+	+	-	-	-
96	+	+	+	-	-	-
97	+	+	+	-	-	-
98	+	+	+	+	-	++
99	+	+	+	+	-	++
100	+	+	+	-	-	-
101	+	+	+	-	-	-
102	+	+	+	-	-	-
103	+	+	+	-	-	-
104	+	+	+	-	-	-
105	+	+	-	-	-	+
106	+	+	+	-	-	-
107	+	+	+	-	-	-
108	+	+	+	-	-	-
109	+	-	+	-	-	+
110	+	+	+	+	-	++
111	+	+	+	+	-	++
112	+	+	-	-	-	+
113	+	+	+	+	-	++
114	+	+	+	-	-	-
115	+	+	+	-	-	-
116	+	+	+	-	-	-
117	+	+	+	-	-	-
118	+	+	+	-	-	-
119	+	+	-	-	-	+
120	+	+	+	+	-	++
121	+	+	+	-	-	-
122	+	+	+	-	-	-
123	+	+	+	-	-	-
124	+	-	-	-	-	+
125	+	-	+	-	-	+
126	+	+	-	+	-	+

No. cepa	Glucosa	Galactosa	Maltosa	Sacarosa	Lactosa	TTC
127	+	+	+	-	-	-
128	+	+	+	+	-	++
129	+	+	+	+	-	++
130	+	+	+	-	-	-
131	+	+	+	-	-	-
132	+	+	+	-	-	-
133	+	+	+	-	-	-
134	+	+	+	-	-	-
135	+	+	+	-	-	-
136	+	-	-	-	-	+
137	+	-	+	-	-	+
138	+	-	-	-	-	+
139	+	-	+	-	-	+
140	+	-	+	-	-	+
141	+	-	-	-	-	+
142	+	+	-	-	-	+
143	+	+	+	+	-	++
144	+	+	+	-	-	-
145	+	+	+	-	-	-
146	+	+	-	-	-	+
147	+	+	+	+	-	++
148	+	-	-	-	-	+
149	+	+	+	+	-	++
150	+	+	+	-	-	-

G R A F I C A 1

PORCENTAJE DE AGENTES AISLADOS DE CASOS
PATOLÓGICOS DE CANDIDOSIS



2. Valoración del fármaco :

Se evaluó la actividad del terbinafine tanto in vitro como in vivo, obteniéndose los siguientes resultados.

2.1. Valoración del fármaco in vitro :

Los resultados de la inhibición de las cepas en base a las diversas concentraciones, se resume a continuación en la tabla 3 y gráfica 2 :

Tabla 3.

Especies	No. cepas	No. cepas sensibles a la concentración ($\mu\text{g/ml}$)				
		0.01	0.1	10	50	100
<u>C. albicans</u>	86			10	66	2
<u>C. tropicalis</u>	26				4	6
<u>C. krusei</u>	14			4	2	
<u>C. parapsilosis</u>	12			6	4	2
<u>C. stellatoidea</u>	10			2		2
<u>C. guilliermondii</u>	2				2	

2. Valoración del fármaco :

Se evaluó la actividad del terbinafine tanto in vitro como in vivo, obteniéndose los siguientes resultados.

2.1. Valoración del fármaco in vitro :

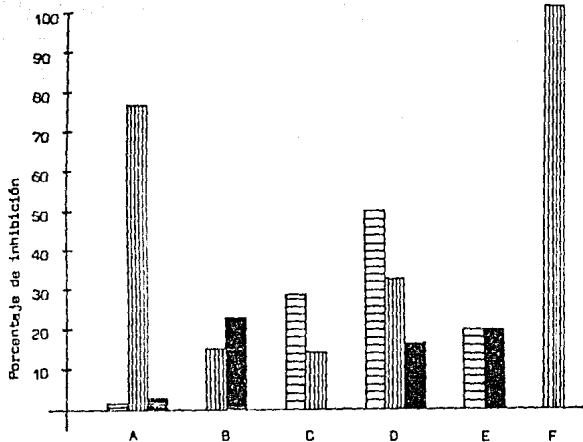
Los resultados de la inhibición de las cepas en base a las diversas concentraciones, se resume a continuación en la tabla 3 y gráfico 2 :

Tabla 3.

Especies	No. cepas	No. cepas sensibles a la concentración ($\mu\text{g/ml}$)				
		0.01	0.1	10	50	100
<u>C. albicans</u>	86			10	66	2
<u>C. tropicalis</u>	26				4	6
<u>C. krusei</u>	14			4	2	
<u>C. parapsilosis</u>	12			6	4	2
<u>C. stellatoidea</u>	10			2		2
<u>C. guilliermondii</u>	2				2	

GRAFICA 2

PORCENTAJE ACUMULATIVO DE CEPAS INHIBIDAS



Concentración µg/ml de terbinafine

A=C.albicans

B=C.tronicalis

C=C.krusei

D=C.parapsilosis

E=C.stellatoides

F=C.quilliermondii

10

50

100

2.2. Valoración del fármaco in vivo :

Se evaluaron 10 pacientes con diagnóstico clínico y micológica de candidosis cutánea y de mucosas.

A) Sexo:

Masculino	4 pacientes	40 %
Femenino	<u>6</u> pacientes	60 %
	10	

B) Edad:

Mínima	22 años	Promedio 40.5
Máxima	59 años	

C) Tiempo de evolución:

Mínimo	8 días
Máximo	3 años

D) Diagnóstico clínico:

Candidosis cutánea	7
Candidosis mucosa (genital)	3

E) Agentes etiológicos aislados: (ver gráfica 4)

C.cutánea	<u>C.albicans</u> (5); <u>C.stellatoidea</u> (2)
C.mucosa	<u>C.albicans</u> (3)

F) Valoración clínica: (ver gráfica 5)

- 5 sin ningún cambio ni clínico ni micológico
- 3 mejoría clínica sin curación micológica
- 1 mejoría clínica y curación micológica
- 1 curación clínica y micológica (C.albicans, piel)

En la tabla 4 y gráfica 3 se resume porcentualmente los datos clínicos en sus diferentes tiempos de evolución, así como la significancia estadística demostrada por χ^2 cuadrada de Pearson.

Tabla 4.

SIGNO O SINTOMA	VISITA INICIAL		1 $\frac{1}{2}$ SEMANAS		3a SEMANA		2 SEM. DESPUES	
	No	%	No	%	No	%	No	%
Eritema	10	100	10	100	8	80	7	70
Descamación	8	80	6	60	4	40	4	40
Vesículas	1	10	0	0	0	0	0	0
Fisuras	3	30	2	20	1	10	1	10
Maceración	10	100	9	90	10	100	9	90
Prurito	10	100	9	90	10	100	9	90
Ardor	4	40	3	30	1	10	1	10

χ^2 cuadrada (Pearson) Comparando la visita inicial con

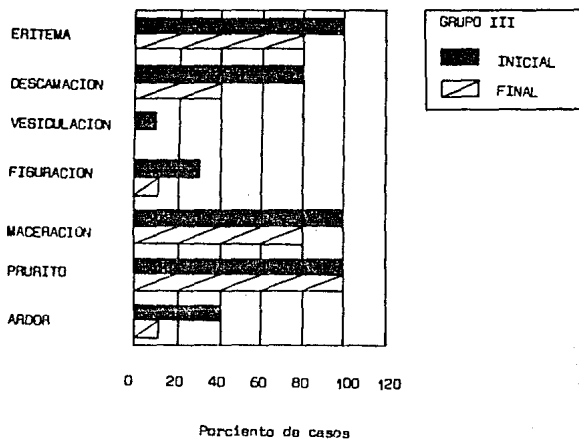
el fin del tratamiento:

Eritema	5.02 - N.S
Descamación	7.14 - N.S
Vesículas	1.05 - N.S
Fisuras	2.25 - N.S
Maceración	2.78 - N.S
Prurito	3.60 - N.S
Ardor	2.93 - N.S

(N.S = No Significativa)

GRAFICA 3

CANDIDOSIS CUTANEA/MUCOSA



Evolución de los signos y síntomas

G) Exámenes de laboratorio:

Se realizaron los siguientes exámenes de laboratorio en ---
forma rutinaria en cada paciente:

Biometría hemática (BH)
Química sanguínea (QS)
Pruebas de función hepática (PFH)
Examen general de orina (EGO)

En ninguna de las pruebas practicadas se observaron cambios
significativos tanto pre como post- tratamiento.

H) Evaluación micológica:

Examen directo:	inicio	intermedio	final	2 sem.
(+) (-)	10-0	9-1	8-2	---
Cultivo: (+)	10	---	0	---

I) Tolerancia:

1.- Efectos colaterales: 4 pacientes refirieron cefalea le
ve y sensación de plenitud, ce_--
diendo espontáneamente.

J) Descrición: (0)

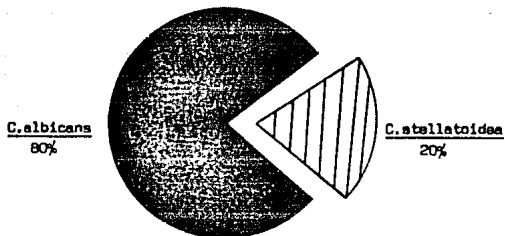
K) Método anticonceptivo en las mujeres del estudio:

Menopáusicas	3	Salpingectomía	1
Dispositivo intrauterino	1	Niega relaciones sexuales	1

GRAFICA 4

CANDIDOSIS CUTANEA / MUCOSA

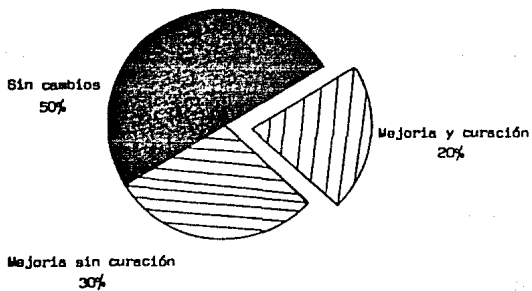
EVALUACION MICOLOGICA



Agentes aislados al inicio del tratamiento.
Valores absolutos y porcentajes.

GRAFICA 5

CANDIDOSIS CUTANEA / MUCOSA



Agentes aislados al inicio del tratamiento.
Valores absolutos y porcentajes.

CONCLUSIONES

C.albicans fue la especie de mayor incidencia en este estudio --- (57.33 %).

Las pruebas fisiológicas como el zimograma y la reducción de sales de tetrazolio fueron determinantes para la tipificación del género-- Candida.

El terbinafine no fue efectivo in vitro contra C.albicans ya que requirió una dosis promedio alta (50 µg/ml) para ser inhibida.

C.parapsilosis demostró ser la especie más sensible in vitro frente al terbinafine, ya que requirió una concentración promedio de 10 µg/ml para ser inhibida.

La concentración mínima inhibitoria fluctuó entre 10-100 µg/ml, - lo que hace que este medicamento sea poco activo para la candidosis.

La acción in vivo del terbinafine contra Candida fue mala, ya que se obtuvo curación en un 20 %; por lo que se concluye que es un antifúngico de bajo espectro, en lo que a micosis superficiales se refiere, --- pues sólo tiene buena acción frente a dermatofitosis. (24, 25)

La droga en general fue bien tolerada, se refirieron algunos efectos adversos como cefalea y sensación de plenitud, los cuales fueron señalados como leves y transitorios, no ameritando la suspensión del tratamiento.

Los exámenes paraclínicos del laboratorio (BH, QS, PFH, EGO), no mostraron alteraciones significativas, por lo que se puede concluir que la droga posee un alto grado de seguridad por vía sistémica.

DISCUSION

De acuerdo a los resultados obtenidos tanto in vitro como in vivo, se observó que el terbinafine es un antimicótico de poca actividad antifúngica en lo que a candidosis se refiere.

Los resultados in vitro demostraron que se requiere de concentraciones muy altas para inhibir el crecimiento de algunas cepas (C. albicans) y como clínicamente la tipificación no tiene importancia, ya que cualquier especie de los diversos cuadros de candidosis, el medicamento no se considera específico para el tratamiento de esta micosis. Esto se confirmó con los datos obtenidos del estudio in vivo, ya que sólo se observó curación en un 20%, manteniéndose en un 50% sin cambio alguno, lo cual demuestra la poca eficacia del terbinafine en candidosis cutáneo-mucosa.

Durante el estudio se valoraron también los diversos efectos colaterales atribuíbles al producto; presentándose en general pocos de éstos, como náuseas y cefalea, por lo que se considera al terbinafine como un producto poco tóxico, lo cual concuerda con la literatura. (3,21,22,23)

La búsqueda de nuevos antimicóticos es de gran importancia y las casas farmacéuticas se preocupan día con día por la síntesis de un antifúngico ideal, es por ésto que la aparición del terbinafine nos da otra expectativa, por ser un antimicótico que difiere en su mecanismo de acción al de los imidazoles, ya que actúa impidiendo la síntesis inicial del ergosterol (principal componente de la membrana fúngica)⁽⁶⁾ lo que sin duda genera la potencialidad del producto, sin embargo su acción que da limitada al tratamiento de las dermatofitosis.

Este estudio se realizó con la finalidad de valorar la actividad tanto in vitro como in vivo del terbinafine, y aunque parece tener una acción reducida sobre las micosis superficiales; el fármaco tiene poca toxicidad y teratogenicidad; lo cual deja muchas alternativas para seguir realizando investigaciones sobre este producto.

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

1. Bonifaz, A. *Micología Médica Básica*. Ed. Méndez Cervantes. México, D.F. 1990.
2. Petranyi, G., Ryder, N.S., Stützt, A. Allylamine derivatives: New class of synthetic antifungal agents inhibiting fungal squalene epoxidase. *Science*. 1984; 224: 1239-1241.
3. Ganzinger, U., Stützt, A., Petranyi, G., Stephen, A. Allylamines: Topical and oral treatment of dermatomycosis with a new class of antifungal agents. *Acta - Derm. Venereol* 1986; 121: 155-160.
4. Ryder, N.S. Specific inhibition of fungal sterol biosynthesis by SF 86-327 - a new allylamine antimycotic agent. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1985; 27: 252-256.
5. Ryder, N.S., Dupont, M.C. Inhibition of squalene epoxidase by allylamine antimycotic compounds. *Biochem J.* 1985; 230: 765-770.
6. Ryder, N.S. The mechanism of action of terbinafine. *Clin Exp. Derm.* 1989; 14: 98-100.
7. Cannon, R.D., Kerridge, D. Correlation between the sterol composition of membranes and morphology in Candida albicans. *J. Med Vet Mycol.* 1980; 26: 57-65.
8. Abruzzo, G.K., Fromtling, R.A., Turnbull, T.A., et al. Effects of bifonazole, fluconazole, itraconazole and terbinafine on the chemiluminescence response of immune cells. *J. Antimicrob. Chemother.* 1987; 20: 61-68.
9. Clayton, Y.W. In vitro activity of terbinafine. *Clinical and experimental dermatology.* 1989; 14: 101-103.
10. Ryder, N.S., Frank, I., Dupont, M.C. Ergosterol biosynthesis inhibition by the thio carbonate antifungal agents tolnaftate and tolciclate. *Antimicrob. Agents - Chemother.* 1986; 29: 858-860.
11. Petranyi, G., Meingassner, J.G., Mieth, H. Antifungal activity of the allylamine derivative terbinafine in vitro. *Antimyc. ag Chemother.* 1987; 31: 1365-1368.
12. Shadomy, S., Espinel, A., Gebhart, R. In vitro studies with SF 86-327, a new orally active allylamine derivative. *Sabouraudia.* 1985; 23: 125-132.

13. Barret, KJ. Lane, AC. Turner, RW. The Mode of antifungal action of tolnafta to. J. Med Vet Mycol. 1986; 24:155-160.
14. Clayton, YM. SF 86-327 A laboratory evaluation of 5 antifungal agents. Proceedings, 13 th International Congress of Chemotherapy. Vienna 1983; 116: 13-14.
15. Savin, R. Successful treatment of chronic Linea pedis (moccasin type) with terbinafine. Clin Exp Derm. 1989; 14:116-119.
16. Ryder, NS. Mechanism of action of the allylamine antimycotics. Proceedings of an Internationals Telesymposium. May 1987; 451-459.
17. Yamaguchi, H. Uchida, K. Once daily administration of terbinafine to guinea-pigs with experimental dermatophytosis. Clin Exp Derm. 1989; 14:108-109.
18. Borges, M. Mechanism of action of antifungals drugs with special reference to the imidazole derivatives. Reviews of Infectious Disease. 1980; 2:520-534.
19. Wartburg, BR. Summary of pharmacokinetic and biotransformation studies in animals with (14C) labelled SF 86-327. Sandoz Document. 1986; 303:25.
20. Ganzinger, V. Willendorfer, A. A report on a pharmacokinetic study of SF --- 86-327 in healthy elderly volunteers. Sandoz Document. 1986; 303:320.
21. Villars, V. Jones, TC. Clinical efficacy and to erability of terbinafine (La_misil) a new topical and systemic fungicidal drug for treatment of dermatomycosis. Clinical and experimental dermatology. 1984; 14: 124-127.
22. Cole, GW. Strickin, G. A comparison of a new oral antifungal terbinafine, --- with griseofulvin as therapy for linea corporis. Arch Dermatol. 1989; 125:-1539-1539.
23. Grassberger, MA. Wieth, H. Petronyi, G. et.al. Aspects of antimycotic research - exemplified by the allylamines. Triangle 1986; 25: 71-84.
24. Schuster, I. Pharmacological properties of a new systemically active antimycotic drug. 17th World Congress of Dermatology; Abstracts II, Berlin 1987; 283.
25. Rippon, JW. A new era in antimycotic agents. Arch Dermatol. 1986; 122:399---402.

26. Mieth, H. Petrányi, G. Preclinical evaluation of terbinafine in vivo. Clinical and experimental dermatology. 1989; 14:104-107.
27. Walker, L. Huppert, M. A rapid, reliable technic for the identification of - Candida albicans. Am. J. Clin. Pathol. 1959; 31: 551-558.
28. Alcubierre, M. A. Ramírez, Ch. L. Nueva Metodología para la tipificación del género Candida (Estudio 200 cepas). Tesis. 1990; Fac. Química. UNAM.
29. Mackenzie, D. W. R. Serum tube identification of Candida albicans. J. Clin. Path. 1962; 15:563-565.
30. Zaragoza-Hernández, J. Espinoza-Taxis, A. Morales-Carranza, A. Acción de diversos sustratos sobre la formación del tubo germinal en el género Candida. - Resúmenes del segundo Congreso Nacional de Micología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 1986, p. 17.
31. Walker, L. Huppert, M. Corn-meal Tween 80 agar: An improved medium for the - identification of Candida albicans. Am. J. Clin. Pathol. 1960; 33:190-194.