



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN

Departamento de  
Exámenes Profesionales

"PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A  
DERIVADOS DEL ÁCIDO CARBÁMICO DE  
*Aspergillus fumigatus* y  
*Trichophyton mentagrophytes*"

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**  
P R E S E N T A :  
**LERINA RUIZ SAENZ**

ASESORES: DR. ANDRÉS ROMERO ROJAS  
DR. ENRIQUE R. ANGELES ANGUIANG  
Q.B.P. AMPARO LODOÑO OROZCO



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 esta 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.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de  
Exámenes Profesionales

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A DERIVADOS DEL ACIDO CARBAMICO DE

Aspergillus fumigatus y Trichophyton mentagrophytes".

que presenta la pasante: Lerina Ruiz Saenz  
con número de cuenta: 9855435-9 para obtener el título de :  
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 10 de marzo de 2004

PRESIDENTE	<u>Dr. Tonatiuh Cruz Sánchez</u>	
VOCAL	<u>Dr. Andrés Romero Rojas</u>	
SECRETARIO	<u>MFC. Beatriz de Jesús Maya Monroy</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>QFB. Gabriela Escalante Reynoso</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>QFB. Ana Laura Vázquez Martínez</u>	

## AGRADECIMIENTOS

---

**A mis padres:** Por haberme aportado el coraje y la decisión de continuar con mis sueños. Por haberme enseñado que la grandeza comienza desde dentro, que los obstáculos nos hacen fuertes y que todo triunfo proviene del trabajo.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por haberme brindado la oportunidad de realizar mis estudios en ella.

**A mis asesores: Dr Andrés Romero Rojas, Dr Enrique Ángeles Anguiano, Amparo Londoño Cruz.** Por haber estado conmigo cuando les necesitaba, por haberme brindado la libertad y confianza para realizar este trabajo. Y sobre todo por haber creído en mi capacidad.

**A mis sinodales:** Por haber tenido la paciencia de revisar mi trabajo.

A todas las personas que hicieron posible esta investigación: especialmente a el **Laboratorio de Inmunofarmacología** y **Laboratorio de Química Medicinal**.

**A todos mis compañeros y amigos:** Por haber compartido un tiempo tan importante en nuestras vidas.

**A todos los profesores:** Por cada uno de los conocimientos que me aportaron y **a los laboratoristas y bibliotecarios:** Por haber contribuido en mi formación académica.

## ÍNDICE

---

	Pág.
1. Índice de tablas .....	4
I. Índice de figuras .....	6
II. Índice de abreviaturas .....	7
1. Resumen .....	9
2. Introducción .....	10
3. Micosis causadas por <i>Trichophyton mentagrophytes</i> .....	17
4. Morfología e identificación .....	18
a. Morfología microscópica .....	18
b. Morfología macroscópica .....	19
4.1.1 Factores de patogenicidad .....	20
4.1.2 Datos clínicos .....	20
4.1.3 Epidemiología .....	23
4.1.4 Diagnóstico de laboratorio .....	24
4.1.5 Tratamiento .....	26
4.2 Micosis causadas por <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	27
4.2.1 Morfología e identificación .....	27
a. Morfología microscópica. ....	28
b. Morfología macroscópica .....	29
4.2.2 Factores de Patogenicidad .....	30
4.2.3 Datos clínicos .....	30
4.2.4 Epidemiología .....	35
4.2.5 Diagnóstico de laboratorio .....	35
4.2.6 Tratamiento .....	37
4.3 Antifúngicos más comunes .....	38

a.	Polienos .....	43
b.	Nucleótidos análogos .....	47
c.	Alilaminas .....	50
d.	Azoles .....	51
e.	Nicomicina .....	54
f.	Otros .....	54
4.4	Carbamatos .....	55
4.5	Métodos para determinar la actividad antifúngica .....	57
4.6	Combinación de antifúngicos .....	58
5.	Justificación .....	61
6.	Hipótesis .....	62
7.	Objetivos .....	62
8.	Material y Reactivos .....	63
9.	Metodología .....	65
a.	Pruebas de identificación de microorganismo .....	65
b.	Microcultivo .....	65
9.1	Tinción de azul de algodón .....	66
9.2	Conservación y cultivo .....	66
9.3	Preparación de diluciones del agente antifúngico .....	67
9.4	Preparación del inóculo .....	70
9.5	Inoculación del medio RPMI-1640 .....	71
9.6	Incubación .....	71
9.7	Lectura de resultados .....	71
9.8	Combinación de compuestos .....	72
10.	Resultados. ....	74
10.1	Identificación de <i>A. fumigatus</i> y <i>T. mentagrophytes</i> .....	74

10.2	Suspensión de conidios	75
10.3	Compuestos control	75
10.4	Resultados obtenidos para <i>T. mentagrophytes</i>	76
10.5	Resultados obtenidos para <i>A. fumigatus</i>	79
8.6	Resultados de la combinación de antifúngicos	82
11.	Discusión	83
12.	Conclusiones	88
13.	Referencias bibliográficas	90

## I. ÍNDICE DE TABLAS

---

	Pág.
Tabla 1 Clasificación de las micosis .....	13
Tabla 2 Algunos agentes clínicos de las infecciones causadas por <i>Trichophyton mentagrophytes</i> .....	21
Tabla 3 Clasificación de aspergilosis .....	31
Tabla 4 Agentes antifúngicos .....	40
Tabla 5 Antifúngicos más comunes en las micosis .....	42
Tabla 6 Condiciones óptimas de crecimiento para <i>T. mentagrophytes</i> y <i>A. fumigatus</i> .....	67
Tabla 7 Preparación de la serie de diluciones del agente antifúngico .....	69
Tabla 8 Características macroscópicas y microscópicas de <i>T. mentagrophytes</i> y <i>A. fumigatus</i> .....	74
Tabla 9 Rangos de D.O y medidas de tendencia central de inóculo de hongos filamentosos .....	75
Tabla 10 Microorganismos control utilizados en la experimentación y sus respectivos rangos de MIC .....	76
Tabla 11 Susceptibilidad a derivados del ácido carbámico de <i>T. mentagrophytes</i> .....	77

Tabla 12 Susceptibilidad a derivados del ácido carbámico de <i>T. mentagrophytes</i> .....	78
Tabla 13 Susceptibilidad a derivados del ácido carbámico de <i>A. fumigatus</i> .....	80
Tabla 14 Susceptibilidad a derivados del ácido carbámico de <i>A. fumigatus</i> .....	81
Tabla 15 Inhibición del crecimiento de <i>T. mentagrophytes</i> .....	82

## II. ÍNDICE DE FIGURAS

---

	Pág.
Figura 1. Imagen de macroconidias de <i>T. mentagrophytes</i> .....	8
Figura 2. Fotografía de la macromorfología de <i>T. mentagrophytes</i> .....	19
Figura 3. Imagen de macroconidias de <i>A. fumigatus</i> .....	28
Figura 4. Fotografía de la macromorfología de <i>A. fumigatus</i> .....	29
Figura 5. Nistatina .....	44
Figura 6. Anfotericina B .....	45
Figura 7. 5-fluorocitosina .....	47
Figura 8. Griseofulvina .....	49
Figura 9. Terbinafina .....	50
Figura 10. Naftifina .....	51
Figura 11. Ketaconazol .....	52
Figura 12. Miconazol .....	53
Figura 13. Fluconazol .....	53
Figura 14. Descarboxilación de la monoamina de ácido carbónico .....	55
Figura 15. Estructura general de los carbamatos .....	56
Figura 16. Microcultivo .....	66
Figura 17. Diagrama de flujo .....	73
Figura 18. MICs de los derivados del ácido carbámico para <i>T. mentagrophytes</i> .....	79

### III. ABREVIATURAS

---

°C = Grados centígrados

ACT = Acetona

ADP = Agar dextrosa papa

ADS = Agar dextrosa sabouraud

*A. fumigatus* = *Aspergillus fumigatus*

*A. flavus* = *Aspergillus flavus*

AMB = Anfotericina B

ATCC = American Type Culture Collection

(colección americana de cepas de referencia)

Conc. = Concentración.

DMSO = Dimetil sulfóxido

D. O. = Densidad óptica

FLC = Fluconazol

ITC = Itraconazol

INDRE = Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica

KTC = Ketaconazol

Lb = Libras

mL = Mililitro

MC = Miconazol

MIC = Concentración mínima inhibitoria

MOPS = Amortiguador ácido 3-[N- morpholino] propanosulfónico

m.o. = Microorganismo

NCCLS = National Committee For Clinical Laboratory Standard

(Comité nacional para la estandarización de laboratorios clínicos)

nm =Nanómetros

pH = Potencial de hidrógeno.

SSF = Solución salina fisiológica

UFC= Unidades formadoras de colonias

μg = Microgramos

μL = Microlitros

*T.mentagrophytes* = *Trichophyton mentagrophytes*

*T. rubrum*= *Trichophyton rubrum*

*T. tonsurans* = *Trichophyton tonsurans*

## 1. RESUMEN

---

Los derivados del ácido carbámico, son nuevos compuestos con propiedades antifúngicas. En este trabajo, se investigó la actividad *in vitro* de dieciocho derivados del ácido carbámico contra aislados clínicos de *Aspergillus fumigatus* y *Trichophyton mentagrophytes*, comparándolos con otros agentes antifúngicos. La actividad antifúngica, fue medida utilizando el método descrito en el documento M38-A del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). El compuesto LQM 667, fue uno de los agentes más potentes contra *Trichophyton mentagrophytes* (concentración mínima inhibitoria MIC 4µg/ mL), seguido de los compuestos LQM 938 (MIC 16µg/ mL), LQM 919 (MIC 32µg/ mL), LQM 451, LQM 914, LQM, LQM 996, LQM 901 (MIC 64µg/ mL) y el resto de los compuestos presentaron una MIC >128µg/ mL. El compuesto LQM 938, inhibió el crecimiento de *Aspergillus fumigatus* a una concentración de 68µg/ mL, siendo el único compuesto que presentó actividad inhibitoria del crecimiento ante este hongo. La actividad antifúngica, de los derivados del ácido carbámico fueron menores a la presentada por anfotericina B (AMB) y Ketaconazol (KTC). Basado en estos resultados, algunos derivados del ácido carbámico han presentado actividad antifúngica contra aislados de *Aspergillus fumigatus* y *Trichophyton mentagrophytes*, estos estudios clínicos son provechosos ya que podrían ser utilizados para futuros estudios en el análisis de estructura - actividad.

## 2. INTRODUCCIÓN

---

Desde la antigüedad las enfermedades por hongos, constituye un problema de salud pública en muchos países del mundo, estas infecciones se pueden presentar en cualquier tejido del cuerpo, sin embargo las principales son en piel y en pulmones.<sup>1</sup> Las primeras observaciones acerca de las enfermedades micóticas fueron realizadas por los griegos quienes las denominaron herpes, ya que estas se extendían en forma circular; así como por los romanos quienes las nombraron tiña que significa cualquier larva de insecto pequeño, relacionándolo con las infecciones de un grupo de insectos queratinófilos.<sup>2</sup>

La micología es la rama de la microbiología que se desarrolló primero. Con el descubrimiento del microscopio (Antonj van Leeuwenhoek) en el siglo XVII, se inicio el estudio de los hongos microscópicos junto con otros microorganismos. Pero, realmente la historia de la micología médica comenzó en 1835 con Angostino Bassi, de origen italiano y alumno de Lázaro Spallanzani (fundador de la biología moderna). A la par, de tantos acontecimientos importantes para la microbiología, comenzaba también la historia de los hongos estudiados en este trabajo.<sup>3</sup>

En 1729, el botánico florentino Pier H. Mitcheli describió por primera vez el género *Aspergillus*, que proviene del latín y que significa salpicar o asperjar, además lo incluyo en su obra "*Nova Plantarum Genera*".<sup>2</sup> Posteriormente, Fresenius es quien utiliza por primera vez el término aspergilosis en 1850, en su investigación de infección fúngica en el saco aéreo de un pájaro, denominando al microorganismo aislado como A.

*fumigatus*,<sup>2</sup> aunque la aspergilosis pulmonar ya había sido una enfermedad fúngica reconocida en el hombre y los animales, descrita en 1815 por Mayer y Emmert.<sup>3</sup> Después, en 1842 Bennett reconoció al *A. fumigatus* en la infección humana, pero fue Stuyter quien en 1847 describió la infección. Posteriormente en 1856, Virchow publicó un informe acerca de la enfermedad bronquial y pulmonar junto con la descripción exacta de los agentes etiológicos que permitían identificar al *A. fumigatus*. Ya en 1910 se habían descrito casi todas las formas de aspergilosis en animales incluyendo el aborto micótico y las enfermedades respiratorias, pero fue hasta 1952 cuando Monod, Cols y Hinson presentaron ejemplos de diversas manifestaciones clínicas de la enfermedad.<sup>2,3</sup> Uno de los primeros centros que estudiaron sistemáticamente los hongos relacionados con enfermedades, así como la forma alérgica y el tipo de colonización de la aspergilosis fue el laboratorio de la Universidad de Columbia.<sup>2</sup>

En 1837, Robert Remark, describió que la tiña era causada por un hongo al cual le dió el nombre de *Achorion schoenleinii* en honor a su maestro Shoenleinii, quien a su vez en 1839 estudio el hongo del favus.<sup>3</sup> Por estas circunstancias persiste la controversia acerca de quién es el fundador de la micología dermatológica. En 1845, Malmsten instituyó el género *Trichophyton*, más tarde en 1847, fue definido por Charles Robin y en 1853, publicó una recopilación de los primeros trabajos sobre dermatófitos en un libro llamado "*Histoire Naturelle des Végétaux Parasites*".<sup>4</sup> Sabouraud en 1890, comenzó a publicar sus estudios sistemáticos y científicos sobre las dermatofitosis, agrupándolos en un volumen llamado "*Las Teignes*" que publicó después en 1910, en donde incluyó un sistema de clasificación de los dermatófitos reconociendo tres

géneros: *Microsporum*, *Trichophyton* y *Epidermophyton*.<sup>2, 3</sup> Posteriormente Chester Emmons en 1934,<sup>2</sup> definió nuevamente a los dermatófitos de acuerdo con las reglas botánicas de nomenclatura y taxonomía.

En las últimas décadas se ha observado un aumento en el número y frecuencia de las micosis, situación que obligará a que en un futuro sea necesario un mayor control de las micosis.<sup>5</sup> Este incremento en las patologías ocasionadas por hongos, se debe principalmente al incremento en el número de pacientes inmunocomprometidos, ya sea como consecuencia de enfermedades como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA),<sup>6</sup> tratamientos oncológicos más activos; así como por el mayor número de trasplantes y de cirugías complejas que se realizan en la actualidad.<sup>7, 8, 9</sup> Entre los hongos que afectan a estos pacientes hay tanto patógenos primarios como oportunistas.<sup>10</sup> Las infecciones por *Malassezia furfur*, *Candida* y dermatófitos<sup>11</sup> son las más frecuentes en la piel, mientras que la histoplasmosis, criptococosis, coccidioidomicosis y aspergilosis son las infecciones con foco primario pulmonar más comunes.

Las múltiples enfermedades causadas por hongos se han clasificado de la siguiente manera. Tabla 1.

**Tabla 1. Clasificación de las micosis.**

Micosis superficiales	Dermatofitosis, Pitiriasis versicolor, Piedras, Tiña negra Oculomicosis, Otomicosis.
Micosis subcutáneas	Micetoma, Esporotricosis, Cromoblastomicosis, Lobomicosis
Micosis sistémicas	Coccidiomicosis, Histoplasmosis, Paracoccidioidomicosis Blastomicosis
Micosis por oportunistas	Candidiosis, Criptococosis, Cigomicosis, Aspergilosis
Enfermedades por actinomicetos y bacterias	Actinomicosis, Nocardiosis, Botriomicosis, Eritrasma Tricomosis axilar, Queratólisis punteada
Micosis raras	Rinoesporidiosis, Otras micosis y prototecosis

Clasificación tomada de "Micología medica Ilustrada" .<sup>3</sup>

Las infecciones de piel y anexos (micosis tegumentarias) continúan siendo las más frecuentes en la población.<sup>12</sup> La tiña en sus diferentes modalidades afecta a gran parte de la población.<sup>13</sup> La tiña de los pies y uñas predominan en forma importante, al igual que la candidosis.<sup>14</sup> Estas enfermedades son importantes porque aunque no amenazan la vida del paciente, son molestas y difíciles de eliminar. Los factores condicionantes predominantes son el uso prolongado de antimicrobianos y esteroides, diabetes mellitus,<sup>15</sup> traumatismo por arreglo de uñas, maceración del tegumento por agua u orina y las enfermedades de transmisión sexual.<sup>12, 13</sup>

Las micosis con foco primario pulmonar son más frecuentes que las ocasionadas por traumatismo.<sup>16</sup> La severidad de estas enfermedades están asociadas principalmente a la inhalación masiva del hongo en lugares confinados (cuevas, sótanos, casa abandonadas, etc) aunque también existen epidemias a campo abierto. Entre los patógenos más comúnmente aislados en pacientes con problemas pulmonares se encuentra el *A. fumigatus*, quien es causante de aspergilosis pulmonar.<sup>17</sup> La aspergilosis tiene una distribución geográfica amplia y afecta a numerosas personas y animales (principalmente mamíferos y aves).<sup>18</sup> En los rumiantes estos hongos causan procesos respiratorios, abortos, mastitis que afectan notablemente la industria ganadera.<sup>19</sup>

La importancia de los hongos fue retomada por Hopkins y Benham, quienes comenzaron el estudio científico de la micología médica.<sup>2</sup> Aunque la importancia del estudio de los hongos, radica no solamente por las enfermedades que causa en humanos, si no también por las que provoca en plantas y animales.<sup>20, 21, 22</sup> A pesar de que algunos hongos son causantes de enfermedades, la mayor parte de las más de 50 000 especies de hongos que existen son benéficas para la humanidad, ya que son imprescindibles para descomponer y reciclar la materia orgánica. Algunos hongos son útiles al ser humano al contribuir a la producción de alimentos, otros han servido como medicamentos al administrar metabolitos secundarios bioactivos (antibióticos) y como inmunodepresores.<sup>23, 24</sup>

El tratamiento de las enfermedades micóticas, se ha realizado desde el surgimiento de estas, en muchas ocasiones en forma empírica, usando remedios caseros lo cual alteraba la presentación de la lesión.<sup>4</sup> Al paso del tiempo, diferentes investigadores propusieron el uso de sustancias sintéticas, así como las derivadas de otros microorganismos.<sup>2, 3</sup> En 1958, se encontró que la griseofulvina<sup>21</sup> administrada oralmente en un cobayo, ayudaba a erradicar algunas infecciones causadas por dermatófitos.<sup>2</sup> Y en la actualidad se cuenta con diferentes antimicóticos sintéticos y derivados de microorganismos que ayudan al tratamiento de las micosis.<sup>3, 24</sup> Pero uno de los mayores problemas que se presentan con las enfermedades micóticas, es que el tratamiento en algunas ocasiones es prolongado, los fármacos empleados provocan efectos secundarios no deseados y en otras ocasiones son ineficaces.<sup>25</sup> Los fármacos clásicos para el tratamiento antimicótico siguen siendo algunos azoles como el ketoconazol (KTC) y miconazol (MC); así como el polieno anfotericina B (AMB).<sup>26, 27</sup>

La AMB es considerado actualmente como el mejor fármaco para el tratamiento primario de aspergilosis; aunque en varios estudios se ha reportado resistencia *in vitro*, lo cual hace que la terapia fracase, además la administración de este fármaco es limitada en pacientes inmunocomprometidos ya que provoca toxicidad.<sup>25</sup> Los azoles, son los compuestos más empleados en el tratamiento de enfermedades causadas por dermatófitos, sin embargo, algunos pacientes han presentado daño hepático principalmente causado por el KTC debido a los periodos prolongados de tratamiento; además, la resistencia que han presentado los hongos ante estos compuestos, limitan en algunos casos su uso.<sup>28</sup> El Itraconazol (ITC) otro derivado de los azoles, es el fármaco alternativo a la

AMB para pacientes que son inmunocompetentes, este ha presentado una buena actividad *in vitro* contra *A. fumigatus*, además ha sido empleado para el tratamiento de aspergiloma y aspergilosis crónica.<sup>29</sup> Sin embargo, en estudios realizados, se encontró resistencia *in vitro* de aislados de pacientes que fueron tratados previamente con ITC <sup>30</sup> esto probablemente se deba a la diversidad genética de *A. fumigatus*, que es sumamente importante y las variaciones genéticas de los aislados al ser cultivados.

Con la situación actual y las perspectivas en los antimicóticos, surgió la necesidad de nuevos fármacos antifúngicos y el interés se ha centrado sobre todo en el desarrollo de compuestos más efectivos <sup>31, 32</sup> y menos tóxicos que los clásicos. Los derivados del ácido carbámico, son nuevos compuestos que se están estudiando para encontrar una posible actividad antimicótica frente a hongos filamentosos. Para poder realizar las pruebas de susceptibilidad se necesitan métodos que sean capaces de medir la susceptibilidad de estos hongos y que presenten reproducibilidad *in vitro*. Estos métodos han sido estandarizados,<sup>33</sup> sin embargo son limitados por el tiempo que requiere para cuantificar el crecimiento micelial, que es de entre 48 y 72 horas. El documento NCCLS M-38P,<sup>34</sup> método utilizado en este trabajo, describe la susceptibilidad a derivados de ácido carbámico midiendo la viabilidad y crecimiento de los conidios en un medio líquido por medio de la turbidez.

## 2.1. MICOSIS CAUSADAS POR *Trichophyton mentagrophytes*

Dentro de las micosis cutáneas se encuentran las micosis causadas por los dermatófitos, hongos que solo infectan tejidos queratinizados superficiales como la piel, pelo y uñas; y que consiste de un grupo de casi 40 hongos interrelacionados que pertenecen a los tres géneros: *Microsporum*, *Trichophyton* y *Epidermophyton*.<sup>35</sup> Las infecciones causadas por dermatófitos se encuentran entre las más comunes en el mundo; y aunque pueden ser prevalentes y problemáticas, no son debilitantes ni ponen en riesgo la vida.

Los dermatófitos se clasifican como geófilos, zoófilos y antropófilos, según su hábitat usual, sea el suelo, animales y humanos.<sup>10</sup> La especie antropófila causa el mayor número de infecciones en los humanos. Estas infecciones son relativamente débiles y crónicas, que producen pocos conidios en cultivos y a veces son difíciles de erradicar.<sup>2, 3, 4</sup> Los dermatófitos se adquieren por contacto de suelo contaminado, de humanos infectados y de animales. Las dermatofitosis son muy comunes en animales domésticos como: el perro y el gato.<sup>36, 37</sup>

Algunas especies antropófilas están geográficamente restringidas, pero otras se encuentran en todo el mundo como es el caso de *T. mentagrophytes*.<sup>38, 39</sup> De ahí la importancia de su estudio.

### 2.1.1. Morfología e identificación.

El *T. mentagrophytes* se identifican por la forma de su colonia y su morfología microscópica después de dos semanas de crecimiento a 25°C sobre agar dextrosa Sabouraud (ADS).<sup>40, 41, 42</sup>

**a. Morfología microscópica:** Los microconidios en cultivos polvorientos son muy redondos, algunas veces presenta hifas septadas con macroconidias (4-8 x 20- 50µm); y se encuentran más fácilmente en cultivos jóvenes de 5 a 10 días de cultivado.<sup>42</sup> Fig. 1.

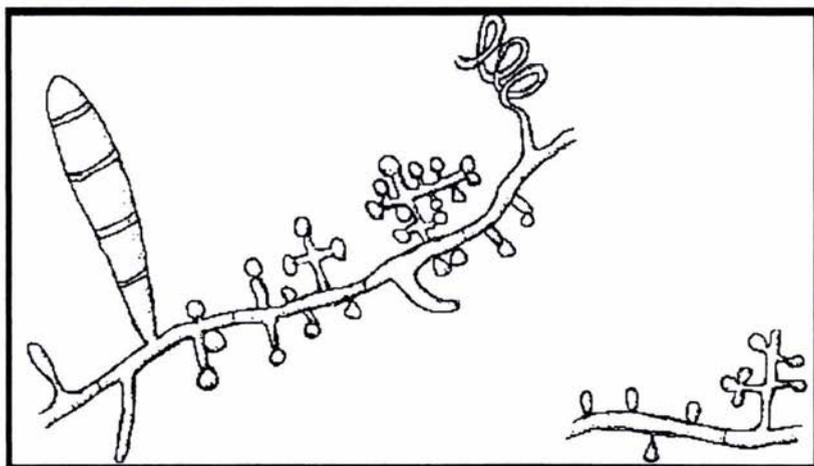


Fig. 1 Imagen de las macroconidias de *T. mentagrophytes*.<sup>42</sup>

**b. Morfología macroscópica:** Son variadas y grandes: su superficie puede ser de color blanca vellosa o algodonosa, con presencia de hendiduras radiales. Presenta un color amarillo en la parte de abajo del cultivo cuando este es viejo y despide un aroma característico.<sup>42</sup> Fig. 2.



**Fig. 2** Fotografía de la macromorfología de *T. mentagrophytes*

### **2.1.2. Factores de patogenicidad**

Durante la infección, las paredes celulares fúngicas de *T. mentagrophytes* han sido un importante factor de patogenicidad.<sup>43</sup> Los componentes de las paredes celulares, median la adherencia del hongo a las células huésped y pueden liberar antígenos inmunodominantes que pueden inducir una respuesta inmune, incluyendo la producción de anticuerpos útiles para el diagnóstico. Las paredes celulares del hongo están conformadas principalmente por capas de carbohidratos, cadenas largas de polisacáridos, glucoproteínas y lípidos. Los polisacáridos de la pared celular pueden activar la cascada del complemento y provocar una reacción inflamatoria; además de que son escasamente degradados por el huésped y se pueden detectar con colorantes especiales.

Muchas especies de *T. mentagrophytes* han desarrollado queratinasas, elastasas y otras enzimas que les permiten ser muy específicas del huésped,<sup>44</sup> además la producción de esporas también es considerado un factor de patogenicidad importante.

### **2.1.3. Datos clínicos.**

Los agentes más comunes relacionados con formas clínicas particulares de infecciones causadas por *T. mentagrophytes* se presentan en el Tabla 2.

**Tabla 2. Algunos agentes clínicos de las infecciones causadas por *T. Mentagrophytes***

<b>Enfermedad de la piel</b>	<b>Localización de las lesiones</b>	<b>Aspecto clínico</b>	<b>Hongo causante *</b>
<b><i>Tinea pedis</i></b> (pie de atleta)	Espacios interdigitales de los pies en personas que usan zapatos	Aguda. Prurito, vesículas eritematosas. Crónica: prurito, descamación fisuras	<b><i>Trichophyton mentagrophytes</i></b>
<b><i>Tinea cruris</i></b> (comezón de jinete)	Ingle	Lesión eritematosa descamativa en áreas intertriginosas. Pruriginosa	<b><i>Trichophyton mentagrophytes</i></b>
<b><i>Tinea capitis</i></b>	Pelo de la piel cabelluda. Endotrix: hongos dentro del cabello. Ectotrix: hongos en la superficie del cabello	Placas de alopecia areata con cabellos de tallos cortos o cabellos rotos en los folículos pilosos. Querión raro. Pelos fluorescentes por infección con <i>Microsporum</i>	<b><i>Trichophyton mentagrophytes</i></b>
<b><i>Tinea barbae</i></b>	Vello de la barba	Lesión eritematosa, edematosa	<b><i>Trichophyton mentagrophytes</i></b>
<b><i>Tinea unguium</i></b> (onicomicosis)	Uña	Uñas distalmente engrosadas o quebradizas; alteraciones del color deslustradas. Habitualmente acompañadas de tinea pedis	<b><i>Trichophyton mentagrophytes</i></b>

\*También puede ser causada por *Trichophyton Rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* *Epidermophyton floccosum* y *M. Canis*.<sup>2</sup>

***Tinea pedis* (tiña del pie; pie de atleta).** La *tinea pedis* es la más prevalente de todas las dermatofitosis.<sup>45, 46, 47</sup> Se presenta como una infección crónica en los pliegues interdigitales del pie.<sup>4</sup> Otras variedades son los tipos vesicular y ulceroso, con hiperqueratosis en la planta del pie. Inicialmente hay prurito entre los dedos de los pies y presencia de pequeñas vesículas que al romperse dejan salir líquidos.<sup>1, 2</sup> La piel de los pliegues interdigitales del pie se maceran y descaman; en esos sitios aparecen grietas susceptibles al desarrollo de infección bacteriana secundaria.<sup>48</sup> Cuando la infección micótica se hace crónica, la descamación y el agrietamiento de la piel son las principales manifestaciones, acompañadas por el dolor y el prurito.<sup>49</sup>

***Tinea unguium* (tiña de las uñas, onicomicosis).** Las infecciones de las uñas pueden ser subsecuentes a una *tinea pedis* prolongada.<sup>39</sup> Con la invasión por hifas las uñas se vuelven amarillentas, quebradizas, engrosadas y friables. Pueden estar afectadas una o más de los pies.<sup>50</sup>

***Tinea corporis* (tiña del cuerpo), *tinea cruris* (tiña de la ingle) y *tinea manus* (tiña de las manos).** La dermatofitosis de la piel lampiña comúnmente da lugar a lesiones tiñosas anulares, con un centro escamoso sin vello, rodeado por un borde rojizo creciente que puede ser seco o vesiculoso. El dermatófito sólo crece en el tejido muerto queratinizado, pero los metabolitos, las enzimas y los antígenos de los hongos se difunden a través de las capas viables de la epidermis para causar eritema, formación de vesículas y prurito. Las lesiones se expanden en dirección centrifuga y en la periferia es donde más frecuentemente se obtiene material para diagnóstico, debido al crecimiento activo de las hifas. La penetración en el

estrato córneo recién formado de las superficies gruesas (plantar y palmar) explican la infección persistente en esos sitios. Cuando la infección se presenta en la región inguinal se le denomina *tinea cruris* o comezón de jinete.<sup>51</sup> La mayor parte de estas infecciones afectan a los varones, y se presentan como lesiones secas y pruriginosa que con frecuencia se inician sobre el escroto y se propagan a la ingle. La *tinea manus* se refiere a las lesiones de las manos o de los dedos; en la cuales las lesiones escamosas y secas pueden afectar una o ambas manos, así como uno, o más dedos.<sup>39</sup>

***Tinea capitis* (tiña de la cabeza) y *tinea barbae* (tiña de la barba).** Es la dermatofitosis o tiña de la piel de la barba y de los cabellos.<sup>52, 53, 54,55,</sup>  
<sup>56</sup> La infección se inicia con invasión de hifas sobre la piel cabelluda con propagación subsecuente hacia la pared queratinizada del folículo piloso.<sup>57</sup> La infección produce placas circulares de color gris oscuro de alopecia, descamación y prurito, con forme el cabello crece por fuera del folículo.<sup>58</sup>

#### 2.1.4. Epidemiología.

La distribución y frecuencia de los distintos tipos de dermatofitosis y sus agentes causales varía notablemente según la región geográfica y el nivel socioeconómico de la población.<sup>59, 60, 61</sup> Estas infecciones se inician en la piel después de un traumatismo o por contacto. Hay evidencia de que la susceptibilidad del huésped puede ser incrementada por la humedad, el calor, la química específica de la piel, la composición de la grasa y la transpiración, la edad joven, la exposición intensa y la predisposición genética (un ejemplo característico es *T. violaceum* en

judíos y otros pueblos semitas, y *Microsporium ferrugineum* en chinos del norte, coreanos y japoneses).<sup>62</sup>

La incidencia es más alta en climas húmedos y cálidos, así como en condiciones de hacinamiento. El uso del calzado suministra calor y humedad condiciones para las infecciones de los pies. La fuente de infección es el suelo o un animal infectado en caso de los dermatófitos geófilos y zoófilos respectivamente. El conidio puede permanecer viable durante tiempo prolongado, las especies antropófilas se pueden transmitir por contacto directo o indirecto a través de fómites como toallas y ropa contaminada, también por compartir baños de regadera y ejemplos similares.

#### **2.1.5. Pruebas diagnósticas de laboratorio.**

**Reacción tricofitida.** En el curso de la dermatofitosis la persona puede demostrar dermatofitosis y mostrar hipersensibilidad a los constituyentes o productos del hongo y desarrollar manifestaciones alérgicas, generalmente vesículas denominadas dermatofitides en cualquier parte del cuerpo, aunque con mayor frecuencia las manos. La prueba de tricofitina en la piel es fuertemente positiva en estas personas. La tricofitina es una preparación cruda de antígeno que se puede emplear para detectar la hipersensibilidad inmediata o tardía a los antígenos dermatofíticos.<sup>63</sup> Muchos pacientes quienes desarrollan infecciones dermatofíticas crónicas no inflamatorias muestran insuficiencia en la respuesta inmunitaria inducida por antígenos dermatofíticos. Estos pacientes con frecuencia son atópicos y presentan respuestas de

hipersensibilidad de tipo I. La inmunidad a los dermatofitos varía en cuanto a duración y grado según el huésped, así como por el sitio y la especie del hongo causante de la infección.<sup>4</sup>

La muestra consiste en raspados de la piel y uñas, además de cabellos arrancados en las áreas afectadas, y se procede a realizar el examen microscópico, donde la muestra se coloca sobre un portaobjetos en una gota de hidróxido de potasio de 10 a 20 %, con o sin blanco calcofluor, que es un colorante inespecífico de la pared de las células fúngicas cuando se observa con microscopio de fluorescencia. Se coloca un cubreobjetos y en seguida se examina la muestra, lo cual se repite después de 20 min. Cualquiera que sea la especie infectante, se observan hifas o cadenas ramificadas de artroconidios (artrosporas) en piel o uñas en los cabellos.

Para identificar las especies de dermatofitos se requiere cultivo, las muestras se inoculan sobre agar inhibidor de moho o agar sabouraud con cicloheximida o cloramfenicol<sup>64</sup> para suprimir el crecimiento de mohos y bacterias, se incuban de 1 a 3 semanas a temperatura ambiente, y se examinan además cultivos en portaobjetos (microcultivo) si es necesario. Las especies cambian con base en la morfología de las colonias (tasa de crecimiento, textura de la superficie, y cualquier pigmentación), la morfología microscópica (macroconidios, microconidios) y, algunos casos los requerimientos nutrimentales.

### 2.1.6. Tratamiento.

La terapia consiste, en la eliminación completa de las estructuras epiteliales infectadas y muertas, y la aplicación de una sustancia tópica antimicótica. Para prevenir la reinfección, el área debe mantenerse seca y evitar las fuentes de infección como mascotas infectadas o compartir las instalaciones de baño.<sup>65</sup>

***Tinea capitis.*** Se trata con griseofulvina<sup>66</sup> durante 4 a 6 semanas. Los lavados frecuentes del cabello con champú y el miconazol crema u otros antimicóticos tópicos,<sup>67</sup> que pueden ser eficaces si se emplean durante semanas.<sup>68</sup> Alternativamente, el KTC, el ITC y la Terbinafina.<sup>69 70, 39</sup>

***Tinea corporis, Tinea pedis e infecciones relacionadas.*** Los fármacos más eficaces son el ITC y la Terbinafina.<sup>71</sup> Sin embargo, se pueden emplear algunas preparaciones tópicas<sup>72</sup> como el nitrato de miconazol, el tolnaftato y el clotrimazol.<sup>73, 74</sup> Cuando se aplican al menos durante 2 a 4 semanas la tasa de curación por lo general es de 70 a 100 %. El tratamiento debe continuarse durante 1 a 2 semanas después de la desaparición de las lesiones. En los casos problemáticos se pueden administrar un breve ciclo de griseofulvina oral.<sup>39</sup>

***Tinea unguium.*** Las infecciones de las uñas, son las más difíciles de tratar, con frecuencia requieren la administración de ITC o Terbinafina por vía oral durante varios meses y también la extirpación quirúrgica de la uña. Son comunes las recaídas.<sup>39, 75</sup>

## **2.2. MICOSIS CAUSADAS POR *A. fumigatus*.**

La aspergilosis constituye un grupo de enfermedades producidas por *Aspergillus* y es la infección micótica oportunista más frecuente del pulmón, siendo la segunda causa más frecuente de enfermedad micótica sistémica. Las especies del género *Aspergillus* se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, siendo saprófitos ubicuos. El *A. fumigatus* es el patógeno más común, pero muchos otros estudios incluyendo al *A. flavus*, *A. niger*, y *A. terreus* que también pueden causar enfermedad. Este género produce abundantes conidios pequeños que forman aerosoles con facilidad, por lo que el hombre se encuentra expuesto a su inhalación. La inhalación de los conidios por individuos inmunocompetentes, raramente tiene un efecto adverso, ya que son eliminados con relativa eficiencia por los mecanismos de inmunidad innata. En los pacientes inmunodeficientes e inmunocomprometidos, la situación es diferente, sobre todo aquellos con leucemia, trasplante de médula ósea y personas a quien se administran corticosteroides, los conidios pueden germinar para producir hifas que invaden los pulmones y otros tejidos.<sup>76</sup>

### **2.2.1. Morfología e identificación.**

Las especies de *Aspergillus* crecen con rapidez, producen hifas aéreas que poseen estructuras conidiales características. Las especies se identifican según sus diferencias morfológicas.<sup>77</sup>

a. **Morfología microscópica.** Todas las especies de *Aspergillus*, se caracterizan por presentar conidióforos cortos y lisos,<sup>42</sup> que se expanden en grandes vesículas hacia el extremo y que están cubiertas por fiálides; estas pueden originarse directamente de la vesícula y dirigirse hacia arriba produciendo largas cadenas de conidios que puede ser de coloración ligeramente verde o parda, sobre todo en la parte superior, cerca de la vesícula. Las especies se identifican primariamente sobre la base de las estructuras conidiales, el tamaño, color y forma del conidióforo, conidios y las fiálides ver Fig. 3.

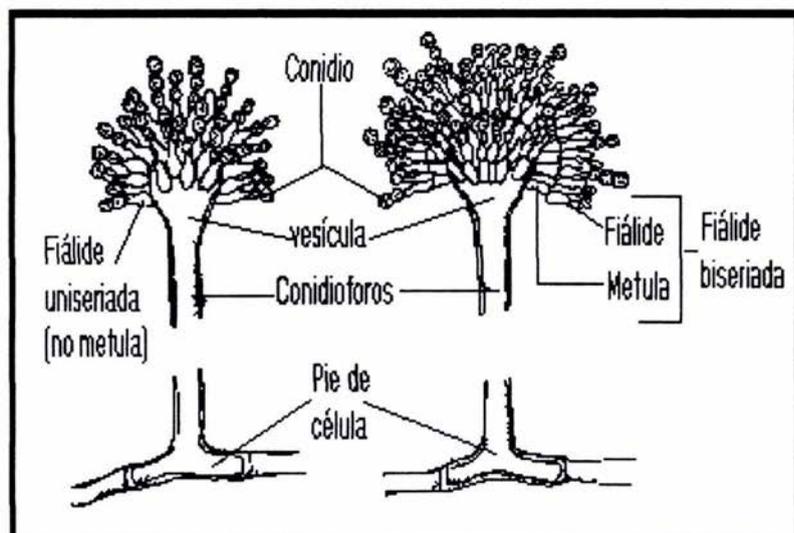
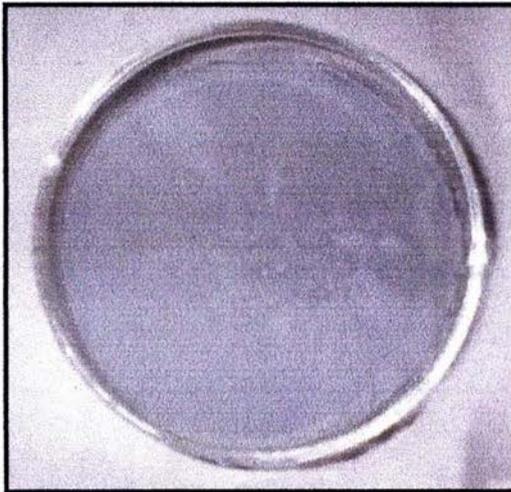


Fig. 3 Imagen de las macroconidias de *A. Fumigatus*.<sup>42</sup>

**b. Morfología macroscópica.** El microorganismo produce una colonia plana, blanca, que en forma rápida se vuelve gris verdosa al ocurrir la producción de conidios. En general el reverso del cultivo es incoloro. Morfología microscópica: conidióforos cortos aproximadamente menores a 300 micrómetros. <sup>42</sup> Fig.4.



**Fig. 4 Fotografía de la morfología macroscópica de *A. Fumigatus*.**

### 2.2.2. Factores de Patogenicidad

Entre los factores de patogenicidad se encuentran: los conidios, su pequeño tamaño permite que sean aspirados y que puedan causar infección en el pulmón y en los senos paranasales; además su capacidad de crecer a 37 °C hace idóneo el afectar al humano, también posee una gran capacidad de adherencia a superficies epiteliales y posiblemente endoteliales y una tendencia a invadir los vasos sanguíneos, así como la producción de un gran número de productos extracelulares tóxicos para las células de los mamíferos (elastasa, restrictocina, fumigatoxina entre otras).<sup>78</sup> La actividad de la enzima elastasa producida por este hongo, es importante por que constituye un componente importante de las proteínas pulmonares totales y el *A. fumigatus* tiene una conocida actividad elastasa. Pero hay otras proteasas importantes como: mitogilina con actividad citotóxica, una metaloproteasa con actividad residual colagenolítica, un galactomannano, una proteína similar a las del *heat shock* y factores cilioinhibidores. Sin embargo, todavía no se han elucidado los determinantes moleculares incluidos en la virulencia del patógeno oportunista.<sup>79</sup>

### 2.2.3. Datos clínicos.

Es importante reconocer que *Aspergillus fumigatus* puede ser un colonizador, causar enfermedad alérgica, infección local o ser responsables de cuadros invasivos de gran gravedad.

**Tabla 3. Clasificación de aspergilosis.**

<p>Procesos inmunoalérgicos</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA)</li> <li>❖ Granulomatosis Broncocéntrica</li> <li>❖ Saprofitismo: Aspergiloma (micetoma, fungus ball)</li> </ul>
<p>Formas invasivas</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Aspergilosis invasiva</li> <li>❖ Aspergilosis angioinvasiva</li> <li>❖ Aspergilosis semiinvasiva</li> <li>❖ Aspergilosis diseminada</li> <li>❖ Otras formas de aspergilosis pulmonar. (en SNC, corazón y otros órganos.</li> </ul>

Clasificación tomada de "ACTA MÉDICA 2000".<sup>80</sup>

**Enfermedad pulmonar.** La aspergilosis constituye la infección micótica oportunista más frecuente del pulmón, es la segunda causa más frecuente de enfermedades micóticas sistémicas. La diversidad de cuadros clínicos a que da lugar la aspergilosis pulmonar se puede agrupar en: **procesos inmunoalérgicos, saprofitismo y formas invasivas.**<sup>80</sup>

**Procesos inmunoalérgicos.** Esta aspergilosis es consecuencia de una reacción de hipersensibilidad a las esporas inhaladas de *Aspergillus* o a focos de endógenos existentes. Se observa en individuos asmáticos o individuos con una base atópica. Se caracteriza por episodios recurrentes de asma bronquial, eosinofilia en sangre y esputo, infiltrados pulmonares fijos o cambiantes y *test* cutáneo para *Aspergillus* positivo. Se desencadenan reacciones inmunoalérgicas de tipo I, II y III. Los pacientes se

quejan de tos, disnea, y expectoran tapones mucosos en forma de moldes bronquiales, donde se puede aislar el hongo. Puede haber fiebre, astenia y pérdida de peso. A veces hay presencia de dolor torácico por reacción pleural.<sup>80</sup>

**Granulomatosis broncocéntrica.** Esta aspergilosis representa una forma de progresión de la aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA). Se produce en individuos con las mismas características descritas para ABPA, hay eosinofilia y *test* cutáneo positivo. La respuesta granulomatosa al *Aspergillus* y los aspergilomas en las paredes de las ectasias bronquiales, producen ruptura por necrosis de la pared bronquial.<sup>80</sup>

**Saprofitismo: Aspergiloma (Micetoma, fungus ball).** Constituye la llamada forma saprofitica o de colonización. La formación del Micetoma o bola de hongos es consecuencia del desarrollo de colonias de *Aspergillus* dentro de una magma de fibrina y moco en cavidades pulmonares. Un micetoma consiste en una masa de material amorfo de hifas septadas entrelazadas, vivas y muertas, moco, sangre, células inflamatorias, epiteliales y restos celulares (detritus) ocupando una cavidad comunicada con el árbol bronquial, siendo usualmente localizada. La masa micelial puede encontrarse libre dentro de la cavidad o estar adherida a la pared por tejido inflamatorio. Los síntomas más importantes son tos persistente, hemoptisis (aparece en aproximadamente el 10 % de los pacientes siendo potencialmente fatal), disnea, fatiga y pérdida de peso; existiendo además los correspondientes a la enfermedad subyacente aunque algunos pacientes son asintomáticos.<sup>81</sup> Entre las patologías más frecuentes en las cuales se presenta y predispone al desarrollo del aspergiloma, es la

tuberculosis,<sup>81</sup> la cual se cuenta en las 2/3 partes de los casos, existiendo otras patologías que condicionan también la formación de cavidades, como la sarcoidosis, artritis reumatoide, colitis ulcerativa, fibrosis post-radiación, absceso pulmonar, bronquiectasias, fibrosis pulmonar idiopática, quistes bronquiales, histoplasmosis, blastomicosis, cardiopatías congénitas cianosantes, infarto pulmonar, aspergilosis broncopulmonar alérgica y más raramente, aspergilosis invasiva.<sup>80, 82</sup>

**La incidencia de sinusitis micótica.** Ha retomado importancia principalmente en Europa, debido a la presencia del Aspergiloma asintomático del seno frontal. La Sinusitis micótica puede clasificarse en cuatro categorías: Fulminante aguda (invasión micótica vascular, isquemia trombótica) Invasora crónica (extensa proliferación de hongos con invasión de tejido regional), colonización no invasora (conocido como micetoma o bola de hongos) y alérgica (infección que aparece en individuos atópicos).

**Formas invasivas.** Son las más graves y ocurren en pacientes inmunodeprimidos.

**Aspergilosis invasiva.** Es una infección nosocomial, que se produce por la inhalación de esporas o por heridas o catéteres infectados.<sup>83</sup> Los hospederos más frecuentes son aquellos con inmunosupresión e inmunocomprometidos (leucemia linfocítica o mielógena, linfoma, receptores de transplante de médula ósea y en especial a las personas que se les administran corticoides). Los síntomas incluyen fiebre, tos, disnea y hemoptisis. Las hifas invaden la luz y las paredes de los vasos sanguíneos y causan trombosis, infarto y necrosis. Desde los pulmones la

enfermedad se puede propagar al aparato gastrointestinal, riñón, hígado, cerebro u otros órganos; produciendo abscesos y lesiones necróticas. Sin tratamiento oportuno el pronóstico de los pacientes con aspergilosis invasiva, es grave. Las personas con enfermedad subyacente menos comprometedoras pueden desarrollar aspergilosis pulmonar necrosante crónica, una forma de enfermedad más leve.<sup>80</sup>

**Aspergilosis angioinvasiva.** Se producen los mismos síntomas que en la aspergilosis invasiva, pero con mayor daño de parénquima pulmonar que se va a caracterizar por trombosis e infartos pulmonares. Hay fiebre, tos, disnea y dolor pleural. La evolución de esta enfermedad es fatal, y presenta la más alta mortalidad.<sup>80</sup>

**Aspergilosis semiinvasiva.** Corresponde a la antes denominada crónica necrotizante y se va a producir en formas menos severas de inmunodepresión, como el alcoholismo o en quienes existe un daño pulmonar previo (tuberculosis antigua, enfisema, sarcoidosis). Los síntomas son tos, expectoración y pérdida de peso. Evoluciona en meses, y excepcionalmente participa todo un pulmón, la hemoptisis es rara en estos casos.<sup>80</sup>

**Aspergilosis diseminada.** Expuesta como parte de la evolución en la forma invasiva, por concepto es denominada cuando se demuestra la fungemia (hemocultivo positivo a *Aspergillus*) o cuando están afectados dos o más órganos no contiguos.<sup>80</sup>

#### **2.2.4. Epidemiología.**

Personas con riesgos de enfermedad alérgica o de aspergilosis invasiva se deben evitar la exposición a conidios de especies de *Aspergillus*. En la mayor parte de las unidades de trasplante de médula ósea se emplean sistemas de aire acondicionado filtrado, vigilancia de la contaminación atmosférica en la habitación de los pacientes, restricción de visitas y otras medidas instituidas para aislar a los pacientes y reducir al mínimo el riesgo de exposición a conidios de *Aspergillus* y otros hongos. A los pacientes en riesgo de aspergilosis invasiva se les administra AMB o ITC en pocas dosis profilácticas. Actualmente se estudia la epidemiología molecular aplicada a la detección de brotes de la aspergilosis nosocomial.<sup>83</sup>

#### **2.2.5. Pruebas diagnósticas de laboratorio.**

Las muestras son tomadas del aparato respiratorio. Las muestras de sangre no son útiles. Se realiza un examen microscópico directo del esputo con KOH o calcofluor blanco; así como en los cortes histológicos, observando hifas hialinas y septadas, de anchura uniforme (casi 4  $\mu\text{m}$ ) y con ramificaciones (dicotomizadas). Se debe examinar esputo fresco en busca de hifas tabicadas, ramificadas de ancho uniforme (4.7  $\mu\text{m}$ ). El esputo puede contener escasos filamentos o tapones de micelio. En los bronquios, el *Aspergillus* puede producir hifas aéreas y conidióforos característicos y en los cortes de tejido, a menudo se ven hifas en vasos sanguíneos con disposiciones paralelas con ramificaciones dicotómicas en ángulo agudo.<sup>77</sup> También se pueden formar conidios en el espacio aéreo

asociados con un aspergiloma. Las hifas verdaderas halladas en la aspergilosis no deben confundirse con las células levaduriformes, hifas y pseudohifas asociadas con la candidiasis invasiva.

Para el cultivo de las especies de *Aspergillus* se pueden utilizar muchos medios de rutina, pero no deben emplearse medios con cicloheximida. Las colonias en desarrollo producen micelios de superficie en pocos días y se pigmentan a medida que se desarrollan conidios. Muchas especies se identifican por su morfología.<sup>77</sup> Dado que las especies de *Aspergillus* son contaminantes comunes, a menudo se cuestiona el resultado positivo de un cultivo.

La aspergilosis pulmonar alérgica activa, aspergiloma y otras colonizaciones locales pueden diagnosticarse por examen directo y/o cultivos repetidamente positivos, a menudo puros. Sin embargo, el examen directo de esputo y cultivo de esputo o sangre habitualmente son negativos en la aspergilosis invasiva. Por ende un solo cultivo en un paciente comprometido puede ser altamente significativo. Se ha aconsejado intensificar los esfuerzos diagnósticos en caso de pacientes con leucemia, leucopenia e infiltrados pulmonares. Estos esfuerzos incluyen aspiración transtraqueal, biopsia por cepillado bronquial, o biopsia de pulmón por toracotomía, en pacientes que pueden tolerar estos procedimientos.<sup>84</sup> Las muestras de elección para la aspergilosis invasiva son la biopsia, los aspirados de lugares estériles.

Algunas veces pueden emplearse las respuestas inmunológicas detectadas luego de exposición a *Aspergillus* para clarificar la enfermedad,

diagnostico y pronostico.<sup>85</sup> En pacientes con aspergilosis bronquiopulmonar alérgica pueden detectarse anticuerpos IgE específicos para *Aspergillus fumigatus* con la prueba de radioalergenoabsorción. El diagnóstico serológico de la aspergilosis invasiva se basa en la detección de antígenos circulantes de *Aspergillus* en diferentes muestras clínicas (suero, orina), esta prueba serológica detecta galactomananos circulantes derivados de la pared celular.

La Tomografía computarizada; ayuda al diagnóstico del aspergiloma, que puede también ser confirmado después de la extirpación quirúrgica de la muestra o asociando los hallazgos anteriores con los estudios bacteriológicos o serológicos.<sup>85</sup> Desde el punto de vista broncoscópico, podemos observar compromiso de la pared de las cavidades en forma irregular, por la presencia del hongo o presencia de la bola de hongos característica dentro de una cavidad cuyo estudio, ya sea por lavado o biopsia directa de la lesión, es altamente positivo para *Aspergillus*.<sup>86</sup>

#### **2.2.6. Tratamiento.**

Para la aspergilosis broncopulmonar alérgica y granulomatosis broncocéntrica. No se utilizan antifúngicos, excepto cuando hay que tratar focos endogenos (sinusitis, micetomas). Es importante evitar la reexposición a los ambientes donde son inhaladas las esporas del hongo. Se prescribe el uso de esteroides, también son beneficiosos los broncodilatadores, el drenaje postural y la fisioterapia respiratoria.<sup>87</sup>

El aspergiloma se trata con AMB y cirugía. Para la aspergilosis invasiva se debe administrar AMB con prontitud.<sup>88</sup> También se han empleado ITC y flucitosina<sup>89</sup> y la combinación de diferentes antifúngicos que han dado respuestas no muy satisfactorias.<sup>90</sup> Las variedades alérgicas de la aspergilosis se tratan con corticosteroides o cromoglicato disódico.

Para la aspergilosis invasiva y diseminada, el medicamento de elección es la anfotericina B. Los triazoles también se indican de manera profiláctica en los pacientes inmunodeprimidos. La combinación de antifúngicos con la cirugía<sup>82</sup> ha mejorado la supervivencia de los pacientes con aspergilosis invasiva.

### **2.3. ANTIFÚNGICOS EMPLEADOS EN EL TRATAMIENTO DE MICOSIS.**

Existe un número limitado, pero creciente de antifúngicos que pueden emplearse para tratar las enfermedades micóticas. Casi todos tienen una o más limitaciones, como sus efectos adversos intensos, el espectro antimicótico reducido, la escasa penetración a ciertos tejidos y la capacidad de inducir la selección de hongos resistentes.<sup>91, 92, 93, 94</sup> En la actualidad se intenta desarrollar nuevos fármacos prometedores, y algunos otros se evalúan en experiencias clínicas.<sup>95, 96, 97, 98, 99</sup> Es difícil encontrar blancos adecuados en los hongos puesto que, al igual que el hombre, los hongos son eucariotas. Muchos de sus procesos celulares y moleculares son similares y con frecuencia hay una amplia homología en genes y proteínas.

La evolución en el tratamiento ha pasado desde el empleo de metales pesados como el yodo potásico, metaloides y metales azufrados, sulfonamidas hasta los primeros antibióticos antifúngicos, como la griseofulvina, nistatina, anfotericina B. Tabla 4.

**Tabla 4. Agentes antifúngicos<sup>3</sup>**

Agentes físicos	Radiaciones: Rayos UV ( 2 000 a 1 800 °A), Rayos X. Ultrasonido Temperatura ( calor de más de 40 ° C)		
Agentes químicos	Antiguos	Sistémicos	Sulfonamidas, Sulfonas Diamidinas aromáticas Estilbamidina, Pentamidina Propamidina Yoduro de potasio.
		Tópicos	Metales pesados (Hg, Ag, Cu, Zn) Halógenos (I, Cl, Br) Alcoholes y fenoles Hipoclorito de sodio a 20%. Disulfuro de Selenio Derivados del ácido benzoico, Ungüento de Whitfield, ácidos grasos, ácido undecilénico, álcalis, bicarbonato de sodio, colorantes, violeta de Genciana, fucsina, verde brillante, alilaminas, tolnaftato, tolciclato, pirrolnitrina, piritione de zinc.
	Modernos	5- Fluorocitosina (sistémico) Imidazoles (tópicos y sistémicos) Alilaminas ( tópicas y sistémicas)	
Antibióticos producidos por m.o	Por hongos	Griseofulvina	
	Por actinomicetos	Derivados poliénicos	Anfotericina B
		Nistatina	
	Saramicetina ( no disponible)		
Por mycobacteriales	Ambruticina		

La clase de fármacos disponibles en la actualidad incluyen los polienos (AMB y nistatina), que se unen al ergosterol en la membrana celular; la flucitosina, un análogo de la pirimidina; los azoles y otros inhibidores de la síntesis ergosterol; la griseofulvina que interfiere con el ensamblado de los microtúbulos.<sup>79</sup> Se investigan los inhibidores de la síntesis de la pared celular, como la nicomicina que inhibe la síntesis del beta glucano. Tabla 5.

**Tabla 5. Antifúngicos más comunes en las micosis.** <sup>3</sup>

FAMILIA	SUSTANCIAS REPRESENTATIVAS
Polienos	Anfotericina B, Nistatina, Tricomicina, Filipina, Candidina.
Análogos precursores de ácidos nucleicos	5 – fluorocitosina.
<i>Azoles (imidazoles)</i>	Bifonazol, ketoconazol, fluconazol, miconazol, Tioconazol, Sertaconazol, Flutrimazol, Eberconazol, Isoconazol, Fenticonazol, Omoconazol, Sulconazol, Oxiconazol, Croconazol, y otros.
Antisépticos o desinfectantes	Tintura de yodo, Pomada de Witfield, Permanganato de potásico, Cloruro de aluminio, Ácido salicílico, Pomada de Drew, Propionato sódico, Undecilato de Zinc, Tintura de Castellani, Violeta de genciana, Quinoleina halogenada, sulfato de cobre, Ácido undecilénico.
Lipopéptidos	Xilocandinas, Equinocandinas, Esporofungina, Aculeacina A, Cilofungina.
Alilamidas	Naftifina, Terbinafina.
Nucleósidos	Polioxima, Tunicamicina, Nicomicina
péptidos	Amorolfina
Derivados de la morfolina	Amorolfina
Derivados de la piridona	Ciclopiroxolamina
Derivados del benzofurano	Griseofulvina
Otros antifúngicos de clasificación diversa	Alicina, Micolasas, SCH 40873, Oligómeros fenólicos, Estramineofungina, Flavovirina, Cispentatina, Bacilisina, Papulacandinas Benanomicinas, Histona HI, Restricticina, etc

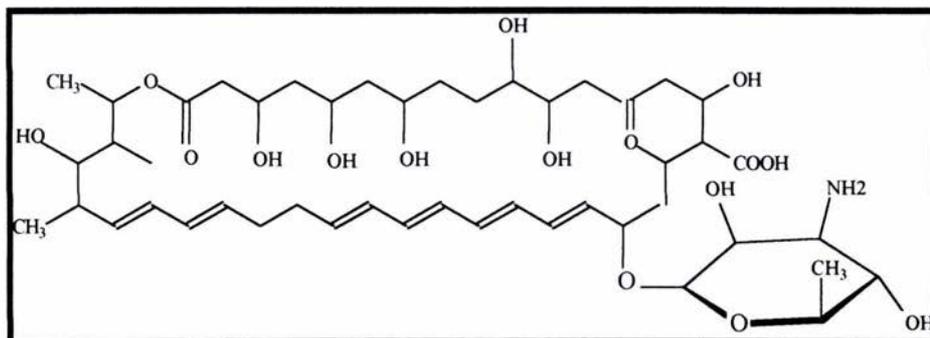
La clasificación de los antifúngicos se realiza según criterios relativos a su estructura y características químicas, a pesar de que la zona en la que se ha producido la infección y sobre la cual debe actuar también interviene al igual que el modo de acción, efecto, vía de administración, origen, toxicidad y selectividad.<sup>4,3</sup>

La clasificación de acuerdo al tipo de acción del antifúngico en las células fúngicas es la siguiente: Polienos, Nucleótidos análogos, Azoles, Nincomicinas, Alilaminas, Tiocarbamatos, Sordarins; y otros.<sup>100</sup>

#### a. Polienos

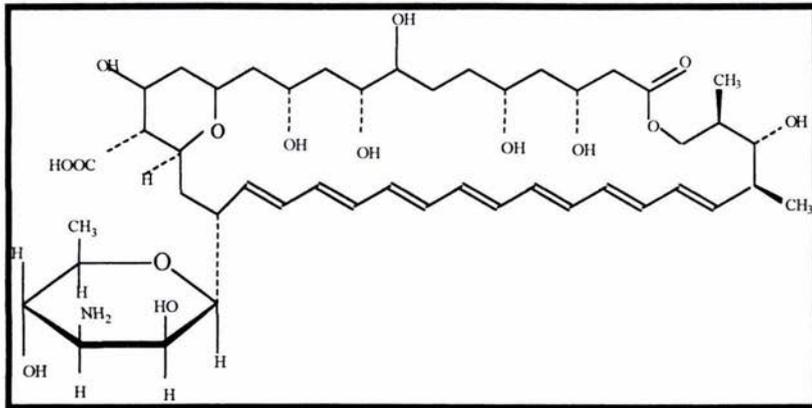
**Polienos.** Forman complejos con el ergosterol y causa la ruptura del plasma de la membrana, aumentando la permeabilidad de esta. Por lo tanto los polienos son funguicidas de amplio espectro.<sup>3</sup> Además, estos compuestos tienen baja toxicidad en células de los mamíferos, debido a que los polienos, tienen una mayor afinidad al ergosterol que al colesterol de las células de los mamíferos.<sup>99, 100</sup>

**Nistatina.** Es un antibiótico polieno estructuralmente interrelacionado con la Anfotericina B y con modo similar de acción. Se puede tratar para tratar las infecciones locales por *Candida* en la boca y en la vagina. También puede suprimir la candidiasis esofágica subclínica y el crecimiento excesivo de *Candida* en el aparato gastrointestinal. No se absorbe a la circulación general y tampoco tiene efectos adversos.<sup>3, 99</sup> Sin embargo, la nistatina es bastante tóxica para su administración parenteral.<sup>100</sup>



**Fig. 5 Nistatina**

**Anfotericina B.** Es un metabolito de *Streptomyces* y es el principal antibiótico poliénico, siendo el fármaco más eficiente en contra de la aspergilosis,<sup>101, 102, 103</sup> ya que posee un amplio espectro y raras veces induce resistencia.<sup>104</sup> El mecanismo de acción de los polienos implica la formación de complejos con el ergosterol en la membrana celulares fúngicas; como resultado hay daño a la membrana y salida del contenido celular. La AMB posee mayor afinidad por el ergosterol que por el colesterol, el esteroles predominante en membranas celulares de mamíferos. Este compuesto empaquetado en liposomas y emulsiones lipoidales ha demostrado eficacia superior en los estudios experimentales y algunos resultados excelentes en los estudios clínicos ya que estas preparaciones son menos tóxicas y permiten emplear concentraciones más altas de AMB.,<sup>105, 106</sup> estas formulaciones disponibles hoy día pueden reemplazar las preparaciones convencionales.



**Fig. 6 Anfotericina B**

Mecanismo de acción: La AMB se administra por vía intravenosa en forma de micelas con desoxicolato sódico disuelto en solución de glucosa. Aunque el fármaco se distribuye ampliamente en tejidos, penetra escasamente al líquido cefalorraquídeo y se enlaza con firmeza al ergosterol en la membrana celular, esta interacción altera la fluidez de la membrana celular y tal vez produce poros en ella, a través de los cuales se pierden iones y moléculas pequeñas. A diferencia de casi todos los otros antimicóticos, la AMB es capaz de provocar muerte celular. Las células de los mamíferos carecen de ergosterol y son relativamente resistentes a esta reacción. La AMB se une con debilidad al colesterol en las membranas de los mamíferos, explicando con esta interacción su toxicidad en estas células, además, se ha observado que en baja concentración tiene efecto inmunoestimulante.<sup>3, 99, 100, 107</sup>

Indicaciones: la AMB tiene un amplio espectro con eficacia demostrada contra la mayor parte de las micosis sistémicas principales incluso coccidioidomicosis, blastomicosis, histoplasmosis, esporotricosis, criptococosis, aspergilosis, mucormicosis y candidiasis. Su respuesta se ve modificada por la dosis y régimen de administración, por el sitio de la infección micótica, el estado inmunitario del paciente y por la susceptibilidad inherente del patógeno. Penetra poco a las articulaciones y al sistema nervioso central y por lo que en algunas infecciones se recomiendan las administraciones intratecal o intraarticular. La AMB se emplea en combinación con flucitosina para tratar la criptococosis.<sup>3, 99, 100</sup>

**Efectos adversos.** Todos los pacientes presentan reacciones adversas ante la AMB, aunque estas han disminuido mucho con las nuevas preparaciones lipídicas. Las reacciones agudas que comúnmente acompañan la administración intravenosa de este fármaco incluyen fiebre, escalofríos, disnea e hipotensión. Estos efectos por lo general pueden aliviarse mediante administración previa o concomitante de hidrocortisona o acetaminofén. Se ha observado que durante el tratamiento se desarrolla tolerancia a los efectos colaterales agudos.<sup>108, 109, 110</sup>

**Los efectos colaterales crónicos.** Usualmente son resultado de la nefrotoxicidad del fármaco.<sup>111</sup> Durante la terapéutica con AMB en la mayoría de los casos se presenta azoemia, por lo que las concentraciones de creatinina sérica y de iones deben ser estrechamente vigiladas. Con frecuencia también se observan hipopotasemia, anemia, acidosis tubular renal, cefalea, náuseas y vómito. Aunque la nefrotoxicidad es parcialmente reversible, puede ocurrir una reducción permanente de las funciones

renales glomerular y tubular. Este daño puede correlacionarse con la dosis total administrada.<sup>3, 100</sup>

### b. Nucleótidos análogos

**Flucitosina.** La flucitosina (5- fluorocitosina) es un derivado fluorado de la citosina. Es un compuesto antimicótico por vía oral utilizado junto con la Anfotericina B para tratar la criptococosis o la de candidiasis. También es eficaz contra muchas enfermedades micóticas dematiáceas. Penetra bien en todos los tejidos, incluso el líquido cefalorraquídeo.<sup>3, 99, 100</sup>

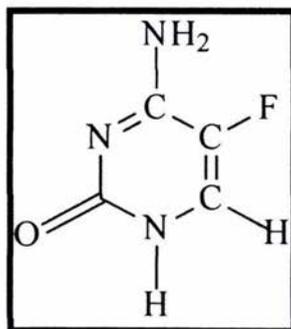


Fig. 7 5-fluorocitosina

**Mecanismo de acción.** Una permeasa transporta activamente la flucitosina al interior de las células fúngicas. La enzima citosina desaminasa fúngica la convierte en 5 fluorouracilo y la incorpora en el monofosfato del ácido 5- fluorodesoxiuridílico, que interfiere con la actividad de la timidilato sintetasa y la síntesis del DNA, la células de mamíferos carecen de citosina desaminasa y, por tanto, están protegidas

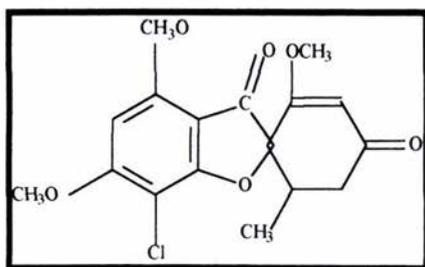
de los efectos tóxicos del fluorouracilo. Desafortunadamente, surgen con rapidez mutantes resistentes que limitan la utilidad de la flucitosina.<sup>3, 99, 100</sup>

**Indicaciones.** La flucitosina se emplea principalmente junto con la Anfotericina B para el tratamiento de la criptococosis y la candidiasis.<sup>100</sup> *In vitro* actúa de manera sinérgica junto con la Anfotericina B contra estos microorganismos y las experiencias clínicas sugieren un efecto benéfico de la combinación sobre todo en meningitis criptocócica. También se ha demostrado que esta combinación retarda o limita el surgimiento de mutantes resistentes a la flucitosina. La flucitosina es eficaz por si misma contra la cromoblastomicosis y otras infecciones micóticas dematiáceas.<sup>3, 99</sup>

**Efectos adversos.** Aunque es probable que la flucitosina en si tenga menor toxicidad para las células de mamíferos, y es relativamente bien tolerada, su conversión a fluorouracilos genera un compuesto altamente toxico que puede ser la causa de los principales efectos colaterales. La administración prolongada de fluorocitosina provoca supresión de la medula ósea, pérdida del cabello y anormalidades de la actividad hepática. La conversión de fluorocitosina a fluorouracilo por las bacterias entéricas pueden causar colitis. Los pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)<sup>6</sup> pueden ser más susceptibles a la supresión de la médula ósea por la flucitosina y se debe vigilar estrechamente la concentración sérica.<sup>99, 100</sup>

**Griseofulvina.** Antibiótico administrado por vía oral derivado de especies de *Penicillium*. Se emplea para tratar dermatofitosis y debe

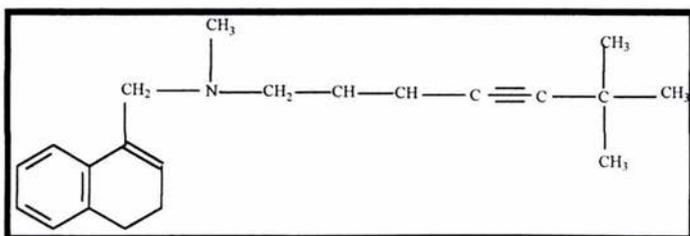
administrarse durante periodos prolongados.<sup>3,4</sup> La griseofulvina se absorbe poco y se concentra en el estrato corneo, donde inhibe el crecimiento de las hifas.<sup>21</sup> No tiene efecto sobre otros hongos. Después de su administración oral la griseofulvina se distribuye por todo el cuerpo, pero se acumula en los tejidos queratinizados. Dentro del hongo la griseofulvina interactúa con los microtúbulos y altera la función del uso mitótico causando inhibición del crecimiento. Solo las hifas en crecimiento activo son afectadas. La griseofulvina es clínicamente útil para tratar la infección con dermatófitos de piel cabellos y uñas. Generalmente se requiere terapéutica oral de semanas a meses. La griseofulvina en general es bien tolerada.<sup>71</sup> El efecto adverso más común es la cefalea, que casi siempre se resuelve sin interrumpir el fármaco. Con mayor frecuencia se observan trastornos gastrointestinales, somnolencia y hepatotoxicidad.<sup>3, 99, 100</sup>



**Fig 8. Griseofulvina**

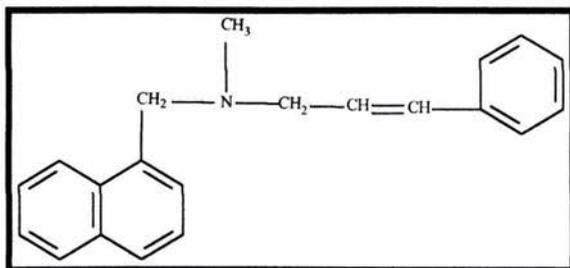
### c. Alilaminas

**Terbinafina.** La Terbinafina es un fármaco alilamina; bloquea la síntesis de ergosterol al inhibir la escualeno epoxidasa. Se administra por vía oral para tratar infecciones por dermatófitos. Ha demostrado gran eficiencia en el tratamiento de las infecciones ungueales y también de otras dermatofitosis. No son comunes los efectos adversos, pero estos incluyen malestar gastrointestinal, cefalea, reacciones cutáneas y pérdida del sentido del gusto. Para el tratamiento a largo plazo de la tiña en las uñas, la Terbinafina, el Itraconazol y el fluconazol, pueden administrarse de manera intermitente mediante un tratamiento de protocolo por pulsos.<sup>3, 99, 100</sup>



**Fig. 9 Terbinafina**

**Naftifina.** Tiene una significativa actividad in vitro frente a levaduras del género *Candida*. Uso restringido a la vía tópica en infecciones causadas por hongos dermatófitos y levaduras, carece de actividad frente a bacterias. Se acumula rápidamente en el trato corneo y sebo alcanzando altas concentraciones en folículo piloso, es transportado a la dermis y epidermis.<sup>3, 99, 100</sup>



**Fig.10 Naftifina**

#### **d. Azoles**

Los imidazoles y los triazoles son fármacos antimicóticos utilizados por vía oral para tratar una amplia variedad de infecciones micóticas sistémicas y localizadas. Las indicaciones de uso aún están bajo evaluación, pero ya han suplido a la AMB en muchas micosis menos graves, debido a que se pueden administrar por vía oral y son menos tóxicos.<sup>3, 99, 100, 112, 113</sup>

**Mecanismo de acción.** Los azoles interfieren con la síntesis del ergosterol<sup>114, 115</sup> bloquean la desmetilación 14  $\alpha$  del lanosterol dependiente del citocromo P450,<sup>116</sup> precursor del ergosterol en hongos, y de colesterol en células de mamíferos. Sin embargo, el citocromo P450 del hongo es aproximadamente de 100 a 1 000 veces más sensible a los azoles que los sistemas de los mamíferos. Se han sintetizado varios azoles tratando de

mejorar su eficacia, disponibilidad y farmacocinética, y reducir sus efectos adversos. Los azoles son fármacos fungistáticos.

**Indicaciones.** El KTC es útil en el tratamiento de la candidiasis mucocutánea crónica, dermatofitosis, blastomicosis, coccidioidomicosis, paracoccidioidomicosis e histoplasmosis no meníngeas. De los diferentes azoles, el FLC ofrece la mejor penetración al sistema nervioso central. Se emplea como tratamiento de sostén en la meningitis criptocócica y coccidioidal. La candidiasis bucofaríngea en los pacientes con SIDA y la candidemia en los pacientes inmunocompetentes también se pueden tratar con FLC. Las indicaciones del ITC se superponen en parte con las de FLC. Los modelos animales y los informes de casos indican que el ITC también es útil para el tratamiento de la aspergilosis invasora, que en general responde poco a la AMB. El ITC ha mostrado eficacia en el tratamiento primario y sostén en histoplasmosis en pacientes con SIDA, histoplasmosis en pacientes inmunocompetentes, coccidioidomicosis no meníngea, esporotricosis, blastomicosis, cromoblastomicosis, aspergilosis y dermatofitosis (especialmente en onicomosis).<sup>3, 99, 100</sup>

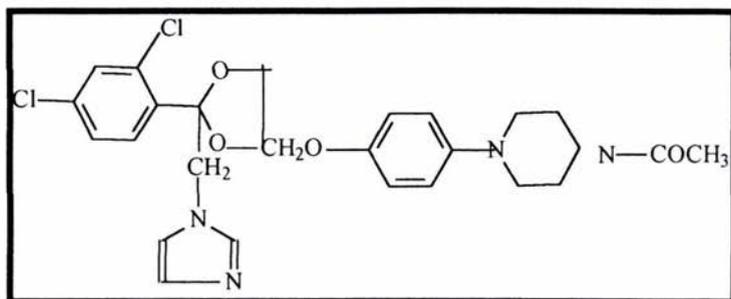


Fig.11 Ketaconazol

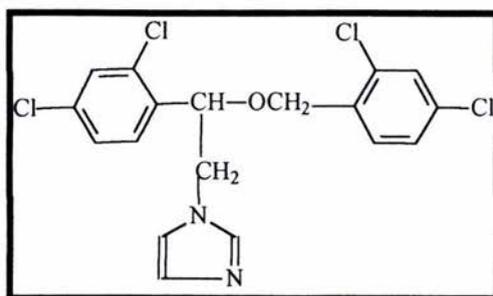


Fig.12 Miconazol

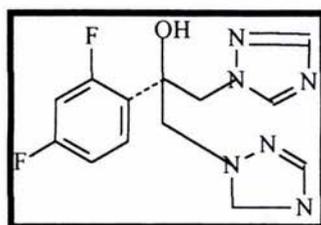


Fig. 13 Fluconazol

**Efectos adversos.** Los efectos adversos de los azoles se relacionan principalmente con su capacidad para inhibir el citocromo P450 de los mamíferos. El ketoconazol es el más tóxico a dosis terapéuticas ya que puede inhibir la síntesis de testosterona y cortisol, lo cual produce varios efectos reversibles como ginecomastia, disminución de la libido, impotencia, irregularidad menstrual y en ocasiones insuficiencia suprarrenal. En las dosis terapéuticas recomendadas, el FCZ y el ITC <sup>117</sup> no causan trastornos significativos a la esteroidogénesis del mamífero. <sup>118, 119, 120, 121, 120</sup> Todos los azoles antimicóticos pueden causar tanto aumento asintomático de las pruebas funcionales hepáticas, así como casos raros de hepatitis.

Puesto que los azoles antimicóticos interactúan con las enzimas del P450, las cuales también se encargan del metabolismo de otros fármacos, pueden ocurrir algunas interacciones farmacológicas importantes. Cuando se emplean isoniacida, fenitoína y rifampicina se pueden observar incrementos de la concentración del azol. La terapéutica antimicótica con azoles también puede inducir a concentraciones en suero mayores de las esperadas de ciclosporina, fenitoína, hipoglucemiantes orales, anticoagulantes, digoxina, y probablemente muchos otros. Para alcanzar valores terapéuticos apropiados a veces es necesario vigilar la concentración en el suero de estos fármacos.<sup>99, 100</sup>

#### e. Nicomicina

La nicomicina es un inhibidor competitivo de la enzima Chitin sintetasa la cual es necesaria para la síntesis de la pared celular.<sup>100</sup> Chitin es un polímero lineal del residuo de *B*- (1, 4)- linked N-acetilglucosamina y es sintetizada en la superficie de la membrana plasmática. La Chitin sintetasa cataliza la polimerización de N- acetilglucosamina en la formación de Chitin.<sup>3, 99</sup>

#### f. Otros.

**Sordarins.** Son una nueva clase de agentes antifúngicos. Estos inhiben la síntesis de proteínas en los hongos.<sup>3, 99, 100</sup> El principal objetivo del sordarin ha sido identificado recientemente como elongación factor 2.

**Pradimicinas y benanomycinas.** Son compuestos fungicidas. Ellos aparecen ligados, en forma calcio – dependiente, a las manoproteínas de la pared, y esto causa osmólisis y fuga del contenido intracelular, particularmente potasio provocando la muerte celular.<sup>3, 99, 100</sup>

**Equinocandinas.** Son compuestos cíclicos lipopeptidos, agentes fungicidas. Estos actúan impidiendo la síntesis de la pared celular, por una no competitiva inhibición de 1, 3 β- D glucano sintetasa, enzima que no tienen las células de los mamíferos. Esta inhibición es alta especificidad.<sup>3, 99, 100</sup>

**Pneumocandinas.** Son análogos del equinocandin son hexapéptidos cíclicos, los cuales inhiben al 1,3 β- D glucano sintetasa. Se denominaron de esta manera debido a que presentaron actividad contra *Pneumocystis carinii*.<sup>3, 99, 100</sup> Además, presentaron actividad contra *Candida* y *Aspergillus spp.*

## 2.4. CARBAMATOS

Los carbamatos son compuestos orgánicos que poseen una estrecha relación funcional con los carbonatos. Normalmente se trata de la monoamina del ácido carbónico, que se descarboxila espontáneamente. Figura 5.

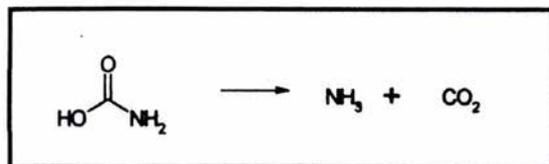
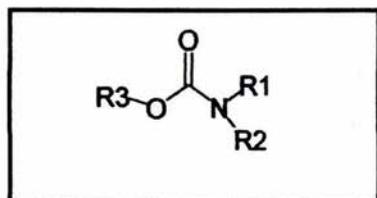


Figura 14. Descarboxilación de la monoamina del ácido carbónico.

Los derivados del ácido carbámico, llamados también carbamatos son compuestos sólidos y estables a temperatura ambiente, cuya estructura general es la mostrada en la Fig. 6. donde R1, R2 y R3, pueden ser un alquilo o un arilo.



**Figura 15. Estructura general de los carbamatos.**

Los carbamatos han tenido importancia desde los años 50 como insecticidas, funguicidas y nematocidas; además, actualmente algunos son usados como pesticidas y productos farmacéuticos en combinación con otros compuestos. En algunas investigaciones realizadas <sup>122, 123, 124</sup> los N-fenilcarbamatos con diferentes sustituyentes en el anillo bencénico y en el éster presentaron actividad antifúngica. Estudios <sup>125, 126, 127</sup> realizados por este grupo de investigación en diferentes Instituciones Públicas en México, han mostrado que los compuestos poseen una actividad antiparasitaria de 85 % al 95%, también se realizaron estudios de susceptibilidad de *Giardia lamblia*, *Helicobacter pilori* y de 13 géneros de bacterias Gram negativas ante derivados del ácido carbámico encontrándose actividad inhibitoria del crecimiento de estos microorganismos. <sup>126, 127, 128</sup>

## 2.5. MÉTODOS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Las metodologías para pruebas *in vitro* de sensibilidad con antifúngicos son limitadas; y estas pruebas son similares a las pruebas usadas para evaluar antibacterianos.<sup>128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135</sup> Algunas de las pruebas son realizadas en agar líquido como: dilución en tubo, mientras que las pruebas de difusión en agar y difusión en agar con discos requieren de un agar sólido. La dilución en tubo es una prueba cuantitativa *in vitro* que permite estimar la MIC de un antifúngico contra un hongo específico, este método es empleado para levaduras y hongos filamentosos. Otro método es la difusión en agar, en donde el microorganismo es sembrado dentro del agar y después se le hacen una serie de pozos a este, el cual sirve como reservorio para el antimicótico, que deberá difundirse dentro del agar. Una modificación de la prueba de difusión en agar origina el método de difusión agar con discos, aquí se utilizan discos de papel filtro impregnados de la solución antimicótico, y esta prueba permite comparar zonas de inhibición de un microorganismo desconocido con la inhibición de un microorganismo control. Generalmente estas pruebas tienen como propósito el definir la cantidad mínima de fármaco o sustancia que puede inhibir el crecimiento del hongo, conocida como concentración mínima inhibitoria (MIC); así como la cantidad necesaria para matar *in vitro*, llamada concentración mínima fungicida (MFC).<sup>136, 137</sup>

Existen otros métodos por los cuales es posible determinar sensibilidad de los microorganismos ante compuestos en estudio, como el

uso de la colorimetría para levaduras, esta prueba se basa en una alteración del pH inducida por las levaduras a través de la fermentación de carbohidratos en el medio de crecimiento, el cual tiene un indicador de pH. En la actualidad se han desarrollado guías para las pruebas de susceptibilidad antimicótica para hongos filamentosos; así como la estandarización de los parámetros más importantes que permiten reproducibilidad y resultados confiables, lo que favorece el desarrollo de investigaciones, comparación de métodos existentes y la creación de nuevas modificaciones. El NCCLS es una organización que ha estandarizado y desarrollado nuevos métodos que han permitido el estudio de susceptibilidad de nuevos compuestos.<sup>34</sup>

## 2.6. COMBINACIÓN DE ANTIFÚNGICOS.

**Mecanismos de interacción.** Se ha observado que algunos pacientes con enfermedades micóticas han tenido una pobre respuesta con algunos antimicóticos, mientras que otros han resultado tóxicos en pacientes inmunocomprometidos. Por esta razón, se ha buscado una mayor efectividad en la combinación de agentes antifúngicos, siendo usada en la práctica médica y especulándose que la interacción puede ser determinada por los mecanismos de acción de cada antifúngico.<sup>138</sup> En la actualidad se han utilizado diferentes combinaciones entre algunos azoles como el FLC y el MC, que son compuestos hidrofílicos que han mostrado mejores efectos ante la combinación con AMB; sin embargo, los azoles hidrofóbicos como MC y FLC no inhiben el crecimiento de *A. fumigatus*, por lo que solo se ha utilizado como pretratamiento antes de administrar la AMB. Este último fármaco ha mostrado un sinergismo con el

MC; mientras que con el ITC y KTC, según los estudios realizados, no han sido una eficiente combinación en algunos pacientes, dando resultados antagónicos.

Se ha observado que durante los tratamientos con antimicóticos, en muchos casos se presenta resistencia ante estos fármacos, por lo que se ha optado por emplear combinaciones de estos. Algunas de las ventajas de la combinación de antifúngicos ha sido el aumento de la eficacia terapéutica al potencializar la respuesta terapéutica,<sup>139</sup> reducir el grado de toxicidad que puedan presentar mediante la reducción de la dosis, atacar a infecciones polimicrobianas e incrementar la eficacia para eliminar a agentes infecciosos.

Los efectos de la combinación de la terapia *in vitro* son: aditividad provocada por la combinación de ambas sustancias, dando como resultado la suma de sus efectos independientes medidos por separado; el sinergismo que describe los efectos de combinación de ambas sustancias y que es significativamente mayor a la suma de los efectos de las drogas por separado; y el antagonismo originado de los efectos de combinación de ambas sustancias siendo significativamente menor que la suma de los efectos de las drogas por separado. Los estudios de sinergismo son realizados mediante el método de dilución en agar o dilución en tubo, los cuales permiten el uso de dos diferentes antimicóticos, en varias concentraciones mostrándose un efecto de inhibición mayor en la combinación que para cada compuesto.

También, existen interacciones entre antimicóticos y los alimentos, un notable ejemplo es la Griseofulvina que se absorbe con más rapidez cuando se le toma con una comida rica en grasa. Así como el KTC requiere un medio ácido para su disolución por lo cual el alimento, los antiácidos, y algunos fármacos como la cimetidina, y la rifampicina dificulta su absorción, mientras que para FCZ la presencia de alimentos o la acidez gástrica no modifica su biodisponibilidad. La biodisponibilidad de la Terbinafina aumenta en un 40 % con la ingestión de alimentos ricos en grasa.

### 3. JUSTIFICACIÓN

---

Considerando el aumento de enfermedades producidas por hongos como *Aspergillus fumigatus* y *Trichophyton mentagrophytes* causantes de un número importante de padecimientos en humanos y animales. Patologías, que a su vez afectan la economía y la salud pública y tomando en cuenta la toxicidad presentada por algunos antimicóticos usados en el tratamiento de estas micosis. Se llegó a la necesidad de evaluar la susceptibilidad a derivados del ácido carbámico de *Aspergillus fumigatus* y *Trichophyton mentagrophytes*, midiendo las propiedades antimicóticas de estos compuestos. Contribuyendo de esta manera a la innovación de nuevos antimicóticos capaces de originar una mejor respuesta terapéutica, con una menor toxicidad, reduciendo a su vez las grandes cantidades de dinero invertidas en el control de estas patologías y creando una alternativa para el tratamiento de micosis.

#### 4. HIPÓTESIS

---

Si los derivados del ácido carbámico poseen propiedades antifúngicas entonces inhibirán el crecimiento de *Aspergillus fumigatus* y *Trichophyton mentagrophytes* en estudios *in vitro*.

#### 5. OBJETIVOS

---

##### **Objetivo general.**

Evaluar la actividad antifúngica de dieciocho derivados del ácido carbámico contra *Aspergillus fumigatus* y *Trichophyton mentagrophytes* mediante el uso del método de microdilución.

##### **Objetivos particulares.**

Determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de cada uno de los derivados del ácido carbámico mediante el uso del método de microdilución.

## 6. MATERIAL Y REACTIVOS

---

### 1. BIOLÓGICO:

Se utilizaron aislados de muestras clínicas de *A. fumigatus* y de *T. mentagrophytes*, proporcionados por el Instituto Nacional de Diagnostico y Referencia Epidemiológica (INDRE).

### 2. REACTIVOS:

- Los derivados de ácido carbámico fueron proporcionados por el laboratorio de química medicinal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Los compuestos evaluados son: LQM 177, LQM 211, LQM 451, LQM 667, LQM 901, LQM 903, LQM 906, LQM 908, LQM 914, LQM 917, LQM 919, LQM 933, LQM 934, LQM 935, LQM 936, LQM 937, LQM 938, LQM 996.
- AMB ( Sigma-Aldrich).
- KTC ( Liomont).
- NaOH 1 N (Productos químicos Monterrey , S.A de C.V).
- Azul de algodón. (Productos químicos Monterrey , S.A de C.V).
- Dimetil sulfoxido DMSO ( Sigma-Aldrich).
- Tween 20 al 0.1%.
- BaCl<sub>2</sub>(Productos químicos Monterrey , S.A de C.V).
- H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> (Productos químicos Monterrey , S.A de C.

### 3. MEDIO DE CULTIVO:

Los medios de cultivo empleados fueron los siguientes: ADP (Becton Dickinson), empleado para la inducción de conidios y esporangioesporas; ADS (Difco) utilizado para determinar el número viable de UFC/mL y como medio *stock* se utilizó RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) (con glutamina, sin bicarbonato y con rojo de fenol como indicador de pH), el cual es un medio sintético adecuado para ser empleado como medio estándar.<sup>34,140, 141</sup> Este medio puede ser amortiguado a un pH de  $7.0 \pm 1$  a 25 °C. El amortiguador seleccionado en este caso fue el MOPS (Sigma-Aldrich), debido a que no presenta antagonismo con los agentes antifúngicos y ha demostrado ser adecuado en este tipo de pruebas.

## 7. METODOLOGÍA

---

### 7.1. Pruebas de identificación de microorganismo

**a. Microcultivos.** En una caja petri se cubrió la parte interior, con una pieza de papel filtro estéril. Colocándose después una varilla de vidrio doblada en forma de " V" ( con 6 cm de largo , 5 cm de separación), un portaobjetos y un cubreobjetos. Se esterilizó a 121 Lb durante 15 minutos. Fig 7.

De una placa de ADS se cortaron cuadros de 1 x 1 –cm con un bisturí estéril. Con unas pinzas estériles se colocó la varilla de vidrio en la base de la caja, colocándose después el portaobjetos sobre la varilla y se transfirió el bloque de agar al centro del portaobjetos. Posteriormente con un asa estéril en forma de " L" se tomo inóculo y se colocó en el centro de los cuatro lados del bloque de agar, cubriéndose con un cubreobjetos; se adicionaron 10 mL aproximadamente de agua estéril sobre el papel filtro de la caja petri evitando que tocará el agar, se tapó la caja y se incubó a 28 °C durante 72 h. para *T. mentagrophytes* y a 35 ° C durante 24h. para *A. fumigatus*.

El crecimiento del m.o se examinó periódicamente y el nivel del agua del microcultivo, evitando que se secase. El hongo creció en la superficie del agar deslizándose sobre la superficie del cubreobjetos.

Cuando las estructuras estuvieron bien desarrolladas, se removió el cubreobjetos, obteniéndose un frotis de este y uno más del portaobjetos.

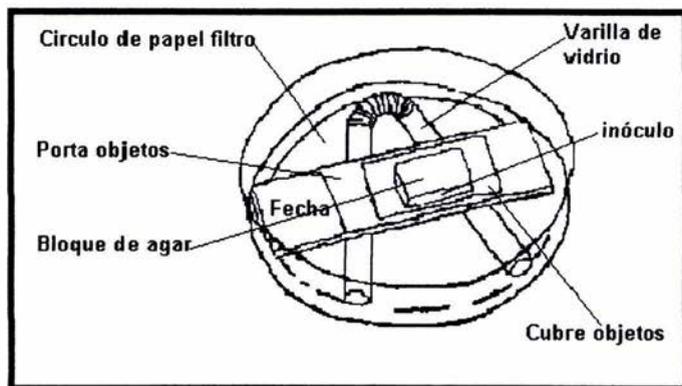


Fig. 7. Microcultivo <sup>42</sup>

**b. Tinción de azul de algodón.** En un portaobjetos se colocó una gota de azul de algodón, posteriormente con un asa en forma de "L" se tomó muestra del hongo en estudio, sumergiendo la muestra en la gota de colorante y cubriendo después con un cubreobjetos y finalmente se observó al microscopio.<sup>142</sup>

## 7.2. Conservación y cultivo.

**1. Conservación.** Para la conservación de los hongos filamentosos se utilizó una superficie de ADP inclinado; donde se mantuvieron las cepas puras, la inoculación se hizo a partir de una colonia aislada de una placa. Una vez crecido el hongo se mantuvo en un refrigerador a 4 ° C.

**2. Cultivo.** Se inocularon las cepas de *T. mentagrophytes* y *A. fumigatus* en ADP usando un asa estéril en forma de "L", únicamente se colocó una toma de material en el centro del agar; posteriormente se incubaron las muestras de acuerdo con las características mencionadas en la tabla 5. Se tomaron las precauciones necesarias para evitar una contaminación cruzada.

**Tabla 6. Condiciones óptimas de crecimiento para *T. mentagrophytes* y *A. fumigatus*.**

HONGO	TIEMPO DE INCUBACIÓN	TEMPERATURA DE INCUBACIÓN
<i>A. fumigatus</i>	7-8 días	34-36 ° C controlada
<i>T. mentagrophytes</i>	21-24 días	Temperatura ambiente

### 7.3. Preparación de diluciones del agente antifúngico.

Para la preparación y conservación de las diluciones antifúngicas, se utilizaron viales estériles con tapón de rosca. Donde el total de volumen de agente antifúngico fue preparado de acuerdo al número de pruebas realizadas y a las propiedades de disolución de los agentes antifúngicos, utilizándose como disolvente DMSO.

Se prepararon una serie de diluciones cuyo rango fue de 128 a 0.0625  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , partiendo de un *stock* de 12800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Las series de

concentraciones fueron preparadas primero en DMSO. <sup>143</sup> Para preparar 5 mL de la dilución de agente antifúngico, primero se tomaron 4.9 mL de medio RPMI-1640 y se colocaron en cada uno de los tubos estériles, después usando una micropipeta se colocó 0.1 mL de DMSO sin agente antifúngico (control positivo); después se tomo 0.1 mL de la concentración más baja en DMSO y se colocó en el siguiente tubo con medio, y se repite el procedimiento para cada una de las concentraciones siguientes en DMSO. Tabla 7.

**Tabla 7. Preparación de la serie de diluciones del agente antifúngico.**

<b>SOLUCIÓN ANTIFÚNGICA</b>						
Paso	Conc. (µg/ mL)	Fuente	Vol. (mL)	Solvente (DMSO) ML	Conc. intermedia (µg/ mL)	Conc. final 1:50 (µg/ mL)+
1	12800	stock			12800	256
2	12800	stock	0.5	0.5	6400	128
3	12800	stock	0.5	1.5	3200	64
4	12800	stock	0.5	3.5	1600	32
5	1600	Paso4	0.5	0.5	800	16
6	1600	Paso 4	0.5	1.5	400	8
7	1600	Paso 4	0.5	3.5	200	4
8	200	Paso 7	0.5	0.5	100	2
9	200	Paso 7	0.5	1.5	50	1
10	200	Paso 7	0.5	3.5	25	0.5
11	25	Paso 10	0.5	0.5	12.5	0.25
12	25	Paso 10	0.5	1.5	6.25	0.125
13	25	Paso 10	0.5	3.5	3.13	0.0625
14	3.13	Paso 13	0.5	0.5	1.565	0.0312
15	3.13	Paso 13	0.5	1.5	0.7825	0.0156
16	3.13	Paso 13	0.5	3.5	0.39125	0.0078

+ concentración 2 x

#### 7.4. Preparación del inóculo.

Después de la inducción de conidios y la formación de las esporangioesporas crecidas en ADP por 7 días a 35° C para *A. fumigatus* y 15 días a 28 ° C para *T. mentagrophytes*; se cubrieron las colonias con aproximadamente 1 mL de SSF 0.85%, y se removieron suavemente hasta formar una solución. Posteriormente se adicióno tween 20, (aproximadamente 0.01 mL de tween por cada mL de SSF), este facilitó la formación del inóculo de *A. fumigatus*.<sup>144, 145, 146, 147</sup> Se obtuvo una mezcla de conidioesporas e hifas fragmentadas, que fueron removidas con una pipeta estéril y transferida a un tubo estéril. Se dejaron reposar de 3 a 5 minutos hasta que las partículas pesadas se sedimentaron; después el sobrenadante se transfirió a un tubo estéril, se tapo el tubo y se mezcló en un vortex por 15 segundos.

La densidad de la suspensión del microorganismo fue leída y ajustada a una longitud de onda de 625 nm (suspensión stock), siendo aceptado un rango de absorbancia (0.09 a 0.11 de D.O. para *A. fumigatus* y *T. mentagrophytes*).<sup>34</sup> Posteriormente para la cuantificación del inóculo se tomó 0.01 ml de una dilución del inóculo stock (1:100, suspensión stock: RPMI-1640) y se colocó en una caja de ADS para la determinación del número viable de unidades formadoras de colonias, las colonias fueron contadas inmediatamente después de hacerse visibles, siendo los tiempos de incubación de 72 h a 28 °C para *T. mentagrophytes* con una concentración final de  $2.25 - 4.40 \times 10^4$  UFC/mL y de 48 h a 35 °C para *A. fumigatus* obteniéndose una concentración de  $3.35- 4.85 \times 10^4$  UFC/mL.

Del inóculo stock del microorganismo se realizó una dilución de 1:50 en el medio estándar (RPMI-1640), la cual fue utilizada para la prueba de susceptibilidad en microplacas.

#### **7.5. Inoculación del medio RPMI-1640.**

Cada pozo de la placa de ELIZA fue inoculado el día de la prueba con 0.1 ml del inóculo stock en 50 mL. Este paso diluyó la concentración del antimicótico y de la densidad del inóculo. El crecimiento del pozo control contenía 0.1 ml de la suspensión 1: 50 y 0.1 ml del diluyente del antimicótico al 2%.

#### **7.6. Incubación.**

Todas las microdiluciones fueron incubadas a 35 ° C durante 48 h para *A. fumigatus* y a 28 ° C durante 72 h para *T. mentagrophytes* sin agitación.

#### **7.7. Lectura de resultados.**

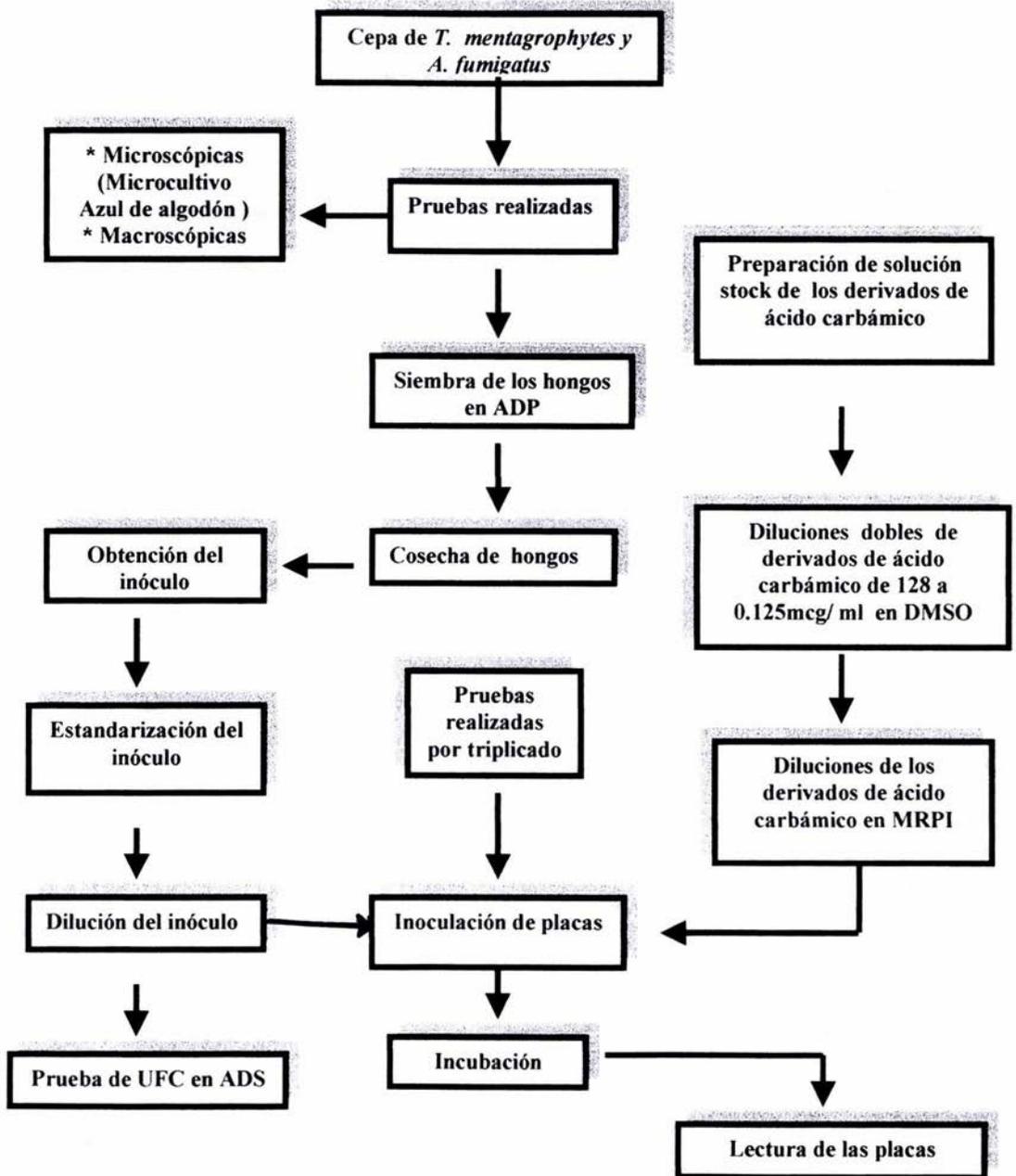
Para facilitar la lectura del crecimiento en cada pozo, se realizó una comparación de cada uno de ellos con el crecimiento del pozo control positivo.<sup>148</sup>

**Criterio de lectura:** ++++ indica crecimiento abundante (100% de crecimiento), +++ indica ligera disminución de crecimiento (75%), ++ indica prominente reducción de crecimiento (50%), + indica ligero crecimiento (25%) y – indica total ausencia de crecimiento ( 0%).<sup>34</sup>

## 7.8. Combinación de compuestos

Una vez obtenidas las respectivas MICs de los derivados del ácido carbámico se procedió a realizar una combinación con el compuesto de referencia para *T. mentagrophytes* (KTC) mediante la adaptación de la técnica del Tablero de Damas. Las diluciones se realizaron con DMSO y el medio empleado fue el RPMI- 1460, obteniéndose un volumen final para cada pozo de 200  $\mu\text{L}$ ; 100  $\mu\text{L}$  de la dilución de antifúngico (50 $\mu\text{L}$  de cada compuesto) y 100  $\mu\text{L}$  de la "suspensión de conidios ajustada" para cada microorganismo a ser probado. Solo se tomaron las MICs de los compuestos que habían presentado mayor actividad antimicótica.

Fig.8. Diagrama de flujo.



## 8. RESULTADOS

8.1. Identificación de *Aspergillus fumigatus* y *Trichophyton mentagrophytes*. Los resultados obtenidos de la prueba microscópica fueron la identificación de las hifas, que se observaron al microscopio óptico. Se realizó la comparación, de las hifas obtenidas en la experimentación con las estructuras mostradas en literatura, las cuales mostraron corresponder al microorganismo en estudio, confirmando así, la pureza del aislado empleado. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8. Características Macroscópicas y microscópicas de *A. fumigatus* y *T. mentagrophytes*

PRUEBA DE IDENTIFICACIÓN	CARACTERÍSTICAS	
	<i>A. fumigatus</i>	<i>T. mentagrophytes</i>
<b>Macroscópica</b>	Color verde grisáceo, polvo fino	Color blanco, textura algodonosa, creció en forma radial, y presentó una pigmentación amarilla en el fondo de la caja.
<b>Microscópica (Microcultivo, Azul de algodón)</b>	Presento hifas septadas, conidióforo y conidioesporas	Presento Macroconidias con hifas septadas. Y esporas asexuales (conidioesporas)

Las pruebas de identificación realizadas fueron observados en un microscopio óptico.

**8.2. Suspensión de conidios.** El inóculo stock presentó una concentración de conidios viables de  $2.25 \times 10^4 - 4.40 \times 10^4$  UFC/ mL para *T. mentagrophytes* y de  $3.35 \times 10^4 - 4.85 \times 10^4$  para *A. fumigatus*, valores aceptados en el rango de referencia. Las medidas de tendencia central para cada uno de los inóculos obtenidas de 6 ensayos se muestran en la Tabla 9.

**Tabla 9. Rangos de D.O y medidas de tendencia central de inóculo de hongos filamentosos.**

Hongo (no. de observaciones)	Rango de DO (625nm)	Media de DO (625nm)	Rango de UFC	Media De UFC	Rango de Inoculo UFC/mL ( $10^4$ )	Media de Inoculo UFC/mL ( $10^4$ )
<i>A. fumigatus</i> (6)	0.098 – 0.106	0.1006	67 - 97	85.66	3.35 – 4.85	4.2830
<i>T. mentagrophytes</i> (6)	0.083 – 0.089	0.0852	45 - 88	73.33	2.25 – 4.40	3.6665

El inóculo blanco =  $0.4 \times 10^4 - 5 \times 10^4$  UFC / mL. <sup>34</sup>

**8.3. Compuestos control.** Se encontraron las respectivas MICs de los compuestos control utilizados (KTC para *T. mentagrophytes* y AMB para *A. Fumigatus*), de ensayos de susceptibilidad por sextuplicado que abarcaron concentraciones de  $0.0078 \mu\text{g/mL}$  a  $128 \mu\text{g/mL}$ . Tabla 10.

**Tabla 10. Microorganismos control utilizados en la experimentación y sus respectivos rangos de MIC**

Microorganismo	Agente antifúngico	MIC rangos de Referencia $\mu\text{g}/\text{mL}$	MIC rangos Experimental $\mu\text{g}/\text{mL}$
<i>A. fumigatus</i>	Anfotericina B	0.4 – 4*	0.25 - 0.5
<i>T. mentagrophytes</i>	Ketoconazol	0.12-2**	0.25 – 0.5

- ATCC 204305. Referido a NCCLS <sup>34</sup>, \*\* Referido al artículo <sup>129</sup>

**8.4. Resultados obtenidos para *T. mentagrophytes*.** De un total de 18 derivados de ácido carbámico, sólo siete compuestos presentaron actividad antifúngica, determinada mediante el método de microdilución ante este hongo; siendo el LQM 667 el más activo. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 11 y 12.

Tabla 11. Susceptibilidad a derivados de ácido carbámico de *T. mentagrophytes*.

Conc. µg / mL	DERIVADOS DEL ÁCIDO CARBÁMICO LQM								
	117	211	451	667	901	906	908	914	917
128	+++	+++	-	-	-	+++	+++	-	+
64	+++	+++	-	-	-	+++	+++	-	+
32	+++	+++	+++	-	++++	+++	+++	++++	++
16	+++	++++	++++	-	++++	+++	++++	++++	+++
8	+++	++++	++++	-	++++	+++	++++	++++	++++
4	++++	++++	++++	-	++++	++++	++++	++++	++++
2	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.5	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.25	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.125	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.0625	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.0312	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.0156	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.0078	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

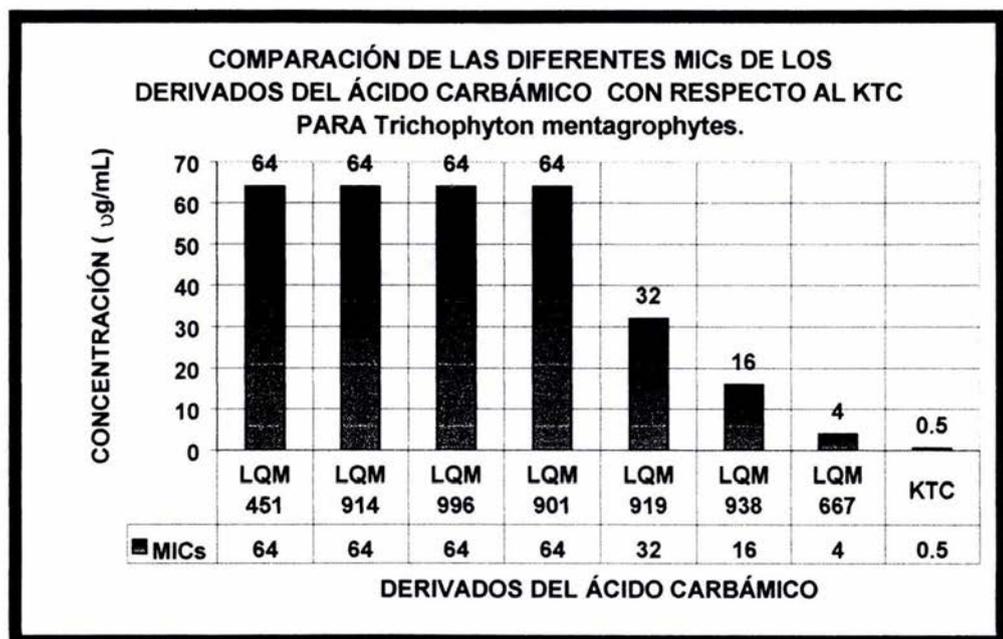
++++ indica crecimiento abundante (100% de crecimiento), +++ indica ligera disminución de crecimiento (75%), ++ indica prominente reducción de crecimiento (50%), + indica ligero crecimiento(25%) y - indica total ausencia de crecimiento ( 0%).

Tabla 12. Susceptibilidad a derivados de ácido carbámico de *T. mentagrophytes*.

μg/LI	DERIVADOS DEL ÁCIDO CARBÁMICO LQM							
	919	933	934	935	936	937	938	996
128	-	+++	++++	+++	++++	++++	-	-
64	-	++++	++++	++++	++++	++++	-	-
32	-	++++	++++	++++	++++	++++	-	+++
16	++++	++++	++++	++++	++++	++++	-	+++
8	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++++
4	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
2	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.5	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.25	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.125	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.0625	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.0312	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.0156	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.0078	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

++++ indica crecimiento abundante (100% de crecimiento), +++ indica ligera disminución de crecimiento (75%), ++ indica prominente reducción de crecimiento (50%), + indica ligero crecimiento(25%) y - indica total ausencia de crecimiento (0%).

Se obtuvieron las MICs de los compuestos en investigación, que presentaron inhibición del crecimiento en la prueba de susceptibilidad a los derivados del ácido carbámico de *T. mentagrophytes*, que se muestran en la siguiente Fig. 9.



**Fig. 9. MICs de los derivados del ácido carbámico para *T. mentagrophytes*.**

**8.5. Resultados obtenidos para *A. fumigatus*.** De los 18 compuestos probados sólo el LQM 938 produjo inhibición a concentraciones altas. La MIC determinada dió como resultado 64 µg / mL. El crecimiento de *A. fumigatus* con los demás compuestos en estudio fueron similares al crecimiento producido después de 48 horas de incubación por el control (++++). Tabla 13 y 14.

Tabla 13. Susceptibilidad a derivados de ácido carbámico de *A. fumigatus*.

Conc. µg/mL	DERIVADOS DEL ÁCIDO CARBÁMICO LQM								
	117	211	451	667	901	906	908	914	917
128	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++++	+++
64	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++
32	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
16	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
8	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
4	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
2	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.5	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.25	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.125	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.0625	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.0312	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.0156	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.0078	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

++++ indica crecimiento abundante (100% de crecimiento), +++ indica ligera disminución de crecimiento (75%), ++ indica prominente reducción de crecimiento (50%), + indica ligero crecimiento(25%) y – indica total ausencia de crecimiento ( 0%).

**Tabla 14. Susceptibilidad a derivados de ácido carbámico de *A. Fumigatus*.**

Conc. µg/mL	DERIVADOS DEL ÁCIDO CARBÁMICO LQM							
	919	933	934	935	936	937	938	996
128	+++	++++	++++	++++	++++	++++	-	++++
64	+++	++++	++++	++++	++++	++++	-	++++
32	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	++++
16	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
8	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
4	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
2	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.5	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.25	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.125	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.0625	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.0312	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.0156	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
0.0078	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

++++ indica crecimiento abundante (100% de crecimiento), +++ indica ligera disminución de crecimiento (75%), ++ indica prominente reducción de crecimiento (50%), + indica ligero crecimiento(25%) y – indica total ausencia de crecimiento (0%).

En esta prueba, todos los compuestos presentaron inhibición a concentraciones mayores a 128 $\mu$ g/mL ante la presencia de *A. Fumigatus*. Excepto el compuesto LQM938, que presentó inhibición a una concentración de 64  $\mu$ g / mL.

**8.6. Combinación de antifúngicos.** La actividad de las diluciones cruzadas de los compuestos en estudio (derivados de ácido carbámico) con KTC se muestran en la Tabla 15.

**Tabla 15. Inhibición del crecimiento de *T. mentagrophytes* ante la presencia de las diluciones cruzadas de los agentes antifúngicos.**

LQM 667 $\mu$ g/mL	16	-	-	-	-	-	-
	8.0	-	-	-	-	-	-
	4.0	++	++	+	-	-	-
	2.0	++++	++++	++++	+	-	-
	1.0	++++	++++	++++	++	-	-
	0	++++	++++	++++	++	+	-
			0	0.125	0.25	0.5	1
		KETACONAZOL $\mu$ g/mL					

++++ indica crecimiento abundante (100% de crecimiento), +++ indica ligera disminución de crecimiento (75%), ++ indica prominente reducción de crecimiento (50%), + indica ligero crecimiento(25%) y – indica total ausencia de crecimiento ( 0%).

## 9. DISCUSIÓN

---

En este estudio se muestran las primeras evaluaciones de susceptibilidad de dos aislamientos clínicos de hongos filamentosos ante 18 derivados del ácido carbámico, determinándose únicamente la MIC. Algunos de los compuestos mostraron tener propiedades antifúngicas sin embargo, el mecanismo de acción no se conoce aún y se encuentra en estudio, pero se hace alusión a las diferencias en su estructura molecular que ha sido factor importante en la relación estructura - actividad, la posición de cada uno de los sustituyentes proporciona ciertas características al compuesto, permitiéndole actuar como antibiótico, antimicótico o bien proporcionándole cualidades como poder originar genotoxicidad ya que en estudios realizados se muestra que la mayoría de los mutágenos contienen sustituyentes que son considerados "estructura de alerta".<sup>125</sup>

El método de microdilución empleado representó una alternativa para medir la susceptibilidad a derivados del ácido carbámico de *T. mentagrophytes* y *A. Fumigatus* utilizando cantidades pequeñas de soluciones antifúngicas y de inóculo, reduciendo con ello los gastos en la experimentación. En este estudio se retomaron factores importantes que anteriormente ya habían sido estudiados, como la preparación del inóculo, las condiciones de incubación, la determinación de la MIC (puntos para la toma de lectura y tiempo de lectura), y los nutrientes del medio.<sup>40</sup>

Se estandarizó la concentración del inóculo, debido a que los resultados de las MIC obtenidas pueden ser influidas por esta. El inóculo

fue trabajado, de acuerdo a la técnica espectrofotométrica,<sup>149</sup> aunque en la actualidad se recomienda usar citometría de flujo, sin embargo, la experimentación se adaptó a las condiciones del laboratorio. Este método, no fue difícil de realizar y es recomendado para algunas especies. Aunque debido a las diferentes pigmentaciones presentadas por los inóculos de *A. fumigatus* y su alta habilidad a la esporulación, aún son necesarios más estudios. Además, las hifas tienden a formar esferas y dificultaron la preparación homogénea de la suspensión. A pesar de ello se obtuvieron para los inóculos valores de DO de entre  $3.35 - 4.85 \times 10^{-4}$  para *A. fumigatus* y  $2.25 - 4.40 \times 10^{-4}$  para *T. mentagrophytes*, los cuales entran en el rango ( $0.4 \times 10^4 - 5 \times 10^4$  UFC / mL) referidos por el NCCLS para hongos filamentosos.

Otra importante variable, en las pruebas de susceptibilidad fue el tiempo de incubación antes de la lectura. Se sabía, que una incubación prolongada elevaría las MIC del agente antifúngico, debido a que estos m.o. poseen un largo periodo de transición. De acuerdo a las recomendaciones de diferentes estudios (de curvas de crecimiento para hongos filamentosos), basados en las características de crecimiento con respecto al tiempo y mediante la observación visual, se escogieron los tiempos de incubación que fueron de 48 h. para el *A. fumigatus*, y de 72 h. para *T. mentagrophytes*. Los cuales resultaron ser muy eficientes en la experimentación no olvidando controlar la temperatura de incubación.

Se seleccionó el RPMI-1640 como medio de referencia, ya que diversos estudios han mostrado que da resultados reproducibles en las pruebas de susceptibilidad *in vitro*. El cual en la experimentación

contribuyó a resultados confiables. El medio seleccionado poseía los nutrientes adecuados para soportar el crecimiento del hongo sin interferir con la acción del antifúngico, alterar la reproducibilidad de las pruebas *in vitro* o los resultados de las MIC. Además, para no originar resultados erróneos, se consideró también la dependencia del hongo ante el medio, ya que los medios ricos en nutrientes aumentan el desarrollo del m.o originando el incremento de las MIC<sub>s</sub>; mientras que el mal desarrollo de un m.o puede originar resultados falsos. Este medio también ha sido recomendado por el NCCLS.

Se utilizó como disolvente el DMSO para la prueba de microdilución, sin embargo, en algunos de los compuestos a concentraciones altas y ante la presencia del medio de referencia (RPMI-1640) se observó una ligera precipitación comparada con otros medios de dilución (ACT, agua). Se han encontrado reportes de que este disolvente afecta las membranas celulares, por ello se controló el porcentaje utilizado en la prueba reduciéndose a 2%. Además, algunos autores reportan que el DMSO suele ser extremadamente tóxico al combinarse con algunos azoles,<sup>150</sup> esto se consideró debido a que como compuestos control se utilizó KTC (para *T. mentagrophytes*) que aunque no se conoce alguna interacción con AMB (sustancia usada como control para *A. fumigatus*) y los derivados del ácido carbámico; se utilizaron cultivos control que contenía únicamente DMSO sin antifúngico, mostrando que no afectaron el crecimiento del microorganismo. El crecimiento control del microorganismo fue a su vez comparado con el crecimiento en los demás posillos, observándose que no afectaba la actividad de los compuestos.

Los resultados muestran que la inhibición para *Trichophyton mentagrophytes* fue mayor ante el compuesto LQM 667 con una MIC de 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  seguida por una MIC de 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para LQM 938, una MIC de 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para LQM 919 y finalmente una MIC de 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para LQM 451, LQM 914, LQM 996, LQM 901 y el resto de los compuestos presentó una MIC de  $>64 \mu\text{g}/\text{mL}$  a 72 horas.

El compuesto que hasta ahora ha presentado una inhibición en pruebas realizadas anteriormente ha sido el compuesto LQM 996, quien ha presentado actividad de antibiótico de amplio espectro, contra *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Helicobacter pylori* para protozoarios como *Giardia lamblia*, *Entamoeba* y cestodos como *Hymenolepis nana* y hongos (género *Thicophitum*) y actualmente se esta tramitando el registro de la patente. Este compuesto también mostró, en este estudio una inhibición ante *T. mentagrophytes* con una MIC de 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , que aunque no fue muy cercana al compuesto de referencia (KTC con MIC = 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), retoma importancia debido a que estos compuestos a concentraciones altas son muy tóxicos, mientras que previos estudios realizados han demostrado que los derivados del ácido carbámico poseen un potencial alto en cuanto a baja toxicidad a dosis altas.<sup>125</sup>

Otro de los compuestos que presentó inhibición a concentraciones altas fue el **LQM 919**, del cual también existen reportes de baja genotoxicidad, para los demás compuestos aún no se tienen datos de toxicidad debido a que estos estudios se han realizado únicamente en compuestos que han demostrado tener alguna actividad Biológica. Al

realizar las comparaciones de las MICs obtenidas con algunos compuestos reportados en literatura como FLC con una MIC de 128 $\mu$ g/ mL se consideran aceptables, sin embargo, requieren de muchos más estudios que avalen su efectividad.

Para *A. fumigatus* la inhibición fue mayor ante el compuesto LQM 938 y los 17 compuestos restantes mostraron una MIC >128  $\mu$ g/ mL a las 48 h. Los resultados obtenidos para este hongo no son muy satisfactorios ya que para la especie de *A. fumigatus*, el NCCLS reporta un rango de MIC de 0.5 – 4 $\mu$ g/ mL con AMB y el valor de la MIC obtenida para el compuesto se consideró alto, mientras que para el compuesto de referencia se obtuvo un valor de 0.5  $\mu$ g/ mL a pesar de ser un aislado clínico.

También, se realizó la combinación de KTC con el compuesto LQM 667, seleccionándose este compuesto debido a que presentó la mayor actividad antifúngica contra *T. mentagrophytes*, con esto se pretendía encontrar un efecto sinérgico originado por los compuestos derivados del ácido carbámico y su interacción con KTC, sin embargo, el resultado fue un efecto aditivo indiferente lo cual indicó efectos por separado para cada uno de los compuestos. Con base en este estudio y las investigaciones ya realizadas en otros trabajos, se especula que las respuestas que puedan presentar las diferentes combinaciones de antimicóticos, puede depender del mecanismo de acción de cada compuesto, de su estructura química y de muchas otras variables que necesitarían estudiarse.

La técnica empleada para la combinación de los compuestos se adaptó debido a las cantidades tan grandes de tubos y medio que se

utilizaría para la prueba estándar del tablero, esto se había ideado ya por algunos investigadores que propusieron minimizar los requerimientos de la prueba y hacerla menos complicada o costosa. El uso de placas para realizar las diluciones seriadas de dos diferentes antimicóticos para producir un rango de combinaciones es discutido aún por varios investigadores. Las ventajas fueron el muestreo de los pozos sin crecimiento visible que permitieron identificar organismos viables persistentes, inoculando una alícuota sin antimicótico en una placa de agar para determinar la CMI. La prueba rindió información similar a la prueba del tablero estándar, dio las concentraciones de las combinaciones de los antifúngicos necesarias para inhibir el crecimiento fúngico. Para evitar las pequeñas cantidades de evaporación y el incremento significativo de los compuestos en estudio y no originar datos falsos de las MICs se utilizaron placas con tapa, además, controles negativos y positivos, para excluir esa posibilidad de error originando por un crecimiento abundante del m.o. en los pozos sin antifúngico. Además, debido a las cantidades tan pequeñas de muestras, el número de ensayos realizados para cada prueba fue por sextuplicado evitando datos erróneos mostrando repetibilidad en el método.

En la actualidad, el nulo crecimiento del m.o. ante la presencia de diferentes antifúngicos, ha sido considerado un verdadero problema e inhabilidad, así como la predisposición genética a resistir ó a interactuar con el antifúngico ha impedido que algunos compuestos no cumplan con su objetivo. Por ello, se buscan nuevos compuestos, como alternativa, que permitan seguir tratando las micosis.

## 10. CONCLUSIONES

---

- ❖ De acuerdo a los objetivos, los derivados del ácido carbámico, presentaron diferentes grados de inhibición al crecimiento de los hongos estudiados. Los compuestos, que mostraron la mayor actividad antimicótica, fueron: LQM 667 ante la presencia de *T. mentagrophytes*, con una MIC de 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y el compuesto LQM 938 ante la presencia del *A. fumigatus* con una MIC de 64  $\mu\text{g} / \text{mL}$ .
  
- ❖ Algunos compuestos como **LQM 996** (MIC de 32  $\mu\text{g} / \text{mL}$ .) y **LQM 919** ( MIC de 64  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ), quienes presentaron una considerable inhibición en el crecimiento de *T. mentagrophytes*, retoman importancia, debido a que en previos estudios presentaron actividades pobres en genotóxicidad y citotoxicidad.
  
- ❖ Las MICs obtenidas para los derivados del ácido carbámico fueron mayores a las de los compuestos control ( KTC 0.5  $\mu\text{g} / \text{mL}$  y AMB 0.5  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ).
  
- ❖ Esta investigación, muestra la actividad antifúngica de los derivados del ácido carbámico, ante cepas de aislamientos clínicos, e implica la necesidad de estudios bioquímicos sobre mecanismos de acción y estudios *in vivo* que permitan encontrar las características farmacocinéticas en el organismo.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

<sup>1</sup> **Wolfgang K. J., Willett H. P., & Beard Amos D.** (1986). *Zinsser Microbiología. 18 Edición. Pp 1342-1348.*

<sup>2</sup> **Rippon W.** (1990). *Micología Médica Hongos y Actinomicetos Patógenos 3ª edición Editorial Interamericana. Mc Graw – Hill. México. 8:186- 292; 23: 668 – 703.*

<sup>3</sup> **Arenas R.** (1993). *Micología Médica Ilustrada. Interamericana. McGraw- Hill. Pp 3-375.*

<sup>4</sup> **Geo F Brooks J. S., Butel S. & Morse A.** (2002). "Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg". *Editorial Manual Moderno 17ª Edición México D, F. 45: 661– 695.*

<sup>5</sup> **Gallejo L. & De la Torre Cisneros J.** (2001). Actualización diagnóstica y terapéutica en infecciones fúngicas invasoras: de los antiguos tópicos a las nuevas evidencias. *Farmacia Hospitalaria. 25; 345 - 355.*

<sup>6</sup> **Santamarina Jáuregui J. M. & Zubero Sulibarria Zuriñe.** (2002). Las micosis en pacientes infectados por el VIH en la era de los tratamientos antirretrovirales de gran eficiencia. *Revista Iberoamericana de Micología. 19; 5 - 8.*

<sup>7</sup> **Montejo M.** (2002). Infecciones invasoras por *Aspergillus* y otros hongos filamentosos en enfermos con trasplante de órganos sólido. *Revista Iberoamericana de Micología. 19: 9 – 12.*

<sup>8</sup> **Cattelan A. M., Loy M., Tognon S., Rea F., Sasset L., & Cadrobbi P.** (2000). An unusual presentation of invasive aspergilosis after lung transplantation. *Transplantation Intenational. 13: 183 – 186.*

<sup>9</sup> **Ribaud P.** (1997). Fungal infections and the Cancer Patient. *European Journal of Cancer. 33: 850 – 854.*

<sup>10</sup> **Quindós G.** (2002). Las micosis en el amanecer del siglo XXI. *Revista Iberoamericana de Micología. 19: 1 - 4.*

<sup>11</sup> **Ambrose N., Lloyd D. & Maillard J-C.** (1999). Immune Responses to Dermatophilus congolensis Infections. *Parasitology Today. 15: 295 – 300.*

<sup>12</sup> **Mogollón S. M. A., Mora G. C. M., Sierra A., Rafaela J. & Ramos de Días C. E.** (1998). *Micosis profundas. Vol. 2. no 3.*

<sup>13</sup> **Sanabria R., Fariña N., Laspina F., Balmaceda M. A. & Samudio M.** Dermatofitos y hongos levaduriformes productores de micosis superficiales. *Departamento de Microbiología, Instituto de Investigación en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional De Asunción.*

- 
- <sup>14</sup> **Castro Alegria L. A., & Bact Gonzales de Polonia L. A. (1995).** Micosis en el Hospital Universitario del Valle, 1980-1992. *Colombia Médica*. 26: 150 - 153.
- <sup>15</sup> **Zülal Erbagci. (2001).** Deep dermatophytoses in association with atopy and diabetes mellitus: Majocchi's granuloma trichophyticum or dermatophytic pseudomycetoma. *Mycopathologia*. 154: 163 - 169.
- <sup>16</sup> **Rodriguez – Hernández M., J. Jiménez – Mejías M. E., Montero J. M., Regordan C. & Ferreras G. (2001).** *Aspergillus fumigatus* Cranial infection after accidental traumatism. *Journal of Clinic Microbiology Infection Disease*. 20: 655 – 656.
- <sup>17</sup> **Peixinho P., Sabino T. , Duarte C., Cruz T. & Braganca N. (2003).** Aspergilosis pulmonar invasiva. *Acta médica portuguesa*. 16; 97 - 99.
- <sup>18</sup> **Merlo W. A., Rosciani A. S., Maccio Orlando A., Solis G. A. & Arzuaga M. Burna A. N. (1998).** Aspergilosis en cisnes. *Servicio de Diagnostico histopatológico de la Facultad de Ciencias Veterinarias*. 1 - 3.
- <sup>19</sup> **Aller Gancedo J. M., Fregeneda Grandes J. M. & Fernández Díaz M. (2000).** Matitis por *Aspergillus fumigatus* en ganado ovino. *Revista Iberoamericana de Micología*. 17: S13 - S17.
- <sup>20</sup> **Yoshiyuki Tatsumi, Mamoru Yokoo, Tadashi Arika & Hideyo Yamaguchi. (2001).** In Vitro Antifungal Activity of KP – 103, a Novel Triazole Derivative, and Its Therapeutic Efficacy against Experimental Plantar Tinea Pedis and Cutaneous Candidiasis in Guinea Pigs. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*. 45: 1493 – 1499.
- <sup>21</sup> **Von Heinmendahl A., England G. C. W., & Sheldon I .M. (2003).** Influence of Griseofulvin treatment on semen quality in the dog. *Animal reproduction science*. XXX. 1 – 7.
- <sup>22</sup> **Olusola Efuntoye Moses & Olusanya Fashanu Sunday. (2001)** Occurrence of Keratinophilic fungi and dermatophytes on domestic birds in Nigeria. *Mycopathologia*. 153: 87 – 89.
- <sup>23</sup> **Herreros E. Martinez C. M. , Almela M. J., Marrito M. S., Gómez de la Heras F., & Gargallo - Viola D. (1998).** Sordarins: In Vitro activities of new antifungal Derivatives against Pathogenic Yeasts, Pneumocystis carinni, and Filamentous Fungi. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 42: 2863 - 2869.
- <sup>24</sup> **Gutiérrez S., Casqueiro J. & Martín J. F. (2000).** Los hongos como factorías celulares: Biodiversidad de metabolitos secundarios. *Revista Iberoamericana Micología*. 17: S54 - S60.
- <sup>25</sup> **Luber A., Maa L., Lam M. & B, Guglielmo J. (1999).** Risk Factors for amphotericin B - induced nephrotoxicity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 43; 267 – 271.
- <sup>26</sup> **Adea Gil, Ciria M., Ferrer R.M., Sádaba B., García - Quetglas E., & Azanza J. R. (2003).** Nuevos medicamentos. *Revista Médica Navarra*. vol. 47; 39 - 44.

- 
- <sup>27</sup> Carrillo Muñoz A. J. Antifúngicos tópicos en micosis superficiales. Actualidad *Dermatológica. Dep. Microbiología – Mitología A. C. L. A. Barcelona.*
- <sup>28</sup> Dannaoui E., Boprel E., Monier M-F., Piens M-A., Picot S. & Persat Florence. (2001). Acquired Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 47; 333 - 340.
- <sup>29</sup> Dannaoui E., Persat Florence, Monier M-F., Boprel E., Piens M-A. & Picot S. (1999). In vitro susceptibility of *Aspergillus spp.* Isolates to amphotericina B and Itraconazole. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 44; 553 - 555.
- <sup>30</sup> Denning DW, Venkateswarlu, & Oakley KL. (1997). Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 41; 1364 - 1368.
- <sup>31</sup> Fernandez Torres B., Carrillo A. J., Martín E., Del Palacio A., Moore M. K., Valverde A., Serrano M. & Guarro J. (2001). In vitro activities of 10 antifungal drugs against 508 dermatophyte strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 45 (9), 2524 – 2528.
- <sup>32</sup> Hawser S.P., Jessup C., Vitullo J. & Ghannoum M. A. (2001). Utility of 2,3-Bis(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulophenyl)-5-[(Phenyl-Amino)Carbonyl]-2H-Tetrazolium Hydroxide (XTT) and Minimum Effective Concentration Assays in the Determination of Antifungal Susceptibility of *Aspergillus fumigatus* to the Lipopeptide Class of Compounds. *Journal of Clinical Microbiology.* 39: 2738 - 2741.
- <sup>33</sup> Espinel-Igloff A & Dawson K. (1995). Comparative and Collaborative Evaluation of Standardization of Antifungal Susceptibility Testing for Filamentous Fungi. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 39: 314 - 319.
- <sup>34</sup> National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1998). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Proposed standard M38-P. *National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.*
- <sup>35</sup> D. King, L.W. Cheever, A. Hood, T. D. Horn, M. G. Rinaldi & W. G. Merz. (1996). Primary invasive Cutaneous *Microsporum canis* Infections in Immunocompromised Patients. *Journal of Clinical Microbiology.* 34: 460 – 462.
- <sup>36</sup> García M. E. & Blanco J. L. (2000). Principales enfermedades fúngicas que afectan a los animales domésticos. *Revista Iberoamericana de Micología.* 17S: S2 - S7.
- <sup>37</sup> Cabañes F. J. (2000). Dermatofitosis animales. Recientes avances. *Revista Iberoamericana de Micología.* 17: S8 - S12.

- 
- <sup>38</sup> **Korting Hans C., Ollert M. & Abeck D. (1995).** Results of German Multicenter Study of Antimicrobial Susceptibilities of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* Strains Causing *Tinea Unguium*. *Antifungal Agents and Chemotherapy*. 39: 1206 - 1208.
- <sup>39</sup> **Gupta K. A. A., Cooper E., Mc Donald P. & Summerbell C. R. (2001).** Utility of Inoculum Counting (Walshe and English Criteria) in Clinical Diagnosis of Onychomycosis Caused by Nondermatophytic Filamentous Fungi. *Journal of clinical Microbiology*. 39: 2115 - 2121.
- <sup>40</sup> **Meletiadis J., Meis F. G. M. J., Mouton W. J. & Verweis P. E. (2001).** Analysis of Growth Characteristics of Filamentous Fungi in Different Nutrient Media. *Journal of clinical Microbiology*. 39: 478 - 484.
- <sup>41</sup> **Gromadzki S., Ramma Ramani, & Vishnu Chaturvedi. (2003).** Evaluation of new Medium for identification of dermatophytes and primary dimorphic Pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*. 41: 467- 468.
- <sup>42</sup> **Davise H. Larone. (1987).** Medically Important Fungy A guide to Identification. *El Servier, New York*. Pp 22 - 45, 179, 180, 189, 202, 206, 207, 209.
- <sup>43</sup> **Esquenazi D., De Souza W., Sales Alviano C. & Rozental S. (2003).** The role of surface carbohydrates on the interaction of microconidia of *Trichophyton mentagrophytes* with epithelial cells. *Immunology and Medical Microbiology*. 35: 113 -123.
- <sup>44</sup> **Tawfik M. Muhsin & Rawa B. Hadi. (2001).** Degradation of keratin substrates by fungi isolated from sewage sludge. *Mycopathologia*. 154: 185 -189.
- <sup>45</sup> **Krista E. Shackelford MD & Donald V. Belsito. (2002).** The etiology of allergic-appearing foot dermatitis: A 5-year retrospective study. *Journal of the American Academy of Dermatology*. Pp. 715-721.
- <sup>46</sup> **Roseeuw D. (1999).** Achilles foot screening project: preliminary results of patients screened by dermatologists. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 12:1; S6 - S9.
- <sup>47</sup> **T Kamihama, T Kimura, J-I Hosokawa, M Ueji, T Takase & K Tagami. (1997).** *Tinea pedis* outbreak in swimming pools in Japan Public Health. 111:4: 249 - 253.
- <sup>48</sup> **A. G. Smith. (1999).** Skin infections of the foot. *The foot*. 9: 2; 56 - 59.
- <sup>49</sup> **Perea S., Ramos J. M., Garau M., Gonzales A., Noriega R A. & Del Palacio A. (2000).** Oprevalence and Risk Factors of *Tinea unguium* and *Tinea pedis* in the General Population in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*. 38: 3226 - 3230.
- <sup>50</sup> **Summerbell RC, Kane J, & Krajden S. (1989).** Onychomycosis, *tinea pedis* and *tinea manuum* caused by nondermatophytic filamentous fungi. *Mycoses*. 32 (12); 609 - 619.

- 
- <sup>51</sup> **Wiederkehr M., & Schwartz R. A. (2003).** *Tinea Cruris*. *Department of Dermatology E Medicine*. 1-11.
- <sup>52</sup> **Connolly M. & De Berker D. (2003).** Disorders of hair in children. *Current Pediatrics*. 13: 6; 429 – 437.
- <sup>53</sup> **S. Martin E. & E. Elewski B. (2003).** *Tinea capitis* in adult women masquerading as bacterial Hypoderma. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 49: 2; 177 –179.
- <sup>54</sup> **M. Ghannoum, N. Isham BA, R. Hajjeh, M. Cano, F. Al-Hasawi, D. Yearick, J. Warner, L. Long, C. Jessup & B. Elewski. (2003).** *Tinea capitis* in Cleveland: Survey of elementary school students. *Journal of American Academy of Dermatology*. 48: 2: 189 –193.
- <sup>55</sup> **B. Silverberg N., M. Weinberg J. & A. De Leo V. (2002).** *Tinea capitis*: Focus on African American women. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 46: 2; S120 - S124.
- <sup>56</sup> **Sami Al Sogair & R. J. Hay. (2000).** Fungal infection in children: *tinea capitis*. *Clinics in Dermatology*. 18: 6; 679 – 685.
- <sup>57</sup> **C. Erdem, N. Kundakçi & A. Gürler (1995).** Clinical and mycological characteristics of *tinea favosa*. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 5; S170.
- <sup>58</sup> **Szepietowski J. C & Schwartz R. A. (2002).** *Tinea Barbae*. *Department of Dermatology E Medicine*. 1-11.
- <sup>59</sup> **Faergemann J. (1995).** Susceptibility to dermatomycosis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 5; S11 - S12.
- <sup>60</sup> **Chabasse D. & Therizol-Ferly M. (2000).** Les mycoses d'importation. *Reveu Française des Laboratoires*. 321; 51- 65.
- <sup>61</sup> **B. Adams B. (2000).** *Tinea corporis gladiatorum*: A cross-sectional study. December, Pages *Journal of the American Academy of Dermatology*. 43: 6; 1039 – 1041.
- <sup>62</sup> **Rotoli V., Forleo P., Cerritelli L., Andreassi M., Masci S. & Amerio P. (1997).** An unusual case of *tinea capitis*. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 9: 1; S190.
- <sup>63</sup> **Karaka M., Memiolu H. R., Acar M. A. & Özpoyraz M.. (1997).** The spectrum of dermatophyte for in patients with *tinea pedis*, *tinea inguinalis* and *tinea corporis* in the Cukurova region. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 7: 1; S194.
- <sup>64</sup> **Barata Feio A., Claro C. & Pinto A.. (1995).** *Tinea capitis* in adults. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 5; S171.

- 
- <sup>65</sup> **Fernández –Torres B., Cabañes F. J., Carrillo–Muñoz A. J. Esteban A., Inza I., Abarca L. & Guarro J. (2002).** Collaborative Evaluation of Optimal Antifungal Susceptibility Testing Conditions for Dermatophytes. *Journal of Clinical Microbiology*. 40: 3999 – 4003.
- <sup>66</sup> **Al Rubaie S. (1995).** Itraconazole vs. griseofulvin in treatment of tinea capitis. *Journal of the European academy of Dermatology and Venereology*. 5; S173.
- <sup>67</sup> **Karelson M., Pärna E., Slim H., Majass M. & Rajangu H. (1995).** Pilot study of lamisil in the treatment of tinea capitis in microsporum canis infected prepubertal children. *Journal of the European academy of Dermatology and Venereology*. 5; S172.
- <sup>68</sup> **Gupta A. K., Ryder E. J., Nicol K. & Cooper A. E. (2003).** Superficial fungal infections: an update on pityriasis versicolor, seborrheic dermatitis, tinea capitis, and onychomycosis. *Clinics in Dermatology*. 21: 5; 417- 425.
- <sup>69</sup> **Drago V., Podrumac B., Kralj B. & Bartenjev I. (1995).** Efficacy of oral terbinafine treatment in tinea capitis in children caused by microsporum canis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 5; S171 – S172.
- <sup>70</sup> **Talarico Fo. S., Arruda L. H. F., Cucé L. C., Foss N. T., Gontijo B., Marques S. A., Santamaria J. R. & M. Souza E. (1995).** Efficacy and tolerability of lamisil (terbinafine) tablets in the treatment of children with tinea capitis. *Journal of the European Academy and Venereology*. 5; S172.
- <sup>71</sup> **Ledezma E., Marciano K., Jorquera A., De Sousa L., Padilla M., Pulgar M. & Apitz-Castro R. (2000).** Efficacy of ajoene in the treatment of tinea pedis: A double-blind and comparative study with terbinafine. *Journal of the American Academy of Dermatology*. Pp 829 – 832.
- <sup>72</sup> **Abidova Z., Arifov S. & Ishanhodjaev Sh. (1997).** Lamisil and griseofulvin in the treatment of tinea pedis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 9: 1; S235.
- <sup>73</sup> **Crevits B., Picoto A., Staberg B., Urbanowski S. & Silny W. (1998).** Comparison of efficacy and safety of oral fluconazole and topical clotrimazole in the treatment of tinea corporis, tinea cruris, tinea pedis, and cutaneous candidiasis. *July Current Therapeutic Research*. 59: 7; 503-510.
- <sup>74</sup> **Laver Z. A. (1997).** The role of Keratospore ointment in the treatment of tinea pedis with plantar hyperkeratosis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 9: 1; S238

- <sup>75</sup> **Gupta K. A.** (2000). Pharmacoeconomic analysis of ciclopirox nail lacquer solution 8% and the new oral antifungal agents used to treat dermatophyte toe onychomycosis in the United States. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 43: 4; S81 - S95.
- <sup>76</sup> **Hori A., Kami M., Kishi Y., Machida U., Matsumura T. & Kashima T.** (2002). Clinical significance of extra -pulmonary involvement of invasive aspergillosis: a retrospective autopsy-based study of 107 patients. *Journal of Hospital Infection*. 50: 175 -182.
- <sup>77</sup> **Abarca M. L.** (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Revista Iberoamericana de Micología*. 17: S79 - S84.
- <sup>78</sup> **Alcalá L., Muñoz P., Peláez T. & Bouza E.** *Aspergillus* y Aspergilosis. Control de Calidad SEIMC. Servicio de Microbiología Clínica, Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid. Pp 1-5.
- <sup>79</sup> **Blanco J. L., Guedeja-Marrón J., Caballero J. & García E. M.** (1998). Aspergilosis: mecanismos de patogenicidad implicados y aproximación al diagnóstico de laboratorio. *Revista Iberoamericana de Micología*. 15: 10-15.
- <sup>80</sup> **Nuñon Gassiot C., Pino A. P., Rodríguez Vázquez J. C., Ramos Gómez M., Páez Prats I. & Gundián González J.** (2000). Aspergilosis pulmonar: un nuevo enfoque en la reemergencia. *Acta Médica* 2000. 9 (1-2) 67-72.
- <sup>81</sup> **M. Celis G., Parte M. G., Gil L. C., Aponte L. C., Gómez T., Alfaro G. & Solbas A.** (2001). Aspergiloma asintomático del seno frontal. *Acta Otorrinolaringológica*. Vol 13-No 1.
- <sup>82</sup> **Baquerizo M. A., Muñoz C. W. & Barrientos C. F.** (2001). Aspergiloma pulmonar. *Revista Chilena de Cirugía*. 53: 480 - 464.
- <sup>83</sup> **Cano J. & Soler M.** (2000). Epidemiología molecular aplicada a la detección de brotes de aspergilosis nosocomial. *Revista Iberoamericana de Micología*. 17: S97 - S99.
- <sup>84</sup> **Kaisu Rantakokko- Jalava, Sanna Laaksonen, Jouni Issakainen, Jukka Vauras, Jukka Nikoskelainen, Matti K. Viljanen & Juha Salonen.** (2003). Semiquantitative Detection By Real - Time PCR of *Aspergillus fumigatus* in Bronchoalveolar lavage Fluids and Tissue Biopsy Specimens from Patients with Invasive aspergillosis. *Journal of Clinical Microbioly*. 41: 4304 - 4311.
- <sup>85</sup> **Che-man Chan, Patrick C. Y. Woo, Andy S. P. Leung, Susanna K. P. Lau, Xiao-yan Che, Liang Cao & Knok-yung Yuen.** (2002). Detection of bodies specific to an antigenic cell wall calactomannoprotein for serodiagnosis of *Aspergillus fumigatus* aspergilosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 40: 2041- 2045.
- <sup>86</sup> **Kaisu Rantakokko-Jalava, Sanna Laaksonen, Jouni Issakainen, Jukka Vauras, Jukka Nikoskelainen, Matti K. Viljanen & Juha Salonen.** (2003). Semiquantitative Detection By

---

Real – Time PCR of *Aspergillus Fumigatus* in Bronchoalveolar lavage Fluids and Tissue Biopsy Specimens from Patients with Invasive aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiol.* 41: 4304 - 4311.

- <sup>87</sup> **Saballs Pere, López Colomé J. L., Gimeno Cobos J. & Knobel F. (2000).** Tratamiento de la aspergilosis invasiva. *Revista Iberoamericana de Micología.* 17: S93 - S96.
- <sup>88</sup> **Lass-Flori C, Kofler G. & Kropshofer G. (1998).** In vitro testing of susceptibility to amphotericin B is a reliable predictor of clinical outcome in invasive aspergillosis. *Journal Antimicrob Chemother.* 42: 497 - 502.
- <sup>89</sup> **Dannaoui E., Persat Florence, France Monier M., Borel E., Piens M. A. & Picot S. (1999).** In vitro susceptibility of *Aspergillus spp.* Isolates to amphotericin B and Itraconazole. *Journal of antimicrobial Chemotherapy.* 44: 553 – 555.
- <sup>90</sup> **Kontoyiannis Dimitrios P, Lewis Russell E, Sagar Namita, May Gregory, Prince Randall A & Rolston Kenneth V. I. (2000).** Itraconazole-Amphotericin B Antagonism in *Aspergillus fumigatus*: an E- Test-Based Strategy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 44: 2915 - 2918.
- <sup>91</sup> **Payá Sánchez J. (2000).** Prevención de la Aspergilosis nasocomial. *Revista Iberoamericana de Micología.* 17: S100 - S102.
- <sup>92</sup> **Denning DW, Venkateswarlu, & Oakley KL. (1997).** Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy.* 41: 1364-1368.
- <sup>93</sup> **Manavathu E. K, Alangaden G. J. & Chandrasekar P. H. (1998).** In vitro isolation and antifungal susceptibility of amphotericin B-resistant mutants of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 41: 615- 619.
- <sup>94</sup> **Mann P. A., Parmegiani R. M., Wei S. Q., Mendrick C. A, Li Xin, Loebenberg D., DiDomenico B., Hare R. S., Walker S. S., & McNicholas P. M. (2003)** Mutations in *Aspergillus fumigatus* Resulting in Reduced Susceptibility to posaconazole Appear To Be Restricted to a Single Amino Acid in the Cytochrome P450 14 $\alpha$ - Demethylase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 47: 577 –581.
- <sup>95</sup> **Fung-Tomc J. C., Huczko E., Minassian B., & Bonner D. P. (1998).** In vitro activity of a New Oral Triazole, BMS- 207147 (ER –30346). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 42: 313 -318.
- <sup>96</sup> **K Venkateswarlu, D.W. Denning , & S. I. Kelly. (1997).** In vitro activity of D0870, a new triazoles antifungal drug, in comparison with fluconazole and itraconazole against *Aspergillus fumigatus* and *Candida krusei*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 39: 731 –736

- <sup>97</sup> **Shigefumi Maesaki, Jun Iwakawa, Yusuhito Higashiyama, Yoshitsugu Miyazaki, Katsunori Yanagihara, Kazunori Tomoro, Takayoshi Tashiro & Shigeru Cono. (2000).** Antifungal activity of a new triazole, variconazole (UK-109496), against clinical isolate of *Aspergillus* spp. *Journal of Infectious Chemotherapy*. 6: 101 - 103.
- <sup>98</sup> **Espinel- Igroff A. (1998)** In vitro Activity of New Triazole Variconazole (UK-109,496) against Opportunistic Filamentous and Dimorphic Fungi and Common and Emerging yeast Pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*. 36: 198 - 202.
- <sup>99</sup> **Victor Lorian, M. (1980).** Antibiotics in laboratory medicine, *Editorial Williams Wilkins Baltimor/ London. Capitulo 7.*
- <sup>100</sup> **Andriole Vincent T. (1999).** Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 44, 151 - 162.
- <sup>101</sup> **E. Verweij Paul, Mensink Marieke, J. M. M. Rijs Antonius, Donnelly J. Peter, Meis Jacques F. G. M. & Denning David W. (1998).** In-vitro activities of amphotericin B, itraconazole and variconazole against 150 clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 42: 389-392.
- <sup>102</sup> **Chiller Tom M., Sobel Raymond A Capilla Luque, Javier, Clemons Karl V., & Stevens David A. (2003).** Efficacy of Amphotericin B or Itraconazole in a Murine Model of Central Nervous System *Aspergillus* Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47: 813 - 815.
- <sup>103</sup> **Lass-Flori C, Kofler G. & Kropshofer G. (1998).** In vitro testing of susceptibility to Amphotericin B is a reliable predictor of clinical outcome in invasive aspergillosis. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 42; 497 -502.
- <sup>104</sup> **Sutton A, D., Sanche S. E, Revankar S. G., Fothergill A. W. & Rinaldi M. G. (1999).** In vitro Amphotericin B Resistance in Clinical isolates of *Aspergillus terreus*, with a Head to Head Comparison to variconazole. *Journal of Clinical Microbiology*. 37: 2343 - 2345.
- <sup>105</sup> **Prieto Yerro C., Vargas Castrillón E., Laredo Velasco L., Pérez C., Ambit Avila M. I. & Picazo de la Garza J. J. (2000).** Utilización de Anfotericina B no convencional en el Hospital Clínico de San Carlos. *Revista Española de Salud Pública* 74: 351 - 359.
- <sup>106</sup> **E. M. Johnson, A. Szekely & D. W. Warnock. (1998).** In-vitro activity of variconazole, Itraconazole and Amphotericin B against filamentous fungi. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 43: 741-745.
- <sup>107</sup> **Sandeep Saxena, Junaid A. Khan & Prahlad C. Ghosh. (1998).** Toxicity and therapeutic efficacy of Amphotericin B delivered through cholesterol hemisuccinate vesicles in the treatment of experimental murine aspergillosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 42: 635-642.

- <sup>108</sup> Meeker, Timothy C.; Siegel, Martin S.; Shiota, Faith M.; Crowley, John J.; McGuffin & Robert W. (1983). Toxicity of Amphotericin B, Miconazole, and Ketoconazole to human granulocyte progenitor cells *in vitro*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 23 (1), 169 -71.
- <sup>109</sup> Yasui, Kojo; Masuda, Midori; Matsuoka, Takafumi; Yamazaki, Munehiro; Komiyama, Atsushi; Akabane, Taro, Murata & Kenjiro. (1988). Miconazole and Amphotericin B alter polymorphonuclear leukocyte functions and membrane fluidity in similar fashions. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 32 (12), 1864 - 1988.
- <sup>110</sup> Satoru Matsumoto, Yoshimi Wakai, Toru Nakai, Kazuo Hatano, Tomoe Ushitani, Fumiaki Ikeda, Shuichi Tawara, Toshio Goto, Fumio Matsumoto & Shogo Kuwahara. (2000). Efficacy of FK463, a new lipopeptide antifungal agent, in Mouse Models of pulmonary Aspergillosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44: 619 -621.
- <sup>111</sup> Luber Andrew D, Maa Lucy, Lam Minh & Guglielmo Joseph B. (1999). Risk Factors for Amphotericin B-induced nephrotoxicity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 43: 267-271.
- <sup>112</sup> Barchiesi F., Arzeni D., Camiletti V., Simonetti O., Cellini A., Offidani A. M. & Giorgio S. (2001). In vitro activity of posaconazole against clinical isolates of dermatophytes. *Journal of Clinical Microbiology*. 39: 4208 - 4209.
- <sup>113</sup> Espinel – Igroff A. (2001). In vitro fungicidal activities of Variconazole, Itraconazole , and Amphotericin B against opportunistic Moniliaceous and Dematiaceous Fungi. *Journal of Clinical Microbiology*. 39: 954 - 958.
- <sup>114</sup> Morita, Tatsuya; Nozawa & Yoshinori. (1985). Effects of antifungal agents on ergosterol biosynthesis in *Candida albicans* and *Trichophyton mentagrophytes*: differential inhibitory sites of naphthiomate and miconazole. *Journal Investigative Dermatology*. 85 (5), 434 - 7.
- <sup>115</sup> Scott, E. M.; Gorman, S. P.; Millership, J. S. & Wright, L. R. (1986). Effect of Miconazole and Clotrimazole on potassium release and inhibition of ergosterol biosynthesis in *Trichophyton mentagrophytes* and related ultrastructural observations. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 17 (4), 423 -32.
- <sup>116</sup> James & Margaret O. (1988). Acute and subacute effects of Miconazole nitrate on hepatic styrene oxide hydrolase and cytochrome P 450-dependent monooxygenase activities in male and female AKR/J mice. *Toxicology*. 50 (3), 269 - 81.
- <sup>117</sup> J. Nguyen M. D. A., Douglas B. Nelson M. D. & R. Thurn M. D J. (1999). Pseudomembranous colitis after itraconazole therapy. *The American journal of gastroenteritis*. 94: 1971-1973.
- <sup>118</sup> Descotes J.; Andre P.; Tedone R. & Evreux J. C. (1985). Miconazole influence on both cellular immune response and hepatic drug metabolism in mice. *Journal Immunopharmacology*. 7 (2), 171 - 8.

- 
- <sup>119</sup> **Morita, Kunihiko; Ono, Takeshi; Shimakawa & Harumi.** (1988). Effects of antimycotics on hepatic steroid metabolism. *Journal Pharmacobiology-Dynamarc.* 11 (12), 808 - 15.
- <sup>120</sup> **Pawelec, G.; Ehninger G.; Rehbein A.; Schaudt K. & Jaschonek K.** (1991). Comparison of the immunosuppressive activities of the antimycotic agents itraconazole, fluconazole, ketoconazole and miconazole on human T-cells. *Journal Immunopharmacology.* 13 (2-3), 299 - 304.
- <sup>121</sup> **Takara Y., Masaaki F., Tadaki Y., & Hiroji O.** (1989) In vivo and in vitro effects of the antifungal agent miconazole on estrogen biosynthesis in human breast cancer. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology.* 25 (10), 1493 - 7.
- <sup>122</sup> **Junya T., Osamu K., Chiyoza T., Shigeko N., Hiroshi N., Toshiro K. & Katsuzo K.** (1988). Fungicidal activity of N-phenylcarbamates. VI. Quantitative structure-activity relations of fungicidal N-(3,4 diethoxyphenyl) carbamates. *Nippon Noyaku Gakkaishi.* 13 (4), 587 - 93.
- <sup>123</sup> **Junya T., Osamu K., Chiyoza T. & Katsuzo K.** (1988). Studies on fungicidal activity of N-phenylcarbamates. IV. Determination of the hydrophobicity of N-phenylcarbamates by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography.* 436 (2), 316 -22.
- <sup>124</sup> **Junya T., Shigeko N., Hiroshi N., Toshiro K. & Katsuzo K.** (1988). Fungicidal activity of N-phenylcarbamates. III. Fungicidal activity of N-phenylcarbamates against benzimidazole-resistant fungi. *Nippon Noyaku Gakkaishi (Journal Agrochemical Bioregulators).* 13 (1), 63-69.
- <sup>125</sup> **Márquez Becerra M.P.** (2002). Actividad Genotóxica de cuatro derivados carbámicos en ratón y análisis de la relación de dicho efecto en su estructura Química. *Instituto Politécnico Nacional.*
- <sup>126</sup> **Ramírez Cruz C.** (2003). Evaluación de la actividad in vitro de derivados del 4-Nitroisoxazoles sobre trofozoitos de *Giardia duodenalis*. *Universidad Nacional Autónoma de México.*
- <sup>127</sup> **Guerrero Olea J.** (2002). Determinación de la concentración mínima inhibitoria de nuevos derivados del ácido carbámico contra *Helicobacter pilory*. *Universidad Nacional Autónoma de México.*
- <sup>128</sup> **Espinel-Igroff A, Bartlett M. & Bowden R.** (1997). Multicenter Evaluation of Proposed Standardization Procedure for Antifungal Susceptibility Testing for Filamentous Fungi. *Journal of Clinical Microbiology.* 35: 139-143.
- <sup>129</sup> **Pujol, J. Capilla, B Fernández-Torres, M Ortoneda & J. Guarro.** (2002). Use of the Sensititre Colorimetric Microdilution Panel for Antifungal Susceptibility Testing of Dermathophytes. *Journal of Clinical Microbiology.* 40: 2618 - 2621.

- 
- <sup>130</sup> **Pfaller MA, Bale M. & Buschelman B.** (1995). Quality control Guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards Recommended Broth Macrodilution Testing of Amphotericin B, Fluconazole, and Flucytosine. *Journal Antimicrobial Chemotherapy.* 33: 1104 - 1107.
- <sup>131</sup> **Denning DW, Radford SA, & Oakley KL.** (1997). Correlation between in-vitro susceptibility testing to itraconazole and in-vivo outcome of *Aspergillus fumigatus* infection. *Journal Antimicrobial Chemotherapy.* 40: 401 - 414.
- <sup>132</sup> **Pfaller J. B., Messer S. A., Hollis R. J., & Diekema D. J.** (2003). In vitro Susceptibility Testing of *Aspergillus spp*; Comparison Etest and reference Microdilution Methods for Determining Variconazole and Itraconazole MICs. *Journal of Clinical Microbiology.* 41: 1126 - 1129.
- <sup>133</sup> **Espinel-Ingroff A.** (2001). Comparison of the E-test with the NCCLS M38-P Method for Antifungal Susceptibility Testing of Common and Emerging Pathogenic Filamentous Fungi. *Journal of Clinical Microbiology.* 39: 1360 -1367.
- <sup>134</sup> **Espinel-Ingroff A. & Rezusta A.** (2002). E-Test Method for Testing Susceptibilities of *Aspergillus spp*. To the New Triazole Variconazole and Posaconazole and to Established antifungal Agents: Comparison with NCCLS Broth Microdilution Method. *Journal of Clinical Microbiology.* 40: 2101 – 2107.
- <sup>135</sup> **H. Marcia, Riesselman, Hazen C. Kevin, & E. Cutler Jim.** (2000). Determination of Antifungal MICs by a Rapid Susceptibility Assay. *Journal of Clinical Microbiology.* 38: 333 - 340.
- <sup>136</sup> **Espinel-Ingroff A, Fothergill A, Peter J, Rinaldi. M. G. & Walsh T. J.** (2002). Testing Conditions for Determination of Minimum Fungicidal Concentrations of new and Established Antifungal Agents for *Aspergillus spp*: NCCLS Collaborative Study. *Journal of Clinical Microbiology.* 40: 3204- 3208.
- <sup>137</sup> **Espinel- Ingroff A.** (2003). Evaluation of Broth Microdilution testing Parameters and Agar Difusión Etest Procedure for Testing Susceptibilities of *Aspergillus spp*. To Caspofungin Acetate (MK-0991). *Journal of Clinical Microbiology.* 41: 403 – 409
- <sup>138</sup> **Maesaki Shigefumi, Kawamura Sumio, Miyazaki Yoshitsugu, Tomono Kazunori, Tashiro Takayoshi & Kohno Shigero.** (1999). Effect of sequential combination of amphotericin B and Azole Antifungal agents against *Aspergillus fumigatus*. *Journal Infection Chemotherapy.* 5: 125 – 129.
- <sup>139</sup> **Kontoyiannis Dimitrios P, Lewis Russell E, Sagar Namita, May Gregory, Prince Randall A & Rolston Kenneth V. I.** (2000). Itraconazole- Amphotericin B Antagonism in *Aspergillus Fumigatus*: an E- Test- Based Strategy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 44: 2915 - 2918.

- 
- <sup>140</sup> Jessup C. J, Warner J, Isham N, Hasan I & Ghannoum M. A. (2000). Antifungal Susceptibility Testing of Dermatophytes: Establishing a Medium for Inducing Conidial Growth and Evaluation of Susceptibility of Clinical Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 38: 341 - 344.
- <sup>141</sup> National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1998). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Proposed standard M38-P. *National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.*
- <sup>142</sup> Contreras Pérez C. & Gonzáles Ochoa A. (2000). Manual de procedimientos de Diagnóstico en Micología Médica Instituto Nacional De Diagnóstico y Referencias Epidemiológicas, SSA. México. D. F. Pp 47.
- <sup>143</sup> Barry AL, Pfaller MA & Brown SD. (2000). Quality Control Limits for Broth Microdilution Susceptibility Testing of Ten Antifungal Agents. *Journal of Clinical Microbiology*. 38: 3457-3459.
- <sup>144</sup> Petrikkou E., Rodríguez-Tudela J. L & Cuenca-Estrella M. (2000). Inoculum Standardization for antifungal susceptibility testing of filamentous Fungi Pathogenic for Humans. *Journal of Clinical Microbiology*. 39: 1345 -1347.
- <sup>145</sup> Gupta A. K., Cooper E. A., MacDonald P. & Summerbell R. C. (2001). Utility of Inoculum Counting (Walshe and English Criteria ) in Clinical Diagnosis of Onychomycosis Caused by Nondematophytic Filamentous Fungi. *Journal of Clinical Microbiology*. 39: 2115 - 2121.
- <sup>146</sup> S. Arunmozhi Balajee & Kieren A. Marr. (2002). Conidial Viability Assay for Rapid Susceptibility Testing of *Aspergillus* Species. *Journal of Clinical Microbiology*. 40: 2741 - 2745.
- <sup>147</sup> Shigeharu Inouye, Tsutomu Tsuruoka, Katsuhisa, & Hideyo Yamaguchi. (2001) Effect of sealing and tween 80 on the antifungal susceptibility testing of essential oils. *Microbiology immunology*. 45 201 - 208.
- <sup>148</sup> Interpretation of Trailing Endpoints in Antifungal Susceptibility Testing by the National committee for Clinical Laboratory Standards Method. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998; 36:153 -156.
- <sup>149</sup> Guarro J., Pujol I., Aguilar C., Llop C. & Fernández Ballart J. ( 1998). Inoculum preparation for in-vitro susceptibility testing og Filamentous Fungi. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 42: 385 - 387.
- <sup>150</sup> Yoshizumi M. O., Vinci V., Fong & Karyn D. (1987). Toxicity of intravitreal miconazole in DMSO. *Journal of Toxicology*. 6(1), 19-27.