



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO DE SENSIBILIDAD *IN VITRO* DE CLIMBAZOL
FRENTE CEPAS DE *MALASSEZIA SPP* ASOCIADAS A
DERMATITIS SEBORREICA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A

BIANCA GUTIERREZ GUTIERREZ



MEXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

A mamá y papá:

Nuevamente como anteriormente.

Por ustedes soy, y llegué a ésta meta, gracias. Los amo.

A mi familia:

Mi abue, tíos y primos. Gracias.

A Mario, Tzitzil, Panch, Tania, Maricela y Marco, por todo su apoyo, pero principalmente por ser mis verdaderos amigos y vivir juntos el paso por la carrera y por la vida. Los quiero.

A Javi, Marco, Leo, Kicke, Gaby, Mony, Margarita y Alma, por compartir la micología conmigo, por su apoyo dentro y fuera del Hospital General de México, pero sobre todo por ser mis amigos.

A mi maestro en toda la extensión de la palabra, Alexandro Bonifaz, por supuesto.

ÍNDICE

Introducción.....	5
Antecedentes	
a)Generalidades del género Malassezia sp	6
b)Dermatitis seborreica (DS).....	11
c)Climbazol.....	17
Planteamiento del problema.....	20
Justificación.....	21
Hipótesis.....	22
Metodología.....	22
Resultados.....	30
Discusión.....	36
Conclusiones.....	42
Bibliografía.....	43

INTRODUCCIÓN

La dermatitis seborreica (DS) es una entidad causada por un descontrol seborreico multifactorial, se asocia a diversas levaduras lipofílicas como *Malassezia sp.*, parte de la flora habitual de la piel de la mayoría de los adultos y adolescentes y se comportan como saprófitas, pueden ser aisladas del 90 al 100% en piel grasa⁽¹⁻³⁾. Su crecimiento por lo regular está asociado por el aumento de las secreciones sebáceas. Este género participa como agente etiológico en infecciones asociadas a diferentes entidades clínicas, entre las cuales se encuentra la propia dermatitis seborreica, que es una dermatosis inflamatoria caracterizada por lesiones rojizas, escamosas y oscuras, pruriginosas de evolución crónica y recidivantes, se presentan en regiones corporales donde hay abundantes glándulas sebáceas, como son cuero cabelludo, cara y parte superior del tronco; puede presentarse tanto en niños como en adultos y es más común en hombres que en mujeres⁽⁴⁻⁶⁾. La explicación de la influencia de las levaduras tipo *Malassezia* sobre la dermatitis seborreica, es que su aumento conlleva al incremento en los signos y síntomas de la enfermedad, de aquí que al disminuir su número, mejora el padecimiento.

El tratamiento de la DS es a base de productos que actúan directamente sobre el descontrol seborreico o bien sobre las levaduras de *Malassezia sp*; los productos más importantes son lociones y pomadas con ácido salicílico, azufre y alquitrán de hulla; también son efectivos el uso concomitante de champúes con disulfuro de selenio y piritione de zinc, propilenglicol, y diversos imidazoles en los que se encuentra al climbazol⁽⁷⁻¹¹⁾.

El climbazol es un derivado imidazólico, producto sintético, de acción básicamente fungistática, de amplio espectro y que actúa exactamente como cualquier tipo de imidazoles, es un producto que se utiliza sólo en forma tópica; puede ser utilizado en forma de champú o en cualquier otra forma tópica como cremas, soluciones, ungüentos⁽¹²⁾.

El presente estudio tiene como finalidad comprobar la sensibilidad de algunas cepas de *Malassezia sp* asociadas a la dermatitis seborreica, mediante

pruebas *in vitro* frente al climbazol para probar que éste como antimicótico fungistático nuevo es útil como tratamiento de la dermatitis seborreica⁽¹³⁻¹⁵⁾.

ANTECEDENTES

a) Generalidades del género *Malassezia* sp

Características generales

Este género tiene características morfológicas, bioquímicas y genotípicas que les permiten ser diferenciadas de otras levaduras. Las células pueden ser esféricas, ovales o cilíndricas, dependiendo de la especie; la producción de blastoconidias (blastosporas) da por un proceso de gemación enteroblástica, monopolar o simpodial, dejando una prominente cicatriz en el lugar de la gemación en la célula madre. Algunas especies pueden desarrollar pseudomicelio *in vivo* e *in vitro*⁽¹⁶⁾.

Actualmente en el género *Malassezia*, se incluyen 11 especies aceptadas, que se resumen en la Tabla 1.

TABLA 1

Especies actualmente aceptadas del género *Malassezia* ⁽¹⁷⁻²¹⁾.

<i>M. furfur</i> , Baillon, 1889.
<i>M. pachydermatis</i> , Dodge, 1935.
<i>M. sympodialis</i> , Simmons, Gueho, 1990.
<i>M. globosa</i> , Gueho, Midgley y Guillot, 1996.
<i>M. slooffiae</i> , Guillot, Midgley y Gueho, 1996.
<i>M. restricta</i> , Gueho, Guillot y Midgley, 1996.
<i>M. obtusa</i> , Midgley, Guillot y Gueho, 1996.
<i>M. dermatis</i> , Sugita, 2002.
<i>M. japonica</i> , Sugita, 2003.
<i>M. nana</i> , Hirai, 2004.
<i>M. yamatoensis</i>

La pared celular es muy gruesa y multi-estratificada; es muy gruesa (~ 0.12µm, 26 a 37% del volumen celular); sus principales componentes son azúcares (~70%), proteínas (~ 10%), lípidos (~ 15-29%) y pequeñas cantidades de nitrógeno y azufre⁽²²⁾.

Desde el punto de vista fisiológico, la característica principal de estas levaduras es la lipofilia o lipodependencia; casi todas las especies requieren de lípidos para su crecimiento como fuente de carbono. Con excepción de *M. pachydermatis*, las especies tienen un absoluto requerimiento *in vivo* e *in vitro* de ácidos grasos⁽²³⁾. La dificultad para aislar y mantener a éstas en cultivos ha sido uno de los factores principales para impedir su estudio⁽²⁴⁾. Al parecer el mejor método para mantenerlas es su conservación a -70°C⁽²⁵⁾.

Nomenclatura y taxonomía del género *Malassezia*⁽²³⁾

Las levaduras del género *Malassezia*, han sido clasificadas y ordenadas de diferentes formas a través de los años. Inicialmente

A pesar de que no se ha descrito para ninguna de las especies el estado teleomórfico, la viabilidad de las técnicas moleculares, especialmente la secuenciación de DNA-ribosomal, llevó a la inclusión de estas levaduras dentro de los *Ustilagomycetes*, una subclase dentro de la división *Basidiomycota* que abarca patógenos comunes de plantas.

Características morfológicas y fisiológicas de las especies^(21,23-25)

A continuación se describe la morfología macroscópica, microscópica y la patología asociada de las especies de *Malassezia* utilizadas en este estudio en la Tabla 2, y las características bioquímicas (fisiológicas) y el contenido de guanina y citosina (G+C) están resumidas en la Tabla 3.

TABLA 2

Morfología y tropismo de las especies de *Malassezia* ^(21,23-25).

ESPECIE	MORFOLOGÍA		PATOLOGÍA ASOCIADA
	MICROSCÓPICA (INCUBACIÓN: 7 DÍAS)	MACROSCÓPICA	
<i>M. furfur</i>	ADm: colonias opacas, lisas, con una elevación central o ligeramente plegadas con una elevación convexa.	Tamaño y forma variable: células ovales, cilíndricas (1.5-3.0 x 2.5-8.0µm) o esféricas (2.5-5.0µm). Forma gemas en una base ancha. Puede formar filamentos.	Pitiriasis versicolor, foliculitis, papilomatosis reticulada y confluyente de Gougerot y Carteaud, psoriasis, onicomicosis, fungemias.
<i>M. pachydermatis</i>	ADm: colonias mate, convexas de color crema (5mm en promedio).	Células pequeñas, ovaladas (2.0-2.5 x 4.0-5.0µm). Forma gemas en una base ancha dejando una cicatriz de gemación prominente.	Foliculitis, infecciones en animales y ocasionalmente en humanos, fungemias.
<i>M. sympodialis</i>	ADm (32°C): Colonias brillantes, lisas, planas o con una ligera elevación central (5mm en promedio).	Células ovales o globosas (1.5-2.5 x 2.5-6.0µm). Base de gemación más estrecha que la célula principal. Presenta gemación repetitiva o simpodial.	Dermatitis seborreica, pitiriasis versicolor, papilomatosis reticulada y confluyente de Gougerot y Carteaud, dermatitis atópica Psoriasis.
<i>M. globosa</i>	ADm: Colonias elevadas, plegadas y rugosas.	Células esféricas (2.5-8.0µm). Base de gemación estrecha. Las cicatrices no son prominentes. Puede formar filamentos cortos en el origen de la gema.	Pitiriasis versicolor, dermatitis atópica, dermatitis seborreica, foliculitis, onicomicosis.
<i>M. obtusa</i>	ADm: Colonias lisas y planas (4mm en promedio).	Células grandes y cilíndricas (1.5-2.0 x 4.0-6.0µm). La base de gemación es ancha. Puede formar filamentos.	Pitiriasis versicolor, psoriasis.
<i>M. restricta</i>	ADm: Colonias opacas, rugosas o lisas en los bordes (3mm de diámetro).	Las células son esféricas a ovales (1.5-2.0 x 2.5-4.0 µm). Formación de gemas en una base relativamente estrecha.	Pitiriasis versicolor, dermatitis seborreica.

ADm, agar Dixon modificado

Tabla 3
Características fisiológicas de las especies de *Malassezia*⁽²³⁾.

ESPECIE	CATALASA	ADS 32°	ADM 32°	ADM 37°	ADM 40°	TWEEN 20	TWEEN 40	TWEEN 60	TWEEN 80	%G+C
<i>M. furfur</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	66.4
<i>M. pachydermatis</i>	+/ \pm	+	+	+	+	-	+	+	+	55.6
<i>M. sympodialis</i>	+	-	+	+	+	-	+	+	+	54.0
<i>M. globosa</i>	+	-	+	\pm	-	-	-	-	-	53.5
<i>M. obtusa</i>	+	-	+	+/ \pm	-	-	-	-	-	60.7
<i>M. restricta</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	-	59.9

Interpretación de símbolos: +, crece; -, no crece; +/ \pm , crece o crece débilmente. ADS, agar dextrosa Sabouraud; ADm, agar Dixon modificado.

Identificación de especies

La identificación de *Malassezia* spp incluye las pruebas bioquímicas indicadas en la Tabla 3. Además, se han utilizado dos pruebas adicionales: la utilización de Cremophor EL (aceite de castor PEG-35) para el crecimiento de levadura y la actividad de β -glucosidasa sobre la esculina dando una coloración negra al medio por la liberación de sales férricas solubles. Hasta el momento las únicas especies diferenciables con estas pruebas son: *M. furfur* que asimila el Cremophor EL; y *M. sympodialis* que fragmenta la esculina⁽²⁶⁾. Los métodos actuales para identificar las especies de éste género también incluyen métodos moleculares muy diversos como la cariotipificación⁽²⁷⁾, análisis por RFLP⁽²⁸⁾, comparaciones de la secuencia de rRNA y DNA^(29,30), PCR-REA⁽³¹⁾, PCR-RFLP⁽³²⁾.

Aislamiento

Hay dos medios descritos en la literatura, que pueden ser recomendados para el aislamiento de todas las especies conocidas del género *Malassezia*. Esta la fórmula dada por Dixon en 1964 y la dada por Leeming y Notman⁽³³⁾. El uso del medio de Sabouraud con aceite de oliva fue frecuentemente usado en el pasado, pero algunas de las especies no sobrevivían en este medio. La formulación de Dixon provee un crecimiento sustancial y da características a las colonias, lo que ayuda a su identificación. La fórmula de Leeming y Notman asegura el aislamiento de todas las especies en una temperatura de incubación de 32-35°C necesariamente, junto con una atmósfera húmeda y en el caso de los cultivos provenientes de piel y otros materiales patológicos tiene que ser mantenido arriba de dos semanas para permitir el desarrollo de todas las especies⁽³³⁾.

La utilización de lípidos puede ser investigado empleando series de compuestos de lípidos tensoactivos del tipo "tween"; los resultados son variables de acuerdo con el grado de cadenas de carbono de cada uno de los tensoactivos^(18, 29).

Epidemiología

Desde hace muchos años se conoce que las levaduras lipofílicas forman parte de la biota cutánea de los animales de sangre caliente. La presencia de las especies de *Malassezia* en piel humana sana, fue detectada desde los inicios de la segunda mitad del siglo XIX; de las especies que aquí se describen, se ha confirmado que *M. pachydermatis* esta claramente adaptada a animales pero ocasionalmente puede ser aislada de humanos⁽³⁴⁾. En cambio las especies lípido-dependientes pueden estar presentes tanto en humanos como en otros animales localizadas en diferentes partes del cuerpo como piel cabelluda, frente, tronco y espalda tanto en personas sanas como en pacientes con diferentes afecciones cutáneas. La frecuencia de *M. restricta* varía según el autor. *M. furfur* es otra especie obtenida pero en menor frecuencia, así como la asociación de *M. globosa* con *M. sympodialis*. De todas las especies *M. obtusa* es la que se obtiene con menor frecuencia⁽³⁵⁻³⁷⁾.

La frecuencia y densidad de la colonización de estas levaduras se encuentra directamente relacionada con la edad de la persona y la actividad de las glándulas sebáceas del área en estudio⁽³⁷⁻³⁹⁾. La diferencia entre los estudios realizados podría ser explicada por las técnicas de muestreo, el medio de cultivo utilizado y posiblemente también por factores geográficos y étnicos⁽⁴⁰⁾.

b) Dermatitis seborreica (DS)

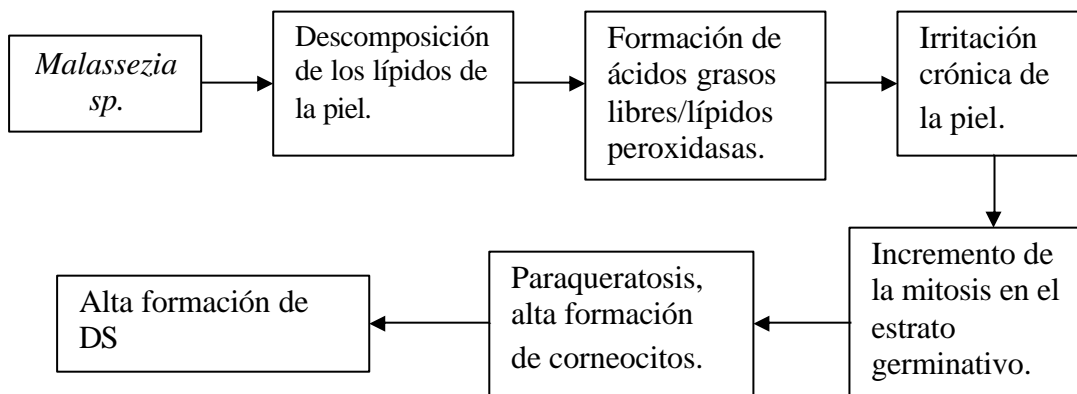
El nombre “dermatitis seborreica” implica inflamación grasa de la piel. Sin embargo, esta enfermedad es mucho más compleja de lo que el nombre llega a sugerir. Por definición, la dermatitis seborreica es una enfermedad inflamatoria, crónica, benigna, que cursa con eritema, inflamación, seborrea y descamación. Se manifiesta en forma de placas más o menos eritematosas, recubiertas de escamas blancas o amarillas, que producen un ligero prurito

Afecta aproximadamente al 2-5% de la población, y se localiza donde predominan las glándulas sebáceas: cuero cabelludo, región centro-facial (frente, laterales de la nariz, conductos auditivos), tórax y espalda⁽⁴¹⁾.

Papel de la *Malassezia sp*

Numerosos estudios confirman⁽⁴¹⁻⁴³⁾ el papel de las levaduras de *Malassezia sp.* en la aparición de la DS, las zonas donde se manifiesta son donde la densidad de *Malassezia* es más elevada, es decir, las zonas más seboreicas (cuero cabelludo: 500,000 levaduras/cm²). El porcentaje de *Malassezia* dentro de la microflora total del cuero cabelludo pasa del 46% para un cuero cabelludo normal a un 82% en la DS.

MECANISMO DE FORMACIÓN DE LA DERMATITIS SEBORREICA⁽¹²⁾.



Papel de la seborrea

Varios argumentos sugieren el papel patógeno de la seborrea en el desarrollo de la DS. Los más importantes son los siguientes:

Topográficos:

Localización clínica preferente de la DS en zonas ricas en glándulas sebáceas, como son: región medifacial, cuero cabelludo, región medio-torácica⁽³⁷⁾

Epidemiológicos:

Prevalencia muy baja de DS antes de la pubertad (independiente del periodo neonatal), y frecuencia superior en el hombre, más que en la mujer (papel de los andrógenos en el crecimiento y la estimulación de las glándulas sebáceas).

Aumenta la incidencia de la DS en la enfermedad de Parkinson, en particular la inducida por los neurolépticos: se observa frecuentemente una hiperseborrea, con una prevalencia de 59,5% de DS en esta población ⁽⁴¹⁾

Bioquímicos:

Faegermann⁽¹⁾, demostró que hay una cantidad de lípidos cutáneos de superficie significativamente superior en un grupo de 60 enfermos de DS, contra un grupo testigo de 60 personas sanas. Esto demuestra claramente el predominio lipídico en la DS.

Terapéuticos:

Acción espectacular de la isotretinoína (seboatrofiante y seboestática) en caso de acné asociado. Otros argumentos sugieren lo contrario: rareza de la asociación acné-DS, caudal de excreción sebácea normal incluso inferior durante la DS.

En definitiva, parece ser que la DS no se desarrolla en un terreno de hiperseborrea. Aunque, el papel del sebo parece tener importancia en el crecimiento de *Malassezia*, levadura implicada en la patología de la DS ^(41,42,44)

Factores diversos

Factores neurológicos:

Hay una gran incidencia de DS en pacientes con enfermedades neurológicas: enfermedad de Parkinson, siringomielia, poliomielitis, tetraplegia. El lazo patogénico es desconocido ⁽⁴¹⁾.

Factores climáticos:

Las condiciones climáticas cálidas, húmedas, la exposición solar excesiva, son factores estimulantes, aunque una exposición moderada a los ultravioletas es beneficiosa. La medición de las temperaturas cutáneas sobre la cara muestra que existen zonas más cálidas: zona T, conducto auditivo externo, contorno del

cuero cabelludo y unas zonas más frías: mejillas, nariz, lóbulo de las orejas, etc. ⁽⁴⁵⁾.

Factores nutricionales:

La DS aparece más frecuentemente en el alcohólico, particularmente en caso de pancreatitis asociada. Ninguno de estos dos factores es explicable, pero sus reportes de asociación con la DS son frecuentes. ⁽⁴¹⁻⁴⁶⁾.

Factores medicamentosos:

Dermatosis de tipo DS han sido manifestadas en tratamientos con cimetidina y metildopa. Al igual que los factores anteriores, la acción de estos medicamentos sobre la DS es desconocido ⁽⁴¹⁾.

Aspectos clínicos

La dermatitis seborreica se observa en el lactante y en el adulto. El diagnóstico clínico es, por regla general, fácil en la persona adulta, pero puede ser más difícil en el lactante, ya que se puede confundir con la dermatitis atópica. La DS es una afección benigna, pero su evolución crónica y recidivante puede repercutir significativamente en la calidad de vida. Las formas más severas pueden revelar una inmunodeficiencia, especialmente enlazada con la infección por el VIH ⁽³³⁾.

Formas del adulto:

El aspecto clínico de la DS "clásica" del adulto se caracteriza por la asociación de lesiones eritemato-escamosas, en las zonas seborreicas de la piel, especialmente en: cuero cabelludo, rostro, y en algunas zonas del tronco ⁽⁴⁾.

DS del cuero cabelludo

Es la forma más frecuente (95%). Para la mayoría de los autores, la pitiriasis *simplex* o simple ("caspa seca"), se considera como una forma leve de DS. La caspa se caracteriza por escamas blanquecinas de pequeño tamaño, poco adherentes y no presenta signos de inflamación evidentes. En cambio, la forma

típica de DS del cuero cabelludo o llamada también *capitis*, presenta placas escamosas, incluso con costras; son de tamaño más grande, tienen un color gris-amarillento y se adhieren al cuero cabelludo. Las escamas son visibles a simple vista, recubren las lesiones eritematosas y débilmente exudativas de aspecto graso u oleoso. La placa eritematosa está totalmente recubierta de escamas y es poco visible, salvo en los bordes externos de la lesión, abarcan frente, sien, región retro-auricular, base del cuello. Las lesiones pueden sobrepasar la línea de inserción capilar a lo que se denomina corona seborreica ^(46,47).

En la fase severa, las lesiones aparecen en placas eritemato-escamosas de tamaño variable, pudiendo recubrir la totalidad del cuero cabelludo. En esta fase, la mayoría de los pacientes se quejan de prurito intenso, a menudo tolerable, pero siempre molesto. En ciertos pacientes, las escamas son abundantes, oleosas y espesas y pueden emitir un olor desagradable y de tipo “rancio” (*pitiriasis steatoide*) ⁽⁴⁶⁾.

DS Facial

La cara constituye la segunda localización más frecuente de DS, 2 de cada 3 pacientes. Las zonas más frecuentes son: surcos nasogenianos, cejas y pabellones auriculares. Esta distribución es la más típica, así como en la barba y en el bigote.

En la cara, las lesiones se parecen a las descritas en la DS del cuero cabelludo. Sin embargo, el componente eritematoso es más importante y las escamas son de aspecto más graso ⁽⁴⁷⁾.

DS del tronco

El tronco constituye la tercera localización más frecuente de la DS (1 paciente sobre 3). Esta localización es la menos molesta gracias a la discreción de las lesiones. La pilosidad densa pectoral puede disfrazar la localización pretorácica ⁽⁴⁾.

Tratamiento

No existe el tratamiento definitivo para la dermatitis seborreica, la mayoría de éstos solo controlan o mejoran el padecimiento, sin embargo, varios principios activos han sido eficaces en los brotes inflamatorios, así como en el manejo del sebo, debido que actúan como saponificantes de la grasa. El papel patógeno u oportunista de las levaduras del género *Malassezia* ha llevado a utilizar los antimicóticos tópicos (ketoconazol, bifonazol y recientemente ciclopiroxolamina).

Los corticoides tópicos tienen actualmente un lugar más reducido debido a la eficacia de los antimicóticos, pero son útiles en formas muy severas y muy inflamatorias. Los esteroides son contradictorios, debido a que disminuyen eritema e inflamación, pero la posibilidad del rebote del proceso es frecuente⁽⁴⁵⁾.

Epidemiología

La DS es un motivo frecuente de consulta dermatológico, en diversos reportes indican que este padecimiento esta alrededor de 7% de todas las dermatosis; sin embargo en las edades más específicas del proceso, esta cifra puede ser mayor⁽³³⁾.

Varios argumentos⁽⁴²⁻⁴⁵⁾ confirman el papel de *Malassezia* en el desarrollo de las lesiones, sin embargo, la DS no se puede considerar como una patología infecciosa, sino como una reacción inflamatoria específica a la presencia de levaduras en gran cantidad. Los factores constitucionales que provocan esta reacción están por determinar, así como el rol de la seborrea, que es probablemente más cualitativo que cuantitativo.

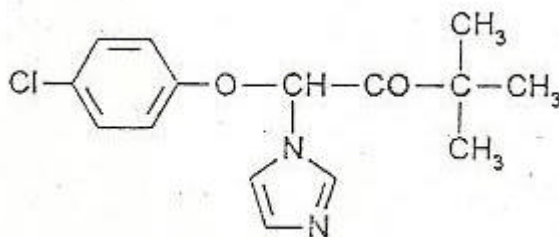
En el adulto, la evolución es crónica con brotes severos en situaciones de nerviosismo o cambios de estación. También los factores climáticos, neuro-psicológicos, medicamentosos, pueden favorecer la aparición del brote⁽³³⁾.

La inmunodeficiencia, especialmente ligada a la infección por el VIH, es a menudo la responsable de DS, grave, atípica y extendida, este fenómeno inmunológico no está bien explicado aún, debido a que otras inmunodeficiencias, especialmente del tipo linfopenia, no presentan una asociación directa con la DS. ⁽³⁹⁾.

c) **Climbazol**

Composición/ Información de los ingredientes^(12,48)

El nombre químico del climbazol es 1-(4-clorofenoxi)-1-(1H-imidazol)-3,3-dimetil-2-butanona, su fórmula total es C₁₅H₁₇ClN₂O₂. Tiene un peso molecular de 292,76 g/mol.



Riesgos de identificación⁽⁴⁸⁾

Perjudicial si es consumido por vía oral, es muy tóxico para organismos acuáticos, puede causar diversos efectos adversos.

Medidas de primeros auxilios⁽⁴⁸⁾

Consejo general: moverse del área de peligro, a la inhalación: moverse al aire fresco, al contacto con la piel: si hay síntomas y estos persisten llamar consultar al médico, si hay contacto con los ojos: lavar inmediatamente con agua abundante, si hay ingesta: obtener atención médica, propiciar el vómito, limpiar la boca con abundante agua. Estas medidas son en el caso de tener un

amplio contacto con la sal, como en el caso de individuos que almacenan el producto y pueden aspirarla.

Almacenamiento⁽⁴⁸⁾

Almacenar en su empaque original, para mantener la calidad del producto no almacenar en áreas de calor o directamente a la luz, mantener en un lugar seco y ventilado.

Propiedades físicas y químicas⁽⁴⁸⁾

De apariencia es un polvo cristalino de color blanco a gris, con olor característico, fácil de enmascarar con fragancias.

Su punto de fusión es de 95°C, tiene una presión de vapor <0,1mbar a 80°C, su solubilidad en agua se considera inmisible pero es soluble en otros disolventes como se muestra en la Tabla 4, posee un coeficiente de partición(n-octanol/agua) de 3,6.

TABLA 4
Solubilidad del climbazol frente a diversos disolventes⁽¹²⁾.

DISOLVENTES	% DE SOLUBILIDAD (APROXIMADA)
Alcohol bencílico	55
Etanol(96%)	50
Fenoxietanol	40
Etoxidiglicol	30
Propilenglicol	30
Butilenglicol	30
Dipropilenglicol	30
Ciertos perfumes en aceite	50

Mecanismo de acción⁽¹²⁾

Su mecanismo de acción es similar a todos los derivados azólicos, actúa a nivel de la 14- α -desmetilasa del lanosterol, dependiente de la citocromo-P450 oxidasa, causando la inhibición de la biosíntesis del ergosterol, principal esterol de la membrana celular del hongo e interrumpe la membrana celular de la levadura y del hongo

Características del producto terminado⁽¹²⁾

Es adecuado para productos del cabello que sean transparentes, aperlados o de color, posee excelente luminosidad, temperatura y estabilidad en almacenamiento, no forma complejos de color con iones metálicos que causen decoloración a la fórmula, tiene buena compatibilidad con el perfume y otros aceites comúnmente usados para el cuidado del cabello, es no higroscópico, es estable en pH ácidos a neutros y hay extensos estudios de seguridad para este producto.

Guías de formulación⁽¹²⁾

Las concentraciones recomendadas para los usos del climbazol son:

Para uso de producto anti-dermatitis seborreica o “anticaspa” en enjuague (ejemplo: Champú anticaspa) máximo 2% y preferentemente de 0,5% a 1,0%.

Para uso de producto constante anticaspa (ejemplo: tónico para el cabello o ampollitas anticaspa) máximo 0,5% y preferentemente de 0,1% a 0,3%.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

La dermatitis seborreica y su expresión más simple, forma *capitis* o comúnmente caspa, es un padecimiento dermatológico común y crónico, que ocurre en aproximadamente el 3-5% de la población mundial adulta. Las levaduras de *Malassezia* forman parte de la flora normal de la piel, y diversos estudios han demostrado que la DS, tiene como principales factores a dichas levaduras, las cuales se pueden hallar en proporciones muy elevadas.

Las especies *M. restricta* y *M. globosa* son las más frecuentemente relacionadas, pero hay otras especies que se han reportado asociadas a la DS, como son: *M. furfur*, *M. sympodialis* y *M. obtusa*. Su papel en la DS ha sido objeto de diversos estudios, donde ha quedado demostrado como terapia efectiva el uso de antimicóticos tópicos que ayudan a curar las lesiones y a desaparecer la recurrencia de los síntomas, particularmente a ir disminuyendo el número de levaduras de *Malassezia* ⁽⁴²⁾.

Esta enfermedad va comprometiendo de manera sensible la calidad de vida de las personas que la padecen, tanto por los síntomas asociados (descamación, eritema y prurito), como por el desagradable aspecto cosmético que las acompañan.

JUSTIFICACIÓN:

Los tratamientos estándares para la DS/*capitis*, consisten en el uso de champúes con antimicóticos para la saponificación de la grasa o sebo, y el control del desarrollo de las levaduras, dichos productos contienen como base jabones o saponificantes más derivados azólicos, por ejemplo ketoconazol, hidroxipiridonas o diversos productos como el piritione de zinc y el disulfuro de selenio, estos tratamientos son útiles para la disminución de grasa y alcanzar el efecto clínico deseado que es impedir la recolonización de las levaduras de *Malassezia*.

Con el fin de proporcionar diversas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la DS, se han evaluado diferentes combinaciones de agentes antimicóticos potentes; el verdadero interés clínico de evaluar estas asociaciones está en reducir la colonización de las levaduras y esto ha sido previamente comprobado mediante estudios *in vitro* en el orden de definir la actividad antifúngica en células de *Malassezia*, no sólo en términos de inhibición del crecimiento, sino también para comprobar los efectos anti-fúngicos esperados de manera específica con el uso de los champúes para el tratamiento de la DS, ya que dichos champúes consisten en aplicar altas dosis del compuesto activo durante un corto periodo de contacto con la zona. Por consiguiente se requiere probar al climbazol como nuevo antimicótico azólico para el tratamiento de la DS ⁽⁴³⁾.

El presente estudio fue planeado para evaluar la actividad inhibitoria en el crecimiento y el efecto fungicida del climbazol contra las cinco cepas de *Malassezia* mediante pruebas de sensibilidad *in vitro*, como las tiras y los discos de difusión o sensidiscos.

HIPÓTESIS

- H₀. El climbazol tiene actividad inhibitoria en el crecimiento de las levaduras de *Malassezia* y tiene efecto antimicótico.
- H₁. El climbazol no tiene actividad inhibitoria en el crecimiento de las levaduras de *Malassezia* y no tiene efecto antimicótico.

METODOLOGÍA

❖ CEPAS.

Para este trabajo se utilizaron 5 cepas estandarizadas de *Malassezia* provenientes de:

<i>M. obtusa</i>	Paciente con psoriasis, México.
<i>M. restricta</i>	Instituto Pasteur, Francia. (cepa referencia)
<i>M. sympodialis</i>	Instituto Pasteur, Francia. (cepa referencia)
<i>M. globosa</i>	Instituto Pasteur, Francia. (cepa referencia)
<i>M. furfur</i>	Instituto Pasteur, Francia. (cepa referencia)

Estas cepas fueron resembradas en medio Dixon modificado (Dm) durante todo el proceso de este trabajo, obteniendo un desarrollo en aproximadamente 5 días.

❖ MEDIO DE CULTIVO.

El agar de Dixon (Adm) modificado esta constituido de la siguiente manera:

Componentes y cantidades para el ADm

Extracto de malta	36.0g
Peptona micológica	6.0g
Bilis de buey	20.0g
Agar-agar	12.0g
Tween 40	10.0mL
Glicerol	2.0mL
Ácido oleico	2.0mL
Agua destilada	1000mL

Ajustándose a un pH final de 6 ± 0.3

FUNDAMENTO:

La formulación de Dixon provee un crecimiento sustancial y da características a las colonias, lo que ayuda a su identificación⁽³³⁾.

PROCEDIMIENTO:

Se pesaron cada uno de los componentes del ADm y se vertieron en un matraz cada uno dejando hasta el final los componentes más viscosos como tween 40 para evitar que se hicieran grumos, se agregó la cantidad de agua necesaria y se calentó con agitación como cualquier otro agar, posteriormente se verificó el pH.

Se esterilizó y se procedió a llenar las placas de Petri con aproximadamente 25mL de ADm en cada caja, para asegurar que durante el periodo de incubación no se secase el agar y se redujera impidiendo con esto el óptimo desarrollo de las colonias, además de asegurándose de no dejar burbujas y que estuvieran bien homogéneo para evitar dejar los lípidos de manera no uniforme. Se dejaron solidificar las placas.

❖ DIFUSIÓN DE DISCOS EN AGAR.

Se trabajó siguiendo los procedimientos estandarizados para el método de difusión de discos, ya que no se podía seguir los estándares del método M27-A desarrollados por el Comité nacional para los estándares de laboratorio clínico de las siglas en inglés NCCLS ("US National Committee for Clinical Laboratory Standards"), debido a que no están reportados estándares para levaduras como la *Malassezia sp*, así como tampoco se cuenta con puntos de corte para estas especies⁽⁴⁹⁾.

Se trabajó con discos de difusión en 12 concentraciones en $\mu\text{g/mL}$, las cuales fueron:

CONCENTRACIONES $\mu\text{g/mL}$

0.01	1.0
0.05	1.2
0.1	1.4
0.2	1.6
0.4	1.8
0.8	2.0

Para impregnar los discos con el antifúngico se disolvió el polvo en alcohol bencílico, se impregnaron los discos a las diferentes concentraciones y posteriormente se llevó a cabo un proceso de liofilización para eliminar todo el exceso de humedad de los discos.

FUNDAMENTO:

Con éste método se estudia la sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos, en función del halo de inhibición producido por la difusión del antifúngico en un medio de cultivo sólido.

Para el inóculo se utilizó una suspensión ajustada al 0,5 McFarland en solución salina (1.5×10^6 UFC/mL).

La inoculación se hace con una torunda impregnada de la suspensión de levadura y se siembra en tres direcciones, se dejó 15 min a temperatura ambiente, se colocan los discos en la superficie. La incubación se hace a 37°C por aproximadamente 5 días.

La lectura se hace midiendo los halos de inhibición del crecimiento en milímetros y dando la $\text{CMI}^{(50)}$

PROCEDIMIENTO:

La preparación del inóculo se hizo tomando una asada de la cepa y se depositó en tubos de ensayo de 16 x 150cm que contenían solución salina isotónica y mediante agitación se homogeneizó, después se ajustó al 0,5 McFarland (1.5×10^6 UFC/mL) agregando más solución salina isotónica (SSI) o más cantidad de levadura según fuera el caso.

En las placas ya preparadas con la cantidad suficiente de ADm se inoculó la suspensión ajustada con unos hisopos, se hizo en tres direcciones y después de dejar reposar las cajas se colocaron los discos con unas pinzas estériles, se utilizó una caja para las concentraciones de $0.01\mu\text{g}$ hasta la de $0.2\mu\text{g}$ (Figura 1), otra caja para las concentraciones de $0.4\mu\text{g}$ hasta la de $1.0\mu\text{g}$ (Figura 2), otra caja para las concentraciones de $1.2\mu\text{g}$ hasta la de $1.6\mu\text{g}$ (Figura 3) y otra caja para las concentraciones de $1.08\mu\text{g}$ y $2.0\mu\text{g}$ (Figura 4). Se sellaron las cajas y se pusieron a incubación.

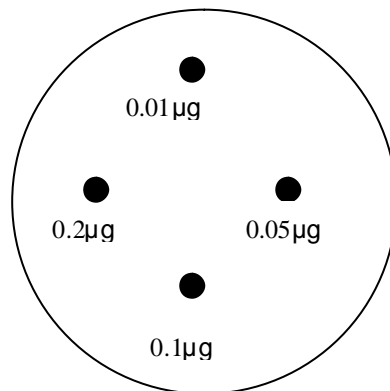


Figura 1

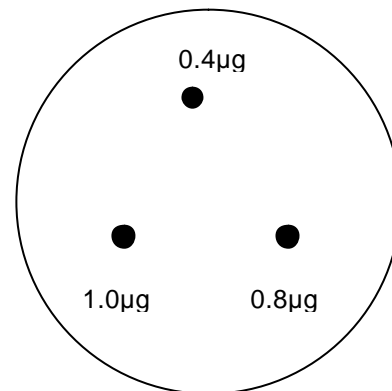


Figura 2

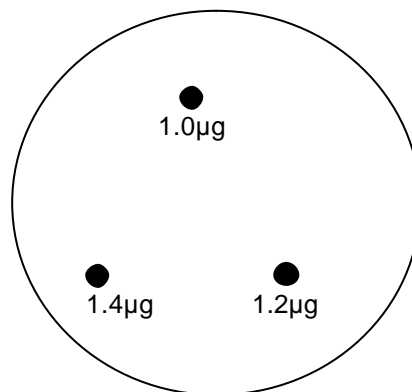


Figura 3

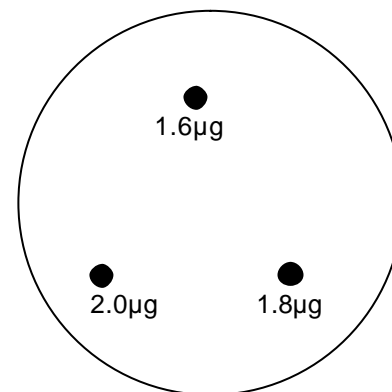


Figura 4

Se utilizaron como cepas de control *C. albicans* y *C. dubliniensis* provenientes de pacientes con candidosis oral, y las cepas de *Malassezia*.

❖ TIRAS IMPREGNADAS CON ANTIFÚNGICO (SISTEMA ETEST DE INVESTIGACIÓN DIAGNÓSTICA).

Se trabajó siguiendo los procedimientos estandarizados para el método de tiras, ya que no se podía seguir los estándares del método M27-A desarrollados por el Comité nacional para los estándares de laboratorio clínico de las siglas en inglés NCCLS (“US National Committee for Clinical Laboratory Standards”), debido a que no están reportados en la literatura estándares para levaduras como la *Malassezia sp*, así como tampoco se cuenta con puntos de corte para estas especies⁽⁴⁹⁾.

Se trabajó con tiras en 12 concentraciones en µg/mL que son:

CONCENTRACIONES µg/mL

0.01	1.0
0.05	1.2
0.1	1.4
0.2	1.6
0.4	1.8
0.8	2.0

Para impregnar las tiras reactivas con el antifúngico se disolvió el polvo en alcohol bencílico se impregnaron las tiras a las diferentes concentraciones y posteriormente se llevó a cabo un proceso de liofilización para eliminar todo el exceso de humedad de las tiras.

FUNDAMENTO:

Las tiras son un método cuantitativo de difusión en agar. Son de plástico inerte que incorporan un gradiente de concentración de antifúngico. Cuando se depositan sobre las placas de agar inoculadas, el antifúngico difunde en el medio y, tras una incubación se determina la CMI en el punto de intersección o de corte de la elipse de inhibición de crecimiento con la tira reactiva.

Para el inóculo se utiliza una suspensión ajustada al 0,5 McFarland en solución salina (1.5×10^6 UFC/mL).

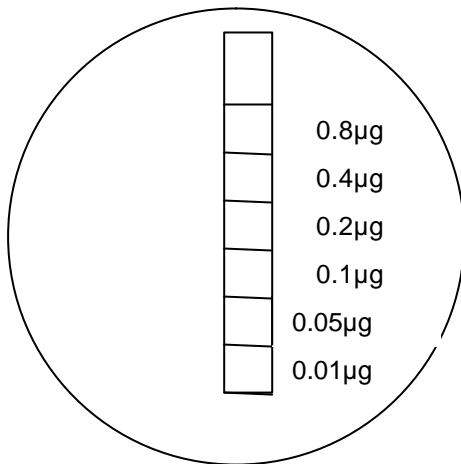
La inoculación se hace con una torunda impregnada de la suspensión de levadura y se siembra en tres direcciones, se deja 15min a temperatura ambiente para que se absorba el exceso del inóculo y se colocan las tiras reactivas en la superficie del agar, bien de forma manual o con un aplicador. La incubación se hace a 37°C por aproximadamente de 5 a 8 días.

La lectura en el caso de los azoles es que la CMI, es la concentración de antifúngico en el punto de intersección de la elipse de inhibición de crecimiento con la tira. En el caso de observarse colonias de menor tamaño en el interior de la elipse de inhibición de los azoles, no hay que tenerlas en cuenta para la determinación de la CMI. A veces, con algunos azoles, se observa doble halo de inhibición pero con colonias del mismo tamaño en su interior, en cuyo caso debe de considerarse resistente. En el caso de observarse triple halo de inhibición, la CMI es la concentración donde las colonias cambian de tamaño⁽⁵⁰⁾

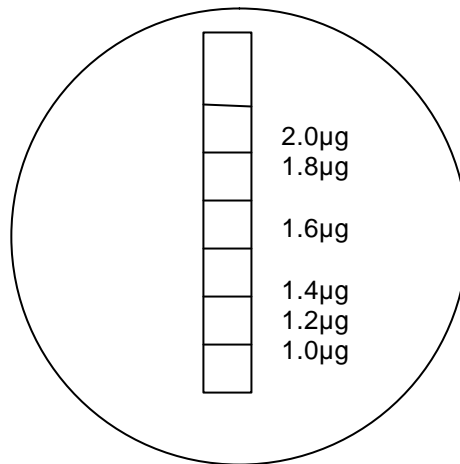
PROCEDIMIENTO:

La preparación del inóculo se hizo tomando una asada de la cepa y se depositó en tubos de ensayo de 16 x 150 que contenían solución salina y mediante agitación se homogeneizó, después se ajustó al 0,5 McFarland (1.5×10^6 UFC/mL) agregando más agua o más cantidad de levadura según fuera el caso, sin embargo se utilizó el mismo tubo de suspensión que se uso para los discos de difusión.

En las placas ya preparadas con la cantidad suficiente de agar Dm se inoculó la suspensión ajustada con unos hisopos, se hizo en tres direcciones y después de dejar reposar las cajas se colocaron las tiras reactivas con unas pinzas estériles, utilizándose una caja por tira.



Tiras A
(Bajas concentraciones)

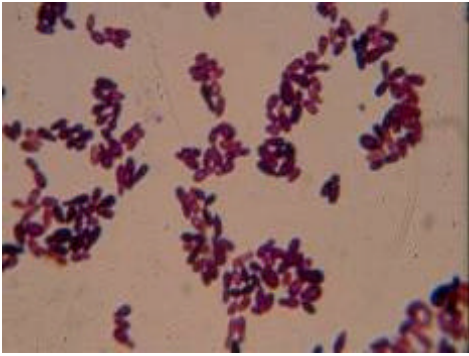


Tiras B
(Altas concentraciones)

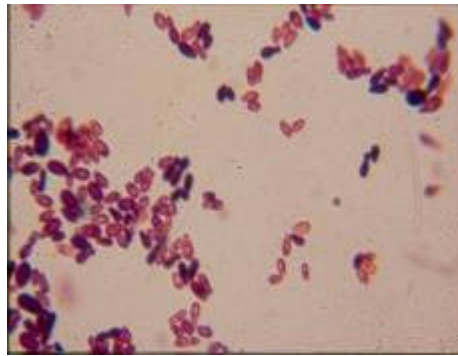
Se utilizaron como cepas de control de calidad *C. albicans* y *C. dubliniensis* provenientes de pacientes de candidosis orales, las cepas de *Malassezia* y además de probar dos cepas de dermatofitos como *T. rubrum* y *M. canis*.

❖ TINCIÓN DE GRAM.

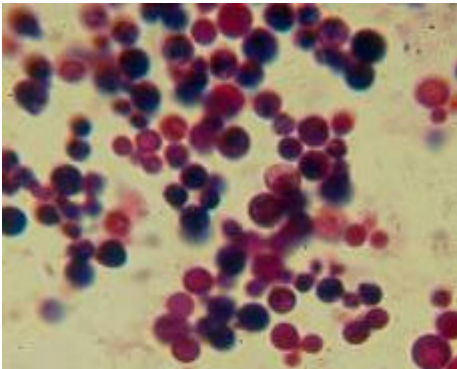
Se utilizó esta técnica, aunque se pudo utilizar otra, ya que es tradicional y fácil de realizar, se hizo con el propósito de observar al microscopio las formas y estructuras de las cinco diferentes levaduras, y se muestran a continuación.



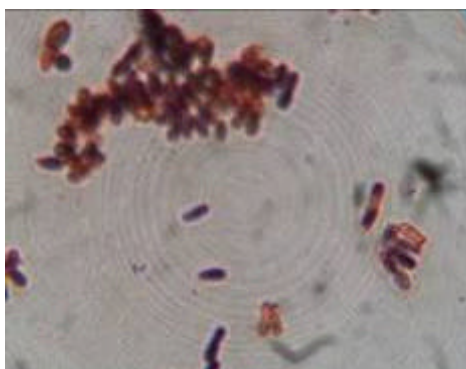
M. restricta



M. furfur



M. globosa



M. obtusa

RESULTADOS

❖ DIFUSIÓN DE DISCOS.

Para este estudio se realizaron dos ensayos para los discos A (de bajas concentraciones), que van de 0.01-1.0µg/mL, y dos más para los discos B (de altas concentraciones) que van de 1.0-2.0µg/mL.

En la Tabla 5 se observan las concentraciones en las que se forman los halos de inhibición para cada especie, para los discos A (0.01-1.0µg/mL), y en la Tabla 6 se muestran las concentraciones en las que se forman los halos de inhibición para cada especie, para los discos B (1.0-2.0µg/mL).

En la Tabla 7 se muestran los rangos de inhibición del crecimiento para los discos A y B (0.01-2.0µg/mL).

TABLA 5
CMI para cada especie.
Discos A (0.01-1.0µg/mL)

CEPAS	ENSAYO 1	ENSAYO 2
<i>M. restricta</i>	DD	DD
<i>M. obtusa</i>	DD	[1.0]=22mm
<i>M. sympodialis</i>	[1.0]=10mm	DD
<i>M. globosa</i>	[1.0]=10mm	[1.0]=12mm
<i>M. furfur</i>	DD	DD

DD, desarrollo disperso: (crecimiento de pocas colonias en toda la caja de manera no continua)

TABLA 6
CMI para cada especie.
Discos B (1.0-2.0µg/mL)

CEPAS	ENSAYO 1	ENSAYO 2
<i>M. restricta</i>	DD	DD
<i>M. obtusa</i>	[2.0]=23mm	DD
<i>M. sympodialis</i>	DD	DD
<i>M. globosa</i>	DD	DD
<i>M. furfur</i>	DD	DD

DD, desarrollo disperso: (crecimiento de pocas colonias en toda la caja de manera no continua)

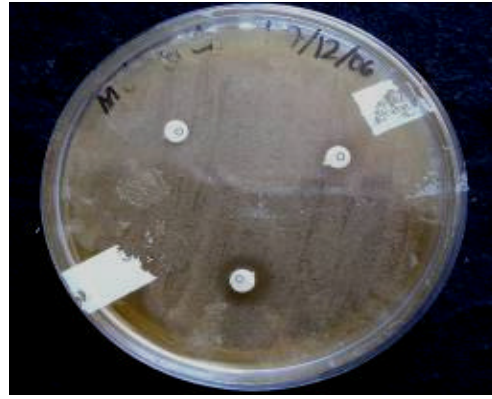
TABLA 7
Rango de CMI para cada especie.
Discos A y B (0.01-2.0µg/mL)

CEPAS	RANGO
<i>M. restricta</i>	DD
<i>M. obtusa</i>	[1.0]-[2.0]
<i>M. sympodialis</i>	[1.0]
<i>M. globosa</i>	[0.8]-[1.0]
<i>M. furfur</i>	DD

DD, desarrollo disperso: (crecimiento de pocas colonias en toda la caja de manera no continua)



M. globosa



M. obtusa

Ambas imágenes corresponden a la Tabla 5.

❖ TIRAS.

Para este estudio se realizaron tres ensayos para las tiras A (de bajas concentraciones), que van de 0.01-1.0 μ g/mL, y tres más para las tiras B (de altas concentraciones), que van de 1.0-2.0 μ g/mL.

En la Tabla 8 se observan las CMI (concentración en la que se forma la elipse de inhibición de crecimiento), para cada especie para las tiras A (0.01-1.0 μ g/mL), y en la Tabla 9 se muestran las CMI promedio para cada ensayo, con cada especie de estas mismas tiras A.

En la Tabla 10 se observan las CMI, para cada especie para las tiras B (1.0-2.0 μ g/mL) y en la Tabla 11 se muestran las CMI promedio para cada ensayo, con cada especie de estas mismas tiras B (1.0-2.0 μ g/mL).

En los ensayos con los dos dermatofitos no se muestra inhibición.

TABLA 8
CMI para cada especie.
Tiras A (0.01-1.0µg/mL)

CEPAS	ENSAYO 1	ENSAYO 2	ENSAYO 3
<i>M. restricta</i>	0.8	0.8	0.8
<i>M. obtusa</i>	0.8	0.8	0.8
<i>M. sympodialis</i>	0.4	0.4	0.4
<i>M. globosa</i>	0.1	0.05	0.1
<i>M. furfur</i>	0.05	0.05	0.1

TABLA 9
CMI promedio para cada especie.
Tiras A (0.01-1.0µg/mL)

CEPAS	PROMEDIO DE ENSAYO
<i>M. restricta</i>	0.8
<i>M. obtusa</i>	0.8
<i>M. sympodialis</i>	0.4
<i>M. globosa</i>	0.2
<i>M. furfur</i>	0.3

TABLA 10
CMI promedio para cada especie.
Tiras B (1.0-2.0µg/mL)

CEPAS	ENSAYO 1	ENSAYO 2	ENSAYO 3
<i>M. restricta</i>	2.0	2.0	1.8
<i>M. obtusa</i>	2.0	2.0	2.0
<i>M. sympodialis</i>	2.0	2.0	2.0
<i>M. globosa</i>	1.8	2.0	1.8
<i>M. furfur</i>	2.0	1.8	1.8

TABLA 11
CMI para cada especie.
Tiras B (1.0-2.0µg/mL)

CEPAS	PROMEDIO DE ENSAYOS
<i>M. restricta</i>	1.9
<i>M. obtusa</i>	2.0
<i>M. sympodialis</i>	2.0
<i>M. globosa</i>	1.8
<i>M. furfur</i>	1.8



M. restricta



M. globosa



M. furfur



M. obtusa

Todas las imágenes corresponden a la Tabla 8.

DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, por lo que respecta a la **difusión de discos en agar**, prácticamente no se puede reportar sensibilidad (S); sensibilidad-dependiente de dosis (S-DD) y resistencia (R), ya que los puntos de corte no están reportados en la literatura para las cepas con que se trabajó. Sin embargo, de acuerdo a cada una de las especies de *Malassezia* estudiadas se puede llegar a las siguientes interpretaciones:

M. restricta

Para esta especie no se observaron patrones definidos de inhibición, o halos de inhibición alrededor de los discos. Se observó un desarrollo disperso en todas las concentraciones, lo que imposibilita dar una CMI. Esta especie es la más sensible de todas, ya que a todas las concentraciones presenta desarrollo disperso.

M. obtusa

Se observaron patrones definidos de inhibición o halos de inhibición a partir de la concentración de 1.0µg/mL hasta 2.0µg/mL. Por lo tanto la CMI para esta especie es de 1.0µg/mL y de acuerdo a los resultados obtenidos esta especie es la que presenta menor sensibilidad de todas, debido a que siguió desarrollándose hasta altas concentraciones.

M. sympodialis

Para esta especie sólo se observó un halo de inhibición a la concentración de 1.0µg/mL, ya que a concentraciones mayores hubo un desarrollo disperso de la colonia, lo que indica que la CMI para esta especie es de 1.0µg/mL pero a concentraciones mayores empieza a haber desarrollo disperso, lo que indica que la especie a concentraciones mayores es más sensible, siendo así la segunda especie más sensible de todas después de *M. restricta* y *M. furfur*.

M. globosa

Se observaron halos de inhibición a concentraciones de 0.8µg/mL hasta concentraciones de 1.0µg/mL, lo que indica que la CMI para esta especie es de

0.8µg/mL, y al igual que *M. sympodialis* a concentraciones mayores empieza a haber desarrollo disperso, lo que indica que la especie a concentraciones mayores es más sensible, siendo la tercera especie más sensible.

M. furfur

No se observaron patrones definidos de inhibición, o halos de inhibición alrededor de los discos para esta especie. Se observó un desarrollo disperso en todas las concentraciones, lo que imposibilita dar una CMI. Al igual que *M. restricta* ésta especie de acuerdo con los resultados obtenidos, es la más sensible de todas, ya que a todas las concentraciones presenta desarrollo disperso.

Por lo que respecta al trabajo en **tiras**, tampoco se pueden reportar sensibilidad (S); sensibilidad-dependiente de dosis (S-DD) y resistencia (R), ya que tampoco están indicados en la literatura para estas cepas con las que se trabajó; al igual que el ensayo anterior se da, una interpretación de los resultados obtenidos

El comportamiento de sensibilidad de las tiras con las especies estudiadas, presenta similitud con el método de la difusión de discos, cuando éstas tienen una concentración de 0.01-1.0µg/mL de antifúngico. Sin embargo, cuando éstas tienen una concentración de 1.0-2.0µg/mL, no existe una correlación con los resultados de la difusión de discos en esta misma concentración, esto se puede deber a un problema de difusión del antifúngico en la superficie del medio de cultivo al utilizar estas segundas tiras.

Al observar las elipses de inhibición en las tiras de concentración de 0.01-1.0µg/mL, los halos o puntos de corte, se presentan en la parte superior de la tira, es decir, en las concentraciones más altas. Lo mismo sucede con las tiras de concentración de 1.0-2.0µg/mL, donde los puntos de corte se encuentran en la parte superior de la tira, es decir, en las concentraciones más altas.

Lo que se esperaba, era que si se presentaban puntos de corte en la parte superior de la tira de concentración de 0.01-1.0µg/mL, se presentarían

entonces, puntos de corte en la parte inferior de la tira de concentración de 1.0-2.0µg/mL, para que entonces existiera una continuidad con las concentraciones a las que es sensible la levadura al antifúngico.

Existen nueve estudios publicados actualmente que están relacionados con el estudio del climbazol, el primero de ellos es el de Yang et al⁽⁵¹⁾, en que utilizaron el método de cromatografía líquida establecida para la determinación de varios agentes “anticaspa”, como: ácido salicílico, piritionato de zinc, octopirox, ketoconazol y climbazol, todos en presentación en champú. El método es mediante un corrimiento en cromatografía líquida y su acción directa contra la seborrea y no específicamente frente a los agentes etiológicos, los resultados de este estudio muestran que el método fue simple, preciso y puntual.

El segundo trabajo es el de Kobayashi et al⁽⁵²⁾, en el que determinan específicamente el efecto del climbazol en citocromo-P450 hepática microsomal y el metabolismo de enzimas para cuatro diferentes isoformas del citocromo P450, examinado en ratas Long-Evans hembras, los resultados para este estudio indican que el climbazol induce e inhibe al citocromo P450 dependiente del metabolismo de enzimas *in vivo* y puede tener efecto dosis-diferencial en el citocromo llamado CYP2B1 e hígado de rata. El tercer trabajo es de los mismos autores⁽⁵³⁾, y está relacionado con el anterior estudio ya que en éste, además de determinar el efecto del climbazol en citocromo-P450 hepático microsomal, comparan el potencial de inducción con otro N-sustituto de azol como el clotrimazol y los resultados para este estudio indican que el climbazol es un nuevo potente inductor de P450 hepático microsomal y del metabolismo de enzimas como el clotrimazol, pero puede tener diferentes mecanismos para esta inducción de enzimas en hígado de rata. Aunque en ambos trabajos se deja en claro que la destrucción del climbazol es por vía hepática, esto tiene poca importancia práctica debido a que éste no se da por vía oral, es decir que sólo se aplica en forma tópica y la absorción percutánea es mínima.

El cuarto trabajo es el de Coiffard et al⁽⁵⁴⁾, en el que comparan la termoestabilidad de varios agentes antiseborreicos naturales y sintéticos diluidos en una solución de pH alrededor de 7. Los productos estudiados fueron los siguientes, naturales: sulfaprolamina y usnato de sodio y como sintéticos: piritionato-olamina y climbazol. Los resultados de este estudio fueron que el piritionato-olamina es el agente más estable entre los estudiados. La interpretación de este trabajo únicamente nos indica la estabilidad del producto a un pH neutro, sin embargo es importante citar que la piel normal, tiene un pH ligeramente ácido. Los resultados sólo se pueden relacionar con termoestabilidad y no con la eficacia de los productos.

El quinto de los estudios es de Mayser et al⁽⁵⁵⁾, el cual se basa en que los estudios de eficacia comparativa *in vitro* pueden no sólo considerar la CMI de las levaduras de *Malassezia*, sino también la biodisponibilidad de la sustancias para el cabello y cuero cabelludo, y en este trabajo utilizan un nuevo método en el que utilizan cabello de diez voluntarios que fueron estandarizados con 5 minutos de incubación con diferentes formulaciones de champúes, inoculados con *M. sympodialis* o *M. globosa* y de acuerdo con los resultados reportados, 1% del climbazol probado puede ser particularmente efectivo. Este es un nuevo método para hallar agentes antimicóticos, específicos para evaluar la eficacia de las formulaciones antiseborreica.

El sexto trabajo es de Wigger et al⁽⁵⁶⁾, en el cual investigaron la eficacia y seguridad del champú de climbazol al 0.65% en la DS de 30 voluntarios. Los resultados fueron que después de varias semanas de tratamiento y lavados, se observó una reducción de la dermatitis seborreica y el prurito, por lo tanto se concluyó que la formulación probada es efectiva en el tratamiento de la pitiriasis *capitis* de moderada a severa. Es importante resaltar que este es el primer trabajo en humanos en el que se comprueba que el climbazol en champú es efectivo y no causa efectos secundarios.

El séptimo trabajo es el de Schmidt A⁽⁵⁷⁾, en el que determinaron la CMI probando 40 cepas de *M. pachydermatis* contra climbazol, clotrimazol y sulfadiazina de plata, obteniéndose como resultados para el climbazol rangos

de CMI <0.06 y $1\mu\text{mL}$, lo que da como conclusión que el clotrimazol y el clotrimazol muestran buena actividad *in vitro* contra *M. pachydermatis*. La actividad del clotrimazol fue aun mayor a la del clotrimazol, que pudo haber sido por la solubilidad en agua del clotrimazol. La interpretación que podemos hacer a este estudio, radica en que la cepa utilizada (*M. pachydermatis*), solamente afecta a diversos tipos de animales y ocasionalmente al humano. Debido a que DS, también se puede presentar en diversos animales (perros, gatos, etc.), tiene sentido de su probable uso en este tipo de reservorios.

El octavo de los estudios es del mismo Schmidt et al⁽⁵⁸⁾, que utilizaron un método de pruebas de sensibilidad *in vitro* que evalúa a *M. furfur* en una placa de microdilución, que es revelada con un método colorimétrico en medio de de Leeming-Notman modificado, previa incubación con Azul de Alamar. Veintidos cepas de *M. furfur* fueron probadas, las CMI fueron determinadas para varios compuestos como, piritionato-olamina, piritionato de zinc, disulfuro de selenio y el clotrimazol, y los resultados para el caso específico de este último, fueron que el rango de sus CMI estuvieron entre 0.03 y $1\mu\text{mL}$ con una media empírica de 0.03mg/mL . Este dato indica la elevada actividad *in vitro* del clotrimazol contra *M. furfur*. Los resultados de este estudio indican que clotrimazol es el que tuvo la mayor actividad *in vitro*.

El ultimo trabajo es del mismo autor Schmidt et al⁽⁵⁹⁾, en este trabajo evalúan al igual que en el anterior la actividad de *M. furfur* en una placa de microdilución, que es revelada con un método colorimétrico en medio de de Leeming-Notman modificado, previa incubación con azul de alamar, pero la diferencia es que en este último trabajo lo hacen contra compuestos azólicos, como el bifonazol, el clotrimazol, el ketoconazol y el clotrimazol, en este estudio se trabajo con 30 cepas de *M. furfur*, y la CMI para el clotrimazol en este estudio fue de <0.06 a $0.5\mu\text{mL}$, con una media $<0.06\mu\text{mL}$, por lo que se concluyó que el clotrimazol al igual que el ketoconazol muestran una actividad similar *in vitro* contra la *M. furfur*.

Resumiendo, de los nueve trabajos, sólo en cinco de ellos se utilizaron cepas de *Malassezia* para el desarrollo del experimento, utilizando únicamente *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. furfur* y *M. pachydermatis* ésta última zoofílica.

Estos estudios fueron realizados con técnicas como la evaluación clínica de pacientes voluntarios con DS de moderada a severa bajo el uso de champúes con climbazol y determinando las CMI en sistemas de microdilución utilizando medio de Leeming-Notman modificado, con el método colorimétrico de azul de Alamar, siendo solamente el último trabajo el más cercano al desarrollo que tuvo este presente trabajo, ya que es el que muestra más cosas en común como por ejemplo, que evaluó cepas de *Malassezia*, aunque solo utilizó a *Malassezia furfur*, y que utilizó componentes azólicos como lo es el climbazol, pero la diferencia principal es la metodología utilizada.

En el trabajo de Ashbee⁽⁶⁰⁾, se incluye la más actual de las revisiones de las especies del género *Malassezia*, su rol en las enfermedades humanas que causa y recientes novedades de la interacción con el sistema inmune del hospedero, además de incluir información acerca de las diferentes especies aisladas de diversos sitios del cuerpo en diferentes países, donde se encuentra una relación con el presente trabajo, así como también información referente a la actividad *in vitro* de diversos componentes (ketoconazol, fluconazol, clotrimazol, itraconazol, etc), contra las once especies reconocidas del género *Malassezia*, en donde se incluyen los rangos de CMI reportados para cada una, pero aún no se incluye al climbazol.

Es por eso que el presente trabajo es pionero en el uso de la técnica de discos de difusión en ADm y el uso de las tiras impregnadas con antifúngico (tipo "etest"), además de trabajar con cinco diferentes especies *Malassezia*, incluidas las dos primeras especies causantes de la DS como son *M. restricta* y *M. furfur*, lo que concuerda con los resultados obtenidos ya que se encontraron como las dos especies más sensibles al climbazol.

Se espera que en el futuro se realicen trabajos clínicos (Fase3) para evaluar las diferentes etapas de la DS contra el uso del climbazol, y también se espera estudios comparativos con otros antimicóticos como el ketoconazol, piritionato-olamina, piritionato de zinc y disulfuro de selenio, que son indicados para el tratamiento de la DS.

CONCLUSIONES

- El climbazol presentó actividad antimicótica *in vitro* frente a las diferentes especies de *Malassezia*.
- Conforme los métodos utilizados, climbazol tiene la mayor actividad *in vitro* en orden decreciente frente a *Malassezia restricta*, *Malassezia furfur* y *Malassezia globosa*.
- El orden de sensibilidad de las cepas, concuerda con el orden de los agentes etiológicos de la DS *capitis*.
- La metodología de difusión de discos en agar fue superior a las tiras impregnadas, para evaluar la sensibilidad del climbazol.
- La sensibilidad en tiras, es una técnica más sencilla, pero deberá estandarizarse más la concentración del producto a probar.

BIBLIOGRAFÍA

1. Faergemann J. Pityrosporum infections. *J Am Acad Dermatol* 1994; 31: Suppl: 18-20.
2. Mervyn L. Clínicas Dermatológicas. Mc. Graw-Hill Interamericana. Vol. 1. México DF, 1996. Pp: 59-64.
3. Salcedo N. Cultures and physiologic properties of the fungus producing tinea versicolor. PAHO. Washington, D.C. 1980; 396: 44-54.
4. Saúl A. Lecciones de dermatología. Edit. Méndez editores. 13ª ed. México. 1998. Pp: 196-197, 356-357.
5. Arti N, Surrinde K, Omkar N, et al. Pityriasis (tinea) versicolor in infancy. *Pediatr Dermatol* 1988; 5: 260-262.
6. Faergemann J, Jones J C, Hettler O, et al. P. ovale (M. furfur) as the causative agent of seborreic dermatitis; new treatment options. *Br J Dermatol* 1996; 134 Suppl: 46: 12-15.
7. Grigoriu D. Medical Mycology. Ediciones Roche Scientific Service; Suiza. 1987. Pp: 177-187.
8. Bäck O, Faergemann J and Hörnqvist R. Pityrosporum folliculitis: A common disease of the young and middle-age. *J Am Acad Dermatol* 1985; 12: 56-61.
9. Faergemann J, Johansson S, Bäck O, et al. An immunologic and cultural study of P. folliculitis. *J Acad Dermatol* 1986; 14: 429-433.
10. Ford G P, Ive F A and Midgley G. Pityrosporum folliculitis and ketoconazole. *Br Dermatol* 1982; 107: 691-695.
11. Kieffer M, Bergbrant I M., Faergemann J, et al. Immune reactions to Pityrosporum ovale in adult patients with atopic and seborrheic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 1990; 22: 739-742.
12. Monografía de Symryse. Crinipan® AD an effective anti-dandruff agent. 2006.
13. Ingham E, Cunningham C. Malassezia furfur. *J Med Veter Mycol* 1993; 31: 265-288.

14. Dorn M y Roehnert K. Dimorphism of *Pityrosporum orbiculare* in a defined culture-medium. *J Invest Dermatol* 1997; 69: 244-248.
15. Bhattacharyya Y, Edgard M, Cordery C, et al. Colonization of living skin equivalents by *Malassezia furfur*. *Med Mycol* 1998; 36: 15-19.
16. Midgley G. The diversity of *Pityrosporum* (*Malassezia*) yeast in vivo and in Vitro. *Mycopathologia* 1989; 106: 143-153.
17. Guillot J, Chermette R, Guého E, Prévalence du genre *Malassezia* chez les mammifères. *J Mycol Med* 1994; 4: 72-79.
18. Guillot J, Guého E, Lesourd M, et al. Identification of *Malassezia* species. *J Mycol Med* 1996; 6: 103-110.
19. Guillot J, Chermette R, Guého E, Conformation of the nomenclatural status of *Malassezia pachydermatis*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1995; 67: 173-176.
20. Guillot J, Chermette R, Guého E, Epidemiological analysis of *M. pachydermatis* isolates by partial sequencing of the large subunit ribosomal RNA. *Research in Veterinary Science* 1997; 62: 22-25.
21. Sugita T, Takashima M, Shinoda T, Suto H, et al. New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1363-1367.
22. Ashbee H R, Evans E G V. Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 21-57.
23. Méndez L J, López R y Hernández F. Actualidades en micología Médica. Contenido temático del VI diplomado en micología médica "Dr. Ernesto Macotella Ruíz". Facultad de Medicina, UNAM. 3a edición. México. 2006. Pp: 109-117.
24. Cunningham A C, Ingman E, Gowland G. Humoral responses to *Malassezia furfur* serovas A, B and C in normal individuals of various ages. *Br J Dermatol* 1992; 127: 476-481.
25. Crespo M J, Abarca M L, Cabanes F L. Evaluation of different preservation and storage methods for *Malassezia* spp. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3872-3875.

26. Mayser P, Papavassilis C, Pickel M, et al. Differentiation of *Malassezia* species: selectivity of Cremophor EL, castor oil and ricinoleic acid for *M. furfur*. *Br J Dermatol* 1997; 137: 208-213.
27. Howell S A, Quin C, Midgley G. Karyotypes of oval cell forms of *Malassezia furfur*. *Mycoses* 1993; 36: 263-266.
28. Schechtman R C, Midgley G, Bingham J S., et al. Adherence of *Malassezia* isolates to human keratinocytes in Vitro a study of HIV-positive patients with seborreic dermatitis. *Br J Dermatol* 1995; 133: 537-541.
29. Guillot J, Guého E. The diversity of *Malassezia* yeast confirmed by rRNA sequence and nuclear DNA comparisons. *Antonie van Leeuwenhoek* 1995; 67: 297-314.
30. Makimura K, Tamura Y, Kudo M, Uchida K, Saito H, Yamaguchi H. Species identification and strain typing of *Malassezia* species stock strains and clinical isolates based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *J Med Microbiol* 2000; 49: 29-35.
31. Gupta A K, Coolí Y, Summerbell R C. Molecular differentiation of seven *Malassezia* species. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1869-1875.
32. Mirhendi H., Makimura K., Zomorodian K, et al. A simple PCR-RFLP method for identification of 11 *Malassezia* species. *J Microbiol Methods* 2005; 61: 281-284.
33. Midgley G. The lipophilic yeasts: state of the art and prospects. *Med Mycol* 2000; 38 (1): 9-16.
34. Mickelsen P A, Viano-Paulson M C, Stevens D A, Díaz P S. Clinical and microbiological features of infection with *Malassezia pachydermatis* in high-risk infants. *J Infect Dis* 1988; 157: 1163-1168.
35. Nakabayashi A, Sei Y, Guillot J Identification of *Malassezia* species isolated from patients with seborrhoeic dermatitis, atopic dermatitis, pityriasis versicolor and normal subjects. *Med Mycol* 2000; 38: 337-341.
36. Gupta A, Kohli Y, Summerbell R, Faergemann J. Quantitative culture of *Malassezia* species from different body sites of individuals with or without dermatoses. *Med Mycol* 2001; 39: 243-251.

37. Marcon M J, Powell DA. Human infections due to *Malassezia* spp. *Clin Microbiol Rev* 1992; 5: 101-119.
38. Nazzaro D M, Passl S, Caprill F, et al. Growth requirements and lipid metabolism of *Pityrosporum orbiculare*. *J Invest Dermatol* 1976; 66: 178-182.
39. Groisser D, Bottonne E J and MLebwohl. Association of *P. orbiculare* (*M. furfur*) with seborreic dermatitis in patients with acquired immuno deficiency syndrome (AIDS) *J Am Acad Dermatol* 1989; 20: 770-773.
40. Gould D J, Mortimer P S, Strong M, et al. A double-blind, placebo-controlled, multicenter trial of lithium succinate ointment in the treatment of seborrheic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 1992; 26: 452-457.
41. Crespo V y Delgado V. *Malassezia* species in skin diseases. *Curr Opin Infect Dis* 2002; 15: 133-142.
42. Orozco T y Arenas R. *Pityrosporum ovale* en dermatitis seborreica. *Dermatología Rev Mex* 1995; 39(6): 343-346.
43. Gupta A, Batra R, Bluhm R, Boekhout T y Dawson T. Skin diseases associated with *Malassezia* species. *J Am Acad Dermatol* 2004; 51(5): 785-798.
44. Lorente G, Ermosilla V. Clinical efficacy of a new ciclopiroxolamine/zinc piritione shampoo in scalp seborrheic dermatitis treatment. *Eur J Dermatol* 2006; 16(5): 1-7
45. Roques C, Brousse S y Panizzutti C. In vitro antifungal efficacy of ciclopiroxolamine alone and with zinc piritione compared to ketoconazole against *Malassezia globosa* and *Malassezia restricta* referente strains. *Mycopathologia* 2006; 162: 395-400.
46. Bonifaz A. *Micología médica básica*. Méndez-Cervantes edit. México, D.F. 2000. Pp: 91-100, 327-331.
47. Arenas R. *Dermatología Atlas. Diagnóstico y tratamiento*. Mc. Graw-Hill Interamericana. México D.F. 1996. Pp: 21-23, 46-47.
48. Monografía de Symryse. Crinipan® AD (Climbazole) Art-NR. 0200510 Safety data sheet. 2005.

49. Espinel –Ingroff A, Warnock D W, Vazquez J A y Arthington- Skaggs B. A. In vitro antifungal susceptibility methods and clinical implications of antifungal resistance. *Med Mycol* 2000; 38, Supplement 1, 293-304.
50. Martín-Mazuelos E, Cantón Lacasa E, Espinel-Ingroff A. Otros métodos para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos. En: Pemán J, Martín Mazuelos E, Rubio MC (Eds.) Guía práctica de identificación y diagnóstico en Micología Clínica. Bilbao, *Rev Iberoam Micol* 2001; 16.1-16.9.
51. Yang Y W, Zhu Y, Su X Q. Determination of antidandruff agent salicylic acid, zinc pyrithione, octopirox, climbazole and ketoconazole in shampoo by high performance liquid chromatography. *Wei Sheng Yan Jiu* 2005; 34(5): 626-8.
52. Kobayashi Y, Suzuki M, Ohshiro N, et al. Induction and inhibition of cytochrome P450 and drug-metabolizing enzymes by climbazole. *Biol Pharm Bull* 2002; 25(1): 53-7.
53. Kobayashi Y, Suzuki M, Ohshiro N, et al. Climbazole is a new potent inducer of rat hepatic cytochrome P450. *J Toxicol Sci* 2001; 26(3): 141-50.
54. Coiffard C, Coiffard L, de Roeck-Holtzhauer Y. Comparison of the thermostability of natural (sulfoprolamine and sodium usnate) and synthetic (climbazole and piroctone olamine) antidandruff agents. *Ann Pharm Fr* 1999; 57(5): 392-6.
55. Mayser P, Argembeaux H, Rippke F. The hair strand test - a new method for testing antifungal effects of antidandruff preparations. *J Cosmet Sci* 2003; 54(3): 263-70.
56. Wigger-Alberti W, Kluge K, Elsner P. Clinical effectiveness and tolerance of climbazole containing dandruff shampoo in patients with seborrheic scalp eczema. *Schweiz Rundsch Med Prax* 2001; 90(33): 1346-9.
57. Schmidt A. In vitro activity of climbazole, clotrimazole and silver-sulphadiazine against isolates of *Malassezia pachydermatis*. *Zentralbl Veterinarmed B* 1997; 44(4): 193-7.
58. Schmidt A, Ruhl-Horster B. In vitro susceptibility of *Malassezia furfur*. *Arzneimittelforschung* 1996; 46(4): 442-4.

59. Schmidt A, Ruhl-Horster B. In vitro susceptibility of *Malassezia furfur* against azole compounds. *Mycoses* 1996; 39(7-8): 309-12.
60. Ashbee HR. Update on the genus *Malassezia*. *Med Mycol* 2007; 45: 287-303.