

71
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

VALORACION DE LA ACTIVIDAD "IN VITRO"
DEL KETOCONAZOL (R 41 400) FRENTE A
DIFERENTES CEPAS DE CANDIDA AISLADAS
DE CASOS PATOLOGICOS



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

MARIA JACKELINE ERENDIRA HERNANDEZ VELOZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

1991



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	PAGINA
INTRODUCCION	1
1. OBJETIVOS	4
2. CANDIDOSIS	5
3. TIPIFICACION DEL GENERO CANDIDA	8
4. TERAPIA	13
5. RESISTENCIA A AZOLES	17
6. KETOCONAZOL	
6.1 ANTECEDENTES	19
6.2 PROPIEDADES FISICOQUIMICAS	22
6.3 MECANISMO DE ACCION	23
6.4 ESTUDIOS FARMACODINAMICOS	
6.4.1 ACTIVIDAD ANTIMICOTICA "IN VITRO"	26
6.4.2 ACTIVIDAD ANTIMICOTICA "IN VIVO"	29
6.5 ESTUDIOS FARMACOCINETICOS	
6.5.1 ABSORCION, METABOLISMO Y EXCRECION	
EN ANIMALES	31
6.5.2 ABSORCION, METABOLISMO Y EXCRECION	
EN EL HOMBRE	32
6.6 REACCIONES ADVERSAS	
6.6.1 TOXICIDAD	33
6.6.2 EMBRIOTOXICIDAD	35
6.6.3 MUTAGENICIDAD Y CARCINOGENICIDAD	35

	PAGINA
6.6.4 TOXICIDAD OFTALMICA	36
6.6.5 EFECTOS SOBRE LAS ENZIMAS MICROSMATICAS	36
6.6.6 REACCIONES SECUNDARIAS	37
6.7 ESTUDIOS DE SEGURIDAD EN EL HOMBRE	37
7. MATERIAL	38
8. METODOLOGIA	42
9. RESULTADOS	50
10. DISCUSION DE RESULTADOS	86
11. CCNCLUSIONES	92
12. BIBLIOGRAFIA	93

I. INTRODUCCION

Ha transcurrido más de una década desde la aparición del ketoconazol, que ha demostrado ser un antimicótico de amplio espectro, activo por vía oral y con mínimos efectos secundarios. Antes de su creación, los clínicos y los pacientes se enfrentaban a las enfermedades micóticas con una serie de fármacos que, especialmente en el caso de las micosis sistémicas tenían un valor limitado y una toxicidad inaceptable, tal es el caso de la griseofulvina, considerada como el primer antimicótico sistémico, pero efectiva sólo sobre dermatofitos, o bien la anfotericina B, cuyo espectro antimicótico es amplio, sin embargo, es demasiado tóxica y de difícil administración.

A pesar de haberse descubierto en 1944 el bencimidazol, este antimicótico no ofrecía grandes perspectivas en el tratamiento de las diversas micosis, por lo que a lo largo de los 35 años siguientes muchas compañías, especialmente Janssen Pharmaceutica, estudiaron la eficacia terapéutica de una serie de imidazoles, a los cuales se le hicieron una diversidad de modificaciones y sustituciones de los radicales, dando como resultado compuestos tales como el tioconazol, sulconazol, tiabendazol, clotrimazol, econazol, etc., en los cuales se comprobaron sus propiedades antimicóticas, encontrándose que algunos presentaban espectros antimicóticos muy limitados (tiabendazol, mebendazol), inducción de enzimas

microsomales hepáticas (clotrimazol), biodisponibilidad por vía oral baja (miconazol), etc.

En la carrera por encontrar un mejor antimicótico, se llegó a la creación del ketoconazol en 1977, el cual tiene una serie de propiedades, como son: amplio espectro, síntesis relativamente sencilla, fácil vía de administración y pocos efectos secundarios.

En la actualidad el ketoconazol se utiliza como tratamiento de elección de la mayoría de las candidosis en: piel, mucosas, vagina y uñas entre otras, incluyendo las sistémicas. Ha sido utilizado ampliamente en casos extensos, crónicos y rebeldes a tratamientos tópicos e inclusive en casos granulomatosos.

Hasta hace poco tiempo, no existían pruebas que apoyaran el desarrollo de resistencia micótica al ketoconazol, ni a otros imidazoles, sin embargo, hoy en día surgen con mayor frecuencia en la literatura, reportes de estudios que comprueban la resistencia en hongos, y es así como surge la inquietud de realizar en el presente estudio pruebas que comprobaran la resistencia "in vitro" de hongos al ketoconazol, en especial de Candida spp. aisladas de casos patológicos, teniendo como referencia trabajos de resistencia "in vitro" e "in vivo", realizados por Van Cutsem y cols. (15) en 1986 con cepas de Candida albicans aisladas de pacientes con candidosis mucocutánea crónica.

Así mismo, el objetivo de este trabajo es conocer los límites de resistencia del total de las cepas estudiadas, y las especies de Candida spp. con mayor resistencia al ketoconazol, por lo cual es importante realizar una tipificación completa de las cepas de Candida spp. , aisladas de pacientes con candidosis, para proporcionar el tratamiento específico adecuado en cada caso.

1.- OBJETIVOS

- Tipificar 100 cepas de Candida spp. aisladas de casos patológicos, mediante la metodología habitual.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del ketoconazol (R 41 400), frente a las cepas de Candida spp.
- Probar la resistencia "in vitro" de Candida spp., aisladas de casos patológicos frente al ketoconazol (R 41 400), utilizando las técnicas de sensidiscos y dilución en tubo.

2. CANDIDOSIS.

La candidosis es una micosis por agente oportunista y cosmopolita por excelencia, causada por varias especies del género Candida, siendo C. albicans el agente etiológico más importante y frecuente, sin embargo, destacan otras especies cuyo poder patógeno es menor y siempre generan el mismo tipo clínico, entre ellas podemos mencionar a C. stellatoidea, C. tropicalis, C. parapsilosis, C. krusei, C. pseudotropicalis, C. guilliermondii y C. zeylanoides (1).

La candidosis presenta una gran variedad de cuadros clínicos, pudiendo ser una enfermedad superficial que afecta primordialmente mucosas (boca, vagina, laringe, faringe, etc.), piel (pliegues), uñas o atacar ocasionalmente órganos profundos tales como pulmones, vísceras, etc., así como cursar en forma crónica, aguda e incluso fulminante.

Las levaduras del género Candida, utilizan como reservorio al hombre y algunos animales homeotérmicos, en los que con frecuencia causan enfermedad. No se aíslan del suelo ni de los detritus vegetales. Diversas especies son componentes de la flora habitual del cuerpo, ya que colonizan al organismo desde los primeros días del nacimiento, y tienen una fuerte predilección hacia las mucosas del tracto gastrointestinal, boca, laringe, faringe, vagina, etc., encontrándose frecuentemente en vías respiratorias

superiores y urinarias. No es frecuente aislar dichas especies de piel sana y no forman parte de la flora de las uñas. Su aislamiento a partir de éstas por lo general indica enfermedad (1).

La candidosis se adquiere en la mayoría de los casos por vía endógena, por la presencia de factores predisponentes en el huésped tales como:

- a).- Factores fisiológicos :cambios de pH en vagina y boca, embarazo, prematurez, etc.
- b).- Enfermedades o procesos debilitantes que impidan al huésped alcanzar su óptimo desarrollo inmunológico o bien disminución de sus defensas orgánicas tales como diabetes, tuberculosis, amibiasis hepática, desnutrición, prematurez, inmadurez, embarazo, senectud, etc.
- c).- Inmunodeficiencias primarias o adquiridas: leucemias, linfomas, enfermedad de Hodgkin, SIDA y en el caso específico de la candidosis mucocutánea crónica, agamaglobulinemias y síndrome de Di George.

d).- Factores iatrogénicos: tratamientos prolongados con antibióticos, corticoesteroides y citotóxicos; tratamientos anticonceptivos orales y dispositivos intrauterinos; procedimientos quirúrgicos y cateterismos.

e).- Factores ocupacionales: especialmente candidosis interdigital y onicomicosis de las manos en personas que mantienen las manos húmedas, como es el caso de lavanderas, amasadoras de pan y tortillas, limpiadoras de fruta o pescado, etc.(1).

f).- Miscelánea: dermatitis inflamatorias previas en específico dermatitis de contacto y del área del pañal; traumatismos ungueales, mal estado de la dentadura, prótesis mal adaptadas y humedad (1).

La candidosis puede adquirirse también por vía exógena como ocurre en el caso de los drogadictos o bien por transmisión sexual (balanitis-vaginitis).

3. TIPIFICACION DEL GENERO CANDIDA

La tipificación se realiza mediante pruebas biológicas y fisiológicas una vez que se ha aislado el agente etiológico. Los medios más utilizados para su aislamiento son: agar Sabouraud, gelosa sangre, agar Biggy y micosel (1,3).

PRUEBAS BIOLOGICAS

Las pruebas biológicas son básicamente pruebas presuntivas que se describen a continuación:

a).- Formación de tubos germinativos.

Esta es una prueba rápida y tal como se mencionó no es determinante para la identificación de C. albicans. Consiste en sembrar la cepa en estudio en una pequeña cantidad del suero humano e incubar durante 3 a 3.5 horas a 37 °C, transcurrido este tiempo sólo C. albicans debe formar tubos germinales, que son estructuras de aproximadamente 5 a 15 μ de longitud, dando la imagen de un "espejo" o "raqueta" al microscopio. La lectura debe hacerse exactamente a las 3.5 horas ya que después de este tiempo todas las especies de Candida forman tubos germinativos. Por lo tanto, esta prueba no es muy confiable y debe apoyarse en otros datos como la formación de clamidoconidios (clamidosporas) y zimograma para determinar la especie (3,5).

b).- Producción de pseudomicelio y clamidosporas (clamidoconidios).

Todas las especies oportunistas de Candida presentan pseudomicelio largo, ramificado con acúmulos de blastoconidios (blastosporas). Los clamidoconidios (clamidosporas) son esféricos con un tamaño mayor al de los blastoconidios (blastosporas) del orden de 16 a 20 μ , presentan una doble membrana refringente con una localización terminal la mayoría de las veces. Son estructuras de resistencia, cuya formación se ve favorecida por una baja tensión de oxígeno, deficiencia de nutrientes y temperaturas entre 18 y 25°C (3). El medio que se emplea comúnmente para esta prueba es el de agar harina de maíz (Corn - meal agar) adicionado de algún agente tensoactivo como el "Tween 80" al 1%. El medio se prepara en cajas de Petri y la cepa en estudio se siembra en forma de estría larga, posteriormente se incuba de 48 a 72 horas y se observa al microscopio colocando directamente la caja sobre la platina.

Esta prueba es determinante para C. albicans. y sólo en raras ocasiones C. stellatoidea y C. tropicalis pueden formar clamidoconidios (clamidosporas) (3), aunque morfológicamente son diferentes.

PRUEBAS FISIOLÓGICAS

PRUEBAS BIOQUÍMICAS.

Se basan en la asimilación (Auxonograma) y fermentación (Zimograma) de carbohidratos, existiendo un perfil bioquímico que identifica a cada una de las especies de Candida.

a). AUXONOGRAMA.

Las pruebas de asimilación de carbohidratos son métodos ampliamente empleados para la identificación de los hongos levaduriformes de importancia clínica. Se han descrito diversos métodos (3), sin embargo, el más utilizado es el método de los discos; éste evalúa la capacidad de las cepas de utilizar carbohidratos, consiste en utilizar un agar base nitrogenado libre de carbohidratos y evaluar el desarrollo de las levaduras alrededor de discos de papel filtro impregnados con el carbohidrato, tras un período de incubación de 5 a 15 días a una temperatura de 25°C.

b). ZIMOGRAMA.

Esta prueba es útil para complementar los resultados de las pruebas de asimilación de carbohidratos en la identificación de las especies. Se emplea un medio líquido base, al cual se le añade el carbohidrato por separado además de un indicador de pH (rojo de fenol o púrpura de

bromocresol). Se requiere que cada tubo contenga una campana de fermentación o tapón de cera para atrapar los gases liberados. Los tubos se inoculan con una asada de la cepa en estudio, se incuban a 25°C y se leen los resultados de 5 a 15 días. La fermentación llevada a cabo por las levaduras se detecta por el vire del indicador, así como por la producción de gas.

REDUCCION DE SALES DE TETRAZOLIO.

Esta prueba es importante y complementaria, sobre todo cuando existe confusión entre C. stellatoidea con clamidoconidios (clamidosporas) positivos y C. albicans.

En este caso se siembra la cepa en estría en el medio Pagano-Levine, que contiene cloruro de trifenil tetrazolio (TTC) y un antibiótico de amplio espectro que impide la contaminación bacteriana, además de un indicador biológico lo que permite una simple y rápida diferenciación de C. albicans de otras especies. Los resultados se observan de 48 a 72 horas a una temperatura de 25°C.

La diferenciación de C. albicans de otras especies se basa en las distintas coloraciones que presentan las colonias en el medio, debido a la capacidad de las levaduras de reducir en mayor o menor grado compuestos de tetrazolio. Las colonias de C. albicans tienen una capacidad limitada o casi nula de reducción, por lo que

sus colonias desarrollan un color blanco o rosa pálido, mientras que las demás especies lo hacen de color púrpura, aunque C. krusei (3) también puede producir colonias blancas, es fácil su diferenciación por la textura de sus colonias que son planas, secas y color mate en contraste con las de C. albicans que son cremosas, y porque tiene diferente perfil bioquímico.

Pueden valorarse otras características de los hongos levaduriformes que nos ayuden a su tipificación como son resistencia a la cicloheximida (actidione), utilización de nitratos y presencia de ureasa; estas últimas 2 pruebas, sobre todo cuando hay confusiones con cepas de Cryptococcus sp.

4. TERAPIA

Para que cualquier terapia tenga éxito es necesario corregir los factores predisponentes de la candidosis.

El tratamiento por lo tanto dependerá del tipo de estos factores ligados al paciente.

Los tratamientos más empleados son los siguientes:

a). Soluciones ácidas y básicas. Empleadas como tratamiento tópico para la corrección del pH en casos como vaginitis y candidosis de boca y del área del pañal.

b). Nistatina. Es un medicamento específico, no se absorbe, por lo cual se usa tópicamente en forma de ungüentos, cremas, óvulos, geles, etc. Su presentación en tabletas sólo es útil para la candidosis gastrointestinal.

c). Imidazoles tópicos. Son recomendados sobre todo para lesiones intertriginosas; existen otras presentaciones como geles óvulos, etc. útiles para mucosas. El tiempo promedio de terapia oscila entre 20 y 25 días con dos aplicaciones por día (1). Los imidazoles más empleados son: miconazol e isoconazol, clotrimazol, ketoconazol, bifonazol y sulconazol.

d). Tolciclato. Es un derivado carbamilado cuya efectividad es similar a la de los imidazoles tópicos.

e). Triazoles. El itraconazol y fluconazol se han empleado en tratamientos sistémicos, en casos muy extensos crónicos y rebeldes a tratamientos tópicos; inclusive en casos granulomatosos.

f). Saperconazol. Se han obtenido buenos resultados de su acción en contra de hongos oportunistas y patógenos en estudios preliminares hechos "in vitro" (4).

g). Anfotericina B. Se debe emplear únicamente para el tratamiento de formas profundas y sistémicas sobre todo las que no responden a imidazoles sistémicos.

KETOCONAZOL

Durante mucho tiempo el tratamiento común para la candidosis fue la violeta de genciana, mas tarde la nistatina y recientemente los derivados del imidazol como el miconazol y clotrimazol, hasta que un nuevo antimicótico fue sintetizado, el ketoconazol, considerado como el primer antimicótico oral de amplio espectro, el cual ofrece un tratamiento simple, poco tóxico y efectivo en contra de infecciones fúngicas. Se conoce que este antimicótico es efectivo en micosis cutáneas y sistémicas como la candidosis vaginal, dermatomicosis, onicomicosis, candidosis mucocutánea crónica, paracoccidioidomicosis, coccidioidomicosis e histoplasmosis.

Su acción origina un aumento en la susceptibilidad de hongos filamentosos y levaduras aifformes facilitando la tarea fagocitaria y lítica de las defensas del huésped, posee un alto índice terapéutico ya que para producir toxicidad a las células humanas, se requiere una concentración 1000 veces mayor a la necesaria para destruir a C. albicans. su grado de eficiencia es del 86 al 90% en curaciones micológicas.

Se ha reportado que el 90% de los pacientes se encuentran libres de efectos secundarios.

Por último se ha observado que 200 mg de ketoconazol una vez al día proporciona una profilaxis efectiva.

El ketoconazol proporciona remisión rápida en el 75-80% de los adultos y el 96% de los niños con candidosis oral aunque la respuesta quizá sea menor en los individuos con ciertos factores predisponentes . La dosis de 200 mg diarios es tan efectiva como dosis mayores en los adultos, e niños se recomienda una pauta de 20 mg 3 veces al día o su equivalencia de 3 mg/kg peso/día. Sin embargo, son necesarios más estudios para definir la tasa de recidiva tras el tratamiento con éxito, y para establecer con más claridad la utilidad del ketoconazol profiláctico en los pacientes de riesgo elevado.

La administración oral del ketoconazol es claramente eficaz para la candidosis vaginal, micosis sumamente frecuente, que hasta hace poco no contaba con un

tratamiento sistémico.

En el caso de la candidosis mucocutánea crónica los resultados con el ketoconazol son esperanzadores, considerando la naturaleza recalcitrante de la enfermedad. Antes de su aparición solían requerirse ciclos repetidos de anfotericina B intravenosa, con riesgo de nefrotoxicidad. Es necesario, sin embargo, analizar más a fondo los beneficios y la dosis óptima del tratamiento profiláctico.

En el caso de la onicomicosis dermatofítica y por levaduras proporciona un tratamiento efectivo. Su amplio espectro de acción presenta una clara ventaja sobre la griseofulvina, que sólo es eficaz frente a las infecciones por dermatofitos, por lo que el ketoconazol es más útil que la griseofulvina.

El ketoconazol actúa para ciertas formas de candidosis sistémica o profunda, incluida la candiduria. Sin embargo el valor real del fármaco en tales infecciones, y en particular, si la probabilidad de respuesta es mayor en unos pacientes que en otros, son temas que no podrán aclararse hasta disponer de mayor experiencia clínica.

Además, sería importante conocer la extensión de colonización por Candida en cada paciente en particular, puesto que esto podría incidir notablemente sobre los resultados del tratamiento.

5. RESISTENCIA A AZOLES

Desde su aparición en 1977, el ketoconazol, demostró ser el primer antimicótico oral de amplio espectro, el cual ha sido utilizado como tratamiento de elección para la candidosis incluyendo la sistémica, sin embargo, reportes recientes (15,16,18,19,39,40) han confirmado la resistencia de Candida a los azoles antimicóticos, principalmente al ketoconazol.

Se ha visto que los pacientes con candidosis mucocutánea crónica, presentan una marcada mejoría al ser sometidos a tratamientos prolongados con ketoconazol (12,38), antes de su aparición estos pacientes eran tratados con otros agentes antifúngicos, administrados en forma tópica o parenteral encontrándose sólo mejorías pasajeras. De los pacientes con candidosis mucocutánea crónica, que han sido tratados con ketoconazol durante tiempos prolongados, y que han recidivado se aislaron las cepas correspondientes, las cuales se sometieron a diversas pruebas "in vitro", observándose que todas fueron resistentes al ketoconazol (15,16,18,19,39,40).

Horsburgh y cols. (38) sugirieron que la resistencia se adquiere durante el tratamiento, sin embargo, esto ha sido cuestionado utilizando diferentes métodos para valorar las concentraciones mínimas inhibitorias, para las especies de Candida obtenidas al principio y al final del tratamiento (34).

Estudios hechos con bacterias (41) han demostrado que la resistencia no ocurre de manera natural, sino que más bien es inducida ya sea por mutación o selección.

En un intento por establecer el mecanismo de resistencia de especies de Candida a los azoles antimicóticos, se han realizado investigaciones y los resultados obtenidos sugieren que estos se enlazan a la citocromo P450 del microsoma de Candida y que dicha unión es menos fuerte en una cepa resistente que en una sensible (11).

Ryley, Wilson y Barret-Bee (42) por otra parte, han atribuido la resistencia a cambios en la estructura o función de la membrana de Candida, ya que el ketoconazol inhibe la biosíntesis del ergosterol, principal esteroide componente de la membrana de las levaduras.

Es importante establecer que el ketoconazol tiene una acción sinérgica con las células del sistema inmune del huésped (25,27,43), así como también conocer la respuesta clínica que presente un paciente sometido a tratamiento con ketoconazol, ya que el fracaso del tratamiento puede ser debido no a la resistencia de la cepa, sino a una disminución en la absorción o incremento en la eliminación de la droga.

6. KETOCONAZOL

6.1 ANTECEDENTES

Durante mucho tiempo y aún en la actualidad, las enfermedades causadas por hongos representan un grave problema para el hombre, sin embargo, éste ha tratado de combatirlos con sustancias antimicóticas que ha ido descubriendo a través del tiempo.

El tratamiento de las micosis superficiales y profundas ha avanzado rápidamente en los últimos años, considerando que sólo a principios de este siglo, la terapia aplicada a infecciones micológicas se reducía al uso de vioformo y violeta de genciana.

Un paso importante fue el descubrimiento de la griseofulvina en 1938, la cual se obtiene a partir de Penicillium griseofulvum, sin embargo, no se introdujo en la medicina hasta 20 años después, y en 1958 Williams y cols. publican su empleo con éxito en la tiña de los niños, sin embargo, ésta cura la tiña de la cabeza y aunque resuelve la de las uñas lo hace por tiempos muy prolongados; no actúa en otras micosis superficiales ni tampoco contra C. albicans.

En 1951 Hazen y Brown descubren la nistatina, primer antibiótico poliénico y el primer anticandidiásico realmente eficaz, el cual se obtiene a partir de Streptomyces noursei. No se absorbe por vía oral, lo cual reduce su empleo y cuando se administra por esta vía sólo

ejerce efecto sobre el tracto gastrointestinal y su contenido. Cuando se administra por vía parenteral es sumamente tóxica.

Hasta esta fecha no existía ningún agente efectivo en el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas como la coccidioidomicosis, paracoccidioidomicosis, histoplasmosis, micetoma, etc. esto trajo como consecuencia el interés de varios investigadores de buscar nuevos fármacos que resultaran efectivos en el tratamiento de dichas enfermedades, así, en 1955 aparece la anfotericina B procedente de Streptomyces nodosus (Gold y cols.), la cual es activa, pero nefrotóxica, se absorbe mal en el tracto gastrointestinal y se tiene que administrar por vía intravenosa lenta, aplicación que únicamente se puede llevar a cabo intrahospitalariamente (32). Su principal uso ha sido en el tratamiento de la coccidioidomicosis e histoplasmosis.

En cuanto a las demás micosis profundas y sistémicas, el panorama terapéutico es variado y pobre, por ejemplo, Erlich en 1910 inició la quimioterapia de la esporotricosis con salvarsan. Gouguerot y cols. la curaban con yoduro de potasio por vía oral, siendo un tratamiento ideal, fácil, activo, barato y rápido (44).

En el caso de la cromomicosis, "la más superficial de las micosis profundas", se han intentado diferentes

tratamientos, como yoduro de potasio, calciferol, anfotericina B, 5-fluorocitosina, etc. (49)

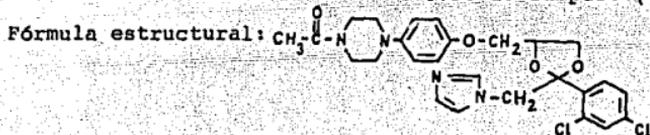
En la búsqueda de nuevos agentes antimicóticos, surgen en 1969 los derivados sintéticos del imidazol (clotrimazol, miconazol y econazol) después de una pausa de cerca de 15 años en cuanto a novedades.

Estos agentes antifúngicos fueron utilizados con éxito en el tratamiento de las micosis más obstinadas, y así con el paso del tiempo se pensó en la posibilidad de obtener un compuesto con una mejor reabsorción oral y actividad sistémica, apareciendo en 1977 el ketoconazol, desarrollado en Bélgica por Janssen, que ha demostrado ser el primer antimicótico oral de amplio espectro, empleado en casi todas las micosis tanto superficiales (dermatofitosis, candidosis, pitiriasis versicolor) como en las sistémicas, principalmente coccidioidomicosis y paracoccidioidomicosis (45,46,47).

Este antimicótico vino a llenar un profundo hueco en la terapia antimicótica y a modificar los esquemas terapéuticos de estos padecimientos, sin embargo, a pesar de este avance tan importante en la Micología médica, no se ha ganado aún la guerra contra los hongos y se siguen trabajando y desarrollando nuevos y mejores antimicóticos para beneficio de la humanidad.

6.2 PROPIEDADES FISICOQUIMICAS

Código de identificación:	R 41 400
Peso molecular:	531.44
Fórmula condensada:	C ₂₆ H ₂₈ Cl ₂ N ₄ O ₄
Fórmula química:	Cis-1-acetil-4-{4-[2-(2,4 diclorofenil)-2-(1H-imidazol-1-ilmetil)-1,3 dioxalan -4 -il] metoxil} fenil} piperazina (27,29,31,44).
Punto de fusión:	145-149°C
Rotación específica:	-1 a +1 a 20°C
Residuo a la ignición:	No más de 0.1%
Pérdida al secado:	Al vacío a 80°C por 4 horas pierde no más de 0.5% de su peso (49)



El ketoconazol es un polvo blanco o ligeramente beige, inodoro y casi insípido. Soluble en ácidos, etanol, dimetil sulfóxido, dimetil formamida, etc., estable si se almacena en condiciones normales. Se suministra en forma de tabletas que contienen 200 mg de ketoconazol por tableta.

Existen otras presentaciones como crema, gel, jarabe y óvulos (44).

6.3 MECANISMO DE ACCION.

Parte de las propiedades del ketoconazol que lo hacen efectivo, como potencia, amplio espectro de actividad, alto índice terapéutico, fácil modo de administración y bajo grado de inactivación; están íntimamente relacionadas con su mecanismo de acción. El modo por el cual el ketoconazol ejerce su actividad en contra de los hongos ha sido investigado completamente a nivel bioquímico y morfológico (25,27).

Estudios bioquímicos han demostrado que el ketoconazol afecta la permeabilidad de la membrana celular de células sensibles, este disturbio se manifiesta por la entrada de iones potasio y compuestos fosforados. Resultados más recientes establecen que estas alteraciones en la membrana celular son consecuencia de la interferencia del ketoconazol con la biosíntesis de lípidos, especialmente con la síntesis de ergosterol, principal esteroide componente de la membrana celular de las levaduras (25,28,29,30,32,33,43), como resultado de la represión de la actividad de la citocromo P450, la cual es necesaria para que se lleve a cabo la reacción de desmetilación de 14 α -metilesteroles a ergosterol

(32,33,34), con la consiguiente acumulación de esteroides con un grupo 14 α -metilo en su estructura, como el lanosterol, obtusifol, 24-metilenodihidrolanosterol, entre otros (33,34,35).

Este fármaco interfiere además con la biosíntesis de triglicéridos y fosfolípidos de los hongos.

Estudios hechos a nivel morfológico mediante microscopía electrónica de barrido han demostrado que el ketoconazol tiene efecto sobre la biosíntesis de lípidos a bajas concentraciones (10-100 ng/ml), causando alteración de la membrana celular como ya se mencionó, cambios en el volumen, deficiente división celular, acumulación de elementos membranosos anormales depositados en la pared celular y en la vacuola central, así como numerosas cicatrices de yemas distribuidas al azar (21,25,27,43).

A altas concentraciones de ketoconazol (0.5-50 μ g/ml), la vacuola central de la célula aumenta de tamaño y se llena de material citoplásmico degradado y de gotas de lípidos; la célula adquiere una forma angular debido a la pérdida de resistencia osmótica y concentraciones mayores de 50 μ g/ml causaron necrosis celular con sobrecarga de grasa (21,25,27,43).

El ketoconazol tiene efecto también sobre el comportamiento de las enzimas oxidativas y peroxidativas de las células observándose que a bajas concentraciones

provoca la producción de peróxido de hidrógeno como consecuencia del incremento de la actividad de la oxidasa-NADH dependiente, inhibición de la actividad de la peroxidasa e incremento de la actividad de la catalasa como una reacción de defensa celular, que trata de mantener niveles bajos de peróxido de hidrógeno intracelular, no tóxicos para la célula. Sin embargo a concentraciones altas la oxidasa-NADH dependiente continua produciendo peróxido de hidrógeno mientras que la actividad de la peroxidasa y de la catalasa es totalmente inhibida con lo cual hay un aumento de niveles de peróxido de hidrógeno en concentraciones tóxicas causando muerte celular (25).

6.4 ESTUDIOS FARMACODINAMICOS

6.4.1 ACTIVIDAD ANTIMICOTICA "IN VITRO".

El ketoconazol tiene un espectro de actividad antimicótica "in vitro" cualitativamente similar a la del miconazol.

Los resultados cuantitativos sobre las concentraciones mínimas inhibitorias del ketoconazol, varían en los diversos laboratorios dependiendo del tamaño del inóculo, medio de cultivo, tiempo y temperatura de incubación y fase de proliferación del hongo. Así pues, los resultados de las pruebas "in vitro" son menos relevantes que los estudios "in vivo", sin embargo, proporcionan información básica sobre el espectro general de actividad de un agente antimicótico.

En un esfuerzo por encontrar un modelo que se acercara con mayor exactitud a la actividad "in vivo" del ketoconazol, con el propósito de analizar la actividad fungistática y citotóxica de este antimicótico, Borgers y cols. (23) idearon un sistema semicuantitativo, el cual consiste de un cultivo mixto de fibroblastos humanos y Candida sp. en medio mínimo esencial de Eagle (EMEM) adicionado de aminoácidos esenciales y 10% de suero fetal bovino. En este sistema, el ketoconazol inhibe fuertemente el crecimiento de Candida albicans a concentraciones bajas, así mismo inhibe completamente la formación del

pseudomicelio, que es la forma patológica predominante de Candida albicans "in vivo". Se cree que el efecto inhibitorio del crecimiento a muy bajas concentraciones y especialmente la inhibición de la formación del pseudomicelio, explican la actividad "in vivo" del ketoconazol, donde las células fagocitarias del huésped permanecen con una pequeña población de patógenos más fácilmente eliminables, sin embargo, con este modelo sólo se pudo aclarar la acción del ketoconazol en micosis superficiales, pero es importante saber lo que ocurre con las células del sistema inmune del huésped en micosis profundas para lo cual se han hecho estudios, los cuales han demostrado que el ketoconazol presenta una acción sinérgica con las células de defensa del huésped.

Para probar este sinergismo se empleó un cultivo mixto de leucocitos en medio escencial mínimo de Eagle, al cual se le adicionó una suspensión de C. albicans y mediante microscopía electrónica de barrido, se observó que los leucocitos engloban ávidamente a las células en fase levaduriforme, sin embargo, son incapaces de erradicar totalmente a C. albicans, ya que después de unos días de incubación las células levaduriformes ingeridas empezaron a formar tubos germinales, los cuales crecen hacia el exterior de los leucocitos y se transforman en largas pseudohifas amifcadas, demasiado grandes para ser controladas por éstos, además los leucocitos degeneran a

través de sus interacciones con las células miceliales. Por otra parte se presentó una situación diferente al adicionar tan solo 0.1 µg/ml de ketoconazol, concentración a la cual se presenta una inhibición de la formación de pseudohifas a partir de levaduras y del crecimiento de las restantes células en fase levaduriforme, eliminando por completo al hongo.

Este modelo comprueba el sinergismo entre el ketoconazol y los leucocitos y explica en parte la efectividad del ketoconazol en erradicar infecciones fúngicas profundas, ya que con una sola dosis diaria se consiguen niveles sanguíneos activos continuos muy superiores a los que inhiben el crecimiento y la transformación de los microorganismos (25,27,43).

Al igual que otros imidazoles antimicóticos, el ketoconazol presenta cierta actividad "in vitro" contra determinadas bacterias Gram positivas, como S. aureus, S. epidermidis o estreptococos enterocóccicos.

Por otra parte se ha demostrado que el ketoconazol también tiene actividad "in vitro" contra Leishmania a concentraciones altas pero potencialmente útiles y contra cepas de Plasmodium falciparum (43).

6.4.2 ACTIVIDAD ANTIMICOTICA "IN VIVO".

El ketoconazol, administrado por vía oral, ha sido eficaz contra una amplia variedad de infecciones experimentales por levaduras, dermatofitos y hongos dimórficos en diversas especies animales (ratas, ratones, cobayos, conejos, pollos, pavos). En la mayoría de los estudios fue necesario una dosis diaria de 2.5 a 10 ó 20 mg/Kg para la profilaxis o el tratamiento, aunque los animales sometidos a inyección con inóculos letales requirieron dosis más altas (52), ya que el ketoconazol tiene menos biodisponibilidad en éstos que en el hombre o en otra especies de animales (44).

En el caso específico de la candidosis, el ketoconazol oral fue efectivo desde el punto de vista profiláctico o terapéutico en animales con candidosis profunda, o infecciones vaginales u oculares. Aunque originalmente fueron necesarios niveles de dosificación bastante altos para obtener un efecto notable sobre las tasas de supervivencia en ratones "normales" con infecciones sistémicas, en los ratones inmunosuprimidos una dosis de 10 mg/Kg/día mejoró la tasa de supervivencia desde el 15% en los controles hasta el 55%. Un estudio comparativo no publicado sobre ratones con infección intravenosa por C. albicans demostró que el ketoconazol a dosis de 160mg/Kg/día por vía oral durante 14 días era más eficaz

(sobrevivieron 6 de 7 animales) que la misma dosis de econazol, miconazol o clotrimazol por vía oral (no hubo sobrevivientes). También resultó ligeramente más eficaz que la anfotericina B (0.25 mg/Kg/día por vía intravenosa o 160 mg/Kg/día por vía oral; 4 de 7 o 5 de 7 sobrevivientes, respectivamente), pero poco menos eficaz que la anfotericina B a dosis mayores por vía intravenosa (2 mg/Kg/día; 7 de 7 sobrevivientes).

En las ratas, cuando el tratamiento se inició en el momento de la infección al riñón por Candida, se obtuvo una supervivencia del 100% con una dosis oral de 5 mg/Kg/día (53). El retraso del tratamiento durante 3 días aumentó la dosis necesaria para obtener una supervivencia del 100% hasta 20 mg/Kg/día.

Estudios de microscopía electrónica de barrido, han demostrado la rápida desaparición de las levaduras del tejido vaginal infectado en ratas tratadas con ketoconazol, con erradicación completa del hongo tras 5 días de tratamiento oral a dosis de 5 mg/Kg/día (13).

Se han realizado también estudios de su actividad "in vivo" en criptococosis, coccidioidomicosis, blastomicosis, histoplasmosis y dermatofitosis obteniéndose buenos resultados.

6.5 ESTUDIOS FARMACOCINETICOS

6.5.1 ABSORCION, METABOLISMO Y EXCRECION EN ANIMALES.

La absorción del ketoconazol por el tracto gastrointestinal, es más rápida en ratas y cobayos que en conejos y perros, donde las máximas concentraciones plasmáticas se alcanzan al cabo de 15 minutos a una hora después de su administración, comparada con la de perros y conejos que es de 1 a 2 horas. Esto se observó al administrar una dosis de 10 mg/Kg de ketoconazol, encontrándose resultados similares en animales en ayunas y no en ayunas. En las ratas se observó una diferencia de la tasa de absorción relacionada con el sexo, siendo más rápida en los machos que en las hembras.

En perros y ratas el ketoconazol experimenta un intenso metabolismo, transformándose en un gran número de metabolitos inactivos, dicho metabolismo es similar al que ocurre en el hombre.

Después de la administración de 10 mg/kg del ketoconazol, a los 4 días se observó que las ratas macho y hembra excretaron alrededor de un 95% del ketoconazol. La vida media de eliminación osciló alrededor de 26 horas para una dosis única de 10 mg/kg/día (43).

6.5.2 ABSORCION, METABOLISMO Y EXCRECION EN EL HOMBRE.

Estudios realizados en voluntarios sanos, demostraron que el ketoconazol se absorbe por el tracto gastrointestinal, una sola dosis oral de 200 mg en forma de una tableta, produjo concentraciones plasmáticas máximas de aproximadamente 3 a 4.5mg/ml 1 ó 2 horas después de su administración.

Se ha observado que los niveles plasmáticos del ketoconazol son más altos y consistentes cuando se administró con alimentos, en comparación con su ingestión en ayunas, debido a la absorción que sufre el fármaco en el tracto gastrointestinal, la cual se lleva a cabo en términos de una difusión sencilla a través del epitelio. La rapidez de difusión se atribuye a que el fármaco es lipofílico, ya que es un compuesto dibásico y dentro del tracto gastrointestinal se encuentra en su forma no ionizada que es la más liposoluble, por lo tanto, la acidez del estómago tiene un papel importante, puesto que el ketoconazol requiere secreción gástrica suficiente para su disolución y absorción posterior (54).

Se ha encontrado que el 1% de esta droga se encuentra libre en el plasma, el 80% esta unido a proteínas plasmáticas y 15% se encuentra asociado a células sanguíneas. Después de su absorción, se metaboliza en el

hígado y las principales vías metabólicas identificadas fueron la oxidación del anillo imidazol, degradación del imidazol oxidado, o-desalquilación oxidativa, degradación oxidativa del anillo piperacina e hidroxilación aromática.

La vida media de eliminación del ketoconazol fue de 6.5, 8.1 y 9.6 horas, tras una sola dosis oral única de 100, 200 y 400 mg respectivamente (43).

Cuatro días después de administrar una dosis oral de ketoconazol, se encontró que alrededor del 70% de la dosis era excretada sin cambio alguno; el 57% con las heces y el 13% restante con la orina.

6.6 REACCIONES ADVERSAS.

6.6.1 TOXICOLOGIA.

Dosis diarias de 20 y 40 mg/kg administrados en la dieta a ratas Wistar, produjeron cambios ligeros que se acentuaron con dosis mayores, de 80 a 160 mg/Kg/día. Murieron 2 de 10 machos con 160 mg/Kg. Los signos de toxicidad incluyeron menor consumo de alimentos y menor aumento de peso, con pocos cambios en el comportamiento, el aspecto o los parámetros hematológicos. La anatomía patológica macroscópica y la histopatológica revelaron lesiones en hígado, riñón, suprarrenales y ovarios, que reflejaban concentraciones séricas elevadas de sodio y nitrógeno ureico sanguíneo, disminución del potasio

sérico, creatinina urinaria y la densidad de la orina. Se apreció tendencia al aumento de fragilidad ósea en las ratas hembras.

Sin embargo, todas las fracturas fueron secundarias a manipulación, y el examen histopatológico y las radiografías no mostraron evidencia de osteoporosis.

En los perros con dosis diarias de 40 mg/Kg de ketoconazol durante un año administrado en forma de cápsulas no se produjeron muertes, pero disminuyó el apetito, aparecieron vómitos y disminuyó el aumento de peso. El hígado pesaba más de lo normal, las concentraciones séricas de GTP (transaminasa glutámica pirúvica) y fosfatasa alcalina estaban aumentadas y en el examen histopatológico era evidente la formación y depósito de lipofucsina. Con dosis de 60 mg/Kg/día durante 20 semanas se produjeron aumentos más acusados de GTP y fosfatasa alcalina, junto con aumento de peso del hígado y reducción de peso del timo. Sin embargo, todos estos cambios fueron reversibles al suspender el tratamiento. Con 80 mg/Kg/día ocurrieron los mismos cambios, además de gastritis severa, ictericia y muerte al cabo de 2 a 4 semanas.

6.6.2 EMBRIOTOXICIDAD.

Dosis de hasta 80 mg/100g de alimentos (alrededor de 80 mg/Kg/día) en ratas machos, y de hasta 40 mg/100g en las hembras, no tuvieron efectos sobre la fertilidad. A dosis de 80 mg/100g de alimentos, en las hembras disminuyó la tasa de gestaciones. La administración durante el período posnatal de dosis altas con los alimentos (100 mg/100g) produjo una tasa baja de embarazos con tamaño pequeño de las crías y menos fetos vivos. Las crías nacieron pequeñas y no aumentaron de peso, y la mayoría fallecieron al cabo de pocos días.

Se observó oligodactilia y sindactilia en la mayoría de las crías que habían recibido alimentos con 100 y 160 mg/100g de ketoconazol. No se produjeron anomalías con dosis menores.

Aunque estas concentraciones corresponden a niveles de dosis tóxicas y subletales, se recomienda que el ketoconazol no se administre a mujeres durante el embarazo.

6.6.3 MUTAGENICIDAD Y CARCINOGENICIDAD.

En estudios estándar de mutagenicidad "in vitro" con cepas de Salmonella typhimurium y la prueba letal dominante "in vivo", con células germinales de ratones machos y hembras a los que se les administró una dosis de

20, 80, 160 y 360 mg/Kg de ketoconazol, así como la prueba de micronúcleo en ratones, no demostró el ketoconazol tener propiedades mutagénicas. Actualmente se están realizando estudios de carcinogenicidad con administración durante toda la vida a ratones y ratas.

6.6.4 TOXICIDAD OFTALMICA.

La aplicación tópica del ketoconazol al 1% no retardó significativamente el cierre de los defectos epiteliales corneales en conejos ni produjo otros síntomas, como inyección conjuntival, edema del estroma o iritis (43).

6.6.5 EFECTO SOBRE LAS ENZIMAS MICROSOMATICAS.

El efecto de un fármaco administrado por vía sistémica sobre las enzimas microsómicas hepáticas tiene interés desde varios puntos de vista, incluyendo las posibles interacciones con otros fármacos metabolizados en el hígado, la probabilidad de que el fármaco estimule su propio metabolismo y la posibilidad de cambios estructurales dentro del hígado (43,51).

La administración aguda de ketoconazol, produjo cierta inhibición inicial del metabolismo farmacológico en modelos animales, pero sólo a dosis relativamente altas -- (58.8 mg/Kg). Por tanto, parece improbable que el ketoconazol altere la capacidad del hígado para metabolizar los fármacos en cuantía importante.

6.6.6 REACCIONES SECUNDARIAS.

Aproximadamente en el 10% de los casos se presentan algunos de los siguientes síntomas: náuseas, prurito, cefalea, mareos, diarrea, somnolencia, nerviosismo. Aunque no se ha encontrado una relación entre el inicio del tratamiento y el comienzo de los efectos secundarios, al suspender el tratamiento desaparecen estos síntomas (43,55,56).

6.7 ESTUDIOS DE SEGURIDAD EN EL HOMBRE.

En varios estudios clínicos se han realizado pruebas de laboratorio, dirigidas a detectar los efectos bioquímicos del ketoconazol. No se apreció toxicidad sobre el sistema hematológico, el ojo ni la función renal, ni sobre el equilibrio electrolítico. Además, dada la tendencia a la fragilidad ósea observada en las ratas hembra durante los estudios de toxicidad, se investigaron en el hombre varios parámetros relacionados con la formación del hueso. No se produjeron cambios adversos de la formación ni la densidad ósea en los pacientes estudiados y no se observaron elevaciones anormales del calcio sérico o la fosfatasa alcalina, ni disminuciones del fósforo sérico. De hecho, en pocos pacientes con lesiones óseas por infecciones micóticas durante el tratamiento, se produjo neoformación ósea (43).

7. MATERIAL.

- Algodón absorbente
- Asa bacteriológica
- Bulbos de goma
- Cajas Petri desechables estériles de 100 x 10 mm.
- Campanas de fermentación
- Cubreobjetos
- Espátula de aluminio
- Etiquetas
- Frascos viales
- Gasa
- Gradillas metálicas para 40 tubos
- Lápiz graso
- Matraces aforados de 10 y 50 ml.
- Matraces bola fondo plano de 500 y 1000 ml.
- Matraces Erlenmeyer de 250 y 500 ml.
- Mecheros Bunsen
- Micropipeta de 100 μ l.
- Papel filtro Whatman No.42
- Papel parafilm
- Pinzas de depilar
- Pipetas volumétricas de 1,5 y 25 ml.
- Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 ml.
- Pipetas Pasteur
- Portaobjetos

- Probetas graduadas de 50 y 250 ml.
- Puntas para micropipeta desechables estériles
- Tela de asbesto
- Tripié
- Tubos de ensaye de 13 x 100 mm con tapón de rosca
- Tubos de ensaye de 13 x 100 mm
- Tubos de ensaye de 16 x 150 mm
- Vasos de precipitado de 100 y 250 ml.

EQUIPO

- Autoclave
- Balanza analítica
- Balanza granataria
- Campana de flujo laminar
- Estufa
- Incubadoras de 28 y 37°C
- Microscopio óptico
- Nefelómetro con filtro verde
- Refrigerador
- Vórtex

REACTIVOS

- Acetona
- Acido acético
- Acido clorhídrico (HCl)
- Acido sulfúrico (H_2SO_4) 1%
- Agua destilada
- Cloramfenicol
- Cloroformo
- Cloruro de Bario ($BaCl_2$) 1%
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Cloruro de trifenil tetrazolio (TTC)
- Colorantes para tinción de Gram
- Etanol
- Extracto de carne
- Extracto de levadura
- Fenol
- Galactosa
- Glucosa
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Lactosa
- Maltosa
- Peptona de caseína
- Púrpura de bromocresol
- Tween 80

MEDIOS DE CULTIVO

- Agar bacteriológico
- Agar Biggy
- Agar corn-meal (harina de maíz)
- Agar Sabouraud
- Caldo Sabouraud

8. METODOLOGIA

Se proporcionaron 100 cepas de Candida spp. de pacientes de consulta externa e interna de los diversos servicios del Hospital General de México S.S., que presentaban diversos tipos de candidosis.

Para verificar la pureza de cada una de las cepas, se realizó una tinción de Gram y siembra en forma de estría en agar Biggy, incubándose 48 horas a 28°C. Una vez comprobada la pureza, se procedió a realizar la marcha rutinaria de tipificación de cada cepa, mediante la metodología habitual a partir del crecimiento obtenido en el medio anterior y cuyos pasos se describen a continuación:

1.- FORMACION DE TUBOS GERMINATIVOS.

Se tomó una asada de la cepa correspondiente y se sembró en 0.5 ml. de suero humano con valores de azúcares, proteínas y lípidos normales, incubándose durante 3 horas a 37°C. Después del tiempo de incubación se homogenizó el medio y se colocó una gota del mismo entre un portaobjetos y un cubreobjetos para su observación al microscopio, verificando la formación de tubos germinativos. Las cepas en las cuales no se obtuvieron estas estructuras se revisaron a las 3.5 horas para reportarlas como negativas.

2.- FORMACION DE CLAMIDOCONIDIOS (CLAMIDOSPORAS).

Para la realización de esta prueba se utilizó corn-meal agar (harina de maíz) adicionado de "Tween 80" al 1%. Las cepas se sembraron en forma de estría haciendo un corte transversal en el agar, con el propósito de aumentar su contacto con el oxígeno. Se incubaron 48 horas a 28°C para posteriormente observar al microscopio colocando directamente las cajas sobre la platina buscando la presencia de pseudohifas y clamidoconidios (clamidosporas) terminales o intercaladas, como prueba confirmatoria de C. albicans.

3.- ZIMOGRAMA.

Se prepararon series de 5 tubos de ensaye de 13x100 mm para cada una de las 100 cepas de Candida spp., con caldo base, el indicador y los diferentes carbohidratos al 2% a probar, los cuales fueron: glucosa, maltosa, sacarosa, galactosa y lactosa. Además se colocó en cada tubo una campana de fermentación para atrapar los gases liberados. Las cepas se sembraron en cada una de las series de 5 tubos, esterilizando el asa antes de cada siembra para evitar arrastre de un carbohidrato a otro. Se incubaron durante 8 días a 28°C y se observó vire del indicador así como producción de gases.

4.- REDUCCION DE SALES DE TETRAZOLIO.

El medio para realizar esta prueba se preparó de acuerdo a la fórmula de Pagano-Levin, que consiste de:

- Peptona	10g
- Extracto de carne	1g
- Glucosa	40g
- Agar bacteriológico	15g
- Agua destilada	1000 ml
- Cloruro de trifenil tetrazolio (TTC)	100 mg
- Cloramfenicol	500 mg

El cloruro de trifenil tetrazolio (TTC) y el medio se esterilizaron por separado, posteriormente se mezclaron y se distribuyó en cajas Petri. Las cepas fueron sembradas en forma de estría en el medio sólido y se incubaron de 48 a 72 horas a 28°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se observaron las diferentes coloraciones que presentaban las cepas en base a sus diferentes capacidades de reducción de las sales de tetrazolio. Los resultados se interpretaron de la siguiente manera: una coloración púrpura como ++, rosa como + y blanca como -.

Con objeto de determinar el solvente más adecuado del ketoconazol para su valoración "in vitro" mediante las técnicas de sensidiscos y dilución en tubo, se realizaron pruebas de solubilidad del mismo empleando los siguientes solventes:

Acido clorhídrico 1N

Acido acético

Acetona

Agua (pH 2 a 8)

Cloroformo

Etanol-Agua 1:1

Etanol-Acetona 1:1

Etanol

Posteriormente se prepararon las siguientes concentraciones del ketoconazol en etanol al 50% (v:v) en agua, al cual se le consideró el solvente de elección, por la total solubilidad que le confiere al fármaco, así como porque no ejerce efecto inhibitorio sobre el desarrollo de las cepas de Candida spp.: 0.01,0.1,1.0,10,50,100 y 500 µg/ml.

A continuación se describen ambas técnicas:

A).- TECNICA DE SENSIDISCOS

Para su realización, las cepas se sembraron en caldo Sabouraud a partir del crecimiento obtenido en agar Biggy y se incubaron 48 horas a 28°C. Posteriormente se ajustó la concentración de células a aproximadamente 1×10^8 células/ml. mediante turbidimetría utilizando solución salina isotónica estéril (SSI), para lo cual se realizaron inicialmente diluciones 1:10 con SSI estéril de cada uno de los cultivos puros de 48 horas y se leyó la turbidez en el nefelómetro; por comparación con la escala de Mac Farlan se determinó la concentración inicial de células, para posteriormente ajustarla mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Conc. inicial}}{\text{Conc. requerida}} - 1 = \text{ml diluyente}$$

La escala de Mac Farlan (57) consiste en realizar una curva utilizando volúmenes diferentes de H_2SO_4 1% y BaCl_2 1%, el precipitado que se forma es proporcional a la turbidez expresada en unidades Klett (UK) y por lo consiguiente a un número aproximado de células/ml., como se indica en la siguiente tabla:

TABLA I ESCALA DE MAC FARLAN.

TUBO No.	H ₂ SO ₄ 1%	BaCl ₂ 1%	No. aprox. Cél/ml x 10 ⁸
1	9.9	0.1	3
2	9.8	0.2	6
3	9.7	0.3	9
4	9.6	0.4	12
5	9.5	0.5	15
6	9.4	0.6	18
7	9.3	0.7	21
8	9.2	0.8	24
9	9.1	0.9	27
10	9.0	1.0	30

Una vez que se ajustó la concentración a aproximadamente 1×10^8 células/ml. de cada una de las cepas, se tomaron 100µl del cultivo y se colocaron en una caja Petri estéril, se vertió agar Sabouraud a una temperatura aproximada de 45°C y se homogenizó el medio. Los discos de papel filtro con un diámetro de 0.6 cm., fueron impregnados con las siguientes concentraciones de ketoconazol en µg/ml. : 0.01, 0.1, 1.0, 10, 50 y 100, se colocaron sobre el medio sólido, incluyendo un disco control impregnado únicamente con el solvente (etanol 50%) por cada cepa. Se manejaron seis discos con la

concentración correspondiente, tres por cada caja Petri, las cuales se refrigeraron durante 30 min. para que se llevara a cabo la difusión del fármaco, y posteriormente se incubaron 48 horas a 28°C.

Para expresar los resultados de concentración mínima inhibitoria (CMI), se consideró a ésta como la mínima concentración del fármaco en la cual se observó la formación de un halo de inhibición, por lo cual todos los discos impregnados con soluciones con una concentración mayor a la CMI presentarán halos de inhibición, mientras que en los discos control no se deben observar.

B).- TECNICA DE DILUCION EN TUBO.

Debido a que Candida sp. es un hongo levaduriforme, presenta un comportamiento de crecimiento similar al de las bacterias, por lo cual es posible la realización de esta técnica para valorar la actividad "in vitro" del ketoconazol frente a las cepas.

Se prepararon series de 5 tubos de ensaye de 13x100 para cada cepa con 3.8 ml. de caldo Sabouraud. A cada tubo se le adicionó 100 µl de cada una de las concentraciones del ketoconazol: 0.1, 1.0, 10, 100 Y 500 µg/ml, respectivamente y 100 µl del cultivo puro de 48 horas con una concentración aproximada de 1×10^8 células/ml. Se incluyó un tubo control de crecimiento de la cepa así como un control del solvente. Todos los tubos

se homogenizaron e incubaron 48 horas a 28°C. Se leyó la turbidez de cada uno de los tubos en el nefelómetro utilizando como blanco caldo Sabouraud.

Los resultados se reportan como concentración mínima inhibitoria al 50% (CI_{50%}), que se interpreta como la mínima concentración del fármaco, la cual produce el 50% de inhibición del crecimiento comparada con un control.

Posteriormente se tomó una asada de cada uno de los diferentes tubos de la serie de cada cepa y se sembró en una sola caja Petri con agar Sabouraud en forma de estría, para observar si había desarrollo de la cepa después de haber estado en contacto con una determinada concentración del ketoconazol. Se incubó 48 horas a 28°C y los resultados se reportan en cruces con base al crecimiento observado.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

9. RESULTADOS

Las 100 cepas de Candida spp. a las cuales se les realizó tinción de Gram, no presentaron contaminación bacteriana al observarlas al microscopio en el medio de agar Biggy, todas redujeron el sulfito de bismuto presente en el medio a sulfuro de bismuto, desarrollando colonias de color café.

Los resultados se reportan a continuación en el siguiente orden:

- A).- Tipificación del género Candida
- B).- Solubilidad del fármaco
- C).- Técnica de sensidiscos
- D).- Técnica de dilución en tubo

A).- TIPIFICACION DEL GENERO Candida

Los resultados se resumen en la Tabla II (Marcha rutinaria de tipificación) e incluye:

- Formación de tubos germinativos en suero humano a 37°C

- Formación de clamidoconidios (clamidosporas) en agar harina de maíz (corn-meal agar) - Tween 80 al 1%

- Zimograma (glucosa, maltosa, sacarosa, galactosa y lactosa)

- Reducción de sales de tetrazolio (TTC). Esta prueba no es rutinaria, pero se utilizó de apoyo para la tipificación.

La tipificación se realizó de acuerdo con la Tabla III anexa, según apuntes de Micología Médica del Instituto Pasteur (1987).

TABLA II. MARCHA RUTINARIA DE TIPIFICACION

NB. CEPA	FORMACION DE TUBOS GERMINATIVOS EN SUERO HUMANO A 37°C	FORMACION DE CLAMIDOCONIDIOS EN CORN MEAL AGAR.	ZIMOGRAMA				TTC	ESPECIE
			GLU	MAL	SAC	GAL LAC		
1	+	+	+	+	-	+	-	<u>C. albicans</u>
2	-	-	+	-	-	+	+	<u>C. parapsilosis</u>
3	+	+	+	+	-	+	-	<u>C. albicans</u>
4	+	+	+	+	-	+	-	<u>C. albicans</u>
5	-	-	+	-	-	+	+	<u>C. krusei</u>
6	+	+	+	+	-	+	-	<u>C. albicans</u>
7	+	+	+	+	+	+	++	<u>C. tropicalis</u>
8	+	+	+	+	-	+	-	<u>C. albicans</u>
9	+	+	+	+	+	+	-	<u>C. albicans</u>
10	+	+	+	+	-	+	-	<u>C. albicans</u>
11	+	+	+	+	-	+	-	<u>C. albicans</u>
12	-	-	+	-	-	-	-	<u>C. krusei</u>
13	+	+	+	+	+	+	-	<u>C. albicans</u>
14	+	+	+	+	-	+	-	<u>C. albicans</u>
15	+	+	+	+	+	+	-	<u>C. albicans</u>
16	+	+	+	+	-	+	-	<u>C. albicans</u>
17	+	+	+	+	+	+	-	<u>C. albicans</u>
18	+	+	+	+	+	+	-	<u>C. albicans</u>
19	+	+	+	+	+	+	-	<u>C. albicans</u>
20	+	+	+	+	-	+	-	<u>C. albicans</u>
21	+	+	+	+	+	+	++	<u>C. tropicalis</u>
22	-	-	+	+	+	+	++	<u>C. tropicalis</u>

TABLA II. MARCHA RUTINARIA DE TIPIFICACION

NO. CEPA	FORMACION DE TUBOS GERMINATIVOS EN SUEÑO HUMANO A 37°C.	FORMACION DE CLAMIDOCONIDIOS EN CORN - MEAL AGAR.	ZIMOGRAMA					TTC	ESPECIE
			GLU	MAL	SAC	GAL	LAC		
23	+	+	+	+	+	+	-	-	<u>C. albicans</u>
24	+	+	+	+	+	+	-	-	<u>C. albicans</u>
25	+	+	+	+	-	+	-	-	<u>C. albicans</u>
26	-	-	+	-	-	-	-	+	<u>C. krusei</u>
27	+	+	+	+	-	+	-	-	<u>C. albicans</u>
28	+	+	+	+	-	+	-	-	<u>C. albicans</u>
29	+	+	+	+	-	+	-	-	<u>C. albicans</u>
30	+	+	+	+	-	+	-	-	<u>C. albicans</u>
31	+	+	+	+	-	+	-	-	<u>C. albicans</u>
32	-	-	+	-	-	+	-	+	<u>C. krusei</u>
33	+	+	+	+	-	+	-	-	<u>C. albicans</u>
34	+	+	+	+	-	+	-	-	<u>C. albicans</u>
35	+	+	+	+	-	-	-	+	<u>C. stellatoidea</u>
36	+	+	+	+	-	+	-	-	<u>C. albicans</u>
37	+	+	+	+	-	+	-	-	<u>C. albicans</u>
38	+	+	+	+	-	+	-	-	<u>C. albicans</u>
39	+	+	+	+	-	+	-	-	<u>C. albicans</u>
40	+	+	+	+	-	+	-	-	<u>C. albicans</u>
41	+	+	+	+	-	+	-	-	<u>C. albicans</u>
42	+	+	+	+	-	+	-	-	<u>C. albicans</u>
43	+	+	+	+	+	+	-	-	<u>C. albicans</u>
44	+	-	+	+	+	+	-	++	<u>C. tropicalis</u>
45	+	-	+	+	+	+	-	++	<u>C. tropicalis</u>

TABLA II. MARCHA RUTINARIA DE TIPIFICACION

Nº. CERA	FORMACION DE TUBOS GERMINATIVOS EN SUIERO HUMANO A 37°C	FORMACION DE CLAMIDOCONIDIOS EN CORN - MEAL AGAR.	ZIMOGRAMA					TTC	ESPECIE
			GLU	MAL	SAC	GAL	LAC		
46	+	+	+	+	-	+	-	-	<u>C. albicans</u>
47	+	+	+	+	-	+	-	-	<u>C. albicans</u>
48	+	+	+	+	-	+	-	-	<u>C. albicans</u>
49	+	+	+	+	-	+	-	-	<u>C. albicans</u>
50	+	+	+	+	-	+	-	-	<u>C. albicans</u>
51	-	-	+	+	-	+	-	+	<u>C. parapsilosis</u>
52	+	+	+	+	+	+	-	-	<u>C. albicans</u>
53	+	+	+	+	-	+	-	-	<u>C. albicans</u>
54	+	+	+	+	-	+	-	-	<u>C. albicans</u>
55	+	+	+	+	-	+	-	-	<u>C. albicans</u>
56	+	-	+	+	-	-	-	+	<u>C. stellatoidea</u>
57	+	+	+	+	-	-	-	+	<u>C. stellatoidea</u>
58	+	+	+	+	+	+	-	-	<u>C. albicans</u>
59	-	-	+	-	-	-	-	+	<u>C. parapsilosis</u>
60	+	-	+	+	-	-	-	-	<u>C. stellatoidea</u>
61	+	+	+	+	-	+	-	-	<u>C. albicans</u>
62	+	-	+	+	-	-	-	+	<u>C. stellatoidea</u>
63	+	-	+	+	-	-	-	+	<u>C. stellatoidea</u>
64	+	-	+	+	-	-	-	+	<u>C. stellatoidea</u>
65	+	-	+	+	-	-	-	+	<u>C. stellatoidea</u>
66	+	+	+	+	-	-	-	+	<u>C. stellatoidea</u>
67	+	+	+	+	-	+	-	-	<u>C. albicans</u>
68	+	+	+	+	+	+	-	-	<u>C. albicans</u>

TABLA II. MARCHA RUTINARIA DE TIPIFICACION

Nº. CEPA	FORMACION DE TUBOS GERMINATIVOS EN SUERO HUMANO A 37°C	FORMACION DE CLAMIDOCONIDIOS EN CORN MEAL AGAR.	ZIMOGRAMA					TTC	ESPECIE
			GLU	MAL	SAC	GAL	LAC		
69	+	-	+	+	-	-	-	+	<u>C. stellatoidea</u>
70	+	+	+	+	-	+	-	-	<u>C. albicans</u>
71	+	+	+	+	-	+	-	-	<u>C. albicans</u>
72	+	+	+	+	-	+	-	-	<u>C. albicans</u>
73	+	+	+	+	+	+	-	-	<u>C. albicans</u>
74	+	+	+	+	+	+	-	-	<u>C. albicans</u>
75	-	-	+	+	+	+	-	++	<u>C. tropicalis</u>
76	+	+	+	+	+	+	-	-	<u>C. albicans</u>
77	+	+	+	+	-	+	-	-	<u>C. albicans</u>
78	+	+	+	+	+	+	-	-	<u>C. albicans</u>
79	-	-	+	+	+	+	-	++	<u>C. tropicalis</u>
80	-	-	+	-	-	-	-	+	<u>C. parapsilosis</u>
81	-	-	+	-	-	-	-	+	<u>C. parapsilosis</u>
82	+	+	+	+	-	-	-	+	<u>C. stellatoidea</u>
83	+	+	+	+	+	+	-	-	<u>C. albicans</u>
84	+	-	+	-	-	-	-	+	<u>C. parapsilosis</u>
85	+	+	+	+	-	-	-	+	<u>C. stellatoidea</u>
86	+	-	+	+	+	+	-	++	<u>C. tropicalis</u>
87	+	+	+	+	-	-	-	+	<u>C. stellatoidea</u>
88	+	+	+	+	-	-	-	+	<u>C. stellatoidea</u>
89	+	+	+	+	-	-	-	+	<u>C. stellatoidea</u>
90	+	+	+	+	-	-	-	+	<u>C. stellatoidea</u>
91	+	+	+	+	-	-	-	+	<u>C. stellatoidea</u>

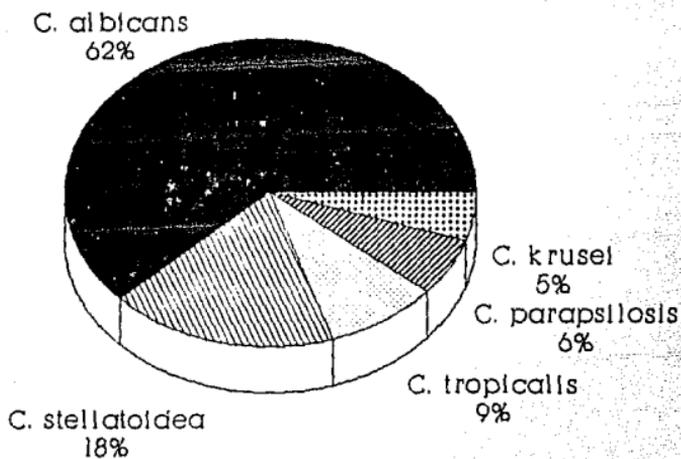
TABLA II. MARCHA RUTINARIA DE TIPIFICACION

Nº. CEPA	FORMACION DE TUBOS GERMINATIVOS EN SUERO HUMANO A 37°C	FORMACION DE CLAMIDOCONIDIOS EN CORN MEAL AGAR.	ZIMOGRAMA					TTC	ESPECIE
			GLU	MAL	SAC	GAL	LAC		
92	+	+	+	+	-	+	-	-	<u>C. albicans</u>
93	-	-	+	-	-	-	-	+	<u>C. lusoi</u>
94	+	-	+	+	+	+	-	++	<u>C. tropicalis</u>
95	+	+	+	+	-	-	-	+	<u>C. stellatoidea</u>
96	+	+	+	+	+	+	-	-	<u>C. albicans</u>
97	+	+	+	+	-	+	-	-	<u>C. albicans</u>
98	+	+	+	+	+	+	-	-	<u>C. albicans</u>
99	+	+	+	+	+	+	-	-	<u>C. albicans</u>
100	+	+	+	+	-	+	-	-	<u>C. albicans</u>

TABLA III. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS Y FISIOLÓGICAS DEL GENERO CANDIDA (SEGUN APUNTES DE MICOLOGIA MEDICA DEL INSTITUTO PASTEUR, 1987).

CEPA	MORFOLOGIA			ZIMOGRAMA					OTRAS CARACTERÍSTICAS
	PSEUDOMONICELIO.	CLAMIDOCONIDIAS.	FILAMENTACION EN SUIERO A 37°C.	GLU	MAL	SAC	GAL	LAC	REDUC. DE TTC
<u>C. albicans.</u>	+	+	+	+	+	+,-	+	-	-
<u>C. stellatoidea</u>	+	+,-	+,-	+	+	-	-	-	+
<u>C. tropicalis</u>	+	+,-	+,-	+	+	+	+	-	++
<u>C. parapsilosis</u>	+	-	-	+	-	-	+,-	-	+
<u>C. krusei</u>	+	-	-	+	-	-	-	-	+,-
<u>C. pseudotropicalis</u>	+	-	-	+	-	+	+	+	+
<u>C. guilliermondii</u>	+	-	-	+	-	+	+	-	+
<u>C. zeylanoides</u>	+	-	-	+,-	-	-	-	-	-

GRAFICA 1. PORCENTAJE DE LAS ESPECIES DE CANDIDA SPP



CEPAS

B).- SOLUBILIDAD DEL FARMACO.

Los resultados de solubilidad del fármaco en los diferentes solventes probados son los siguientes:

TABLA IV. SOLUBILIDAD DEL KETOCONAZOL EN DIVERSOS SOLVENTES.

Acido clorhídrico 1N	SOLUBLE
Acido acético	SOLUBLE
Acetona	SOLUBLE
Agua (pH 2 a 8)	INSOLUBLE
Agua-Acetona 1:1	INSOLUBLE
Cloroformo	SOLUBLE
Etanol-Agua 1:1	SOLUBLE
Etanol-Acetona 1:1	SOLUBLE
Etanol	SOLUBLE

C).- TECNICA DE SENSIDISCOS.

Los resultados de las lecturas de la curva patrón de Mac Farlan en unidades Klett (UK) se presentan en la Tabla V y en la gráfica 2.

TABLA V. CURVA PATRON DE MAC FARLAN.

TUBO No.	No. aprox. cél/ml. $\times 10^8$	UK
1	3	35
2	6	60
3	9	87
4	12	129
5	15	160
6	18	186
7	21	210
8	24	230
9	27	270
10	30	298

Por otra parte, los resultados de la valoración "in vitro" del ketoconazol mediante la técnica de sensidiscos se resumen a continuación en la Tabla VI, VII, VIII y las gráficas correspondientes.

GRAFICA 2. CURVA PATRON DE MC. FARLAN

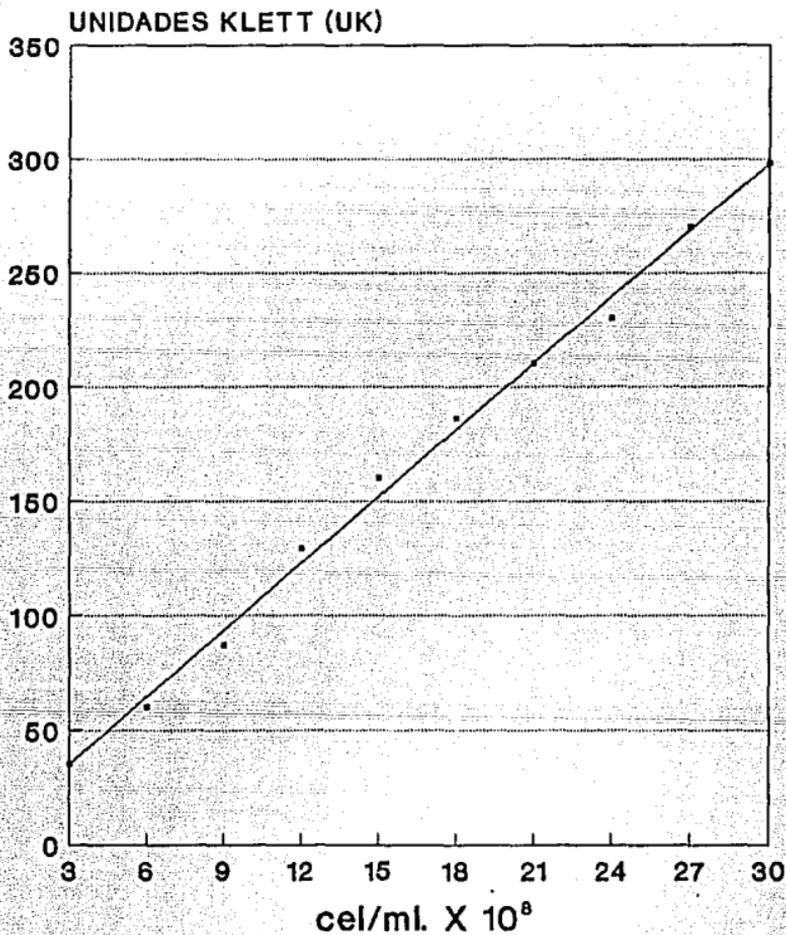


TABLA VI. SENSIBILIDAD DE Candida spp.
AL KETOCONAZOL.

CEPA	CONCENTRACION DE KETOCONAZOL ($\mu\text{g/ml}$).					
	0.01	0.1	1.0	5.0	10	100
<u>C. albicans</u>	-	-	+	+	+	+
<u>C. parapsilosis</u>	-	-	-	-	+	+
<u>C. albicans</u>	-	-	+	+	+	+
<u>C. albicans</u>	-	-	+	+	+	+
<u>C. krusei</u>	-	-	-	-	+	+
<u>C. albicans</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C. tropicalis</u>	-	-	-	-	-	-
<u>C. albicans</u>	-	-	+	+	+	+
<u>C. albicans</u>	-	-	+	+	+	+
<u>C. albicans</u>	-	-	+	+	+	+
<u>C. albicans</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C. krusei</u>	-	-	-	-	-	-
<u>C. albicans</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C. albicans</u>	-	-	-	-	+	+
<u>C. albicans</u>	-	-	+	+	+	+
<u>C. albicans</u>	-	-	+	+	+	+
<u>C. albicans</u>	-	-	+	+	+	+
<u>C. albicans</u>	-	-	+	+	+	+
<u>C. albicans</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C. albicans</u>	-	-	-	-	+	+
<u>C. albicans</u>	-	-	-	-	+	+

TABLA UI. SENSIBILIDAD DE Candida spp.
AL KETOCONAZOL.

CEPA	CONCENTRACION DE KETOCONAZOL ($\mu\text{g/ml}$).					
	0.01	0.1	1.0	5.0	10	100
<u>C.albicans</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C.albicans</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C.albicans</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C.tropicalis</u>	-	-	-	-	-	-
<u>C.tropicalis</u>	-	-	-	-	-	-
<u>C.albicans</u>	-	-	-	-	+	+
<u>C.albicans</u>	-	-	-	-	+	+
<u>C.albicans</u>	-	-	-	-	+	+
<u>C.albicans</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C.albicans</u>	-	-	-	-	+	+
<u>C.parapsilosis</u>	-	-	-	-	-	-
<u>C.albicans</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C.albicans</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C.albicans</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C.albicans</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C.stellatoidea</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C.stellatoidea</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C.albicans</u>	-	-	-	-	-	-
<u>C.parapsilosis</u>	-	-	-	-	-	-
<u>C.stellatoidea</u>	-	-	-	+	+	+

TABLA VI. SENSIBILIDAD DE Candida spp.
AL KETOCONAZOL.

CEPA	CONCENTRACION DE KETOCONAZOL ($\mu\text{g/ml}$).					
	0.01	0.1	1.0	5.0	10	100
<u>C. albicans</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C. stellatoidea</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C. stellatoidea</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C. stellatoidea</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C. stellatoidea</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C. stellatoidea</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C. albicans</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C. albicans</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C. stellatoidea</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C. albicans</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C. albicans</u>	-	-	-	-	+	+
<u>C. albicans</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C. albicans</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C. albicans</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C. albicans</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C. tropicalis</u>	-	-	-	-	-	-
<u>C. albicans</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C. albicans</u>	-	-	-	-	-	-
<u>C. albicans</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C. tropicalis</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C. parapsilosis</u>	-	-	-	-	-	-

TABLA UI. SENSIBILIDAD DE Candida spp.
AL KETOCONAZOL.

CEPA	CONCENTRACION DE KETOCONAZOL ($\mu\text{g/ml}$).					
	0.01	0.1	1.0	5.0	10	100
<u>C. parapsilosis</u>	-	-	-	-	-	-
<u>C. stellatoidea</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C. albicans</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C. parapsilosis</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C. stellatoidea</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C. tropicalis</u>	-	-	-	-	-	-
<u>C. stellatoidea</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C. stellatoidea</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C. stellatoidea</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C. stellatoidea</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C. stellatoidea</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C. albicans</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C. krusei</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C. tropicalis</u>	-	-	-	-	-	-
<u>C. stellatoidea</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C. albicans</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C. albicans</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C. albicans</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C. albicans</u>	-	-	-	+	+	+
<u>C. albicans</u>	-	-	-	+	+	+

+ INHIBICION DEL CRECIMIENTO

- NO INHIBICION DEL CRECIMIENTO

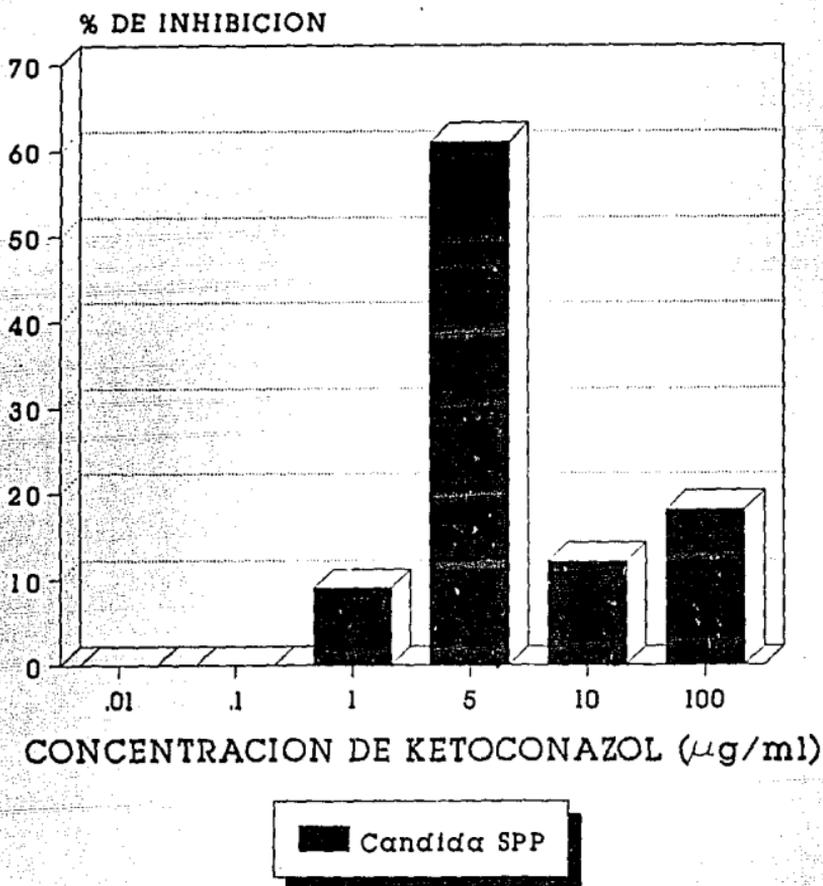
TABLA VII. PORCENTAJE DE CEPAS DE Candida spp. INHIBIDAS.

CONCENTRACION DE KETOCONAZOL ($\mu\text{g/ml}$)	% INHIBICION
0.01	-
0.1	-
1.0	9
5.0	61
10.0	12
100.0	10

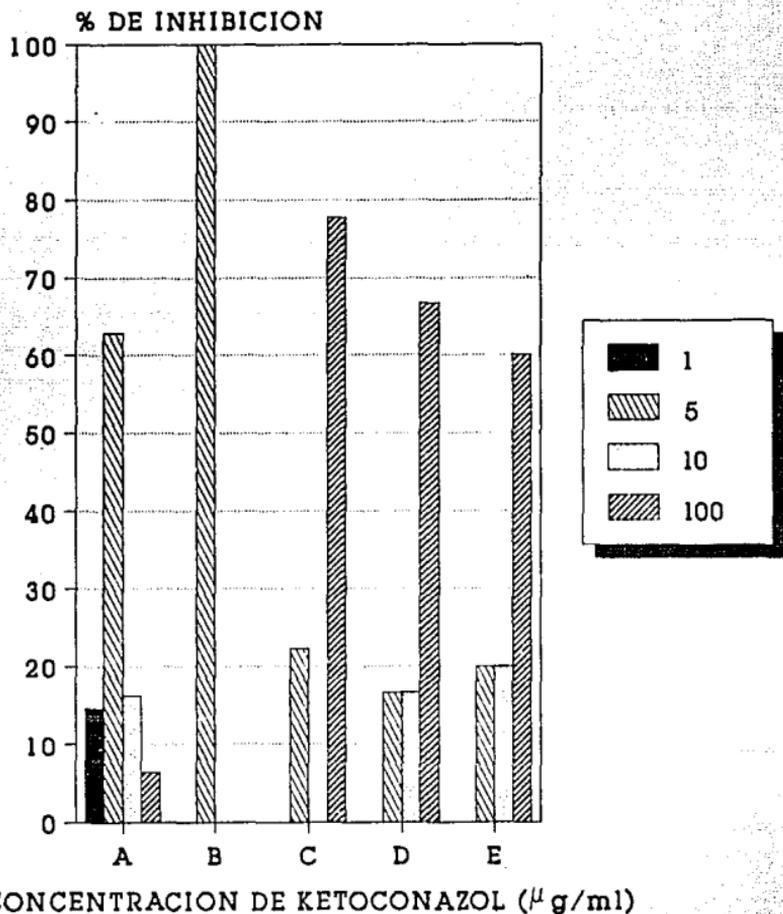
TABLA VIII. PORCENTAJE ACUMULATIVO DE CEPAS DE Candida spp. INHIBIDAS.

CEPA	CONCENTRACION DE KETOCONAZOL ($\mu\text{g/ml}$)					
	0.01	0.1	1	5	10	100
<u>C.albicans</u>	-	-	14.5	62.9	16.2	6.4
<u>C.stellatoidea</u>	-	-	-	100.0	-	-
<u>C.tropicalis</u>	-	-	-	22.2	-	77.8
<u>C.parapsilosis</u>	-	-	-	16.6	16.6	66.6
<u>C.krusei</u>	-	-	-	20.0	20.0	60

GRAFICA 3. RELACION ENTRE LA CONCENTRACION DE KETOCONAZOL Y EL PORCENTAJE DE INHIBICION ACUMULATIVO DE CANDIDA SPP



GRAFICA 4. PORCENTAJE ACUMULATIVO DE CANDIDA SPP INHIBIDAS



A) *C. albicans* B) *C. stellatoidea* C) *C. tropicalis* D) *C. parapsilosis* E) *C. krusei*

D).- TECNICA DE DILUCION EN TUBO.

Para comprobar los resultados de la valoración "in vitro" del ketoconazol obtenidos por la técnica de sensidiscos, se realizó una segunda técnica, la de dilución en tubo, cuyos resultados se presentan en las Tablas IX,X,XI,XII,XIII y en las gráficas 5,6,7 y 8.

TABLA IX. SENSIBILIDAD DE Candida spp.
AL KETOCONAZOL.

CEPA	CONTROL		CONCENTRACION DE KETOCONAZOL ($\mu\text{g/ml}$)									
			0.1		1		10		100		500	
	UK	$\frac{\text{cm}^3}{= 10^8}$	UK	$\frac{\text{cm}^3}{= 10^8}$	UK	$\frac{\text{cm}^3}{= 10^8}$	UK	$\frac{\text{cm}^3}{= 10^8}$	UK	$\frac{\text{cm}^3}{= 10^8}$	UK	$\frac{\text{cm}^3}{= 10^8}$
<u>C. albicans</u>	200	19.94	195	19.43	43	3.02	32	2.78	15	0.94	5	-
<u>C. parapsilosis</u>	198	10.91	109	10.01	30	3.31	35	3.0	13	0.74	6	0.02
<u>C. albicans</u>	196	19.53	194	19.32	42	3.72	21	1.56	13	0.74	6	0.02
<u>C. albicans</u>	198	10.91	105	10.40	42	3.72	35	3.0	16	1.05	4	-
<u>C. krusei</u>	205	20.45	200	19.94	44	3.92	30	3.31	15	0.94	-	-
<u>C. albicans</u>	210	20.97	200	20.76	46	4.13	31	2.59	15	0.94	7	0.12
<u>C. tropicalis</u>	190	10.91	105	10.40	102	10.09	100	17.09	100	17.09	60	5.56
<u>C. albicans</u>	202	20.14	200	19.94	52	4.74	30	3.31	16	1.05	5	-
<u>C. albicans</u>	200	19.94	194	19.32	40	4.33	37	3.20	15	0.94	3	-
<u>C. albicans</u>	196	19.53	190	10.91	53	4.05	30	2.40	17	1.15	2	-
<u>C. albicans</u>	205	20.45	205	20.45	53	4.05	33	2.79	22	1.66	5	-
<u>C. krusei</u>	210	20.97	206	20.55	100	10.7	102	10.1	176	17.47	72	6.00
<u>C. albicans</u>	196	19.53	192	19.12	43	3.02	33	2.79	12	0.64	7	0.12
<u>C. albicans</u>	206	20.55	201	20.04	55	5.05	40	3.51	10	1.25	6	0.02
<u>C. albicans</u>	198	10.91	105	10.40	34	2.09	20	1.46	17	1.15	2	-
<u>C. albicans</u>	206	20.55	202	20.14	42	3.72	20	2.20	19	1.35	4	-
<u>C. albicans</u>	210	20.97	206	20.55	56	5.15	30	3.31	14	0.04	4	-
<u>C. albicans</u>	200	19.94	199	19.04	50	4.54	39	3.41	10	1.25	6	0.02
<u>C. albicans</u>	200	20.76	200	19.94	52	4.74	31	2.59	11	0.53	2	-
<u>C. albicans</u>	190	19.73	190	19.73	56	5.15	34	2.90	12	0.64	2	-

TABLA IX. SENSIBILIDAD DE Candida spp.
AL KETOCONAZOL.

CEPA	CONTROL		CONCENTRACION DE KETOCONAZOL ($\mu\text{g/ml}$)									
			0.1		1		10		100		500	
	UK	cm^3 $\times 10^3$	UK	cm^3 $\times 10^3$	UK	cm^3 $\times 10^3$	UK	cm^3 $\times 10^3$	UK	cm^3 $\times 10^3$	UK	cm^3 $\times 10^3$
<u>C. tropicalis</u>	190	10.91	106	10.58	52	4.74	31	2.59	16	1.05	7	0.12
<u>C. tropicalis</u>	196	19.53	193	19.22	102	10.09	100	17.09	176	17.47	56	5.15
<u>C. albicans</u>	106	10.58	108	17.09	49	4.43	30	3.31	19	1.35	7	0.12
<u>C. albicans</u>	198	10.91	102	10.09	58	4.54	39	3.41	20	1.46	4	-
<u>C. albicans</u>	192	19.12	192	19.12	47	4.23	35	2.99	17	1.15	3	-
<u>C. krusei</u>	200	20.76	206	20.55	200	19.94	190	19.73	187	10.60	60	5.56
<u>C. albicans</u>	196	19.53	195	19.43	190	10.91	109	10.01	107	10.60	71	6.69
<u>C. albicans</u>	106	10.58	108	17.09	52	4.74	32	2.69	20	1.46	6	0.02
<u>C. albicans</u>	106	10.58	104	10.30	49	4.43	31	2.59	19	1.35	5	-
<u>C. albicans</u>	190	19.73	192	19.12	47	4.23	29	2.20	10	1.25	6	0.02
<u>C. albicans</u>	106	10.58	105	10.40	50	4.54	40	3.51	20	1.46	7	0.12
<u>C. krusei</u>	209	20.06	200	20.76	190	19.73	109	10.01	106	10.50	50	5.36
<u>C. albicans</u>	199	19.04	191	19.01	49	4.43	36	3.10	15	0.94	9	0.33
<u>C. albicans</u>	206	20.55	201	20.04	200	19.94	196	19.53	106	10.50	62	5.77
<u>C. stellatoidea</u>	100	10.71	100	10.71	53	4.05	39	3.41	14	0.04	5	-
<u>C. albicans</u>	190	19.73	195	19.43	56	5.15	32	2.69	16	1.05	3	-
<u>C. albicans</u>	102	10.09	100	17.09	40	4.33	35	2.99	10	1.25	2	-
<u>C. albicans</u>	200	19.94	200	19.94	49	4.43	39	3.41	15	0.94	0	0.22
<u>C. albicans</u>	202	20.14	196	19.53	46	4.13	32	2.69	12	0.64	6	0.02
<u>C. albicans</u>	206	20.55	199	19.04	51	4.64	42	3.72	10	1.25	5	-

**TABLA IX. SENSIBILIDAD DE Candida spp.
AL KETOCONAZOL.**

CEPA	CONTROL		CONCENTRACION DE KETOCONAZOL ($\mu\text{g/ml}$)									
			0.1		1		10		100		500	
	UK	$\text{c/ml} \times 10^0$	UK	$\text{c/ml} \times 10^0$	UK	$\text{c/ml} \times 10^0$	UK	$\text{c/ml} \times 10^0$	UK	$\text{c/ml} \times 10^0$	UK	$\text{c/ml} \times 10^0$
<u>C. albicans</u>	100	10.71	105	10.40	50	4.54	32	2.69	16	1.05	6	0.02
<u>C. albicans</u>	200	20.76	206	20.55	52	4.74	36	3.10	10	1.25	4	-
<u>C. albicans</u>	196	19.53	192	19.12	51	4.64	37	3.20	19	1.35	4	-
<u>C. tropicalis</u>	190	10.91	105	10.40	179	17.10	176	17.47	170	16.06	52	4.74
<u>C. tropicalis</u>	206	20.55	200	19.94	190	19.73	196	19.53	107	10.60	67	6.20
<u>C. albicans</u>	106	10.60	104	10.30	40	4.33	31	2.59	15	0.94	8	0.22
<u>C. albicans</u>	192	19.12	190	10.91	54	4.95	33	2.79	10	1.25	6	0.02
<u>C. albicans</u>	196	19.53	109	10.01	52	4.74	30	3.31	15	0.94	5	-
<u>C. albicans</u>	206	20.55	204	20.35	53	4.05	36	3.10	10	1.25	4	-
<u>C. albicans</u>	190	10.91	109	10.01	49	4.43	31	2.59	16	1.05	3	-
<u>C. parapsilosis</u>	200	19.94	200	19.94	199	19.04	107	10.60	105	10.40	62	5.77
<u>C. albicans</u>	206	20.55	201	20.04	40	4.33	30	3.31	14	0.04	6	0.02
<u>C. albicans</u>	107	10.60	105	10.40	46	4.13	32	2.69	19	1.35	7	0.12
<u>C. albicans</u>	196	19.53	194	19.32	52	4.74	39	3.41	17	1.15	4	-
<u>C. albicans</u>	106	10.50	100	17.09	47	4.23	31	2.59	20	1.46	4	-
<u>C. stellatoidea</u>	200	19.94	194	19.32	51	4.64	35	2.99	13	0.74	6	0.02
<u>C. stellatoidea</u>	190	19.73	191	19.01	49	4.43	30	2.40	16	1.05	0	0.22
<u>C. albicans</u>	206	20.55	206	20.55	200	19.94	194	19.32	190	10.91	56	5.15
<u>C. parapsilosis</u>	206	20.55	200	19.94	190	10.91	106	10.50	100	17.09	60	5.56
<u>C. stellatoidea</u>	192	19.12	190	10.91	52	4.74	46	4.13	30	1.25	4	-

**TABLA IX. SENSIBILIDAD DE Candida spp.
AL KETOCONAZOL.**

CEPA	CONTROL		CONCENTRACION DE KETOCONAZOL ($\mu\text{g/ml}$)									
			0.1		1		10		100		500	
	UK	c/ml =10 ⁸	UK	c/ml =10 ⁸	UK	c/ml =10 ⁸	UK	c/ml =10 ⁸	UK	c/ml =10 ⁸	UK	c/ml =10 ⁸
<u>C.albicans</u>	218	28.96	286	28.55	44	3.92	37	3.28	14	8.04	6	8.82
<u>C.stellatoidea</u>	286	28.55	282	28.14	43	3.82	32	2.78	17	1.25	-	-
<u>C.stellatoidea</u>	218	28.96	286	28.55	54	4.95	36	3.18	18	1.25	8	8.22
<u>C.stellatoidea</u>	282	28.14	282	28.14	49	4.43	38	3.31	16	1.85	8	8.22
<u>C.stellatoidea</u>	288	19.94	186	19.53	44	3.92	33	2.79	16	1.85	6	8.82
<u>C.stellatoidea</u>	284	28.35	288	19.94	58	4.54	38	3.31	16	1.85	8	8.22
<u>C.albicans</u>	285	28.45	284	28.35	39	3.41	38	2.48	15	8.94	6	8.82
<u>C.albicans</u>	192	19.12	187	18.68	45	4.82	36	3.18	18	1.25	4	-
<u>C.stellatoidea</u>	109	18.81	181	17.99	48	3.51	26	2.87	17	1.15	5	-
<u>C.albicans</u>	188	18.71	187	18.68	41	3.61	29	2.38	16	1.85	4	-
<u>C.albicans</u>	187	18.68	187	18.68	51	4.64	39	3.41	16	1.85	5	-
<u>C.albicans</u>	188	18.71	185	18.48	49	4.43	34	2.89	16	1.85	6	8.82
<u>C.albicans</u>	188	17.89	179	17.78	39	3.41	31	2.59	15	8.94	5	-
<u>C.albicans</u>	188	17.89	188	17.89	38	3.31	38	2.48	14	8.48	4	-
<u>C.tropicalis</u>	284	28.35	283	28.25	199	19.04	198	18.91	187	18.68	58	5.36
<u>C.albicans</u>	182	18.18	188	17.89	56	5.15	32	2.78	18	1.25	8	8.22
<u>C.albicans</u>	288	19.94	288	19.94	196	19.53	196	19.53	188	17.89	62	5.77
<u>C.albicans</u>	198	18.91	198	18.91	48	4.33	38	2.48	16	1.85	7	8.12
<u>C.tropicalis</u>	195	19.42	198	18.91	58	5.36	36	3.18	19	1.35	6	8.82
<u>C.parapsilosis</u>	289	28.86	285	28.45	195	19.43	177	17.58	178	16.06	56	5.15

**TABLA IX. SENSIBILIDAD DE Candida spp.
AL KETOCONAZOL.**

CEPA	CONTROL		CONCENTRACION DE KETOCONAZOL ($\mu\text{g/ml}$)									
			0.1		1		10		100		500	
	UK	c/ml $\times 10^3$	UK	c/ml $\times 10^3$	UK	c/ml $\times 10^3$	UK	c/ml $\times 10^3$	UK	c/ml $\times 10^3$	UK	c/ml $\times 10^3$
<u>C. parapsilosis</u>	237	29.66	285	29.45	196	19.53	100	17.09	176	17.47	50	5.36
<u>C. stellatoidea</u>	100	10.71	106	10.58	46	4.13	38	2.40	19	1.36	6	0.02
<u>C. albicans</u>	198	18.91	189	18.01	52	4.74	36	3.18	16	1.05	5	-
<u>C. parapsilosis</u>	288	19.94	198	18.91	48	4.33	31	2.59	19	1.36	6	0.02
<u>C. stellatoidea</u>	288	19.94	196	19.53	51	4.64	36	3.18	18	1.25	4	-
<u>C. tropicalis</u>	210	28.97	287	28.66	190	19.73	100	18.71	168	16.65	55	5.05
<u>C. stellatoidea</u>	196	19.53	193	19.22	51	4.64	39	3.41	17	1.15	4	-
<u>C. stellatoidea</u>	282	28.14	108	10.71	47	4.23	36	3.18	16	1.05	3	-
<u>C. stellatoidea</u>	198	18.91	109	18.01	46	4.13	31	2.59	15	0.94	6	0.02
<u>C. stellatoidea</u>	192	19.12	198	18.91	42	3.72	36	3.18	14	0.04	6	0.02
<u>C. stellatoidea</u>	198	18.91	106	10.58	38	3.31	31	2.59	14	0.04	7	0.12
<u>C. albicans</u>	282	28.14	198	19.73	49	4.43	39	3.41	18	1.25	4	-
<u>C. lusaei</u>	196	19.53	193	19.22	46	4.13	48	3.51	16	1.05	2	-
<u>C. tropicalis</u>	282	28.14	282	28.14	192	19.12	184	18.58	176	17.47	52	4.74
<u>C. stellatoidea</u>	195	19.43	198	18.91	51	4.64	41	3.61	19	1.36	6	0.02
<u>C. albicans</u>	190	19.73	196	19.53	52	4.74	48	3.51	28	1.46	5	-
<u>C. albicans</u>	288	19.94	197	19.63	49	4.43	38	3.31	18	1.25	4	-
<u>C. albicans</u>	198	18.91	100	10.71	47	4.23	32	2.78	16	1.05	6	0.02
<u>C. albicans</u>	192	19.12	189	18.01	58	4.54	36	3.18	14	0.04	7	0.12
<u>C. albicans</u>	291	28.04	199	19.04	53	4.85	35	2.99	18	1.25	8	0.22

TABLA X. DESARROLLO DE *Candida* spp EN AGAR SABOURAUD DESPUÉS DE ESTAR EN CONTACTO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE KETOCONAZOL.

CEPA	CONCENTRACION DEL KETOCONAZOL ($\mu\text{g/ml}$)				
	CRECIMIENTO EN AGAR SABOURAUD				
	0.1	1.0	10	100	500
<u><i>C. albicans</i></u>	++++	++++	++	++	+
<u><i>C. albicans</i></u>	++++	++++	++	++	+
<u><i>C. albicans</i></u>	++++	++++	++	++	+
<u><i>C. tropicalis</i></u>	++++	++++	++++	+++	++
<u><i>C. tropicalis</i></u>	++++	++++	++++	+++	++
<u><i>C. albicans</i></u>	++++	++++	++	++	+
<u><i>C. albicans</i></u>	++++	++++	++	++	+
<u><i>C. albicans</i></u>	++++	++++	++	++	+
<u><i>C. albicans</i></u>	++++	++++	++	++	+
<u><i>C. albicans</i></u>	++++	++++	++	++	+
<u><i>C. parapsilosis</i></u>	++++	++++	++++	+++	++
<u><i>C. albicans</i></u>	++++	++++	++	++	+
<u><i>C. albicans</i></u>	++++	++++	++	++	+
<u><i>C. albicans</i></u>	++++	++++	++	++	+
<u><i>C. albicans</i></u>	++++	++++	++	++	+
<u><i>C. stellatoidea</i></u>	++++	++++	++	++	+
<u><i>C. stellatoidea</i></u>	++++	++++	++	++	+
<u><i>C. albicans</i></u>	++++	++++	++++	+++	+
<u><i>C. parapsilosis</i></u>	++++	++++	++++	+++	++
<u><i>C. stellatoidea</i></u>	++++	++++	++	++	++

TABLA X. DESARROLLO DE *Candida* spp EN AGAR SABOURAUD DESPUÉS DE ESTAR EN CONTACTO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE KETOCONAZOL.

CEPA	CONCENTRACION DEL KETOCONAZOL ($\mu\text{g/ml}$)				
	CRECIMIENTO EN AGAR SABOURAUD				
	0.1	1.0	10	100	500
<i>C. albicans</i>	++++	++++	++	++	+
<i>C. stellatoidea</i>	++++	++++	++	++	+
<i>C. stellatoidea</i>	++++	++++	++	++	+
<i>C. stellatoidea</i>	++++	++++	++	++	+
<i>C. stellatoidea</i>	++++	++++	++	++	+
<i>C. stellatoidea</i>	++++	++++	++	++	+
<i>C. albicans</i>	++++	++++	++	++	+
<i>C. albicans</i>	++++	++++	++	++	+
<i>C. stellatoidea</i>	++++	++++	++	++	+
<i>C. albicans</i>	++++	++++	++	++	+
<i>C. albicans</i>	++++	++++	++	++	+
<i>C. albicans</i>	++++	++++	++	++	+
<i>C. albicans</i>	++++	++++	++	++	+
<i>C. tropicalis</i>	++++	++++	++++	++++	++
<i>C. albicans</i>	++++	++++	++	++	+
<i>C. albicans</i>	++++	++++	++++	++++	++
<i>C. albicans</i>	++++	++++	++	++	+
<i>C. tropicalis</i>	++++	++++	++	++	+
<i>C. parapsilosis</i>	++++	++++	++++	++++	++

TABLA XI. PORCENTAJE ACUMULATIVO DE CEPAS DE Candida spp. SENSIBLES Y RESISTENTES.

CEPA	% CEPAS SENSIBLES	% CEPAS RESISTENTES
<u>C. albicans</u>	93.5	6.58
<u>C. stellatoidea</u>	100.0	-
<u>C. tropicalis</u>	22.2	77.0
<u>C. parapsilosis</u>	33.3	66.7
<u>C. krusei</u>	40.0	60.0

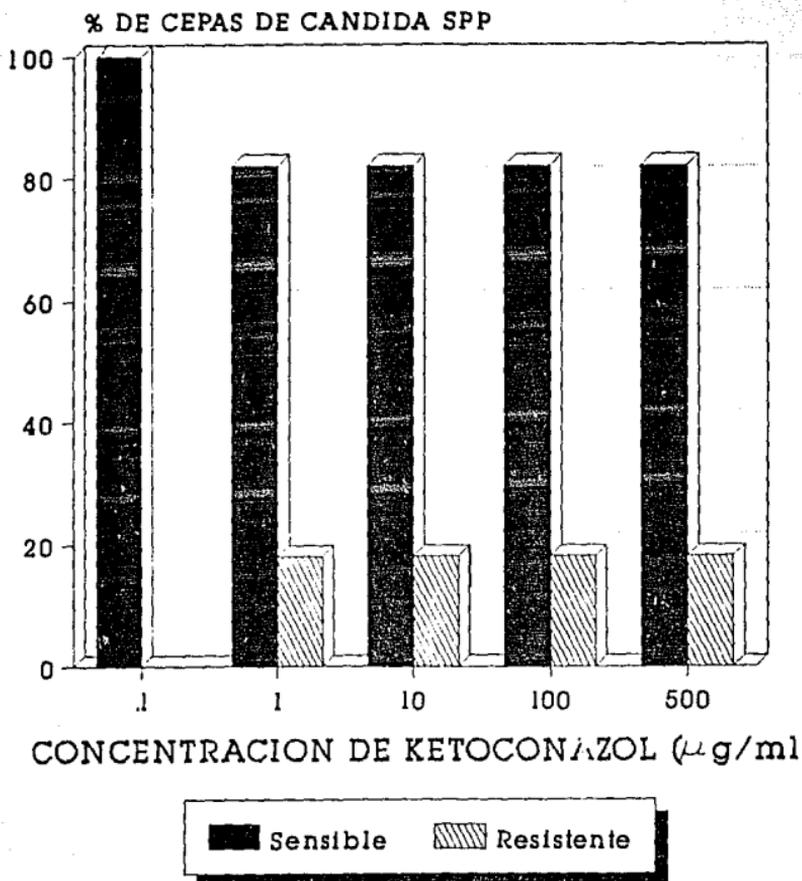
TABLA XII. PORCENTAJE ACUMULATIVO DE CEPAS DE Candida spp. SENSIBLES.

CEPA	% CEPAS SENSIBLES	No. CEPAS
<u>C. albicans</u>	70.0	50
<u>C. stellatoidea</u>	22.0	10
<u>C. tropicalis</u>	2.40	2
<u>C. parapsilosis</u>	2.40	2
<u>C. krusei</u>	2.40	2
TOTAL	100.0	02

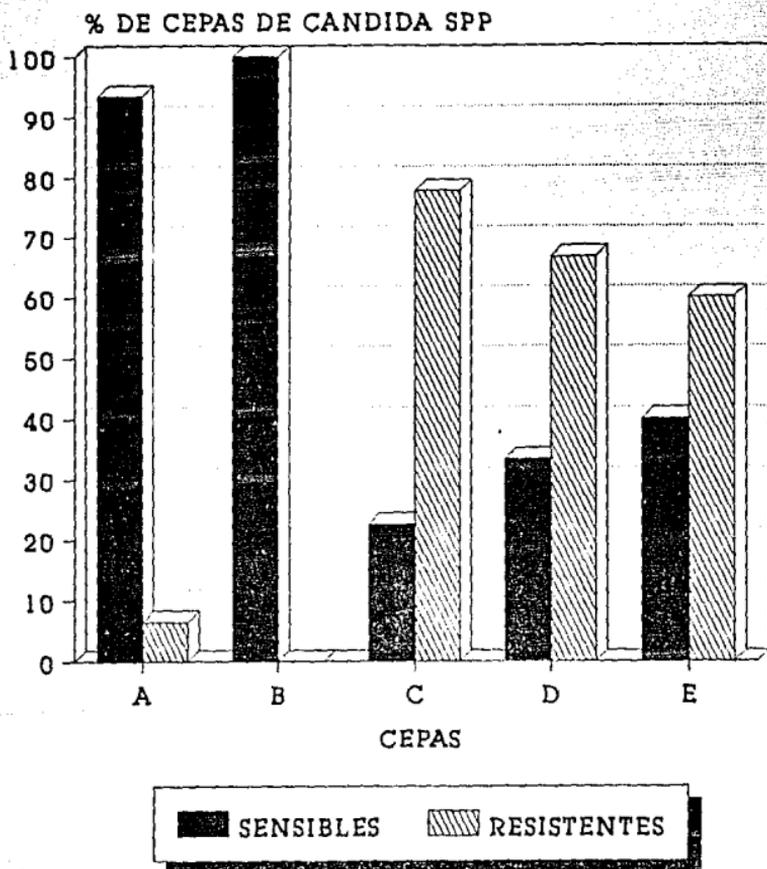
TABLA XIII. PORCENTAJE ACUMULATIVO DE CEPAS DE Candida spp. RESISTENTES.

CEPA	% CEPAS RESISTENTES	No. CEPAS
<u>C. albicans</u>	22.2	4
<u>C. stellatoidea</u>	-	-
<u>C. tropicalis</u>	30.9	7
<u>C. parapsilosis</u>	22.2	4
<u>C. krusei</u>	16.7	3
TOTAL	100.0	10

GRAFICA 5. RELACION ENTRE LA CONCENTRACION DE KETOCONAZOL Y EL PORCENTAJE DE CEPAS DE CANDIDA SPP SENSIBLES Y RESISTENTES

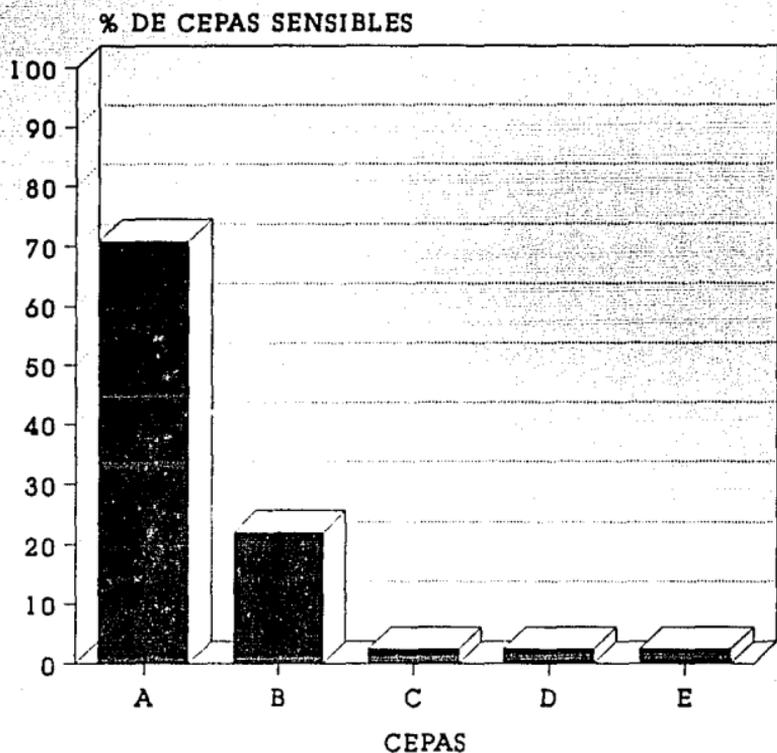


GRAFICA 6. PORCENTAJE ACUMULATIVO DE
CEPAS DE CANDIDA SPP SENSIBLES Y
RESISTENTES AL KETOCONAZOL



A) *C.albicans* B) *C.stellatoidea* C) *C.tropicalis* D) *C.parapsilosis* E) *C.krusei*

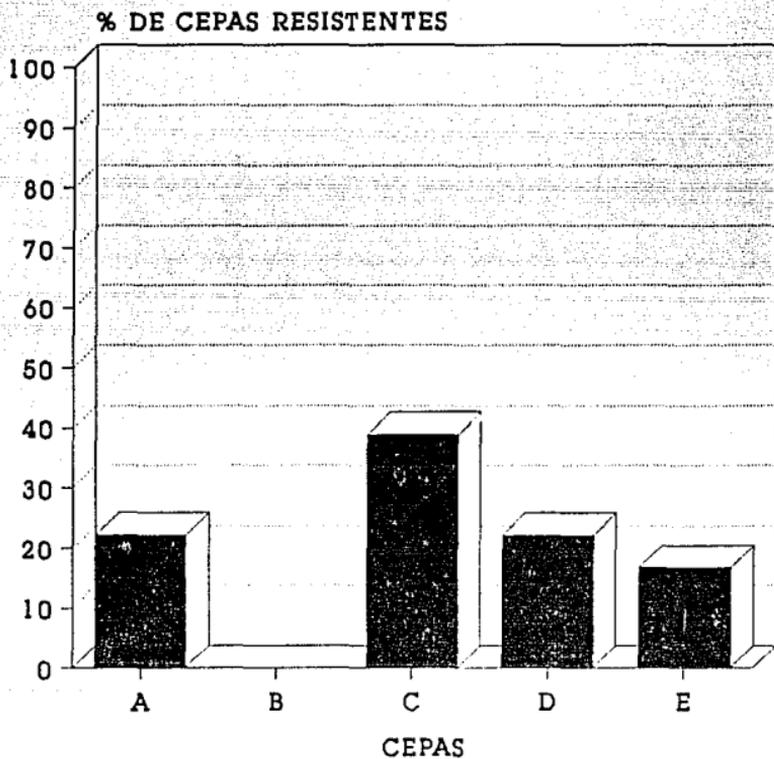
GRAFICA 7. PORCENTAJE ACUMULATIVO DE
CEPAS DE CANDIDA SPP SENSIBLES AL
KETOCONAZOL



CONC. 0.01-500 μ g/ml

A) *C. albicans* B) *C. stellatoidea* C) *C. tropicalis* D) *C. parapsilosis* E) *C. krusei*

GRAFICA 8. PORCENTAJE ACUMULATIVO DE
CEPAS DE CANDIDA SPP RESISTENTES AL
KETOCONAZOL



CONC. 0.01-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$

A) *C. albicans* B) *C. stellatoidea* C) *C. tropicalis* D) *C. parapsilosis* E) *C. krusei*

10. DISCUSION DE RESULTADOS

En la tipificación de las cepas de Candida spp., se observó un fuerte predominio de C. albicans (62%) sobre las demás especies, lo que está de acuerdo con la bibliografía y por lo tanto C. albicans sigue siendo el agente etiológico más frecuente de la candidosis.

De acuerdo con las pruebas de solubilidad se comprobó que el ketoconazol no es un compuesto netamente lipofílico, ya que presentó una buena solubilidad en etanol al 50% (V:V) en agua. Aun cuando el fármaco se solubilizó en cloroformo, etanol y acetona; se empleó como solvente el etanol al 50% en la técnica de dilución en tubo con objeto de poder incorporar el ketoconazol al medio de cultivo para su valoración "in vitro", y de esta manera tener las mismas condiciones de solubilidad del fármaco en las dos técnicas empleadas en este estudio. Además se observó que el etanol-agua no interfiere con la valoración "in vitro" del fármaco en ambas técnicas, obteniéndose una distribución uniforme y conociéndose la concentración del mismo en el medio de cultivo.

La literatura reporta al dimetilsulfóxido (DMSO) como un solvente efectivo (10,11), sin embargo, las desventajas que presenta sobre el solvente seleccionado en este estudio son accesibilidad y costo.

Por otra parte, la difusión del solvente en la técnica de sensidiscos es excelente, ya que se obtuvieron halos de inhibición perfectamente delineados.

Para mayor confiabilidad de los resultados se colocaron discos control impregnados sólo con el solvente, mientras que en la técnica de dilución en tubo, se corrieron tubos control con medio de cultivo y un volumen proporcional al inóculo del solvente por cada cepa, y de esta manera descartar la posibilidad de que las cepas no sean sensibles al fármaco, sino al solvente.

En la técnica de sensidiscos se encontró que la concentración mínima inhibitoria (CMI) de 82 cepas de Candida spp. se dió entre 1-10 µg/ml, observándose un 61% de ellas sensibles a una concentración de 5µg/ml de ketoconazol.

En las 18 cepas restantes de Candida spp. no se observaron halos de inhibición a una concentración de 100 µg/ml. Esto demuestra que dichas cepas no son sensibles al ketoconazol; sin embargo, para comprobar que efectivamente el 18% de las cepas son resistentes al ketoconazol, se empleó una segunda técnica, la de dilución en tubo, ya que ésta proporciona más sensibilidad que la de discos, debido a que Candida spp. presenta un crecimiento similar al de las bacterias y el fármaco se puede incorporar al medio de cultivo. En esta técnica se

encontró que el 82% de las cepas de Candida spp. presentaron una concentración inhibitoria al 50% (CI ^{50%}) de 1µg/ml y en el 18% de cepas de Candida spp. se observó crecimiento a una CI ^{50%} mayor de 100 µg/ml de ketoconazol.

Los resultados al inocular las cepas en agar Sabouraud, después de haber estado en contacto con diferentes concentraciones del fármaco, nos muestran que las cepas resistentes desarrollan en mayor proporción que las sensibles.

En ambas técnicas los resultados fueron iguales, 82% de cepas de Candida spp. sensibles y 18% resistentes, presentándose un mayor porcentaje de resistencia en C. tropicalis, C. parapsilosis y C. krusei. Las cepas de C. albicans fueron solamente en un 6.5% resistentes, mientras que en C. stellatoidea se obtuvo 100% de cepas sensibles.

A pesar de que los resultados nos muestran un bajo porcentaje de resistencia de C. albicans al ketoconazol, este estudio nos da una clara idea de la importancia que tiene el hecho de que siendo C. albicans el agente etiológico más frecuente de la candidosis, es necesario la búsqueda de nuevos y mejores antimicóticos en el tratamiento de enfermedades en las cuales se presenta resistencia del agente etiológico, como ocurre en el caso específico de la candidosis mucocutánea crónica.

Por otra parte, es importante realizar una tipificación completa del agente etiológico de la candidosis, para proporcionar al paciente el tratamiento adecuado, sobre todo en casos específicos en los cuales puede haber la posibilidad de resistencia, como puede observarse en los resultados obtenidos en este estudio, en los cuales C.tropicalis presentó una mayor resistencia al ketoconazol en comparación con C. albicans.

Existen límites de resistencia, por lo tanto para comprobarlo sería aconsejable incrementar el número de cepas y realizar nuevamente este estudio para obtener mayor información sobre el número de cepas sensibles y/o resistentes al ketoconazol.

ESTADISTICA

Después de aplicar dos métodos diferentes, se pretende demostrar estadísticamente la resistencia de un determinado número de cepas a diferentes concentraciones del fármaco. El método estadístico que se aplicó es Prueba de hipótesis aplicando la T de Student para ajustar los valores obtenidos a una distribución normal (58,59).

Suponemos que la resistencia de las cepas a la aplicación de diferentes concentraciones del fármaco, es una variable aleatoria normal, por lo tanto se pretende probar la hipótesis siguiente:

$$H_0: \mu_0 = 0$$

vs.

$$H_1: \mu_1 > 0$$

H_0 : A mayor concentración del fármaco el crecimiento es nulo (hipótesis nula)

H_1 : A mayor concentración del fármaco el crecimiento es constante o persistente (hipótesis alterna).

Se eligió el valor de significancia $\alpha = 5\%$; si la hipótesis es cierta; entonces la variable aleatoria:

$$T = \frac{\sqrt{n} \bar{x} - \mu_0}{SD}$$

$$n = 100$$

$$SD = 21.2$$

$$\bar{x} = 15$$

t = n-1 grados de libertad.

$$\mu_0 = 0$$

$$\mu_1 = 1$$

$$T = \frac{\sqrt{100} \cdot 15 - 0}{21.2} = 7.08$$

El valor crítico para la región de rechazo es C donde :
 $P(t < C) \mu_0 = \alpha = 0.05 = 1.66$ (tablas de T de Student para 99 grados de libertad).

$$C = 1.66$$

$$t = 7.08$$

Si $t > C \implies$ se rechaza H_0 y se acepta H_1 .

Si $t < C \implies$ se acepta H_0 y se rechaza H_1 .

Como $t > C$ se rechaza la hipótesis nula (H_0) y se acepta la hipótesis alterna (H_1).

* El análisis estadístico se realizó sobre el valor máximo de concentración del fármaco (500 $\mu\text{g/ml}$).

11. CONCLUSIONES

De acuerdo al estudio realizado se llega a las siguientes conclusiones:

- En la frecuencia de especies estudiadas de casos de candidosis, se obtuvo un predominio de C. albicans (62%) siendo el agente etiológico más importante de la candidosis.

- Para realizar el estudio "in vitro" del ketoconazol, se comprobó que la mayor solubilidad del fármaco se presenta en el solvente etanol-agua al 50%.

- Para la valoración de la sensibilidad y/o resistencia de las cepas de Candida spp. frente al ketoconazol, se utilizaron dos técnicas: sensibilización y dilución en tubo empleando la escala de Mac Farlan, obteniéndose resultados similares.

- Por ambos métodos de valoración del ketoconazol "in vitro", se obtuvieron límites de resistencia ($\geq 100 \mu\text{g/ml}$) en el 18% del total de las cepas estudiadas.

- La resistencia de las cepas fue mayor en proporción para las especies C. tropicalis, C. parapsilosis y C. krusei. C. albicans se comportó en parámetros regulares obteniéndose un 6.5% de resistencia y en C. stellatoidea no se comprobó resistencia.

12. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Bonifaz A. Micología Médica Básica. Ed. Méndez-Cervantes. México, D.F. 1990.
- 2.- Velasco-Tay. Nociones de Micología. Ed. Méndez-Cervantes . México, D.F. 1978.
3. Alcubierre Moya M., Ramírez Chávez L. Nueva metodología para la tipificación del género Candida (Estudio de 200 cepas). México, D.F. 1990.
- 4.- García Legorreta A. Estudio "in vitro" del Saperconazol (R 66 905). Efecto sobre diversas cepas de hongos patógenos y oportunistas. México, D.F. 1990.
- 5.- Koneman E.W. Diagnóstico Microbiológico. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Arg. 1983.
- 6.- Liehr H., Grun M., Brunswig D., Sautter T. Ketoconazole. Lancet, i: 319-320, 1982.
- 7.- Roderick H. Ketoconazole. British Medical Journal. 285: 585-586. 1982.
- 8.- Dismukes W., Bennett J., Drutz D., Graybill J., Remington J. and Stevens D. Criteria for Evaluation of Therapeutic Response to Antifungal Drugs. Reviews of Infectious Diseases, 2(4): 535-544, 1980.

- 9.- Symoens J., Moens M., Dom J., Scheijgrond H., Dony J.
Evaluation of Two Years of Clinical Experience with
Ketoconazole. *Reviews of Infectious Diseases*, 2(4):
674-687, 1980.
- 10.- Mercer E.I. Inhibition of sterol 14 α -demethylasa
enzymes. *Biochemical Society Transactions*, 11: 663-
666, 1983.
- 11.- Fregoso-Dueñas F. Ketoconazole in Vulvovaginal
Candidosis. *Reviews of Infectious Diseases*, 2(4): 620-
622, 1980.
- 12.- Hay R., Wells R., Clayton Y. and Wingfield, H.
Treatment of Chronic Mucocutaneous Candidosis with
Ketoconazole: A study of 12 cases. *Reviews of
Infectious Diseases*, 2(4): 600-605, 1980.
13. Thienpont D., Van Cutsem J. and Borgers M.
Ketoconazole in Experimental Candidosis. *Reviews of
Infectious Diseases*, 2(4): 570-576, 1980.
- 14.- Horsburgh C.R., Kirkpatrick C.H. and Teutsch C.B.
Ketoconazole and the Liver. *Lancet*, i 860, 1982.
- 15.- Smith K.J., Warnock D.W., Kennedy C.T., Jhonson E.M.,
Hopwood V., Van Cutsem J. and Vanden Bossche H. Azole
Resistance in Candida albicans. *Journal of Medical
and veterinary Mycology*, 24: 133-144, 1986.

- 16.- Jhonson E.M., Richardson M.D. and Warnock D.W. In vitro- resistance to imidazole antifungals in Candida albicans. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 13: 547-558, 1984.
- 17.- Mohammed A., Athar and Winner H.I. The development of resistance by Candida species to polyene antibiotics in vitro. Journal of Medical Microbiology, 4: 505-517, 1971.
- 18.- Warnock D.W., Jhonson E.M., Richardson M.D. and Vickers C.F. Modified response to ketoconazole of Candida albicans from a treatment failure. Lancet, 1, 642-643, 1983.
- 19.- Holt R.J. and Azmi A. Miconazole-Resistant Candida. Lancet, 1, 50-51, 1983.
- 20.- Bastide M., JJouvert S. and Bastide J.M. A comparison of the effects of several antifungal imidazole derivates and polyenes on Candida albicans: an ultrastructural study by scanning electron microscopy. Can. J. Microbiol., 28: 1119-1126, 1982.
- 21.- De Nollin Sonja and Borgers M. Scanning Electron Microscopy of Candida albicans After In Vitro Treatment with Miconazole. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 7(5): 704-711, 1975.

- 22.- Odds F.C. Laboratory evaluation of antifungal agents: a comparative study of five imidazole derivates of clinical importance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 6: 749-761, 1980.
- 23.- Aerts. F., De Brabander M., Vanden Bossche H., Van Cutsem J. and Borgers M. The activity of ketoconazole in mixed cultures of fungi and human fibroblasts. *Mykosen*, 23(2): 53-67, 1980.
- 24.- Jonson E.M., Barnard M.L., Richardson M.D. and Warnock D.W. Effect of Ketoconazole on the Initial Stages of Germ Tube Formation by Strains of Candida albicans. *Mykosen*, 25(9): 481-486, 1982.
- 25.- Borgers M., Mechanism of action on Antifungal Drugs, with Special Reference to the Imidazole Derivates. *Reviews of Infectious Diseases*, 2(4): 520-534, 1980.
- 26.- Saag M.S. and Dismukes W.E. Azole Antifungal Agents: Emphasis on New Triazoles. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*, 32(1): 1-8, 1988.
- 27.- Borgers M., Vanden Bossche H. and De Brabander M. The Mechanism of Action of the New Antimicotic Ketoconazole. *The American Journal of Medicine*, 24: 2-8, 1983.
- 28.- Yoshida Y. and Aoyama Y. Interaction of azole antifungal agents with Citochrome P450 14DM purified from S.cerevisiae microsomes. *Biochem. Pharmacol.*, 36(2): 229-235, 1987.

- 29.- Vanden Bossche H., Willemsens G., Cools W. and Cornelissen F. Inhibition of ergosterol synthesis in Candida albicans by ketoconazole. Arch. Int. Physiol. Biochim., 87: 849-851, 1979.
- 30.- Marriot M.S. Inhibition of Sterol Biosynthesis in Candida albicans by Imidazole-containing Antifungals. Journal of General Microbiology, 117: 253-255, 1980.
- 31.- Vanden Bossche H., Willemsens G., Cools., Cornelissen F., Lauwers W. and Van Cutsem M. In vitro and In vivo Effects of the Antimycotic Drug Ketoconazole on Sterol Synthesis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 17(6) 922-928, 1980.
- 32.- Dismukes W.E. Azole Antifungal Drugs: Old and New. Annals Of Internal Medicine, 109: 177-179, 1988.
- 33.- Baldwin B.C. Fungicidal inhibitors of ergosterol biosynthesis. Biochemical Society Transactions, 11: 659-663, 1983.
- 34.- Gibbons F., Pullinger R. and Mitropoulos A. Studies on the Mechanism of Lanosterol 14 α -Demethylation. Biochem. J., 183: 309-315, 1979.
- 35.- Vanden Bossche H., Willemsens G., Cools W., Lauwers F.J. and Jeune L. Biochemical effects of Miconazole on Fungi. Inhibition of ergosterol biosynthesis in Candida albicans. Chem. Biol. Interactions, 21: 59-78, 1978.

- 36.- Sud I. and Feingold D. Heterogeneity of Action Mechanisms Among Antimycotic Imidazoles. Antimicrobial Agents of Chemotherapy, 20(1): 71-74, 1981.
- 37.- Speller D C. and Warnock D.W. Sensitivity and resistance to antifungals. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 15: 514-517, 1985.
- 38.- Horsburgh C.B. and Kirkpatrick C. H. Long-Term therapy of Chronic Mucocutaneous Candidosis with Ketoconazole: Experience with 21 patients. American Journal of Medicine, 74: 23-29, 1983.
- 39.- Levine H.B. Resistance to Ketoconazole. Lancet, ii; 211, 1982.
- 40.- Odds F.C. ketoconazole resistance. Lancet, ii; 771, 1982.
- 41.- Demerec M. Origin of Bacterial resistance to antibiotics. J. Bact., 56: 63, 1948.
- 42.- Ryley J.F., Wilson R.G. and Barrett-Bee K.J. Azole resistance in *C. albicans*. Sabouraudia, 22: 53-63, 1984.
- 43.- Levine H.B. Ketoconazol en el tratamiento de las micosis. Ed. DOYMA. Barcelona, España, 1985.
- 44.- Janssen Pharmaceutica: Micosis; 5-112, 1981.

- 45.- Graybill J., Lundberg D., Donovan W., Levine H.B., Díaz Rodríguez M. and Drutz D. Treatment of Coccidioidomycosis with Ketoconazole: Clinical and laboratory Studies of 18 patients. *Reviews of Infectious Diseases*, 2(4): 661-673, 1980.
- 46.- Welsh O., González J., Díaz Z., Madero D. Therapeutic Evaluation of Ketoconazole in Patients with Coccidioidomycosis. *Reviews of Infectious Diseases*, 2(4): 651-655, 1980.
- 47.- Restrepo A., Stevens D., Gómez I., Leiderman E., Angel R., Fuentes J., Arana A., Mejía G., Vanegas A. and Robledo M. Ketoconazole: A New Drug for the Treatment of Paracoccidioidomycosis. *Reviews of Infectious Diseases*, 2(4): 633-642, 1980.
- 48.- Drouhet E. and Dupont B. Chronic Mucocutaneous Candidosis and other Superficial and Systemic Mycosis Successfully Treated with Ketoconazole. *Reviews of Infectious Diseases*, 2(4): 606-619, 1980.
- 49.- Pharmacokinetics of Amphotericina B and Flucytosina. *Post. Med. Journal*, 55: 667, 1979.
- 50.- USP. XXI; 1985. p. 580.
- 51.- Niengheers J., &euron F. and Awouters. Inhibition and induction of microsomal enzymes in the rat. A comparative study of four antimycotics: Miconazole, *Pharmacodyn*, 251: 26-38, 1981.

- 52.- Graybill J.R., Williams D. M., Van Cutsem E. and Drutz D.J. Combination therapy of experimental Histoplasmosis y Cryptococcosis with Amphotericina B ketoconazole. *Reviews of Infectious Diseases*, 2(4): 551-558, 1980.
- 53.- Thienpont D., Van Cutsem J., Van Gerven F., Heeres J. and Janssen P.A. Ketoconazole - a new broad spectrum orally active antimycotic. *Experientia*, 35: 606, 1979.
- 54.- Van der Meer J.W., Keuning J.J., Scheijground H.W., Heykants J., Van Cutsem J. and Brugmans. The influence of gastric acidity in the bioavailability of ketoconazole. *Jornal of Antimicrobial Chemotherapy*, 6(4): 552-554, 1980.
- 55.- Stevens D., Williams P. and Sugal A. Ketoconazole effects. *Ann. Intern. Med.*, 97(2): 284-285, 1982.
- 56.- Botter A., Dethier F. and Deremans W. Treatment with ketoconazole. A new oral antimycotic agent. *Mycosen*, 22(6): 274-278, 1979.
- 57.- Bailey W.R. and Scott E. *Diagnostic Microbiology*. Cuarta edición. The C.V. Mosby Company. Saint Louis, 1974.
- 58.- Infante Gil S. Zarate de Lara, Guillermo P. *Métodos Estadísticos*. Ed. Trillas. México, D.F., 1984.
- 59.- Kreysig E. *Introducción a la Estadística Matemática*. Ed. Limusa. México, D.F., 1985.