



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Av. 1° de Mayo S/N Cuautitlán Izcalli, México

**Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de
los derivados de ácido carbámico sobre aislamientos
clínicos de *Candida albicans*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :

OLGA RODRÍGUEZ SÁNCHEZ.

ASESORES: Dr. ANDRÉS ROMERO ROJAS.
Dr. ENRIQUE ANGELES ANGUIANO.

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO 2007.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



AGRADECIMIENTOS:

A mis padres Naty y Daniel por el apoyo que me brindaron, gracias por sus consejos y por que siempre han estado ahí cuando los necesito.

A Selene y Victor por compartir momentos de felicidad y tristeza a mi lado por siempre hacerme notar mis errores y cualidades gracias.

A Pedro y Araceli por estar ahí en momentos de necesidad.

A Francisco por que haz sido una maravillosa persona que me ha enseñado todas las oportunidades que tiene la vida.

A todos mis amigos por los bellos momentos que hemos disfrutado juntos.

A Dr. Enrique Ángeles Anguiano y al Laboratorio de Química Medicinal por las facilidades prestadas para la elaboración de esta tesis.

A Alharma SA de CV por proporcionar los materiales y equipos necesarios para este trabajo.

A mi esposo Fidel por que me haz dado fortaleza cuando mi corazón ha estado apunto de desfallecer, y me has dado en ese momento lo que más necesitaba... seguridad!! Para atreverme a volar!!!. Te amo por que me diste libertad para que descubriera lo que más valoro en ti, Gracias.



INDICE.

| | Páginas. |
|--|----------|
| I. Índice de Figuras. | V |
| I. Índice de Tablas. | VIII |
| II. Índice de Gráficas. | IX |
| Resumen. | 1 |
| 1. Introducción | 2 |
| 1.1. Generalidades de los hongos. | 2 |
| 1.2. Tipos de micosis. | 7 |
| 1.3. Importancia de los hongos en la sociedad. | 9 |
| 2. <i>Candida albicans</i> . | 11 |
| 2.1. Generalidades. | 11 |
| 2.2. Pruebas bioquímicas. | 14 |
| 2.3. Candidiasis. | 15 |
| 2.3.1. Antecedentes históricos. | 16 |
| 2.3.2. Edad y sexo. | 16 |
| 2.3.3. Patogenia. | 17 |
| 2.3.4. Factores predisponentes. | 17 |
| 2.3.5. Formas clínicas. | 18 |
| 2.3.5.1. Candidiasis genital. | 19 |
| 2.3.5.2. Candidiasis oral. | 19 |



| | Páginas. |
|---|----------|
| 2.3.5.3. Intertrigo. | 20 |
| 2.3.5.4. Onicomiosis por Candida. | 20 |
| 2.3.5.5. Granulomas. | 21 |
| 2.3.5.6. Candidiasis mucocutánea crónica. | 21 |
| 2.3.5.7. Candidiasis urinaria. | 21 |
| 2.3.5.8. Candidiasis sistémica profunda. | 22 |
| 3. Tratamiento de las Candidiasis invasivas. | 24 |
| 3.1. Tratamiento en las Candidiasis mucocutáneas. | 24 |
| 4. Prevención en las Candidiasis invasivas. | 24 |
| 5. Principales clases de antifúngicos. | 25 |
| 5.1. Anfotericina B. | 26 |
| 5.1.1. Historia y fuentes. | 27 |
| 5.1.2. Propiedades químicas. | 27 |
| 5.1.3. Mecanismo de acción. | 28 |
| 5.1.4. Absorción, distribución y excreción. | 29 |
| 5.1.5. Aplicaciones terapéuticas. | 29 |
| 5.1.6. Efectos adversos. | 31 |
| 5.2. Ketoconazol. | 33 |
| 5.2.1. Historia y fuentes. | 33 |



| | Páginas. |
|---|----------|
| 5.2.2. Mecanismos de acción. | 35 |
| 5.2.3. Absorción, distribución y excreción. | 36 |
| 5.2.4. Aplicaciones terapéuticas. | 37 |
| 5.2.5. Efectos adversos. | 38 |
| 6. Carbamatos. | 39 |
| 6.1. Generalidades. | 39 |
| 6.2. Modo de acción. | 42 |
| 6.3. Pruebas biológicas. | 42 |
| 6.3.1. Actividad antiparasitaria. | 42 |
| 6.3.2. Actividad antibactericida. | 43 |
| 6.4. Reacciones adversas. | 44 |
| Justificación. | 46 |
| Hipótesis. | 47 |
| Objetivos. | 47 |
| 7. Material y Métodos. | 48 |
| 7.1. Material biológico. | 48 |
| 7.2. Reactivos y equipo instrumental. | 48 |
| 7.3. Levaduras. | 50 |
| 7.3.1. Pruebas de identificación. | 50 |



| | Páginas. |
|---|----------|
| 7.4. Conservación de Levaduras. | 50 |
| 7.4.1. A corto y mediano plazo. | 50 |
| 7.4.2. A largo plazo. | 51 |
| 7.5. Preparación del inóculo. | 52 |
| 7.6. Principios activos. | 53 |
| 7.6.1. Preparación de las diluciones. | 53 |
| 7.7. Llenado de placas. | 57 |
| 7.7.1. Inoculación de la microplaca para la determinación de las MIC´S de los Carbamatos. | 57 |
| 7.7.2. Inoculación en microplaca para la determinación de las MIC´S de los Carbamatos. | 58 |
| 7.8. Lectura y susceptibilidad. | 60 |
| 7.8.1. Criterios de susceptibilidad. | 61 |
| 7.9. Control de Calidad. | 61 |
| 8. Resultados. | 63 |
| 9. Discusión. | 70 |
| 10. Conclusiones. | 74 |
| 11. Bibliografía. | 75 |
| 12. Anexos. | 82 |



INDICE DE FIGURAS.

| | Páginas. |
|---|----------|
| Figura #1. Estructura general de una célula micótica tanto en su forma vegetativa como de reproducción. | 6 |
| Figura #2. Crecimiento típico de <i>Candida albicans</i> en medio selectivo de Agar Sabouraud. | 12 |
| Figura #3. Secuencia general a seguir para la identificación del género <i>Candida</i> . | 13 |
| Figura #4. Tubo germinativo de <i>Candida albicans</i> observando a través del microscopio óptico. | 15 |
| Figura #5. Candidiasis oral también conocida como algodoncillo. | 23 |



| | Páginas. |
|--|----------|
| Figura #6. Candidiasis genital. | 23 |
| Figura #7. Principales sitios de acción dentro de la célula micótica de los diferentes grupos de antifúngicos. | 26 |
| Figura #8. Estructura química de anfotericina B. | 26 |
| Figura #9. Representación esquemática de la anfotericina B. | 28 |
| Figura #10. Estructura química del ketoconazol. | 33 |
| Figura #11. Estructura general de los carbamatos. | 39 |



Páginas.

Figura #12. Estructuras de los carbamatos utilizados para la comparación con anfotericina y ketoconazol. 54

Figura #13. Preparación de las distintas diluciones de los antifúngicos y carbamatos con DMSO. 55

Figura #14. Dilución de las soluciones stock de antifúngicos y carbamatos en RPMI para adicionarlos a los pocillos de las microplacas. 56

Figura #15. Llenado de las microplacas para la determinación de las MIC'S de los antifúngicos de referencia. 59



Páginas.

| | |
|---|----|
| Figura #16. Llenado de las microplacas para la determinación de las MIC´S de los diferentes carbamatos. | 60 |
|---|----|

INDICE DE GRAFICAS.

| | |
|--|----|
| Grafica #1. Representación de la ubicación de las muestras que fueron analizadas para detectar la MIC. | 65 |
|--|----|



INDICE DE TABLAS.

| | Páginas. |
|---|----------|
| Tabla #1. Clasificación de las micosis de acuerdo al grado de daño que causan. | 7 |
| Tabla #2. Clasificación de los hongos de importancia medica de acuerdo a su reproducción. | 9 |
| Tabla #3. Principales derivados azólicos que sé encuentran disponibles en la terapia fúngica. | 34 |
| Tabla #4. Principales usos de los carbamatos en las diferentes industrias. | 40 |



Páginas.

Tabla #5. Localización dentro del organismo de las 61 cepas de *C. albicans* de aislamientos clínicos.

63

Tabla #6. MIC´S de los antifúngicos de referencia tanto en la cepa ATCC 14053 como en las cepas de aislamientos clínicos.

64

Tabla #7. Concentraciones mínimas inhibitorias presentadas por los carbamatos en muestras clínicas de *candida albicans*.

67



ABREVIATURAS.

AB.- Anfotericina B.

CLSI. Estándares de Laboratorios Clínicos.

ATCC.- American Type Culture Collection .

C. albicans.- *Candida albicans*.

DMSO.- Dimetil Sulfoxido.

Ket.- Ketoconazol.

Kg.- kilogramo.

LCR.- Líquido cefalorraquídeo.

LQM.- Laboratorio de Química Medicinal.

µg.- Microgramo.

mg.- Miligramo.

MIC.- Concentración Mínima Inhibitoria.

MIC´S.- Concentraciones mínimas inhibitorias.

mL.- mililitro.

NDA.- Revisión de la aplicación de nuevas drogas.

SDA.- Agar Dextrosa Sabouraud.

SSF.- Solución salina fisiológica.



RESUMEN.

Candida albicans es un hongo levaduriforme saprofita, forma parte de la flora normal microbiana causando infecciones que se cree son de origen endógeno. Este microorganismo genera infecciones denominadas Candidiasis. Presenta una gran variedad de cuadros clínicos, afecta principalmente mucosas (boca, vagina), piel, uñas y de manera excepcional otros órganos como pulmones, intestinas.

En el trabajo se determinó la concentración mínima inhibitoria de los derivados del ácido carbámico en cepas de origen clínico de *Candida albicans* para ser utilizados como una posible alternativa en el tratamiento de las micosis. Estos carbamatos al ser comparados contra dos de los antimicóticos más comúnmente utilizados en la terapia contra dichas micosis presentaron un MIC semejante a la encontrada para la Anfotericina B (LQM 938, 006, 007, 667) y una superior a la determinada para ketoconazol lo cual nos permite sugerir a dichos carbamatos como alternativa en la terapia contra micosis originadas por *Candida albicans*



1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Generalidades de los hongos.

Los hongos son organismos ampliamente distribuidos (ubicuos). Existen alrededor de 200 especies patógenas, de las cuales unas 60 se asocian de forma consistente a infecciones humanas. No dependen de la luz y pueden crecer en cualquier dirección, incluso dentro del substrato (epitelio).

Se encuentran en gran cantidad de hábitats, la mayoría terrestre, característica importante porque con frecuencia intervienen en la mineralización del carbono orgánico.

Son avasculares, eucariotas, unicelulares (levaduras) y multicelulares (micelios o filamentos). Son heterótrofos, lo que implica que requieren de material orgánico preformado y carecen de clorofila, en contraposición con los organismos autótrofos, que sintetizan los nutrientes por fotosíntesis. Digieren la materia orgánica antes de ingerirla y la almacenan en forma de glucógeno con la ayuda de exoenzimas.⁴⁰

La unidad fundamental anatómica y de crecimiento en los hongos lo constituye la hifa, cuya estructura es cilindroide; septada o aseptada (cenocítica), uni o



multinucleada, y presenta diferentes tamaños y formas, como se muestra en la figura número 2. ²

Una masa de hifas integra el micelio, la forma filamentososa, con ramificaciones laterales y crecimiento apical; las masas de micelios conforman colonias. Los micelios vegetativos crecen en o sobre el medio (substrato) y absorben los nutrientes; las hifas aéreas forman la porción más visible de la colonia; los micelios fértiles o reproductivos desarrollan conidias o esporas. Su ciclo de vida inicia con la germinación de dichas esporas u otras estructuras, prosigue con el crecimiento en un substrato y aumento de biomasa, y termina con la esporulación y la diseminación a partir del micelio inicial.

La forma vegetativa predominantemente unicelular que exhiben diversos hongos se denomina levadura (de estructura oval o cilíndrica). Los hongos que presentan fases levaduriforme y micelial (la primera a temperatura corporal y la segunda en el ambiente) son llamados hongos dimórficos.²²

No tienen motilidad, con excepción de algunas especies y de formas ameboideas que se presentan en fase vegetativa. La pared celular, rígida, contiene una gran cantidad de quitina (el equivalente en las plantas es la celulosa); difiere de las células de mamíferos por la presencia de ergosterol, en lugar de colesterol.

El crecimiento de los hongos involucra habitualmente dos fases, vegetativa y reproductiva. En la fase vegetativa las células son haploides y se dividen por



mitosis, en tanto que en la fase reproductiva se reproducen por medio de esporas, cuya producción puede ser de manera sexual (meiosis) o asexual (mitosis), dependiendo de la especie y las condiciones. Las esporas pueden permanecer en reposo por largos períodos de tiempo, a veces años.⁸

De acuerdo a sus necesidades nutricionales, los hongos pueden ser saprofitos, mutualistas o parásitos.

Los hongos producen metabolitos muy útiles en los procesos de fermentación comercial y en la industria de alimentos: panadería, cervecería y quesería; en la producción de antibióticos (penicilinas, cefalosporinas), inmunodepresores (ciclosporina), hormonas y esteroides; ácidos orgánicos (ácido láctico y el ácido cítrico empleado en la elaboración de un refresco de gran consumo); enzimas (celulasa, catalasa, amilasa, renina). *Saccharomyces cerevisiae* es una levadura valiosa no únicamente por su valor comercial sino como sistema modelo en estudios de genética eucariota.

Los hongos tienen un papel esencial en la descomposición de la celulosa, con la producción de bióxido de carbono y agua; por otra parte, representan pérdidas económicas al degradar papel, telas, cuero, hidrocarburos y otros productos; el aspecto útil es su responsabilidad en el reciclaje de la madera en los bosques y su empleo en la limpieza de suelos contaminados por materiales tóxicos. Degradan casi todo, con excepción de algunos plásticos y pesticidas.⁴⁰



Los hongos mutualistas o simbiotes tienen relaciones beneficiosas con otros organismos. Ejemplos de esto son los líquenes, asociaciones de hongos con algas o cianobacterias y las micorrizas, asociaciones de hongos y raíces de plantas. También presentan relaciones simbióticas con insectos, como las hormigas y termitas.

Un elevado número de hongos es causa de graves pérdidas económicas en la producción agrícola y ganadera, debido a las enfermedades que causan a animales y plantas (un gran porcentaje de cosechas y granos almacenados se pierde).²²



HIFA

LEVADURA

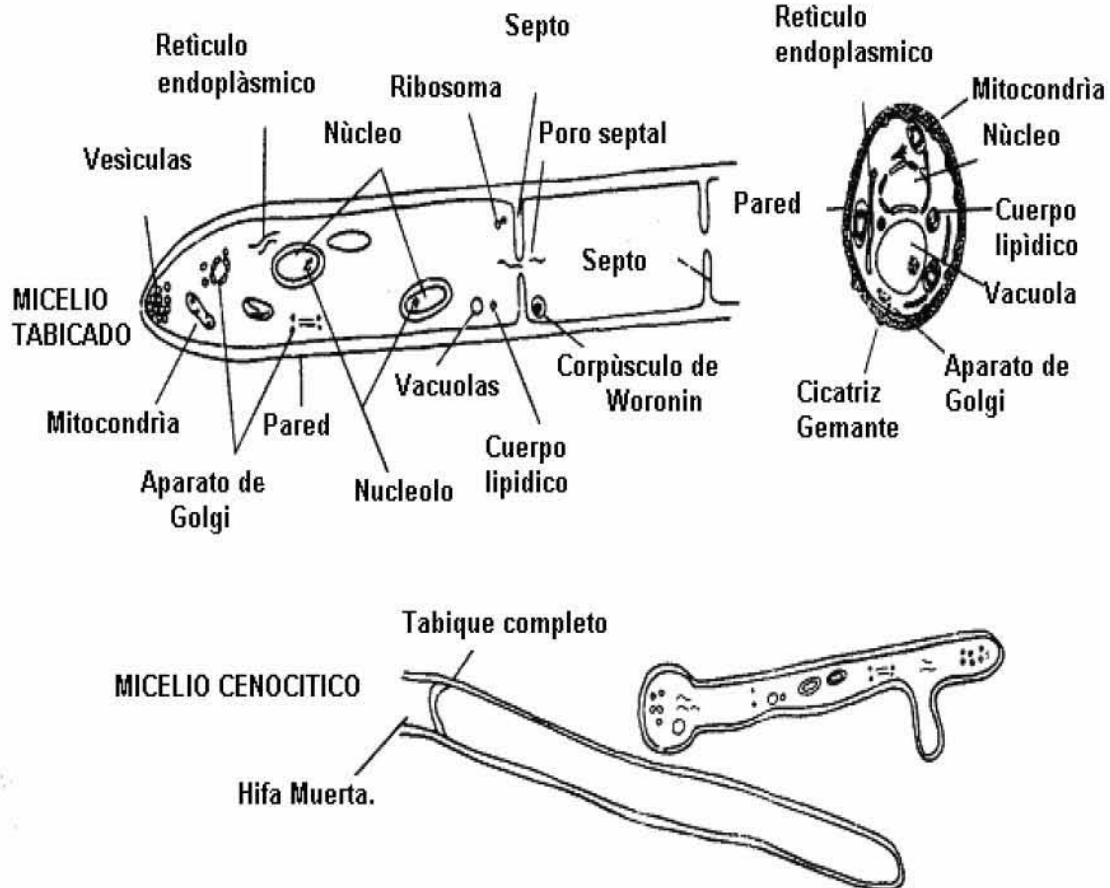


Figura #1. Estructura general de una célula micotica tanto en su forma vegetativa como de reproducción. ²



1.2 Tipos de micosis.

Las enfermedades de origen fúngico se denominan micosis (superficiales, cutáneas, subcutáneas, sistémicas, oportunistas) algunos de estos ejemplos se muestran en la tabla #1. Los hongos también son clasificados de acuerdo al tipo de reproducción que tienen (sexual o asexual) como se muestra en la tabla #2. La hipersensibilidad a hongos también es causa de padecimientos no necesariamente asociados a una infección.⁴⁰

| CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LAS MICOSIS | | |
|--|---|--|
| Tipos | Enfermedad | Hongo (Género) |
| Superficial: Cabello y capas externas de piel | Pitiriasis versicolor Tiña negra. Pitiriasis versicolor. | <i>Malassezia</i> <i>Exophiala</i> <i>Malassezia</i> <i>furfur</i> |
| Cutáneo: Epidermis profunda y superficies queratinizadas | Dermatofitosis Candidiasis cutánea y candidiasis bucal (algodoncillo) membrana de | <i>Trichophyton</i> <i>Microsporum</i> <i>Epidermophyton</i> <i>Candida</i> <i>albicans.</i> |



| | | |
|---|--|---|
| | mucosas. | |
| Subcutáneo: Dermis, tejido subcutáneo y músculo | Eumicetoma Esporotricosis Cromoblastomicosis | <i>Madurella</i> <i>Sporothrix</i> <i>Fonsecaea</i> |
| Sistémico: Diseminado a diferentes órganos | Histoplasmosis Paracoccidioidomicosis Coccidioidomicosis | <i>Histoplasma</i> <i>Paracoccidioides</i> <i>Coccidioides</i> |
| Oportunista: Diversos órganos | Candidosis Criptococosis Zigomicosis Aspergillosis | <i>Candida</i> <i>Cryptococcus</i> <i>Rhizopus</i> <i>Aspergillus</i> <i>fumigatus</i> y otras especies de <i>Aspergillus</i> . |

Tabla #1. Clasificación de las micosis de acuerdo al grado de daño que causan. ⁴



| | |
|----------------------------|---|
| Ascomycotina | Su reproducción sexual se lleva a cabo en sacos llamados ascas, que producen ascosporas |
| Basidiomycotina | Su reproducción sexual se lleva a cabo en un saco llamado basidio, con la producción de basidiosporas |
| Hongos Mitospóricos | Llamados también deuteromicetos u hongos imperfectos. No se ha observado en ellos reproducción sexual. Incluye a la mayoría de hongos patógenos para el humano. |
| Zigomycotina | Tienen reproducción sexual por medio de gametos; la asexual da lugar a zigosporas. |

Tabla #2. Clasificación de los hongos de importancia medica de acuerdo a su tipo de reproducción.¹⁹

1.3 Importancia de los hongos en la sociedad.

Desde los albores de la humanidad el hombre ha estado relacionado con los hongos, beneficiándose de ellos en algunos casos, en otros siendo afectado ya sea



directa o indirectamente por los daños que provocan en animales, plantas o bien en alimentos almacenados.⁵

Estando esto estrechamente vinculado a cambios producidos en la práctica médica como son: uso de fármacos que producen inmunosupresión (quimioterapia contra el cáncer, tratamiento con esteroides y tratamiento con inmunosupresores en pacientes con transplantes de órganos), uso frecuente y a veces indiscriminado de antibióticos de amplio espectro que elimina la flora normal y el uso de catéteres intravenosos.⁴⁵

Por lo que el aumento de la frecuencia y la gravedad de las micosis sistémicas en pacientes con alteraciones inmunológicas y la aparición de diferentes formas de presentaciones clínicas de las micosis clásicas y de nuevas infecciones fúngicas, ha sido una tendencia clara en las últimas décadas en el siglo XX. Este papel cada vez más importante de los hongos en la patología humana, ha supuesto un incremento en el empleo de los antifúngicos sistémicos y ha ejercido una importante presión sobre la necesaria investigación para la obtención y desarrollo de nuevas moléculas. Aún más si tenemos en cuenta que el tratamiento de las infecciones graves invasoras está limitado el uso de la Anfotericina B en sus distintas formulaciones comercializadas o en evaluación clínica o como alternativas en determinadas micosis, fluconazol, itraconazol, o 5-fluorocitosina. Sin embargo, las tasas de fracaso en determinadas patologías son superiores al



50%, hecho en el que inciden diversos factores importantes como las enfermedades subyacentes a las micosis que padecen los pacientes.¹²

Además, a estos cambios se une la aparición de enfermedades infecciosas que provocan inmunosupresión crónica como el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Todo lo anterior ha hecho que los hongos, sean considerados en la actualidad, patógenos de importancia.

Dentro de las micosis, las producidas por levaduras del género *Candida* son las de más frecuente presentación contando con un gran número de formas clínicas dividiéndose en sistémicas y superficiales.

Tanto las candidiasis sistémicas como las superficiales tienen una gran importancia. Las primeras por involucrar varios órganos de diferentes sistemas, poniendo en riesgo la vida del paciente; mientras que las segundas por la gran cantidad de consultas médicas que genera.⁴²

2. Candida albicans.

2.1 Generalidades.

Candida albicans es un hongo levaduriforme saprofita, se parte de la flora normal microbiana endógena normal y se cree que las infecciones son de origen endógeno.



Para su cultivo se utiliza principalmente agar dextrosa sabouraud, esta crece en un tiempo promedio de 48 a 72 horas a 25°C y hasta en 24 horas a 37°C, dando colonias limitadas, planas, cremosas, opacas, generalmente lisas, aunque algunas veces se presentan rugosas, de color blanco o blanco amarillento observese en la figura #1.¹⁵

Todas las especies de *Candida* se reproducen por blastosporas, dependiendo de cada una de ellas fluctúan entre 2 a 10µm de diámetro, formando gemas de la mitad de su tamaño; En ocasiones se puede observar pseudomicelio, sobre todo cuando provienen de medios muy pobres o viejos. Se tiñen bien con azul de algodón, PAS y Wrigth; aunque no se rigen por el Gram, generalmente son positivas, llegando a cambiar cuando las colonias envejecen.²³

Al igual que las bacterias, su tipificación se hace basándose en pruebas fisiológicas y morfológicas como se muestra en la figura #3.⁸



Figura #2. Crecimiento típico de *Candida albicans* en medio selectivo de Agar Saburoaud.

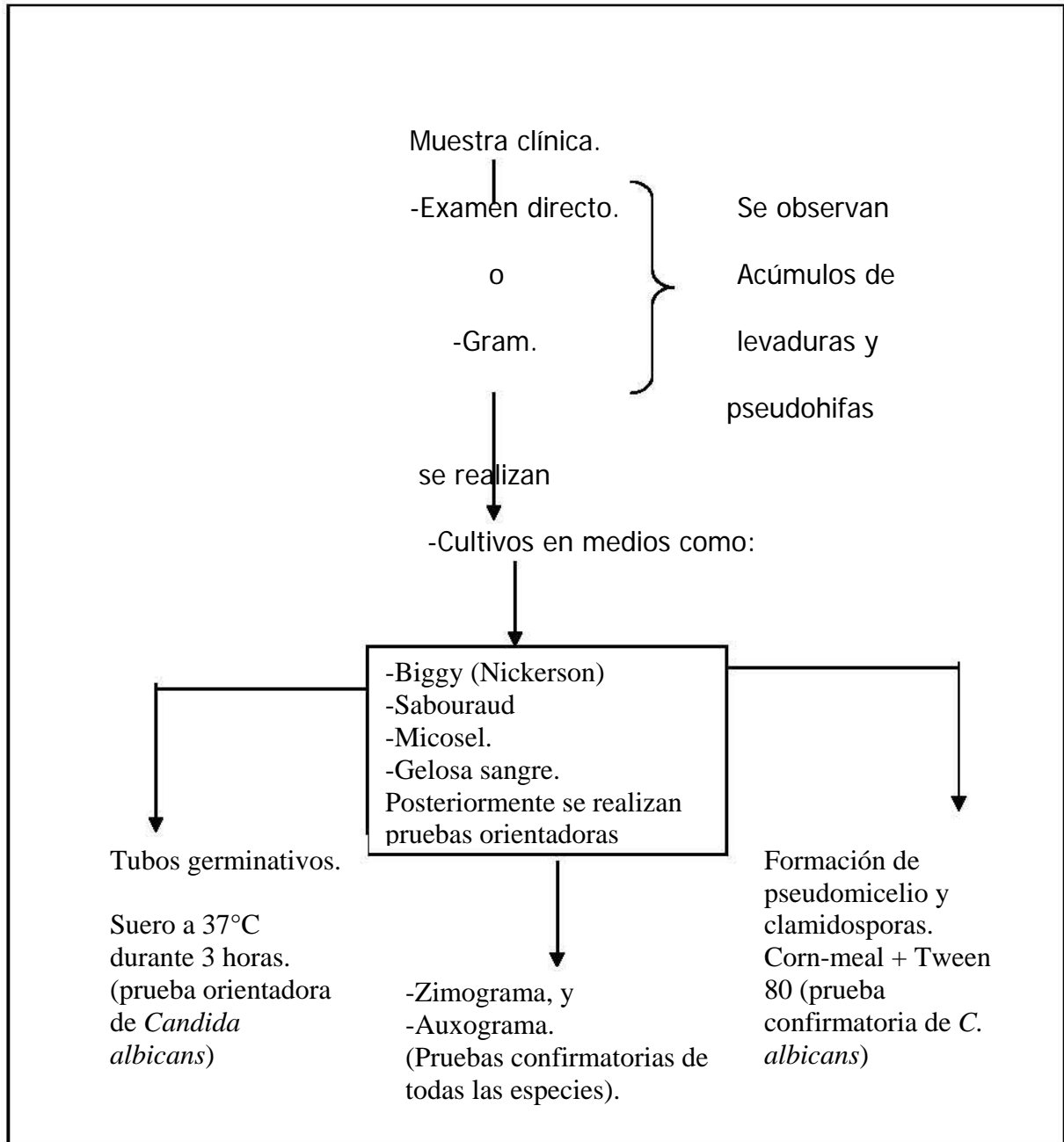


Figura #3. Secuencia general a seguir para la identificación del género *Candida*.⁸



La prueba del tubo germinativo. Es el método más aceptado y económico en el laboratorio clínico para la identificación de levaduras. Proporciona una identificación definitiva de este microorganismo en 3 horas.⁶

Los tubos germinales parecen extensiones de las células levaduriformes, similares a hifas, producidas por lo general por un estrechamiento en el punto del origen de la célula, como se muestra en la figura #4.⁴

2.2 Pruebas bioquímicas.

Se basan en la fermentación (zimograma) y utilización (auxonograma) de carbohidratos. Existe un perfil bioquímico que identifica a cada una de las especies de *Candida*.⁸

Las especies de *C. albicans* causan las infecciones micóticas oportunistas encontradas con más frecuencia. Las infecciones por *Cándida* son causadas por varias especies, aunque *Candida albicans* es el agente etiológico más común. Las infecciones por este patógeno se denominan candidiasis.¹⁹

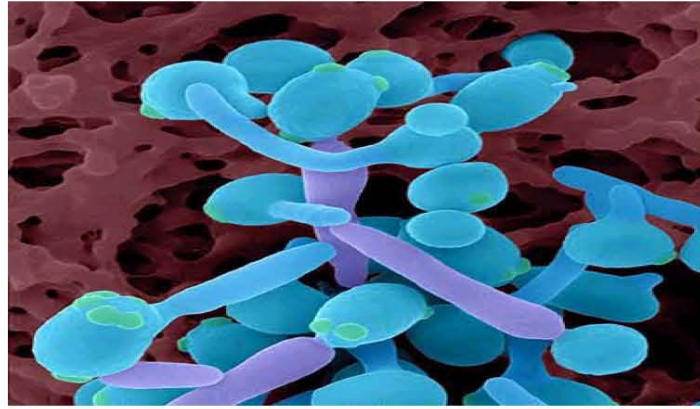


Figura #4. Tubo germinativo de *Candida albicans* observado a través de microscopio óptico.¹⁸

2.3 Candidiasis.

Es una micosis causada por diversas especies de levaduras oportunistas del género *Candida* (ver anexo 1), como ya se menciona en mayor proporción *Candida albicans*. Presenta una variedad de cuadros clínicos, afecta principalmente mucosas (boca, vagina, etc), piel, uñas y de manera excepcional otros órganos como pulmones, intestinas, etc.⁵¹

A través del tiempo ha sido nombrada de diferente manera ya sea por su localización o por su ubicación geográfica así algunas de sus diferentes sinonimias son las siguientes: moniliasis, muguet, algodoncillo, blastomicosis.¹¹



2.3.1 Antecedentes históricos.

La candidiasis es una de las enfermedades micóticas que se conocen desde la antigüedad, Hipócrates en su obra "Epidemics", describe que en niños recién nacidos y pacientes debilitados se presentan placas blanquecinas en la boca, a lo que denominó "estomatitis aftosa". En Francia fueron descritas diversas variedades clínicas por Veron y Berg en 1835, y no es sino hasta 1844 Bennet y 1853 Robin, quienes aíslan el hongo y proponen de nueva cuenta que la enfermedad es propia de pacientes debilitados.⁸

2.3.2 Edad y sexo.

La candidiasis se presenta en todas las edades, es común en lactantes, esto se origina por infección de las mucosas a nivel de canal de parto, sobre todo cuando la madre cursó con candidiasis en el último tercio del embarazo; En los adultos se presenta entre la 3^a y 4^a década, aunque en ancianos también es frecuente, esto más bien está relacionado con procesos o enfermedades concomitantes.³⁷

La candidiasis puede afectar a ambos sexos por igual, únicamente los casos de genitales son más frecuentes en la mujer por las condiciones anatómicas propias de la vagina.³⁴



2.3.3 Patógenia.

Los tres efectos patogénicos de los hongos que le dan importancia médica son: micotoxicosis, enfermedades de hipersensibilidad y la colonización de los tejidos. Refieren esta última como la forma principal por la cual las levaduras del género *Candida* provocan su acción patógena en el hombre y los animales.²⁹

La adherencia de *C. albicans* es el primer paso en la invasión y colonización de los tejidos mucocutáneos, la cual es probablemente mediada por la interacción de las glucoproteínas de superficie de la levadura con la célula epitelial del hospedero. Luego se produce la aparición de tubos germinativos, micelio o pseudomicelio (según la especie), los cuales penetran directamente en la célula epitelial. La adherencia continúa con la producción de enzimas hidrolíticas como proteinasas, fosfatasas, y fosfolipasas. Una vez dentro de la célula epitelial los hongos proliferan. Generalmente las especies de *Candida* que no se adhieren no son patógenas.²⁰

2.3.4 Factores predisponentes.

La presencia de *Candida albicans* en determinados procesos infecciosos, está dada por la existencia de ciertos factores predisponentes. En este sentido se exponen los siguientes factores:



-
- * Daño en la integridad de la piel por maceración de sus tejidos, heridas, abrasión por quemaduras térmicas o químicas y por presencia de catéteres vasculares.
 - * Desbalance nutricional u hormonal provocado por diabetes, anticonceptivos orales, embarazo, malnutrición y uremia.
 - * Disminución del número de células fagocitarias como resultado de leucemia, granulomatosis, aplicación de radiaciones o quimioterapia contra el cáncer.
 - * Defectos intrínsecos en las funciones de las células fagocitarias como resultado de enfermedades granulomatosas crónicas y deficiencia de mieloperoxidasa.
 - * Alteración de la función fagocitaria causada por uremia, enfermedades virales y el uso de corticoides y agentes antimicrobianos como aminoglucósidos y sulfamidas. ²⁴

2.3.5 Formas clínicas

Siendo una de las infecciones más frecuentes y polimórficas que atacan al hombre, su nivel de profundidad o sistematización no depende tanto del factor etiológico en sí, sino del factor predisponente con el que se asocie. Las variedades clínicas son las siguientes. ²⁷



2.3.5.1 Candidiasis genital.

Es la infección más frecuente y molesta que afecta el aparato genital de la mujer, se presenta normalmente en la edad reproductiva, aunque es posible verla en niñas recién nacidas, esto es atribuible a los altos niveles hormonales heredados de la madre y a la colonización de las mucosas durante el parto. También se halla con frecuencia en mujeres diabéticas por aumento de la glucosa en los tejidos y en los pacientes con tratamientos prolongados con antibióticos como la tetraciclina y los aminoglucocidos que eliminan las bacterias normales de la vagina. La balanopostitis o balanitis es una lesión en el pene y en el surco balanoprepucial con eritema y placas blanquecinas. Se ve en hombres cuya pareja es portadora de una vulvovaginitis por *Candida* y en diabéticos. El cuadro clínico se caracteriza por una leucorrea blanca, espumosa, grumosa, de aspecto viscoso muy pruriginoso que recubre la pared de la vagina y el endocervix; la mucosa de la zona se encuentra eritematosa, un ejemplo de esta se muestra en la figura #6.²⁴

2.3.5.2 Candidiasis oral.

También conocida como algodoncillo, muguet o sapillo. Se caracteriza por la presencia de placas pseudomembranosas blanquecinas cremosas que pueden recubrir la lengua, mucosa oral y en ocasiones afecta la comisura labial. Se ve con frecuencia en recién nacidos de madres con infecciones vaginales que se infectan



al paso por el canal del parto, en pacientes en estadio terminal de enfermedades caquetizantes, tales como los carcinomas y en ancianos que padecen de enfermedades debilitantes.

La esofagitis por lo general proviene de la candidiasis oral. Se observan lesiones semejantes a las orales, como se muestra en la figura #5.¹³

2.3.5.3 Intertrigo.

Se produce en los pliegues de inflexión de la piel de dos superficies que se rozan donde se acumula la humedad (sudor) y aumenta la maceración. La localización más frecuente son los pliegues axilares, submamarios, inguinales, intergluteos, perianales e interdigitales de las manos y pies. Los pacientes más afectados son obesos y diabéticos. Las lesiones se caracterizan por formar placas erimatoescamosa con bordes bien definidos, son húmedas y en ocasiones aparecen escamas o costras. Los síntomas son prurito y ardor. Las candidiasis por rozadura del pañal son semejantes a las por intertrigo.³⁹

2.3.5.4 Onicomocis por Candida.

La lesión en la uña y en el reborde de la misma (paroniquia). La uña incrementa de grosor, sé opaca y oscurece y a veces aparecen estrías. En el reborde de la uña hay inflamación, edema, dolor y puede producirse expulsión de pus. Aparecen en personas que mantiene con frecuencia sus manos húmedas por largos períodos.⁴⁴



2.3.5.5 Granulomas.

Se presentan en cualquier parte de la piel, dando lugar a lesiones verrugosas, vegetantes que pueden ulcerarse. Es una forma clínica rara. Se ve en niños inmunosuprimidos o en adultos con diabetes descompensada.⁴⁵

2.3.5.6 Candidiasis mucocutánea crónica.

Es casi exclusiva de niños con defectos genéticos o en la función del Timo que los llevan a alteraciones en la inmunidad celular. Las lesiones abarcan todo el cuerpo y las mucosas y en la piel son granulomatosas. Es muy difícil de curar y gran parte de estos pacientes no llegan a edad adulta, ya que se produce invasión a todos los órganos de la economía.⁴⁶

2.3.5.7 Candidiasis urinaria.

Es observada en pacientes diabéticos, con catéteres y trastornos con los corticoides. Puede afectar el riñón, dando manifestaciones de pielonefritis, o localizarse en la vejiga y en la uretra produciendo poloquiuria, dolor vesícula y manifestaciones de uretritis.⁸



2.3.5.8 *Candidiasis sistémica profunda.*

Son menos frecuentes, se asocian a factores predisponentes severos. Tiene mala respuesta al tratamiento y para que se produzca tiene que haber, por lo general, invasión sanguínea. Entre estas tenemos la candidiasis broncopulmonar, la endocarditis, la meningoencefalitis.

La septicemia ocurre en pacientes con inmunosupresión severa de la inmunidad humoral y celular. Un ejemplo de lo anterior es el SIDA, donde se pueden presentarse todas las formas descritas de las candidiasis, aunque las más frecuentes son: la oral esofágica, cutánea y genital. ⁴⁸



Figura #5. Candidiasis oral también conocida como algodoncillo. izq. Caso invasivo en sus primeras etapas que se encuentra afectando únicamente el área de la lengua. der. Caso severo de Candidiasis oral que se encuentra afectando paladar lengua y parte de la garganta.¹⁸

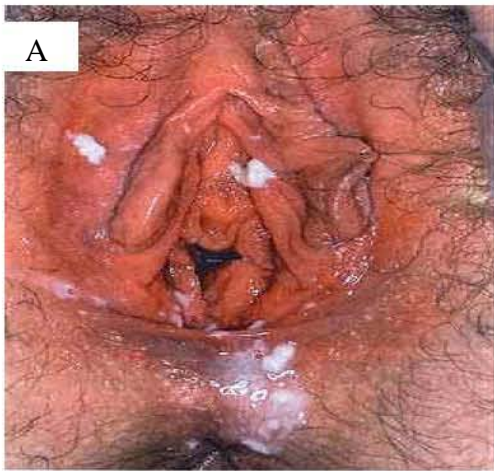


Figura #6. Candidiasis genital. A) La forma más común de candida es la vaginal caso invasivo aún sin destrucción de mucosas. B) Candidiasis infantil también conocida como enfermedad del pañal C) Candidiasis a nivel peniano la cual esta en aumento en las ultimas fechas.¹⁸



3. Tratamiento de las Candidiasis invasivas.

De forma general la anfotericina B y los azoles han jugado un rol protagónico en el tratamiento de las candidiasis sistémicas. En la selección de una u otra alternativa terapéutica tiene un peso determinante la actividad de la anfotericina B frente a especies *no-albicans* de *Candida* (*Candida kruzei*) y la menor toxicidad y más fácil administración de los azoles. Flucitocina tiene actividad frente a varias especies de *Candida* pero no es frecuentemente usada.³⁹

3.1 Tratamiento en las candidiasis mucocutáneas.

El tratamiento de las candidiasis mucocutáneas es dominado por los antifúngicos de la familia de los azoles. Estas drogas se pueden usar por vía tópica o sistémica y son fármacos de probada seguridad y eficacia. Un problema significativo de las enfermedades mucosales es la tendencia relativamente pequeña de los pacientes que la padecen de sufrir recidivas. En algunos casos las recidivas están obviamente explicadas (Ej. en candidiasis orofaríngeas en pacientes con infección avanzada y no controlada de VIH) pero en otros la causa es una incógnita (Ej. Candidiasis vaginal en mujeres sanas).⁹

4. Prevención de las candidiasis invasivas.

La estrategia de profilaxis es útil en los casos donde los factores predisponentes están bien definidos en un grupo específico de pacientes los antimicóticos son



variados como se ve en la figura #7. En grupos de pacientes que están bajo terapia que produce prolongada neutropenia (Ej., en receptores de trasplantes de médula ósea) hay suficiente predisposición para justificar una terapia profiláctica para candidiasis invasivas.⁴⁷

5. Principales clases de antifúngicos.

La terapia contra los hongos ha estado presente desde que se tiene conciencia de las micosis, algunos tratamientos han perdurado a través del tiempo, por su efectividad, escasos efectos colaterales y bajo costo, tal es el caso de la solución yodada y el ungüento de Withfield para las tiñas o el yoduro de potasio en la esporotricosis.

Con el envenenamiento de la griseofulvina (1938), como primer antimicótico oral, se desencadenó la búsqueda de nuevos productos propios del metabolismo antagonico de hongos y actinomicetos. Así se obtuvo a finales de los 50's la nistatina y la anfotericina B.¹³

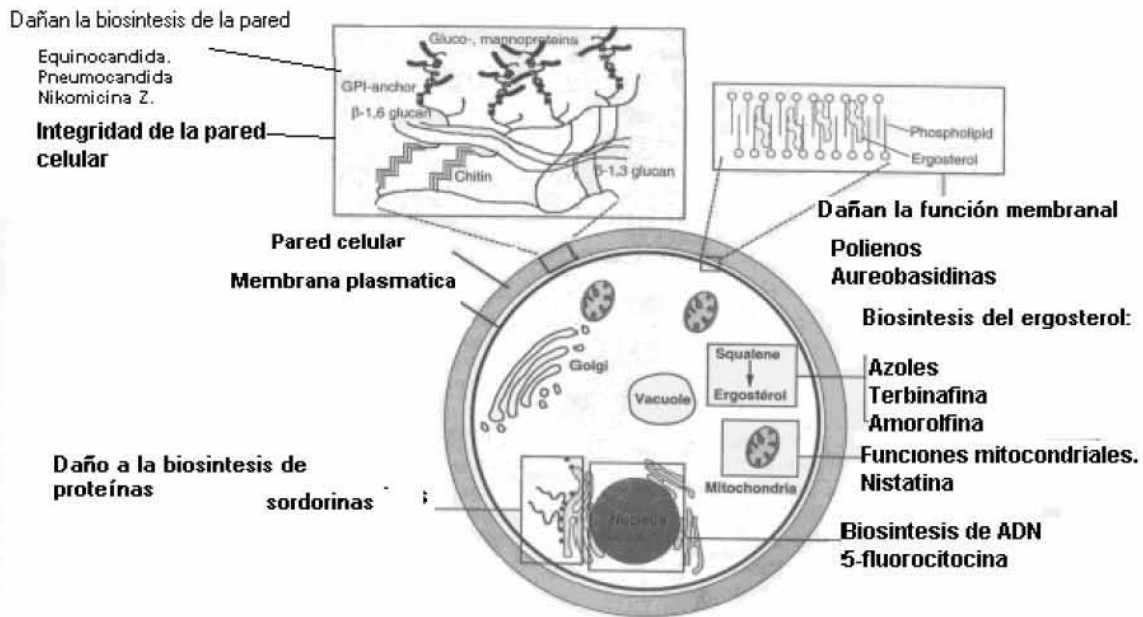


Figura #7. Principales sitios de acción dentro de la célula mitótica de los diferentes grupos de antifúngicos.¹³

5.1 Anfotericina B.

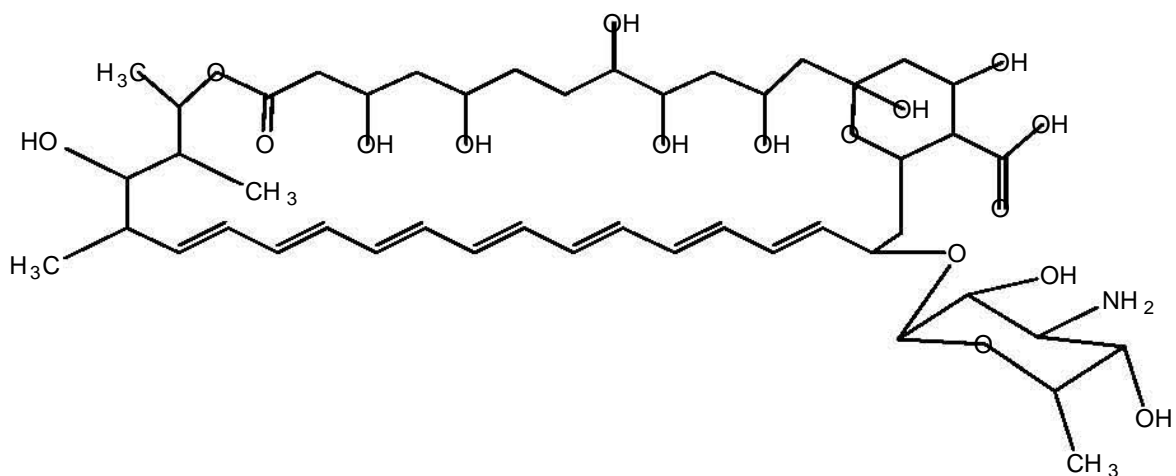


Figura #8. Estructura química de Anfotericina B.¹⁶



5.1.1 Historia y fuentes.

En 1956, Gold y colaboradores descubrieron la anfotericina B al estudiar una cepa de *Streptomyces nodosus*, un actinomiceto aerobio obtenido del valle del Río Orinoco en Venezuela.²¹

5.1.2 Propiedades químicas.

La anfotericina B es miembro de una familia de casi 200 antibióticos macrólidos poliénicos. Los fármacos estudiados hasta la fecha comparten la característica de poseer cuatro a siete dobles ligaduras conjugadas; un éster cíclico interno; poca hidrosolubilidad; toxicidad notable con la administración parenteral, y un mecanismo común de acción antimicótica. La anfotericina B es un macrólido hepténico que contiene siete dobles ligaduras conjugadas en la posición trans y es 3-amino-3,6-dideoximanosa (micosamina) unida al anillo principal por un enlace glucosídico. El comportamiento anfotérico, del cuál ha tomado su nombre este fármaco, depende de la presencia de un grupo carboxilo en el anillo principal y otro amino primario en el de micosamina; uno y otros grupos confieren hidrosolubilidad en extremos de pH. Por medio de cristalografía de rayos X, se ha mostrado que la molécula es rígida, cilíndrica y los grupos hidroxilo hidrófilos del anillo de macrólido forman una "cara" contraria a la porción poliénica lipófila.¹



5.1.3 Mecanismo de acción.

La actividad antimicótica de la anfotericina B depende cuando menos en parte de su unión a la fracción esteroles y, en particular, al ergosterol que está en la membrana de los hongos sensibles. Por su interacción con los esteroides de las membranas en los microorganismos, los polienos forma poros o conductos. El resultado es un incremento en la permeabilidad de la membrana que permita la salida de diversas partículas pequeñas. Otros mecanismos de acción podrían incluir una lesión oxidativa a los hongos, cuando menos *in vitro* y esto se ve representado en la figura #9.¹⁶

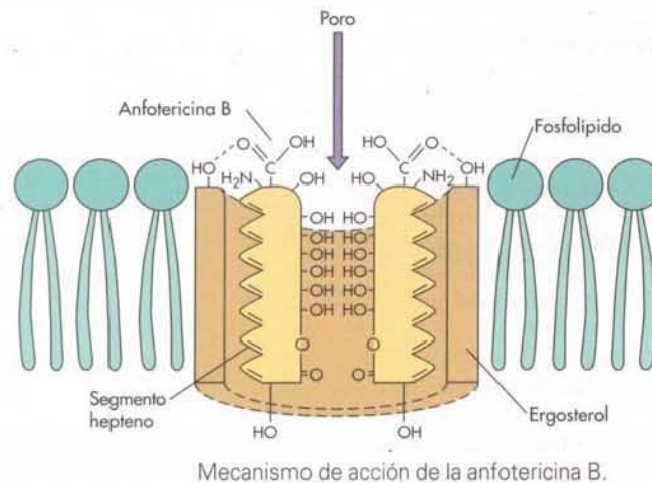


Figura #9. Representación esquemática de la anfotericina B.¹⁶



5.1.4 Absorción, distribución y excreción.

Es insignificante la absorción de las presentaciones de la anfotericina B en vías gastrointestinales. La anfotericina B que persiste en el plasma está ligada en más del 90% a las proteínas, en particular, μ lipoproteína. En promedio, 2 a 5% de cada dosis aparece en la orina si el individuo recibe diariamente el fármaco. La eliminación del medicamento no cambia en individuos anéfricos ni en pacientes sometidos a hemodiálisis. Las enfermedades de hígado o vías biliares no ejercen efecto conocido alguno del metabolismo de la anfotericina en seres humanos. Por lo menos 33% de una dosis inyectada se recupera sin modificaciones, por extracción metanólica. De tejidos como en la autopsia; las concentraciones mayores se identifican en hígado y bazo, y hay cantidades menores en riñones y pulmones. Las cifras de anfotericina B-desoxicolato en líquidos inflamatorios de pleura, peritoneo, membrana sinovial y en humor acuoso en promedio constituyen el 66% de las concentraciones mínimas en plasma. Poca anfotericina B penetra en líquido cefalorraquídeo, en humor vítreo y en líquido amniótico normal. Por su unión extensa en los tejidos, se advierte una fase terminal de eliminación con una vida media aproximada a 15 días.²¹

5.1.5 Aplicaciones terapéuticas.

Las dosis terapéuticas usual de anfotericina B es de 0.5 a 0.6 mg/Kg. de peso que se administra en solución glucosada al 5%, en un lapso de 4 h. La esofagitis por



Candida en adultos mejora con 0.15 a 0.2 mg/kg/día. La mucormicosis de evolución rápida o las aspergilosis invasoras son tratadas de 1.0 a 1.2 mg/kg al día, hasta detener su evolución.

En sujetos con meningitis por coccidioides, se necesita el goteo intrarraquídeo del fármaco; se inyecta en el LCR de la columna lumbar, en la cisterna bulbocerebelosa o magna o en el ventrículo cerebral lateral. Sea cuál sea el sitio de inyección, el tratamiento se inicia con dosis de 0.05 a 0.1 mg con incrementos de tres veces por semana hasta llegar a 0.5mg, según lo permita la tolerancia. Después de ello, la terapéutica se continúa siguiendo un plan de dos veces por semana.¹⁶

El tratamiento más conveniente de mucormicosis, aspergilosis invasora, esporotricosis intracutánea, criptococosis, fusariosis, alternariosis, tricosporonosis y peniciliosis marneffeii es la administración intravenosa de la anfotericina B. A pesar de que los imidazoles y los triazoles son útiles en muchos sujetos con blastomicosis, histoplasmosis, coccidioidomicosis y paracoccidioidomicosis, se prefiere la anfotericina B cuando dichas micosis muestran evolución rápida, cuando se manifiestan en el huésped inmunodeprimido o cuando afectan al sistema nervioso central. La anfotericina B es eficaz también en algunos pacientes con neutropenia intensa y fiebre que no involuciona con antibacterianos de amplio espectro; aplicada una vez por semana, se utiliza para evitar la recaída en individuos con SIDA que han sido tratados satisfactoriamente por criptococosis o histoplasmosis.⁴⁴



En la cistitis por *Candida*, es eficaz el lavado vesical con anfotericina B a dosis de 50µg/ml de agua estéril. La recaída es frecuente si la sonda se deja en la vejiga o hay bastante orina residual después de la micción. La inhalación de la anfotericina B no ha producido buenos resultados en el tratamiento de las micosis pulmonares ni ha sido útil la instalación intranasal para evitar la aspergilosis en individuos neutropénicos. La anfotericina B local es eficaz sólo en la candidiasis cutánea.

La anfotericina B sigue siendo el antifúngico de referencia en el tratamiento, de las infecciones sistémicas graves y también el patrón con el que establecer comparaciones con los nuevos antifúngicos.¹²

5.1.6 Efectos adversos.

La principal reacción aguda a la anfotericina B intravenosa comprende fiebre y escalofríos. A veces se observan hipernea y estridor respiratorio o hipotensión leve, pero rara vez ocurren broncospasmo o anafilaxia reales. El individuo con cardiopatías o neumopatías persistentes pueden tolerar el mayor metabolismo de la reacción deficiente y presentar hipoxia o hipotensión. En pacientes se debe considerar una dosis de prueba de 1mg; es necesario observar al sujeto durante 2 horas antes de administrar la dosis terapéutica habitual. La reacción cesa de manera espontánea en término de 30 a 45 minutos, pero la piperidina puede acortarla. La administración previa de acetaminofén oral o el empleo de hemisuccinato de hidrocortisona por vías intravenosa a razón de 0.7 mg/kg, al comenzar la venoclisis, reduce las respuestas. Las reacciones febriles desaparecen



con nuevas venoclisis. Lactantes, niños y pacientes que reciben dosis terapéuticas de corticosteroides muestran menor propensión a sufrirlas.¹⁶

En 80% de individuos que reciben anfotericina B por micosis profunda, se advierte hiperazoemia. La toxicidad depende de la dosis y es transitoria y aumenta por la administración concomitante de otros medicamentos nefrotóxicos como aminoglucósidos o ciclosporina. Incluso durante ciclos breves se observa daño histológico permanente en los túbulos renales, pero son frecuentes los déficit funcionales en individuos cuya función renal era normal antes del tratamiento, salvo que la dosis total rebase los 3 a 4 g (en un adulto). También se observa acidosis tubular renal, y pérdida renal de potasio y magnesio durante el tratamiento, durante varias semanas después. Se necesita potasio complementario en un 33% de los individuos que reciben anfotericina por tiempo prolongado.

En personas y animales de experimentación, la "saturación inicial" con cloruro de sodio ha disminuido la nefrotoxicidad, incluso de privación hídrica o salina. La administración en 1L de solución salina por vía intravenosa, el mismo día que se administra anfotericina B, ha sido recomendada para adultos que toleran la carga de sodio y que no han recibido dicha cantidad en las soluciones intravenosas.¹⁰

La anemia hipocrómica normocítica es común; el hematocrito disminuyó en promedio a 27% en un estudio. El mecanismo probable es la menor producción de eritropoyetina. Las personas con disminución de esta hormona en plasma mejoran si se les administra eritropoyetina recombinante. La anemia muestra reacción lenta después del tratamiento. Entre los efectos adversos frecuentes están cefalea,



náusea, vómito, malestar general, pérdida ponderal y flebitis en sitios de venoclisis periférica se ha atribuido la encefalopatía a la anfotericina B. En raras ocasiones, surgen trombocitopenia o leucopenia leve. La hepatotoxicidad no se encuentra establecida con firmeza.²⁶

5.2 Ketoconazol.

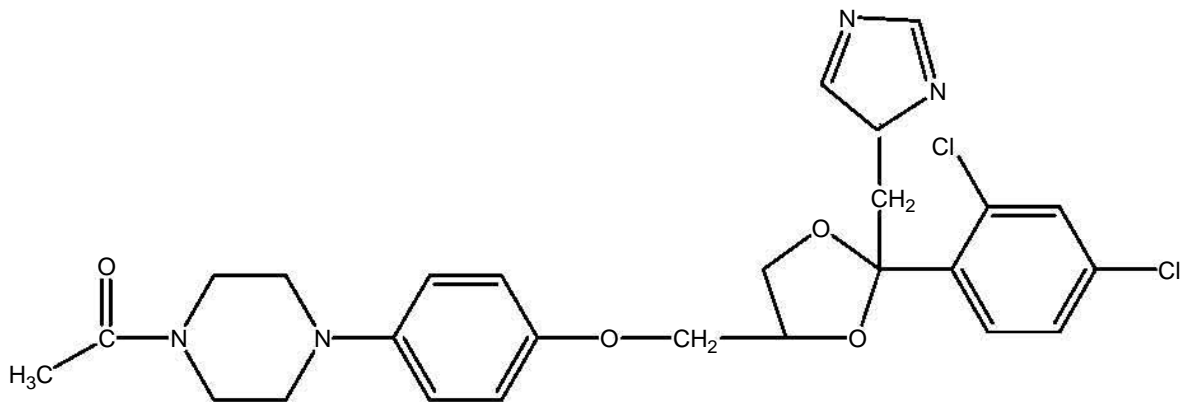


Figura #10. Estructura química del Ketoconazol.³⁶

5.2.1 Historia y fuentes.

Antifúngico sintético caracterizado por la presencia en su estructura de un anillo azólico de 5 átomos, unido a otros anillos aromáticos.

Descubierto a finales de 1960 pertenecen al grupo más grande de los antifúngicos.

Los antimicóticos azólicos incluyen dos clases generales que son los imidazoles y triazoles como se muestra en la tabla #3 . Ambos comparten el mismo espectro y mecanismo de acción contra los hongos.



Los triazoles sistémicos se metabolizan con mayor lentitud y tienen menor efecto en la síntesis de esteroides en el ser humano, que los imidazoles. Por esta razón los agentes que se estudian en este momento pertenecen al grupo de los triazoles.⁴³

| Imidazoles | Triazoles |
|-------------|-------------|
| Clotrimazol | |
| Miconazol | |
| Ketoconazol | Terconazol |
| Econazol | Itraconazol |
| Butoconazol | Fluconazol. |
| Oxiconazol | |
| Sulconazol | |

Tabla #3. Principales derivados azólicos que se encuentran disponibles en la terapia fúngica.¹⁶

El primero en utilizarse fue el ketoconazol, pero ha sido sustituido por el fluconazol, que posee una serie de ventajas relacionadas con su espectro de acción, su farmacocinética y su toxicidad. De forma general se puede decir que los derivados azólicos son considerados fármacos de segunda elección en el



tratamiento de las infecciones sistémicas producidas por diversos hongos, tras la anfotericina B.⁴³

5.2.2 Mecanismo de acción.

El principal efecto de los Azoles es la inhibición de la esterol 14- α desmetilasa del lanosterol en los hongos, un sistema de enzimas que depende de citocromo p450 microsomal. Este citocromo p450 en el cuál actúa los hongos es nombrado como CYP51A1, según la nomenclatura internacional. Al Cyp51A1 ahora también se le conoce como Erg11p, es el producto del gen Arg11 en el que se une el nitrógeno del imidazol o el anillo del triazol generan una atadura del hierro en el grupo hemo del citocromo p450 como sexto ligando. De ese modo estos fármacos entorpecen la biosíntesis de ergosterol en la membrana citoplásmica y permiten la acumulación de los 14- α -metilesteroles.¹⁶

Estos metilesteroles pueden alterar la disposición íntima (empacamiento) de las cadenas acil fosfolípidos y, con ello, alterar las funciones de algunos sistemas enzimáticos de la membrana como ATPasa y enzimas del sistema del transporte electrónico, y de este modo inhibir la proliferación de hongos.

Otro blanco de los antifúngicos azólicos fue descrita como la desaturación del esterol, una enzima del citocromo p450 implicada en la desaturación del ergosta-5,7-dienol, en el ergosterol.



Algunos azoles como el clotrimazol, incrementan directamente la permeabilidad de la membrana citoplasmática del hongo, pero las concentraciones necesarias para este fin quizá se obtengan solo con uso local.⁵⁰

5.2.3 Absorción distribución y excreción.

La absorción del ketoconazol oral varía con la persona. Se necesita un medio ácido para que se disuelva, por ello la biodisponibilidad disminuye de sobremanera en sujetos que ingieren bloqueadores de receptores H₂-histaminérgicos, como cimetidina, o inhibidores de la bomba de protones. La administración simultánea de antiácidos también altera la absorción. La ingestión de alimentos no ha tenido efecto importante sobre la concentración máxima del fármaco alcanzada en el plasma. Después de consumir dosis de 200, 400 y 800 mg, las concentraciones plasmáticas máximas del fármaco son 4, 8 y 20 mcg/ mL, aproximadamente. La vida media del producto aumenta con la dosis y puede llegar a 7 u 8 horas si ésta es de 800mg. El ketoconazol se metaboliza en forma extensa y los productos inactivos aparecen en las heces. Las concentraciones del medicamento activo en la orina son pequeñísimas. En sangre, 84% se liga a proteínas plasmáticas, en particular albúmina, 15% se une a eritrocitos y el 1% circula en forma libre. La hiperazoemia, hemodiálisis o diálisis peritoneal no cambian el metabolismo del



fármaco. La moderada disfunción hepática no ejerce efecto alguno de su concentración en sangre.¹⁶

El ketoconazol llega eficazmente a los queratinocitos; su cifra en LCR, en sujetos con meningitis micótica, es menor de 1% de la concentración total en plasma. La inducción de la actividad de enzimas microscópicas hepáticas por parte de la rifampicina, isoniazida y tal vez por la fenilhidantoína acelera la eliminación metabólica del ketoconazol y sus concentraciones pueden disminuir más de 50%. El fármaco aumenta las cifras plasmáticas de ciclosporina, midazolam, triazolam, indinavir y fenitoína por que son metabolizados por la enzima CYP3A4 del citocromo p450. También puede intensificarse el efecto anticoagulante de la warfarina.²¹

5.2.4 Aplicaciones terapéuticas.

El ketoconazol, es eficaz en blastomicosis, histoplasmosis, coccidioidomicosis, pseudoalergias, paracoccidioidomicosis, tiñas, tiña versicolor, candidiasis mucocutánea crónica, vulvovaginitis por *Candida* y candidiasis de boca y esófago. Su eficacia es escasa en sujetos inmunodeficientes y con meningitis. La dosis habitual en un adulto es de 400 mg orales, una vez al día. Los niños pueden recibir 3.3 a 6.6 mg/kg/día. El tratamiento dura 5 días en caso de vulvovaginitis por *Candida*, 2 semanas en esofagitis por *Candida*, y 6 a 12 meses en micosis profundas. La reacción lenta al fármaco ha hecho que el ketoconazol sea inadecuado para individuos con micosis graves o evolución rápida.¹⁶



5.2.5 Efectos adversos.

Los efectos adversos del ketoconazol que dependen de la dosis son náuseas, anorexia y vómito, observados en un 20% de los pacientes que reciben 400mg/día. La tolerancia mejora si se administra con alimentos, a la hora de acostarse o en fracciones. En 4% aproximadamente de individuos que reciben ketoconazol, surge una erupción alérgica y, en 2%, prurito sin erupción. También se ha señalado caída del cabello.²¹

El ketoconazol inhibe la biosíntesis de esteroides tanto en los enfermos como en los hongos al bloquear al citocromo p450. De este modo, a veces surgen algunas anomalías endocrinas. En promedio, 10% de las mujeres señala irregularidades menstruales. Un número variable de varones sufre ginecomastia y decremento de la libido y potencia sexual. A grandes dosis, se ha señalado azoospermia pero la esterilidad no ha sido permanente. La dosis de incluso 400mg, causan una disminución transitoria de las concentraciones plasmáticas de testosterona libre y C-17b estradiol; dosis similares también ocasionan a veces una reducción transitoria de la respuesta del cortisol plasmático estimulada por ACTH y suprimen la producción de andrógeno en mujeres con síndrome de ovario poliquístico. Se han utilizado dosis de 800 a 1200mg de ketoconazol para suprimir los valores de cortisol plasmático en sujetos con enfermedad de Cushing. Se han señalado hipertensión y retención hídrica y se acompañan de mayores concentraciones de desoxicorticosterona, corticosterona y 11-desoxicortisol.¹⁷

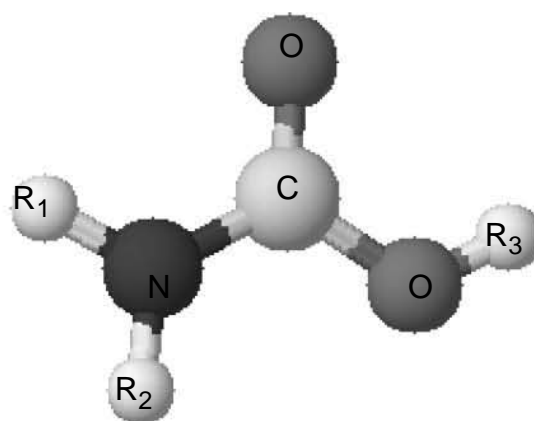


El incremento asintomático leve de la actividad de aminotransferasa en plasma es frecuente y aparece en 5 a 10% de los pacientes. Dichos valores se normalizan de manera espontánea. Es infrecuente la hepatitis sintomática o farmacoinducida.⁹

6. Carbamatos.

6.1 Generalidades.

Los carbamatos también conocidos como uretanos, son compuestos orgánicos presentan una estrecha relación funcional con los carbonatos su estructura general se observa en la figura #11. Su nomenclatura esta relacionada al ácido carbónico, por lo cuál son similares con los esterés de los mismos, cuentan con un grupo –NH₂, -NHR ó –NR₂, unido a un grupo carbonilo de ester, sus usos más importantes se enlistan en la tabla #4.³²



R₁, R₂ y R₃ = Hidrógeno, alquilo u arilo.

Figura #11. Estructura general de los carbamatos.³³



Los carbamatos al polimerizarse producen compuestos conocidos como poliuretanos, estos son ampliamente usados en diferentes áreas.³²

La síntesis de los carbamatos puede realizarse de los siguientes compuestos:

- Isocianatos.
- Aminas.
- Amidas.
- Nitrilos, nitrenos, nitroaromáticos y cuprolitiados.
- Haluros de alquilo.
- Alcoholes y cloroformatos.
- Carbonato de metilo o dietilo y aminas aromáticas.

Aunque algunos se han obtenido de fuentes naturales como las bleomicinas las cuales se obtiene del actinomiceto *Streptomyces verticillos* y las mitomicinas del *Streptomyces caespitosus*.³³

| Área. | Usos. |
|-------|---|
| | Relajante muscular, hipnótico, sedante, ansiolítico, tranquilizante, anestésico local, anticonvulsivante, en el tratamiento del mal del Parkinson, anticarcinogénico, antiulceroso, |



| | |
|----------------|--|
| Medicina. | antimicrobiano, antihelmíntico, en aparatos ortopédicos, injertos artificiales, hemoaglutinante, compuestos hemocompatibles, antitrombogénico, en corazón artificial, como productor de piel temporal, piel sintética. |
| Cosmética. | Deodorizante. |
| Agrícola. | Insecticida, herbicida, nematocida, rodenticida, funguicida. |
| Industria. | Conservador de pinturas, en pintura para autos, accesorios para autos, cristales de seguridad, mezcla para bloques, pegamento para loseta vinílica, tuberías, salas, sillas, colchones, cuerdas, zapatos, telas e hilos. |
| Navegación. | Recubrimiento de barcos y submarinos, elementos de flotación, velas y boyas. |
| Investigación. | Inhibidores de proteasa, colinesterasa y elastasa. |

Tabla #4. Principales usos de los carbamatos en las diferentes industrias.³²



6.2 Modo de acción.

Los carbamatos tienen una alta afinidad por las esterasas, tales como la quimiotripsina, la acetilcolinesterasa, la pseudocolinesterasa, carboxilesterasa plasmáticas y hepáticas, paraoxonasa, y otras esterasas no específicas dentro del cuerpo. Funcionan como el sustrato normal de las enzimas acilasas de este grupo, de esta manera los carbamatos son capaces de inhibir principalmente la acetilcolinesterasa en el sistema nervioso.

En el caso particular de los fenilcarbamatos, éstos son capaces de inhibir la mitosis, y lo hacen por interferencia de los centros de organización de los microtúbulos, que es el sitio donde se lleva a cabo el ensamble del complejo de tubulina que forman los túbulos de las fibras del uso mitótico, los cuales son responsables del alineamiento y separación de las cromátidas hermanas durante la división celular. Estos compuestos también interfieren en la síntesis de proteínas.³

6.3 Pruebas biológicas.

6.3.1 Actividad antiparasitaria.

En la facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM bajo la dirección del M. V. Z Pablo Martínez Labat en el laboratorio de parasitología, se estudio la actividad antiparasitaria contra *Hymenolepis nana* en ratones CD1.



Los compuestos probados proporcionaron resultados empleando dosis de 5, 10 y 50 mg/kg, presentaron una eficacia del 85 al 95% de actividad antiparasitaria, siendo muy similar esta respuesta a la del praziquantel (medicamento testigo), además mediante microscopia electrónica se evidenció la desaparición de las vellosidades que recubren los proglótidos de los parásitos lo que afecta la nutrición del organismo.

Por otro lado se evaluaron *in vitro* algunos derivados del ácido carbámico sobre *Gardia lamblia*, y se determinó una concentración efectiva de entre 3.80 y 18.16 $\mu\text{g/ml}$, realizado por la Dra. Enedina Jimenez Cardoso, del hospital infantil de México ³³

6.3.2 Actividad antibactericida.

En el laboratorio de Microbiología industrial de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, bajo la asesoría de la M. en C. Stella Reginensi, empleando la técnica de difusión en agar y utilizando sensidiscos impregnados con 500 y 2000 μg de los derivados carbámicos. Se evaluaron 18 cepas provenientes de muestras clínicas y de cepas ATCC, causantes de infecciones gastrointestinales en su mayoría. Los resultados mostraron que los derivados del ácido carbámico tienen efectividad contra 13 géneros de bacterias Gram (-) al utilizar la concentración de 2000 μg , dentro de estas cepas probadas se encontraba *Vibrio cholerae* el cuál figuró como el más sensible.



En el Laboratorio de biología molecular bajo la dirección del Dr. Andrés Romero Rojas, en la FES-Cuautitlán, se determinó la actividad de los derivados de los ácidos carbámicos contra *Helicobacter pylori* (mediante los métodos de Kirby Bauer y de dilución en agar), *Criptococcus neoformans*, *Candida albicans* ATCC 12053 (por el método de microdilución en RPMI-1640), *Escherichia coli* (método de Difusión en agar), *Staphylococcus aureus* (método de microdilución). De los carbamatos probados el que ha presentado mayor actividad es el LQM996 a diversas concentraciones de acuerdo al microorganismo del que se trate.¹

6.4 Reacciones adversas.

Debido a su uso como insecticida los efectos adversos más estudiados son escasos. Así es que los ésteres de carbamato de N-metilo causan carbamitación reversible de la enzima acetilcolinesterasa, lo que permite la acumulación de acetilcolina, la sustancia neuromediadora en las uniones neuroefectoras parasimpáticas (efectos muscarínicos), en las uniones mioneurales del músculo esquelético y en los ganglios autónomos (efectos nicotínicos), así como en el cerebro (efectos en el SNC). La combinación carbamilo-acetilcolinesterasa se disocia más rápidamente que el complejo fosforilo-acetilcolinesterasa producido por los compuestos organofosfatados. Esta labilidad tiene varias consecuencias importantes:

1. Limita la duración del envenenamiento con insecticida carbamato N-metilo.



-
2. Es responsable del intervalo que existe entre la dosis que genera los síntomas y la dosis letal sea mayor que el que existe en el caso de la mayoría de los compuestos organofosfatados.
 3. Con frecuencia invalida la medición de la actividad de la colinesterasa en la sangre como indicador diagnóstico de la intoxicación.

Los carbamatos de N-metilo se absorben por inhalación, ingestión y algunos penetran por la piel, aunque esta última tiende a ser la ruta menos tóxica.

En las uniones nerviosas colinérgicas con músculo liso y células glandulares, la alta concentración de acetilcolina causa contracciones musculares y secreción respectivamente. En las uniones musculares esqueléticas, el exceso de acetilcolina puede producir excitación (espasmos musculares), pero también puede debilitar o paralizar la célula al despolarizar la placa terminal. Las concentraciones elevadas de acetilcolina pueden causar alteraciones sensoriales y conductuales, incoordinación y depresión en la función motora en el cerebro (aunque raras veces causan convulsiones), a pesar de que los insecticidas de carbamato de N-metilo no penetran eficazmente al sistema nervioso central.

La depresión respiratoria, combinada con edema pulmonar, es la causa común de muerte en el envenenamiento con estos compuestos.³



JUSTIFICACIÓN.

El papel cada vez más importante de *Candida albicans* en la patología humana, ha generado un incremento en el uso de los antifúngicos sistémicos y ejercido presión en la comunidad científica para que se realicen investigaciones para la creación de moléculas más eficaces y con menos toxicidad como es de esperar en todo nuevo fármaco. Esto aunado a que los fármacos existentes contra el uso de las infecciones graves invasoras han dejado de presentar una buena respuesta contra ellas y dentro de los tratamientos que se ofrecen en su contra esta la Anfotericina B en sus distintas formulaciones comerciales (desoxicolato, liposómicas, lipídicas, intralipídicas, coloidales), el Ketoconazol aunque estos dos son de los más clásicos, también encontramos el Fluconazol, Itraconazol, entre otros.

Los problemas de seguridad y toxicidad de los fármacos antifúngicos así como de la resistencia de los mismos contra los diversos hongos han hecho imprescindible el desarrollo de nuevos antifúngicos que aporten ventajas con respecto a los ya existentes.

Por todo esto el trabajo tiene como propósito probar si los derivados del ácido carbámico pueden ser utilizados como antifúngicos específicamente contra *Candida albicans* lo cuál proporcionaría una nueva alternativa contra el tratamiento de los mismos.



HIPOTESIS.

- H_0 = Los carbamatos pueden ser adecuados antimicóticos contra *Candida albicans* con lo que se proporcionaría una alternativa de tratamiento contra las infecciones causadas contra este hongo.
- H_1 = Los carbamatos no presentan actividad antimicótica.

OBJETIVO GENERAL.

- Realizar la determinación de la capacidad antimicótica que presentan los derivados del ácido carbámico en aislamientos clínicos de *Candida albicans* utilizando el método de microdilución en placa.

OBJETIVO PARTICULAR.

- Comparar la actividad antimicótica que presentan los derivados del ácido carbámico frente a Ketoconazol y Anfotericina B contra *Candida albicans*.



7. Materiales y Métodos.

7.1 Material biológico.

- Cepa *Candida albicans* ATCC 14053
- 61 cepas de *Candida albicans* aislamientos clínicos.
- Suero humano.

7.2 Reactivos y equipo instrumental.

- Solución salina fisiológica.
- Agar Dextrosa Sabouraud (SDA) (bioxon, lote 17f94382, caducidad diciembre 2005).
- Cromoagar selectivo para candida. (BBL, lote 18250, caducidad octubre 2005).
- Dimetil sulfoxido (Merck).
- Caldo de infusión cerebro y corazón (clave 10493, caducidad agosto 2005).
- Solución de RPMI-1640 con 25nM Hepes con L-glutamina sin bicarbonato de sodio y con rojo de fenol (catalogo 01103686, caducidad noviembre 2005).
- Solución de RPMI-1640 con 25mM Hepes buffer con L-glutamina sin bicarbonato de sodio y con rojo de fenol (clave 2859, caducidad febrero 2006).
- Anfotericina B-*Streptomyces* (clave A-4888, SIGMA).
- Ketoconazol (clave k-1003, SIGMA).



-
- Skim milk (SIGMA clave 23067JB, caducidad octubre 2005).
 - Carbamatos (sintetizados en el Laboratorio de Química Medicinal de Postgrado):
 - LQM 996.
 - LQM 919.
 - LQM 211.
 - LQM 181.
 - LQM 906.
 - LQM 006.
 - LQM 007
 - LQM 938.
 - LQM 667.
 - Microplacas 96 pozos de poliuretano fondo plano (Evergreen clave 333-8000-01F).
 - Microscopio óptico (Lieder MI-535).
 - Espectrofotómetro (génesis-20 thermo spectronic).
 - Tubos crioprotectores de 1.5mL.
 - Tubos de Ependorf de 1.5mL.
 - Lector de microplacas (Genios Tecan F129004).
 - Centrifuga (Becton Dickinson 211-466).
 - Campana de flujo laminar vertical.



7.3 Levaduras.

7.3.1 Prueba de identificación.

Se trabajo con 61 cepas de *Candida albicans* de aislamientos clínicos de 200 pacientes muestreados que fueron proporcionadas en cromoagar selectivo para *candida* posteriormente se identificaron analizando sus características macro y microscópicas. Esto se realiza mediante la morfología que presenta en el medio de SDA y mediante la tinción de gram de estas colonias, su crecimiento en este medio es de 24 horas, posteriormente se realiza la prueba de tubo germinativo en 0.5mL de suero humano fresco incubándose a 37 grados por 2-3 horas. Además de esto se sembraron en medio de cromoagar selectivo para *Candida albicans* donde crece con un color verduzco característico. Una vez identificadas y purificadas se conservan a corto, mediano o largo plazo según lo requerido.²⁸

7.4 Conservación de las levaduras.

7.4.1 A corto y mediano plazo.

Para la conservación de cepas se utilizan una serie de pasos. Desde la conservación más simple que es ha corto plazo que no es nada más que el sembrado en cajas de petri y colocados en el refrigerador para su utilización en un plazo no mayor a una semana.

La conservación a mediano plazo es en la cual cada una de las cepas se mantiene en un medio de conservación que es el medio de agar BHI en donde cada una de las



cepas previamente identificadas por medios selectivos y métodos como el cromoagar selectivo para candida. Son purificadas y posteriormente sembradas en estos medios sólidos.

La cepa es sembrada por estría en un tubo de rosca que contenga BHI previamente esterilizado y que haya pasado el control de calidad.

Este sembrado se realiza por duplicado dejando el tubo semiabierto para que la cepa pueda respirar. Este método de conservación tiene un tiempo de duración de hasta seis meses.

7.4.2 A largo plazo.

Para la conservación de las cepas a largo plazo se utiliza como herramienta principal la liofilización(Ver anexo 1). El cuál es un método mediante el cuál se puede mantener a la cepa y otros productos viable por varios años.

Además de la liofilización las cepas se conservaran en Nitrógeno liquido el cual esta a -270° C. Para esto se realizo el siguiente método.

1. Sembrar la cepa pura de forma masiva en medio SDA.
2. Preparar caldo BHI con 5% de Skim milk estéril.



-
3. Una vez enfriada la solución dentro de la campana de flujo laminar se colocan 1.5 mL en tubos crioprotectores y se colocan tres asadas de levadura pura. Se cierran los tubos y se dejan enfriar a temperatura ambiente.
 4. Una vez fríos se colocan en el refrigerador (-4° C) por 2 horas, posteriormente al congelador 2-3 horas (-20° C), a continuación se coloca en el supercongelador (-70° C) 1 día y finalmente se coloca en el Nitrógeno líquido.

Este método es muy útil para conservar las cepas puras y con la mayor viabilidad además de que su tiempo de viabilidad aun no se ha determinado.³⁴

7.5 Preparación del inóculo.

1. Todos los organismos deben ser cultivados en placas de Agar Dextrosa Sabouraud (SDA) o Agar Dextrosa papa (ADP) y observar su pureza y viabilidad. La temperatura de incubación debe ser a 37°C.⁴⁹
2. El inóculo se prepara tomando 5 colonias de un cultivo de 24 horas de incubación. Las colonias se suspenden en 5 ml de solución salina fisiológica estéril (0.85%).
3. La suspensión resultante se agita en vórtex por 15 segundos y se ajusta la densidad celular en un espectrofotómetro, adicionando suficiente SSF estéril para disminuir la absorbancia a la producida por un estándar 0.5 de McFarland



(abs=0.135 +/- 0.005 a una longitud de onda de 540nm). Este procedimiento dará una suspensión stock de levaduras de 1×10^6 a 5×10^6 células por mL. Una suspensión de trabajo es hecha por una dilución 1 en 100 seguida por una dilución 1 en 20 de la suspensión stock con RPMI-1640, lo cual resulta en 5×10^2 a 2.5×10^3 células X mL.³⁰

7.6 Principios activos.

7.6.1 Preparación de las diluciones.

Las soluciones stock de antifúngicos deben prepararse en concentraciones de por lo menos 1280 µg/mL para ser probadas, cualquiera es buena.

1. Se pesaron 38.4 mg con una variación de 0.4mg del antifúngico o carbamato (los cuales se muestran en la figura 12) en una balanza analítica, y se le disolverá en 3 mL de Dimetilsulfoxido (DMSO).
2. A partir de ésta solución se realizaron diluciones seriadas dobles con DMSO de acuerdo a la **figura 13** de carbamato o antifúngico. Estas diluciones 100 veces más diluidas que la concentración inicial.
3. Se tomaron 100µL de cada solución, y se diluyen con 900µL de RPMI de acuerdo a la **figura 14**. De esta forma se obtendrá una concentración 2 veces mayor a la final. Una vez que la solución se haya adicionado a la placa junto con la levadura, la concentración final será la requerida para el estudio.
4. Se preparo un blanco con 100µL de DMSO diluido en 900µL de RPMI.³¹

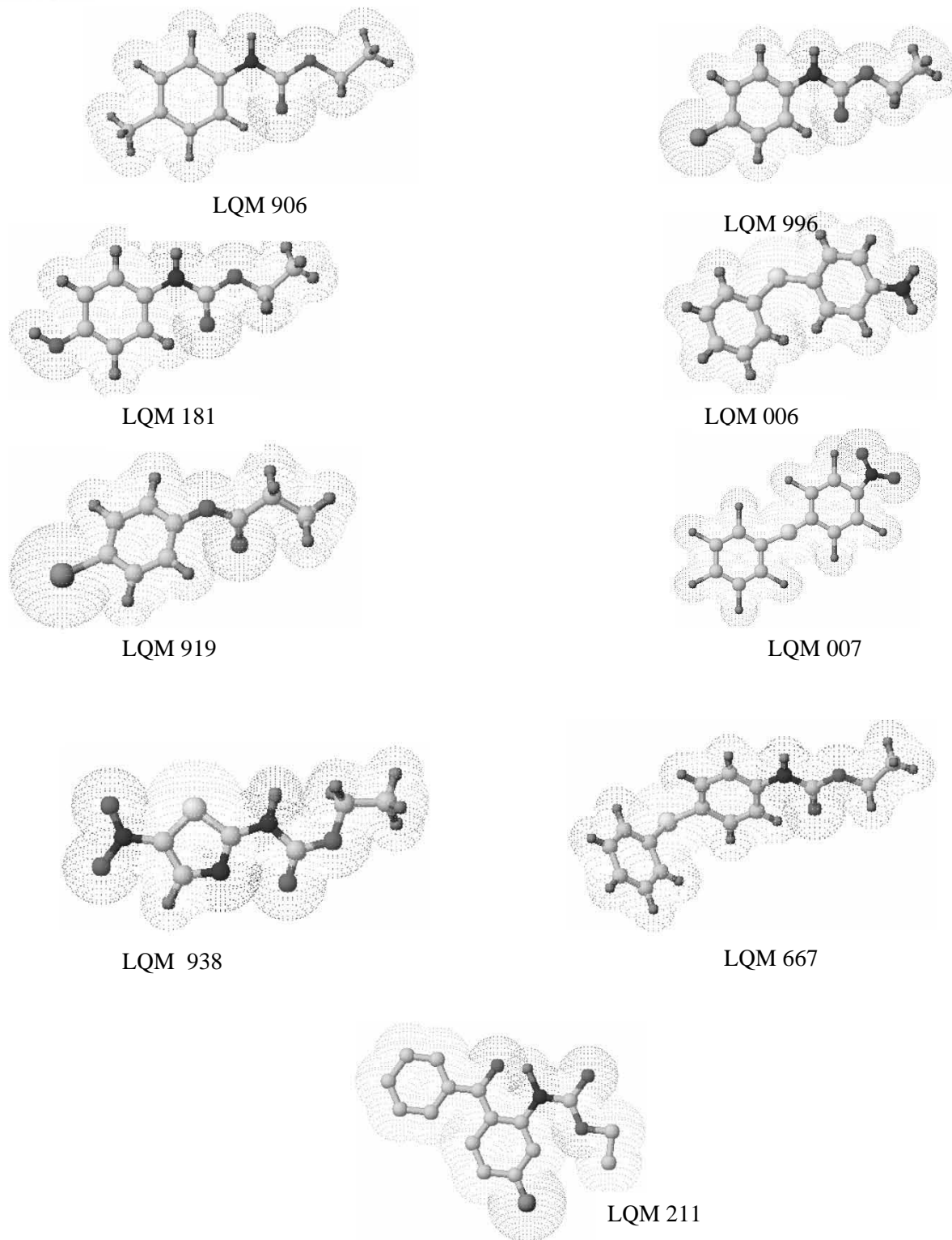


Figura #12. Estructuras de los carbamatos utilizados para la comparación con anfotericina y ketoconazol.



Pa. Principio activo.
DMSO. Dimetil sulfoxido.

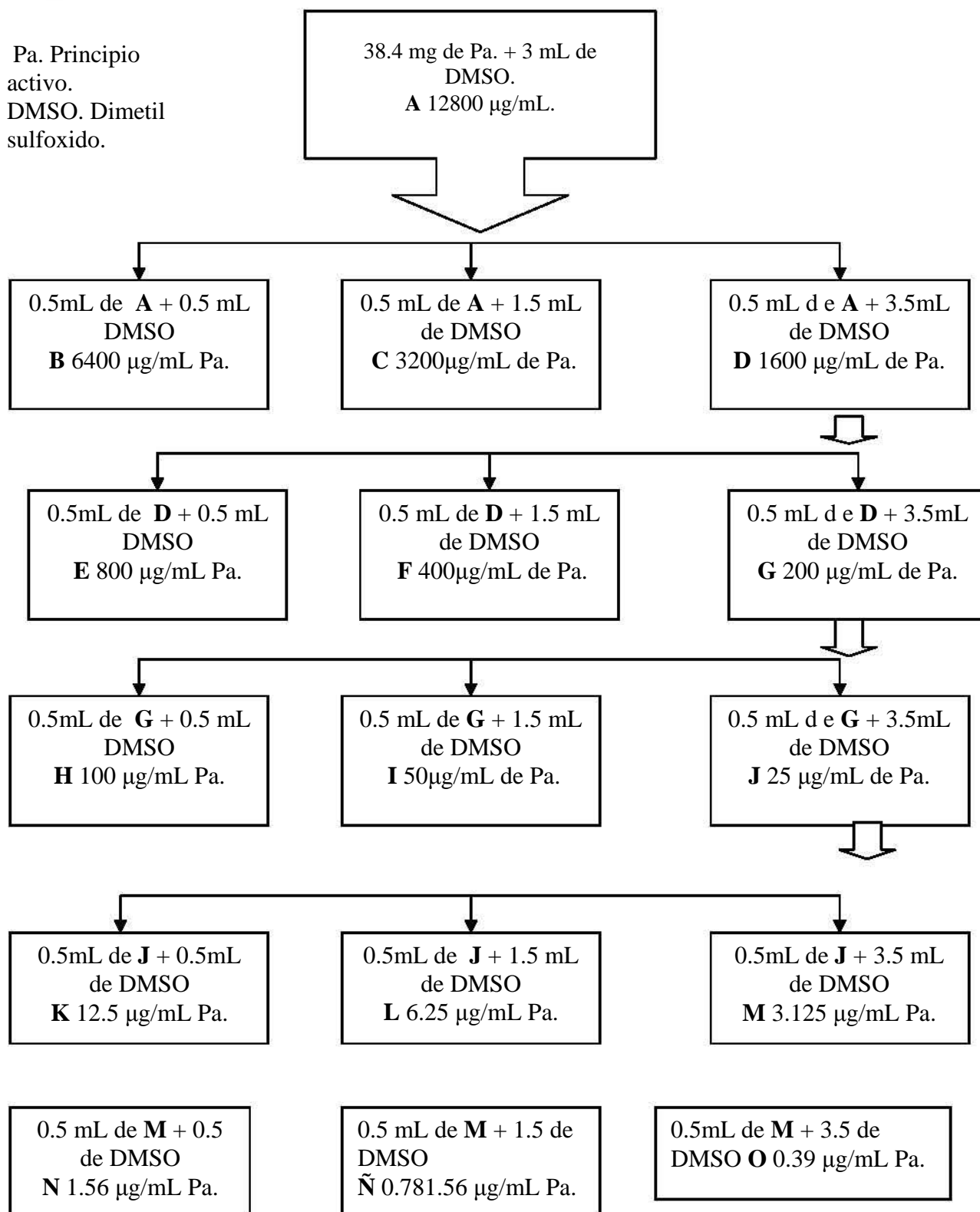


Figura #13. Preparación de las distintas diluciones de los antifúngicos y carbamatos con DMSO.

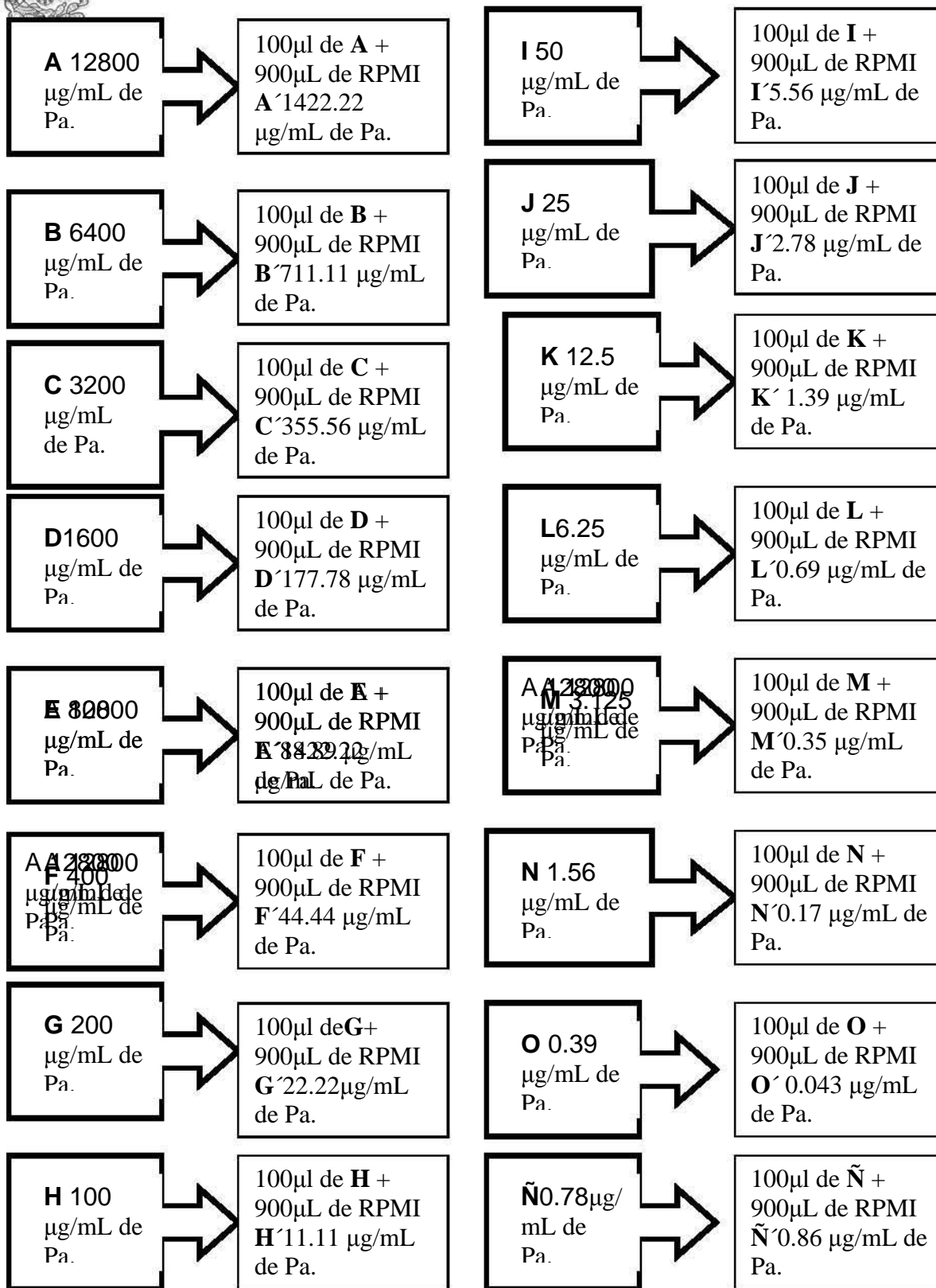


Figura #14. Dilución de las soluciones stock de antifúngicos y carbamatos en RPMI para adicionarlos a los pocillos de las microplacas.



7.7 Llenado de las placas.

7.7.1 Inoculación de la microplaca para la determinación de la MIC de los Antifúngicos de Referencia.

1. Trabajándose estrictamente en condiciones estériles. Se tomaron 100µL de cada dilución de principio activo, con una micropipeta y diferente puntilla previamente estéril.
2. Se colocan en cada uno de los pocillos de forma ascendente (de la menor a la mayor concentración) en las filas A, B y C se coloco anfotericina B y en las filas C, D y E se coloco el ketoconazol.
3. En las filas G y H se agregaran los controles positivos y negativos.
4. En los pocillos de las filas G y H, se les adicionara únicamente 100µL de RPMI estéril.
5. Al finalizar de colocar las diluciones de principio activo, se procede a colocar 100µL del inculo previamente estandarizado y disuelto en RPMI, tanto de la cepa estándar como de las a cepas de aislamientos clínicos. Excepto en la fila H a la cuál se le adicionara 100µL más de RPMI.
6. Finalmente se tapara la microplaca y se incubara a 37°C verificando el crecimiento a las 24 horas (ver figura #15).



7.7.2 Inoculación en microplaca para la Determinación de las MIC'S de los Carbamatos.

1. Trabajándose estrictamente en condiciones estériles. Se tomo 100µL de cada dilución de principio activo, con una micropipeta y diferente puntilla.
2. Se colocara en cada uno de los pocillos en forma ascendente (de la menor a la mayor concentración).
3. Para los controles positivos, en los pocillos de la columna 11: A, B, C y D, se colocaran 100µL de RPMI sin DMSO. Para los pocillos E, F, G y H de la misma columna, se colocaran 100µL de la solución blanco de RPMI con DMSO (blanco).
4. Para el control negativo en los pocillos A, B, C y D de la columna 12, se colocarán 200µL de RPMI estéril sin DMSO. Para los posillos E, F, G y H de la misma columna, se colocarán 100µL de la solución del antifúngico de referencia (AB) disuelto en RPMI con DMSO.
5. Al finalizar de colocar las diluciones de principio activo, se procede a colocar 100µL del inculo previamente estandarizado y disuelto en RPMI excepto en los pocillos A, B, C y D de la columna 12 a los cuales no se les adicionara levadura.
6. Finalmente se tapará la microplaca y se incubara a 37°C verificando el crecimiento a las 24 horas



7. Para los carbamatos que presenten actividad antifúngica se realizaron las por triplicado (ver figura #16).³¹

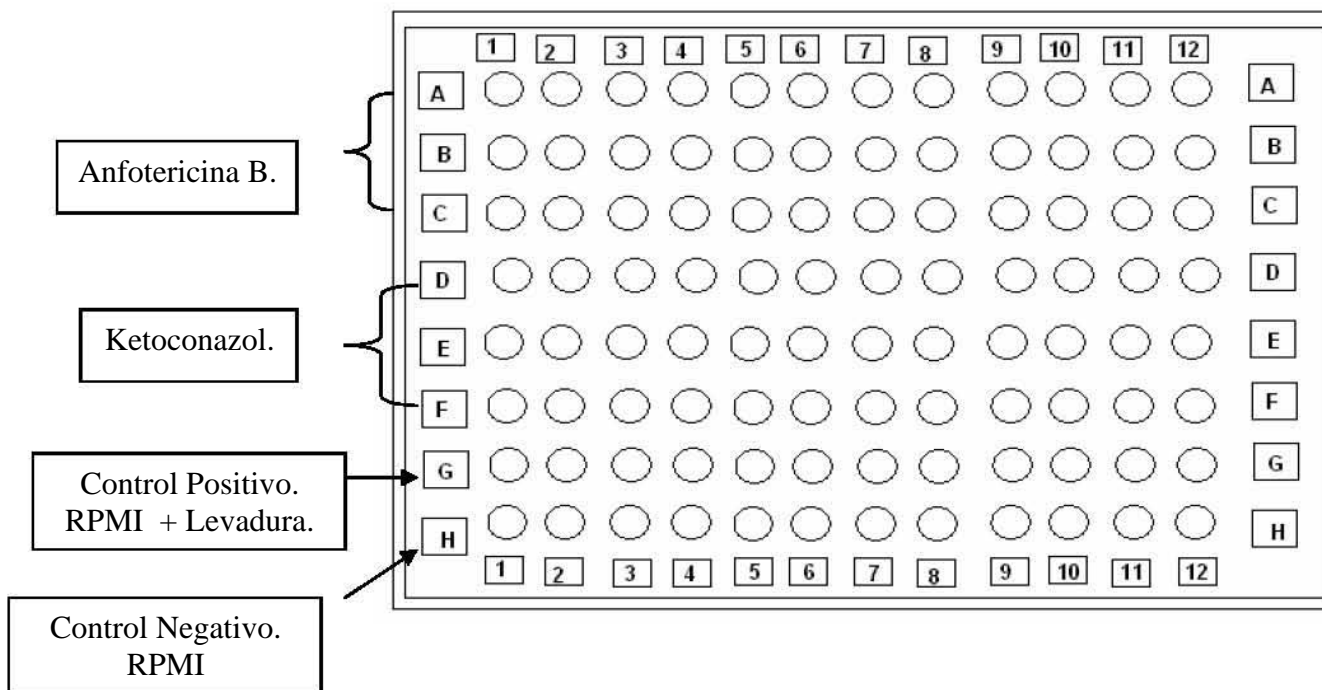


Figura #15 Llenado de las microplacas para la determinación de las MIC'S de los antifúngicos de referencia.

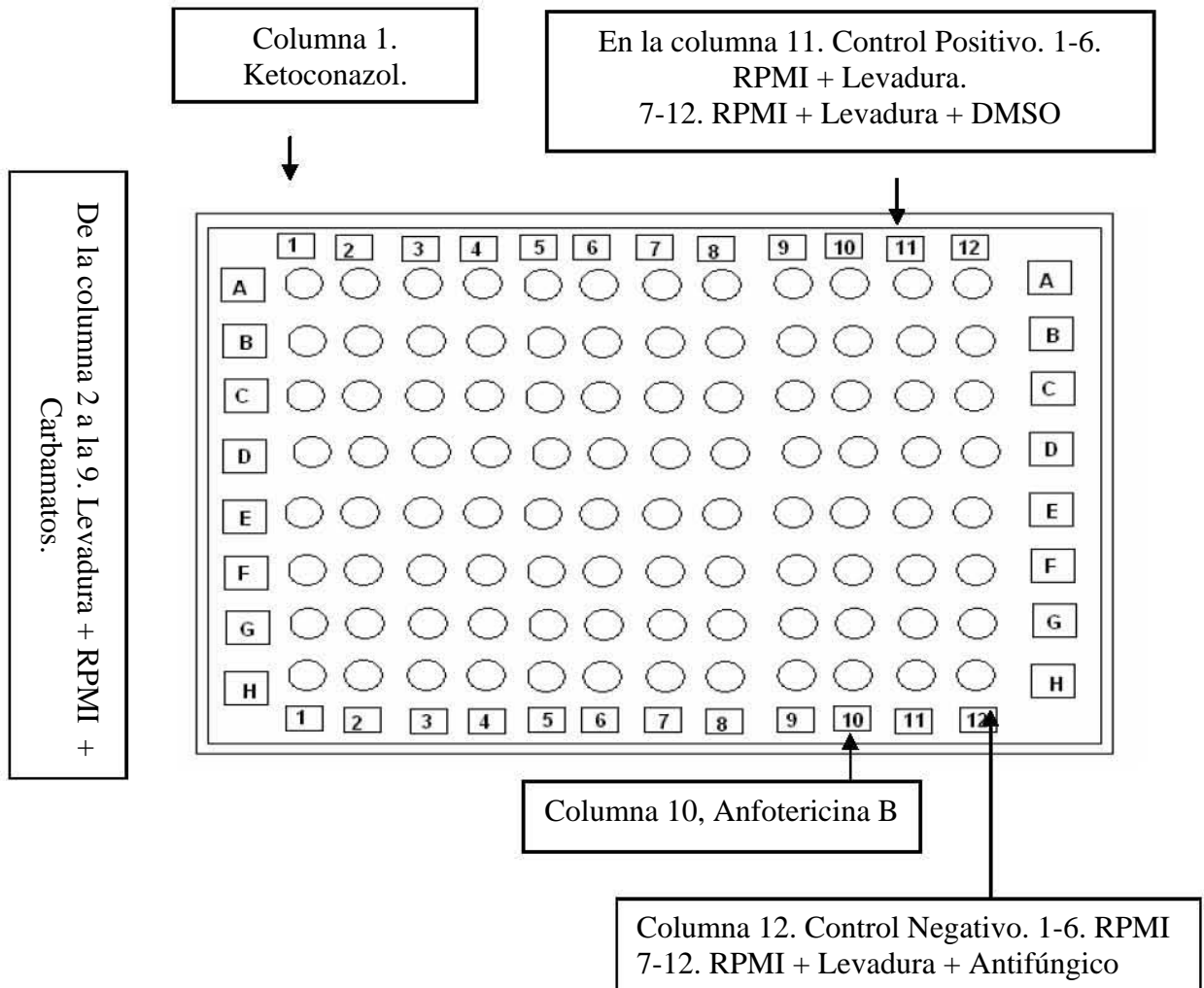


Figura #16. Llenado de las microplacas para la determinación de las MIC'S de los diferentes Carbamatos.

7.8 Lectura y susceptibilidad.

La MIC es considerada como la menor concentración de un agente antifúngico que inhibe sustancialmente (80%) el crecimiento del organismo apreciado en este caso espectrofotométricamente.



La susceptibilidad de las cepas frente a cada antifúngico de referencia así como a los diferentes carbamatos se evaluó mediante un lector de microplacas (Genios Tecan F129004) proporcionándonos de esta manera concentraciones.

7.8.1 Criterios de susceptibilidad.

Como sabemos los criterios de susceptibilidad varían de acuerdo al método de determinación de susceptibilidad *in vitro* utilizado, para el caso de nuestro interés los criterios de susceptibilidad se basan en la comparación con la MIC encontrada en la Anfotericina B comparadas con los diferentes carbamatos.

7.9 Control de Calidad.

Microorganismos.

- *Candida albicans* ATCC 14053.

Antifúngicos de referencia.

- Se confrontan los carbamatos a la anfotericina B (clave A-4888, SIGMA).
y el ketoconazol (clave k-1003, SIGMA para evaluar su eficacia).



Placas.

El primer control negativo contiene únicamente el medio de cultivo RPMI, de esta forma comprobamos que el medio se encuentre libre de microorganismos.

El segundo control negativo incluye la levadura disuelta en el medio de cultivo RPMI con DMSO y el antifúngico de referencia.

El primer control positivo tiene la levadura disuelta en RPMI.

El segundo control positivo lleva la levadura disuelta en el RPMI y el DMSO, esto nos permite analizar si este afecta el desarrollo de la levadura.



8.RESULTADOS.

Candida albicans el microorganismo trabajado fue obtenido de 200 pacientes de la zona de Cuautitlán Izcalli en la tabla # 5 se muestran la ubicación de las 61 cepas de *C. albicans* obtenidas de aislamientos clínicos los cuales fueron identificadas al ser sembradas en cromóagar selectivo para *Candida*. De estas muestras el 30.5 % de las cepas fueron *Candida* y específicamente *albicans* (ver grafica #1)

Tabla #5. Localización dentro del organismo de las 61 cepas de *C. albicans* de aislamientos clínicos.

| Localización de las muestras. | Número de cepas aisladas. |
|-------------------------------|---------------------------|
| Vaginal. | 37 |
| Faríngeo. | 19 |
| Espuito. | 1 |
| Urocultivo. | 2 |
| Uretrales. | 2 |
| Total. | 61. |



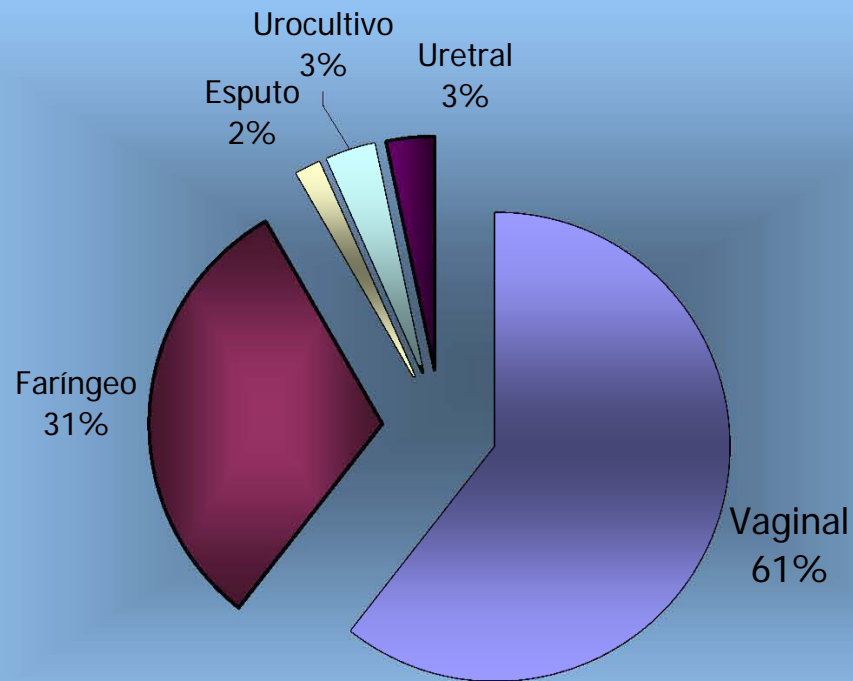
Tabla #6. MIC`S de los antifúngicos de referencia tanto en la cepa ATCC14053 como en las cepas de aislamientos clínicos.

| Antifúngico. | <u>Candida albicans</u> ATCC 14053. | <i>C. albicans</i> aislamientos clínicos (media obtenida). |
|-----------------|--|--|
| Anfotericina B. | 0.25 - 1 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$. ¹ | 0.17 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$. |
| Ketoconazol. | 0.25 - 1.35 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$. ⁹ | 177.78 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$. |

En la tabla #7 se enlistan las medias de las MIC`S obtenidas por los carbamatos y antifúngicos de referencia sobre *C. albicans*.



Ubicación dentro del organismo de las muestras.



Mujeres
89.23%.

Hombres
10.77%.

Total de
muestras 61 de
200 pacientes
muestreados .
Representa el
30.5%.

Grafica #1. Representación de la ubicación de las muestras que fueron analizadas para detectar la MIC.



Tabla #7. Media de las MIC'S presentadas por los carbamatos en muestras clínicas de *Candida albicans*.

| Número de cepa. | Anfotericina B (µg/ml) | Ketoconazol. (µg/ml) | LQM 996 (µg/ml) | LQM 919 (µg/ml) | LQM 906 (µg/ml) | LQM 181 (µg/ml) | LQM 211 (µg/ml) | LQM 938 (µg/ml) | LQM 006 (µg/ml) | LQM 007 (µg/ml) | LQM 667 (µg/ml) |
|-----------------|------------------------|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| ATCC 14053 | 0.25 | 1.35 | 711.11 | — | 711.11 | — | 711.11 | 0.086 | 0.17 | 0.086 | 0.086 |
| 1 (V) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.17 | 0.086 | 0.086 |
| 2 (V) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.086 | 0.086 | 0.086 |
| 3 (V) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.086 | 0.086 | 0.17 |
| 4 (V) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.17 | 0.17 | 0.086 | 0.086 |
| 5 (V) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 6 (V) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.17 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 7 (V) | 0.086 | 88.89 | — | — | — | — | — | 2.78 | 0.34 | 0.086 | 0.086 |
| 8 (V) | 0.086 | 88.89 | — | — | — | — | — | 0.086 | 1.39 | 0.17 | 0.17 |
| 9 (F) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 2.78 | 1.39 | 0.17 | 0.17 |
| 10 (F) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.17 | 0.17 | 0.086 | 0.17 |
| 11 (F) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 1.39 | 0.69 | 0.34 |
| 12 (F) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 1.39 | 0.17 | 0.17 |
| 13 (F) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.086 | 0.086 |
| 14 (F) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 15 (F) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 16 (F) | 0.17 | 355.56 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 17 (F) | 0.086 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 18 (V) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 19 (V) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |



| | | | | | | | | | | | |
|---------|-------|--------|---|---|---|---|---|-------|------|-------|-------|
| 20 (V) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 21 (F) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 22 (F) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 23 (F) | 0.086 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 24 (V) | 0.17 | 355.56 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 25 (V) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.17 | 0.17 | 0.17 |
| 26 (V) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 27 (F) | 0.086 | 88.89 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 28 (F) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 29 (F) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 30 (F) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 31 (F) | 0.086 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 32 (F) | 0.086 | 88.89 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.34 | 0.17 |
| 33 (F) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 34 (V) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.17 | 0.17 | 0.17 |
| 35 (V) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 36 (V) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.17 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 37 (V) | 0.17 | 355.56 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 38 (V) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 39 (V) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 40 (Ur) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 41 (E) | 0.086 | 88.89 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 42 (V) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 43 (V) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.17 | 0.086 | 0.086 |



| | | | | | | | | | | | |
|---------|-------|--------|---|---|---|---|---|-------|------|------|------|
| 44 (V) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 45 (V) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 46 (V) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 47 (U) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 48 (U) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 49 (V) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 50 (V) | 0.17 | 355.56 | — | — | — | — | — | 0.17 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 51 (V) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 52 (V) | 0.086 | 88.89 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 53 (V) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 54 (V) | 0.34 | 88.89 | — | — | — | — | — | 0.17 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 55 (V) | 0.34 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 56 (V) | 0.086 | 355.56 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 57 (V) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 58 (V) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.34 | 0.17 |
| 59 (V) | 0.17 | 88.89 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 60 (V) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |
| 61 (Ur) | 0.17 | 177.78 | — | — | — | — | — | 0.086 | 0.34 | 0.17 | 0.17 |

— Resistente.

V.- vaginal.
E.- esputo.

F.- faríngeo.

Ur.- uretral

U.- urocultivo.



9. DISCUSIÓN.

La creciente necesidad de antifúngicos más eficaces que permitan tratamientos más cortos o con dosis menores contra las micosis existentes este trabajo se enfoca en las evaluaciones de diversos carbamatos contra la cepa de *Candida albicans* ATCC 14053 usándola como cepa control así como con aislamientos clínicos de *C. albicans*

Para este estudio se controlaron variables como son la temperatura, el tiempo de incubación así como la concentración del inóculo ya que son variables que pueden afectar los resultados.

Todos los compuestos se solubilizaron de manera adecuada en DMSO sin embargo algunos de los carbamatos a concentraciones altas en las diluciones (44-177mcg/ ml) ante el medio de cultivo (RPMI-1640), presentaron una ligera precipitación; lo cual solo se presentó en los carbamatos que no presentaron actividad antifúngica, la propuesta de estandarización realizada por la CLSI de los EE.UU., recomienda el medio RPMI 1640 permite la adecuada evaluación¹. En los controles positivos utilizados hubo diferencia de crecimiento entre las levaduras de los pocillos ya que algunos presentaban una lectura de 800µg/mL mientras que otras superaban los 1200 µg/mL, aunque con estos datos podemos concluir que el DMSO no afecta el desarrollo de las levaduras y por lo tanto tampoco la prueba de



susceptibilidad. A pesar de que el DMSO no afecta el desarrollo de las levaduras se han encontrado reportes^{31, 36,43,49} de que este disolvente afecta la permeabilidad de la pared celular de la levadura volviéndolas más susceptibles al compuesto en prueba, por este motivo se cuidó extremadamente que la cantidad de DMSO utilizado en las diluciones no presentara la interferencia con el desarrollo de *C. albicans*, utilizando pipetas volumétricas 1 a 5 mL.³⁰

Aunque se esperaba que los carbamatos que presentaran mayor efectividad contra *C. albicans* fueran el LQM 996, 919, 211 e incluso el 181, ya que se contaban con antecedentes que indicaban que presentaban una MIC de un valor similar al establecido para la anfotericina y una mayor eficacia que el ketoconazol, esto no resultó del todo cierto esto es debido a que había sido probada con una cepa ATCC 10231³³ las cuáles poseen una patogenicidad mayor, aunque en este experimento se utilizó la cepa ATCC 14053 los resultados mostraron un aumento en la concentración muy considerable ya que las cepas clínicas presentaron una mayor resistencia ya que la mayoría ha estado expuesta con anterioridad a diversos tratamientos lo cual al no ser terminados le permiten a esta levadura presentarla aunque no siempre esta resistencia clínica es causada por el microorganismo, por esto se prefiere emplear los términos de "resistencia" cuando el fenómeno es atribuible al hongo (*C. albicans*) y "fracaso terapéutico" cuando su origen no es inherente a este agente causal⁴⁰, lo cual se demuestra debido a que las MIC'S presentadas se elevan significativamente lo cual se muestra en la tabla #8



aunque este aumento en la resistencia se presentó en ketoconazol a diferencia de anfotericina B, en un estudio colaborativo realizado por Barchiesi en 1994, con el medio RPMI 1640, el rango encontrado para *C. albicans* fue de 0.25-1 $\mu\text{g}/\text{m}$ es decir más amplio que el encontrado.¹

La anfotericina B es un fungicida el cuál es el más recomendado en caso de micosis sistémicas por lo que es punto de partida para la evaluación de los carbamatos y el KET que es un fungistático pero a pesar de ello es el principal en la terapia en caso de micosis superficiales por su baja toxicidad en comparación con la anfotericina por lo cuál nos da pauta para su comparación con dichos carbamatos. En la tabla #6 se encuentra la media de susceptibilidad de los antifúngicos.

Con los resultados obtenidos podemos observar que los carbamatos que son eficaces son el LQM 006, 007, 696, 938, los cuales inhiben a *C. albicans* de una manera tan eficaz como la propia anfotericina B obteniendo una MIC de 0.17 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lo cuál se puede evaluar en la tabla #7 donde se observa claramente su actividad aunque no se puede determinar si dicha actividad es fungicida o fungistática de estos carbamatos en comparación con la AB en donde la concentración de la MIC obtenida por dichos compuestos es el doble de la primera con esto los carbamatos pueden ser una alternativa de tratamiento en contra de las micosis tópicas e incluso sistémicas que son las de mayor importancia y estos al ser comparados con el ketoconazol en la tabla #7 se demuestra una reducción



en la concentración de la MIC realmente significativa aunque han emergido nuevos triazoles que han ampliado la gama terapéutica disponible (ver tabla #3) también son una alternativa terapéutica habitual en el tratamiento de infecciones fúngicas los cuales presentan una MIC de 0.25-1.35µg /ml lo cual sigue siendo superior que la encontrada para 4 de los carbamatos ya mencionados pero su tiempo de tratamiento es menor y las reacciones adversas mínimas.⁹

Estos estudios colocan a estos 4 carbamatos como posibles alternativas de tratamiento en contra de *C. albicans* si superan las pruebas preclínicas y clínicas restantes (ver anexo 2). Y si presentara algún efecto sinérgico con algún antifúngico, puede ser utilizados en terapias combinadas con ellos, disminuyendo de esta forma las reacciones adversas que se pueden presentar durante el tratamiento.



10. CONCLUSIONES.

- Los carbamatos que presentan actividad antimicótica son el LQM 006, 007, 696 y el LQM 938 y su actividad se compara con la actividad de la anfotericina B.
- Los carbamatos que presentan actividad antimicótica son el LQM 006, 007, 696 y el LQM 938 y su actividad es mejor a la presentada por el Ketoconazol.
- EL LQM 996, 919, 907, 181, 213 no presentaron ninguna actividad ni fungicida ni fúngica frente a *C. albicans*.
- Los carbamatos no presentan una actividad antimicótica sustentable debido a la variabilidad de las lecturas presentadas por las cepas de *C. albicans* de muestras clínicas y a la ATCC 14053.



11. BIBLIOGRAFÍA.

1. Andreu F., González M. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de anfotericina B en levaduras de interés médico. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 1998; 50(1). pp. 48-53.
2. Arenas G. *Micología médica ilustrada*. Mc Graw Hill, 2ª ed. México DF. 2003. pp. 189-203.
3. Arratia Jenny. Estudio del daño del ADN en células de estomago de ratón administrado con los derivados carbamicos LQM 919 y LQM 996. 2004. pp. 11-13, 24-5. Tesis de licenciatura, Q.F.B. FES- Cuautitlán, UNAM.
4. Bailey & Scott. *Diagnostico Microbiológico*. Panamericana, 11 ed. Philadelphia, 2002. pp. 811-820.
5. Bennett J., Klich M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Review*. 2003;16. pp. 497-516.
6. Bikandi J., Millan R. Detection of antibodies to *Candida albicans* germ tubes during experimental infections by different *Candida* species. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 1998;5. pp. 369-374.
7. Bonifaz, A. *Micología Básica*. Mendez ed, 2ª reimpresión. México D. F. 1994. pp. 277-301.
8. Bonifaz A. *Micología Médica Básica*. Mendez ed. México 2002. pp. 9-13.



-
9. Bonifaz A. y Hernández- Veloz J. Valoración de la actividad *in vitro* del Ketoconazol (R 41400) frente a 100 cepas de *Candida spp.* Aislamientos de casos patológicos. Revista LAB. 1995;7(1). Pp. 15-19.
 10. Chang M. and Cury A. Amphotericin β -metronidazole combination against *Candida spp.* Revista Iberoamericana de Micología. 1998;15. pp. 78-80.
 11. Cardozo E., Pardi G., Perrone M. Detección de *Candida Albicans* en pacientes con Estomatitis Sub-Protésica, medicados con Anfotericina Tópica. Acta odontológica venezolana. 2003;41(3). pp.188-194.
 12. Carrillo A., Brio S. y Quidos G. Una nueva generación de Fármacos Antifúngicos. Revista Iberoamericana de Micología. 2001;18. pp. 2-5.
 13. Dominique S. and Jacques B. *Candida and Candidiasis*, 2002. ASM Press. Washington D. C. pp.349-373.
 14. <http://www.fda.gov/cder/handbook/index.htm>
 15. Godoy P., Leila P. Identificación de *Candida albicans* utilizando el medio cromogenico Albicans ID. Revista Iberoamericana de Micología. 2001;18. pp. 197-199.
 16. Goodman & Gilman. Las bases Farmacológicas de la Terapéutica. Mc Gram Hill, 11 ed. Vol. 2. México DF. 2003. pp. 1311-24.
 17. Hernández M., Pla J. Y Nombela C. Aspectos moleculares y genéticos de la resistencia a azoles en *Candida albicans*. Revista Iberoamericana de Micología. 1997; 14. pp. 150-154.



18. <http://www.imagenes.google.com/imgres>.

19. Jawetz, Melnick & Adelberg's. Lance, Medical Microbiology, 23ed. 2003. pp. 215-280.
20. Jonson A. The biology of mating in *Candida albicans*. Nature Reviews Microbiology. 2003;1. pp. 106-116.
21. Katzung, G. Bertram, M. D. PHD. Farmacología: autoevaluación y repaso. El manual modero. México D. F. 2000. pp. 53-57.
22. Kwong-Chung. Medical Mycology. Lea & Febiger. Philadelphia 1992. pp. 300-314.
23. Linares M. Identificación de levaduras. Revista Iberoamericana de Micología. 2001;11. pp. 1-17.
24. Lopez M., Aline T. Correlation of *Candida* species and symptoms among patients with vulvovaginal candidiasis in Maringa; Paraná, Brazil. Revista Iberoamericana de Micología. 2004;21. pp. 202-205.
25. Martín E., Cantón E. Otros métodos para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos. Revista Iberoamericana de Micología. 2001;16. pp. 16-23.
26. Martínez J. Y Albrecht C. Sensibilidad al fluconazol y a la anfotericina B en cepas de *Candida* provenientes de aislamientos clínicos. Revista Iberoamericana de Micología. 1998;15. pp. 298-299.



-
27. Marr K., Carter R. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clinical Infectious Diseases*. 2002;34. pp.909-917.
 28. Morales R., Avilés A. Y Ramos M. Conservación de *Candida albicans* en cuentas a -70°C . *CECMED*. 2004. 9;49-50. pp. 1-10.
 29. Murray P. R., Rosenthal K. S. *Medical Microbiology*. 2002; 4ed. St. Louis: Mosby
 30. National Committee for Clinical Laboratory Standards (2004). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard NCCLS document M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
 31. National Committee for Clinical Laboratory Standards (2004). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard NCCLS document M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
 32. Odilon Abraham. Síntesis de Carbamatos a partir de aminas aromáticas. 1993. pp. 1-13. Tesis de licenciatura, Q.F.B. FES- Cuautitlán, UNAM.



-
33. Ortega, Diana. Determinación de la concentración Mínima Inhibitoria de los derivados de ácido carbámico en *Candida albicans* y *Criptococcus neoformans*. 2005. Tesis de licenciatura, Q.F.B. FES- Cuautitlán, UNAM.
34. Pardi G. Determinantes de Patogenicidad de *Candida albicans*. Acta odontológica. Venezolana. 2002; 40(2). pp. 185-192.
35. Pérez C. Mata-Essayag S. Mantenimiento de *Criptococcus* sp. Con el método de Castellani. Revista de la sociedad Venezolana de Microbiología. 2003; 23(2). Pp. 1-10.
36. <http://www.plmlatina.com/cddef/mex/productos/3005.htm>.
37. Pontón J. Diagnóstico Microbiológico de las micosis. Revista Iberoamericana de Micología. 2002; 19. pp. 25-29.
38. Quidós, G. La micosis en el amanecer del siglo XXI. Revista Iberoamericana de Micología. 2002; 19. pp. 1-4.
39. Rex J., Welsh T., Sobel J. Practice Guidelines for the Treatment of Candidiasis. Clinical infectious Diseases. 2000;30. pp. 662-678.
40. Ripton J. Micología Médica: hongos y actinomicetos patógenos. MacGraw-Hill, 3^a ed. México 2003. pp. 524-600.
41. Román D. Innovación y desarrollo farmacéutico. Asociación farmacéutica. México, D. F, 2001. pp. 35-65.



-
42. Rueda R. Micosis superficiales y dermatomicosis. Colombia Médica. 2002; 33. pp. 10-16.
43. Rosenstein E. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas (PLM). Thomson PLM. 50 ed. México D. F. 2006. pp 227-29, 1726-27.
44. Sanchez L., Ortiz N., Villar M. Point prevalence, microbiology and antifungal susceptibility patterns of oral *Candida* isolates colonizing or infecting Mexican HIV/ AIDS patients and healthy persons. Revista Iberoamericana de Micología. 2005;22. pp. 83-92.
45. Santos P., Oleastro M. Infecciones fúngicas en pacientes pediátricos con enfermedad granulomatosa crónica. Revista Iberoamericana de Micología. 2002; 34. pp. 6-9.
46. Senet J. and Senet M. Risk factors and physiopathology of candidiasis. Revista Iberoamericana de Micología. 1997;14. pp. 6-13
47. Sevilla E., Escobar I., Pedrazal L. Estudio multicéntrico de utilización de antifúngicos en el paciente oncohematológico. Farmacia hospitalaria, 2002; 22. pp. 188-196.
48. Sturtevant J. and Calderone R. *Candida albicans* adhesions: Biochemical aspects and virulence. Revista Iberoamericana de Micología. 1997; 14. pp. 90-97.
49. Torres J., Madrenys N. Y Jiménez T. Concentraciones Mínimas Inhibitorias de levaduras a cinco antifúngicos utilizando un micrométodo de dilución



estandarizado y el E- test. Revista Iberoamericana de Micología.

1997;14. pp. 115-118.

50. Vanden H. Mechanisms of antifungal resistance. Revista Iberoamericana de Micología. 1997;14. pp. 44-49.

51. Vidotto V., Yumi C. Correlation between germ tube production, phospholipase activity and serotype distribution in *Candida albicans*. Revista Iberoamericana de Micología. 1999; 16. pp. 208-210.



A N E X O S.



Anexo #1. Principales características de las especies de Candida de interés medico.

| Especie. | Morfología | | | | Fermentación | | | | | Asimilación. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|------------------|---------------|----------------|------------|--------------|-----------|---------|---------|---------|--------------|-----------|---------|---------|-----------|----------|---------|-----------|----------|-----------|----------------|--------|-------------|-------------|----------|------------|----------|------------|---------|------------|------------|-----------------------------|---------|-----------------|---------------|-----------|
| | Tubo germinativo | Clamidiospora | Hifa verdadera | Pseudohifa | Glucosa | Galactosa | Sucrosa | Maltosa | Lactosa | Galactosa | L-Sorbosa | Sucrosa | Maltosa | Colobiosa | Trealosa | Lactosa | Melobiosa | Rafinosa | Melzitosa | Soluble starch | Xilosa | L-Arabinosa | D-Arabinosa | D-Ribosa | L-Rhamnosa | Glicerol | Erythritol | Ribitol | Galactitol | D-Mannitol | Metil- glucosido a-D- | Salicin | Acido succinico | Acido citrico | Nitratos. |
| <i>C. albicans.</i> | +/- | + | V | + | + | V | - | + | - | + | +/- | + | - | + | - | - | - | V | + | + | V | V | V | - | V | - | V | - | V | + | V | - | V | V | - |
| <i>C. glabrata.</i> | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | +/- | - | - | - | - | - | - | - | - | - | V | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>C. guilliermondii.</i> | - | - | - | + | + | V | + | - | - | + | + | + | + | + | - | + | + | + | - | - | + | + | V | V | + | - | + | + | + | + | +/- | + | + | + | - |
| <i>C. haemulonii.</i> | - | - | - | - | + | - | + | - | - | + | - | + | - | + | - | - | S | + | - | - | + | S | - | - | + | + | - | + | + | + | V | - | + | + | + |
| <i>C. kefyr</i> | - | - | - | + | + | + | + | - | V | + | - | + | - | V | V | + | - | + | - | - | V | V | - | V | - | V | - | - | - | V | - | V | V | V | - |
| <i>C. krusei</i> | - | - | - | + | + | - | - | - | - | V | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | V | - |
| <i>C. lusitaniae</i> | - | - | - | + | + | V | + | V | - | V | + | + | + | + | + | - | - | - | + | - | + | V | V | + | + | + | - | + | - | + | + | + | + | V | - |
| <i>C. norvegensis.</i> | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | V | + | + | - |
| <i>C. parapsilosis.</i> | - | - | - | + | + | V | V | V | - | + | V | + | + | - | + | - | - | - | - | - | + | + | - | V | - | + | - | + | - | + | V | - | V | V | - |
| <i>C. tropicalis</i> | - | - | V | + | + | + | V | + | - | + | V | V | + | V | + | - | - | - | +/- | + | + | V | - | V | - | V | - | V | - | + | +/- | v | + | V | - |
| <i>C. viswanathii</i> | - | - | - | + | + | + | V | + | - | + | - | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | + | - | + | - | + | + | + | + | + | - |



Anexo #2. Pruebas que se realizan para que un fármaco salga al mercado.

Etapas de la investigación y desarrollo de fármacos.

Si bien el orden de las primeras etapas de estudio y el tiempo general en que se realiza la investigación y el desarrollo de un medicamento nuevo varía en gran medida, la mayoría de las actividades que se llevan a cabo son generalmente constantes. Y las etapas son las siguientes:

Investigación preclínica.

Exploración.

Esta fase está predeterminada normalmente por una planeación estratégico-administrativa, en la cual se evalúan aspectos del mercado, necesidades terapéuticas y capacidades internas de la compañía, con el objetivo de establecer las áreas de interés primario para investigar.

Cualquiera que sea el origen del descubrimiento del compuesto el siguiente paso será *confirmar su estructura* y proceder a caracterizarlo. Así mismo, el químico responsable deberá asegurar que se cuenta con cantidades suficientes del compuesto puro para poder realizar la evaluación biológica.

Los farmacólogos, los biólogos y otras especialidades relacionadas, emplearán una multitud de técnicas sofisticadas para observar, reportar y analizar los *efectos*



primarios y secundarios que podría tener la sustancia en el hombre,

las cuales van desde el tratamiento *in Vitro* de partículas subcelulares, el uso de tubo de cultivo, tejidos u órganos aislados *in Vitro*, hasta, que con mayor frecuencia, la administración a animales intactos, determinaran la posible actividad antibacteriana, antiviral y antitumoral de los compuestos, con una metodología tal que permitirá evaluar cantidades tan pequeñas como nanogramos y aún picogramos, inclusive existen más de 350 modelos que proveen sistemas de funcionamiento en ciertos órganos similares a los humanos, y existen guías y recomendaciones generales del organismo de salud internacionales para realizar este tipo de investigación.

Definición.

Esta fase se denomina así, por que es aquí donde se definirán las sustancias que se someterán a las autoridades sanitarias, para obtener su aprobación y realizar estudios en humanos.

El área química deberá describir detalladamente la ruta seguida para la síntesis original, a través de un proceso exhaustivo de verificaciones y controles, cuyo inicio es el establecimiento de especificaciones tales como apariencia, punto de fusión, pureza, etc., para todos y cada uno de los reactivos iniciales, tanto de los productos intermediarios como del compuesto deseado, evaluando con detalle los rendimientos obtenidos en cada etapa.¹⁴



Investigación clínica.

Fase I.

Con esa fase se inicia toda una nueva sección de estudios en todas las áreas especializadas, dentro del procedimiento de investigación y desarrollo del nuevo medicamento.

En el área química trabajarán con los procesos a una escala tal que permita obtener suficientes cantidades del compuesto, e iniciarán el desarrollo de los proveedores de ingredientes primarios y de reactivos requeridos para la síntesis.

En el área de farmacología clínica se trabajará por primera vez en humanos. En la actualidad, se calcula que no menos del 12% de los compuestos que entran a estudios en humano llegan a estar a disposición del médico.

El objetivo de los estudios de la fase I -también conocidos como de desarrollo del perfil farmacológico- no será determinar ni comparar la utilidad sino de establecer la dosificación y la seguridad del medicamento candidato; la duración de su permanencia en el organismo y otros factores preeliminares en un número reducido de voluntarios sanos (20 a 50), en los cuales se realizarán pruebas de farmacodinamia, farmacocinética y principalmente de tolerancia al medicamento con la administración de dosis totalmente controladas y paulatinamente incrementadas de una o varias formas farmacéuticas. Se acepta generalmente que se inicien pruebas de fase I cuando se cuenta, por lo menos, con datos de seguridad provenientes de pruebas de toxicidad subaguda en animales y siempre



y cuando la dosificación a utilizar en el hombre se encuentre entre un rango adecuado entre la más baja y la más alta antes probada; o bien, si existe una separación amplia entre la DE_{50} y la DL_{50} . El nivel de dosis inicial será el mínimo y se irá incrementando o disminuyendo cuidadosamente, según sea el caso, dependiendo de los efectos observados.

Fases II.

Cuando la fase I ha eliminado la probabilidad de una experiencia peligrosa o desastrosa- y se cuenta con datos preliminares sobre la dosificación- comienza la fase II, también conocida como "estudios pilotos de la eficacia". En ella se realizarán estudios comparativos de diferentes esquemas de dosificación, al inicio con voluntarios sanos internos para detallar aún más los hallazgos de la fase anterior y determinar con mayor seguridad la dosis máxima tolerada. Simultáneamente, se analizará la farmacocinética del medicamento en el ser humano, y se verificará la manifestación de efectos colaterales detectados con antelación.

La fase III o Clínico-terapéutica se inicia sólo en caso de que los resultados de la fase II indique buenos augurios en el nuevo medicamento, y es la lógica extensión hacia un número mayor de pacientes. En esta etapa se tratará de determinar, a través de estudios comparativos multicéntricos de gran escala, el beneficio real del producto en la práctica y el rango de dosis adecuada para el



tratamiento. Se realiza con un número elevado de personas (generalmente varios miles) que presenten determinada enfermedad bajo las condiciones en que se presume se utilizará el producto. Son frecuentemente coordinados por especialistas externos familiarizados con el padecimiento quienes asimismo podrán interrumpir el estudio en el caso de que los efectos adversos lo ameriten.

En la elección de pacientes se excluirá específicamente a dos sectores de la población- los menores y los ancianos- quienes serán sujetos a una investigación particular posterior, ya sea inmediatamente antes o después del programa de registro del medicamento.

En esta etapa los estudios clínicos requieren ser realizados generalmente con métodos "doble ciegos" y deben ser controlados. Uno de los mayores problemas a los que se enfrenta el investigador clínico durante esta etapa, es demostrar el efecto real del producto contra lo que se conoce como placebo.⁴¹