

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA

EFICACIA TERAPÉUTICA DEL RAVUCONAZOL FRENTE A *Candida albicans* EN UN MODELO DE VAGINITIS MURINA

Por

Q.B.P. MARIANA ELIZONDO ZERTUCHE

Como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS con  
orientación terminal en MICROBIOLOGÍA MÉDICA

Febrero, 2008

EFICACIA TERAPÉUTICA DEL RAVUCONAZOL FRENTE A *Candida albicans*  
EN UN MODELO DE VAGINITIS MURINA

Aprobación de tesis:

---

DRA. GLORIA M. GONZÁLEZ GONZÁLEZ

Directora de Tesis

---

DRA. ELVIRA GARZA GONZÁLEZ

Co-Director de Tesis

---

DR. LUIS ANGEL CECEÑAS FALCÓN

Co-Director de Tesis

---

DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO

Subdirector de Estudios de Posgrado

EFICACIA TERAPÉUTICA DEL RAVUCONAZOL FRENTE A *Candida*  
*albicans* EN UN MODELO DE VAGINITIS MURINA

Presentado por:

Q.B.P. MARIANA ELIZONDO ZERTUCHE

Este trabajo se realizó en el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría de la Dra. Gloria María González González, y la coasesoría de la Dra. Elvira Garza González y el Dr. Luis Angel Ceceñas Flacón.

---

Dra. Gloria María González González

Directora de Tesis

## DEDICATORIA

A mis padres y hermanos que me han apoyado en todo lo que me propuesto,  
gracias por su aliento y amor en todos mis momentos.

A mis amigos que aunque pocos se que su amistad es verdadera, gracias por sus  
consejos y su gran sentido del humor.

A la Dra. Gloria por su motivación, amistad y cariño.

Muchas gracias por creer en mí.

A quien me ha apoyado de manera incondicional, a ti Efrén.

GRACIAS,

Dra. Gloria Ma. González González.

Dra. Elvira Garza González

Dr. Luis Angel Ceceñas Falcón

A todo el personal del Departamento de Microbiología en especial a las Q.C.B.  
Lydia y Diana del laboratorio de Micología.

Y claro no pueden faltar Angelitos y Carlos.

# TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO.....	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Biología.....	3
1.2 Epidemiología.....	4
1.3 Patogénesis.....	6
1.3.1 Virulencia de <i>Candida albicans</i> .....	6
1.3.2 Factores predisponentes.....	7
1.3.3 Defensa del huésped.....	8
1.4 Manifestaciones clínicas.....	9
1.4.1 Candidosis vulvovaginal.....	9
1.4.2 Candidosis vulvovaginal recurrente.....	10
1.5 Resistencia antifúngica.....	11
1.5.1 Antecedentes.....	12
1.6 Tratamiento.....	12

1.6.1 Antifúngicos convencionales.....	12
1.6.1.1 Antifúngicos tópicos más comunes en el tratamiento de la vulvovaginitis.....	13
1.6.1.2 Polienos.....	14
1.6.1.3 Azoles.....	14
1.6.1.3.1 Fluconazol.....	15
1.6.1.3.2 Nuevos antifúngicos.....	16
1.6.1.3.2.1 Ravuconazol.....	16
1.6.1.3.2.1.1 Actividad <i>in vitro</i> .....	18
1.6.1.3.2.1.2 Actividad <i>in vivo</i> .....	18
1.7 Pruebas de susceptibilidad <i>in vitro</i> .....	18
1.8 Objetivos.....	20
1.8.1 Objetivo general.....	20
1.8.2 Objetivos específicos.....	20
1.9 Justificación.....	21
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	22

2.1 Estrategia general.....	22
2.2 Estudios <i>in vitro</i> .....	24
2.2.1 Aislamientos clínicos de <i>Candida albicans</i> .....	24
2.2.2 Agentes antifúngicos.....	24
2.2.3 Prueba de macrodilución.....	25
2.2.4 Control de calidad.....	26
2.3 Estudios <i>in vivo</i> .....	26
2.3.1 Cepa de ratones.....	26
2.3.2 Preparación del inóculo.....	27
2.3.3 Modelo murino.....	27
2.3.4 Regímenes terapéuticos.....	27
2.3.5 Cuantificación de la carga microbiana .....	28
2.3.5.1 Análisis estadístico.....	28
3. RESULTADOS.....	29
3.1 Actividad <i>in vitro</i> .....	29
3.2 Actividad <i>in vivo</i> .....	30

4. DISCUSIÓN.....	32
5. CONCLUSIONES.....	35
6. REFERENCIAS.....	36

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Causas de vaginitis.....	5
2. Concentraciones empleadas en los ensayos <i>in vitro</i> .....	25
3. Cepas de control de calidad y su rango de susceptibilidad <i>in vitro</i> .....	26
4. Actividad <i>in vitro</i> del ravuconazol y fluconazol contra <i>C. albicans</i> .....	29
5. Resultados del estudio <i>in vivo</i> .....	31

## LISTA DE FIGURAS

Tabla	Página
1. Morfología de <i>Candida albicans</i> .....	5
2. Estructura molecular del fluconazol.....	25
3. Estructura molecular del ravuconazol.....	26
4. Esquema de la estrategia general .....	29

## ABREVIATURAS

VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
°C	Grados centígrados
%	Por ciento
mg	Miligramo
Kg	Kilogramo
µg	Microgramo
gr	Gramo
mL	Mililitro
L	Litro
FDA	Food and Drug Administration
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
RPMI	Roswell Park Memorial Intitute
ATCC	American Type Cultura Collection
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
DMSO	Dimetilsulfoxido

CMC	Carboximetilcelulosa
MG	Media Geométrica
FLU	Fluconazol
RAVU	Ravuconazol
LOG <sub>10</sub>	Logaritmo base 10

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

La candidosis vaginal es una infección muy frecuente en la población femenina, particularmente durante la etapa sexualmente activa y durante la concepción. Constituye la causa más frecuente de visita de un paciente con su ginecólogo y se estima que un 75% de todas las mujeres experimentarán al menos un episodio de vaginitis por *Candida* spp., durante su vida (30). La incidencia de candidosis vulvovaginal aumenta en mujeres dentro del rango de 20 – 40 años de edad; más del 85% de los casos de candidosis vulvovaginal son producidos por *Candida albicans* (12) y más del 20% de las mujeres sanas son portadoras asintomáticas de este microorganismo. En Estados Unidos de América, se reportan aproximadamente 13 millones de casos de vulvovaginitis micótica anualmente, generando alrededor de 10 millones de visitas al ginecólogo (21). Estos datos y las experiencias diarias de los clínicos afirman la impresión de que las micosis humanas en general y las enfermedades vaginales micóticas en particular están en aumento. *Candida* spp., es la segunda causa de infección en vagina. Se piensa que los altos niveles de estrógenos así como un sistema inmune comprometido, hacen a las mujeres más susceptibles a la candidosis, por lo que se presenta con mayor frecuencia en mujeres embarazadas, en etapa postmenopáusica con tratamiento hormonal, mujeres diabéticas, etc. y aunado a éstos, otros factores predisponentes diversos para esta entidad clínica son el uso de ropa sintética y ajustada, la aplicación de duchas y perfumes vaginales, tratamiento con antibióticos, alergias locales, etc. (23).

Una complicación importante de la candidosis vaginal es la recurrencia, la cual se define como la aparición de 4 ó más casos de candidosis vulvovaginal en un periodo de un año

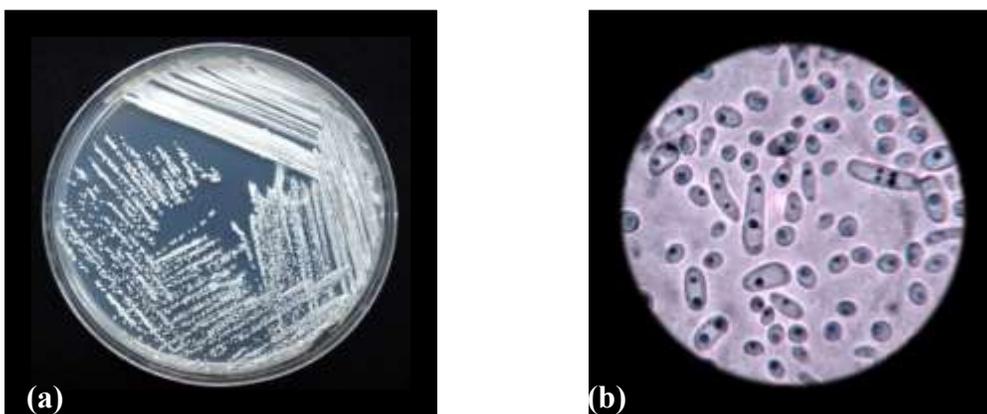
(32). La recurrencia aparece hasta en un 5% de las mujeres afectadas por candidosis (24). Tales recaídas causan gran frustración tanto en el paciente como en el clínico, pues se ha demostrado que conforme mayor es el número de episodios de recurrencia, menores son las tasas de curación de la candidosis (31). El manejo de estos casos requiere un diagnóstico etiológico preciso debido a que es crucial para una terapia apropiada, la cual deberá ser más prolongada para asegurar la eliminación de la infección, considerando los aspectos toxicológicos del fármaco a largo plazo y los posibles efectos secundarios.

La prevalencia de infecciones micóticas en pacientes de cualquier tipo, incluyendo pacientes con SIDA, cáncer y trasplantados, la relativa toxicidad de algunos fármacos existentes y la aparición de cepas resistentes debido al uso excesivo e inapropiado de los fármacos ha tenido como consecuencia la urgencia en el desarrollo de fármacos más efectivos (29).

Asimismo, la experimentación en animales es indispensable para el estudio de eficacia terapéutica en enfermedades micóticas, así como en otras enfermedades infecciosas. La información obtenida va dirigida hacia la potencia *in vivo* de un compuesto dado bajo las condiciones experimentales expuestas y de esta manera realizar inferencias acerca del valor antifúngico en el tratamiento terapéutico o profiláctico que pueda extrapolarse a la infección natural o espontánea en los seres humanos. Dado el incremento de candidosis vulvovaginal resistente a los tratamientos ordinarios, es importante realizar una evaluación de la susceptibilidad *in vitro* e *in vivo* de los fármacos convencionales y los de reciente desarrollo frente a este agente infeccioso (*C. albicans*).

## 1.1 Biología

*Candida albicans* pertenece al phylum Ascomycota, clase Ascomycetes, orden Saccharomycetales, familia Saccharomycetaceae, es un hongo dimórfico que forma largas pseudohifas, hifas y blastoconidias. Sus colonias son de rápido crecimiento, en agar Sabouraud se muestran circulares, lisas, blancas o cremosas, de bordes precisos y centro ligeramente prominente. Microscópicamente se aprecian como células esféricas o subesféricas o como blastoconidias con un tamaño de 2.0-7.0 x 3.0-8.5  $\mu\text{m}$  (Figura 1). Anteriormente se le conocía como *Candida stellatoidea* y hoy en día aún se le refiere en ocasiones como *Monilia albicans*. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C. No sobrevive durante mucho tiempo en superficies secas y, por el contrario, presenta una gran supervivencia en ambientes húmedos, al grado de haber sido aislado de cepillos de dientes, toallas y cosméticos.



**Figura 1.** Morfología de *Candida albicans*. (a) Colonia típica. (b) Vista al microscopio (100x)

En el ser humano, sus reservorios más importantes son el tracto digestivo, respiratorio y la mucosa vaginal, en donde en condiciones normales radica en equilibrio con otras bacterias de nuestro cuerpo y actúa como un saprobio, no siendo así su sólo aislamiento una señal de infección de estos sitios. Osbourne y col. obtuvieron cultivos de levaduras del 22% de 130 mujeres universitarias asintomáticas siendo *C. albicans* el 95% del total de levaduras aisladas de la mucosa vaginal (27). Sin embargo, existen factores que predisponen las infecciones vaginales por *Candida albicans* como son altos niveles de estrógeno, un sistema inmune comprometido, estar o haber estado bajo terapia antibacteriana de amplio espectro, diabetes mellitus, etc., que la convierten en un patógeno oportunista (30).

## **1.2 Epidemiología**

Existe una variedad muy diversa de infecciones y factores que producen vaginitis (Tabla 1), sin embargo *Candida albicans* es el organismo mayormente asociado con infecciones sistémicas (2, 4) y es el segundo agente causal de infecciones vaginales (el primero son las bacterias). *C. glabrata* es reconocida como la segunda especie más comúnmente presente en tal padecimiento después de *C. albicans* (13, 26).

Tabla 1. **Causas de Vaginitis**

<b>Tipo de Vaginitis</b>	<b>Causas y comentarios</b>
Candidosis vulvovaginal	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida tropicalis</i> .
Vaginosis bacteriana	<i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Mycoplasma hominis</i> , <i>Mobiluncus</i> spp y <i>Bacteroides</i> spp.
Tricomoniasis	<i>Trichomonas vaginalis</i> .
Vaginitis atrópica	Deficiencia de estrógenos.
Irritación química	Jabones, productos higiénicos (tampones, toallas sanitarias, condones de látex).
Liquen plano (tipo descamativo)	Lesiones planas, hiperqueratóticas con presencia de pus o dolorosas; se asocian a lesiones vulvares y orales.
Vaginitis alérgica	Esperma, productos higiénicos (tampones, toallas sanitarias, condones de látex o diafragmas), tintes, alergenios inhalados, exposiciones ocupacionales.
Cuerpo extraño con o sin infección o trauma	Tampones, dispositivos anticonceptivos y otros.

Las especies de *Candida* son organismos ubicuos (27). Su notoria incidencia se ha reportado mayormente en pacientes inmunocomprometidos, tales como los que están en cuidados intensivos, VIH-positivos, post-cirugía, transplantados, etc. Se aíslan con mayor frecuencia de la cavidad oral y son detectadas aproximadamente del 31 – 55% de individuos saludables, sin embargo bajo ciertas condiciones puede comportarse como un patógeno oportunista.

Actualmente es el hongo mayormente encontrado en sangre y es el cuarto organismo más comúnmente aislado de la misma (4, 14, 22,). Poco se sabe con certeza sobre las fuentes originales y principales de distribución de *C. albicans* y los reservorios de la misma. Sin lugar a dudas, son necesarios más estudios y mayor investigación para poder definir de manera más completa los aspectos cruciales de su epidemiología y poder marcar las medidas, técnicas y herramientas necesarias para prevenir su continua distribución.

## **1.3 Patogénesis**

### **1.3.1 Virulencia de *Candida albicans***

Se conocen diferentes factores que contribuyen a la virulencia de *Candida albicans*, dentro de los que se incluyen la adherencia a células epiteliales y endoteliales, producción de proteinasas, formación de hifas y pseudohifas, cambio fenotípico, producción de fosfolipasas y modulación antigénica como resultado de la formación de pseudohifas. Ciertamente la formación de pseudohifas es una vía reconocida de elevada adherencia e invasión de tejidos, así como una forma de aumentar la producción de enzimas proteolíticas y la modulación antigénica. La producción de proteinasas se encuentra asociada a la patogenicidad de *C. albicans* (6). Algunas cepas virulentas comúnmente producen aspartil proteinasa; estas cepas son más patogénicas en una gran variedad de modelos animales experimentales para la candidosis (6, 8).

La adherencia es un factor de virulencia de suma importancia. Aunque la sola propiedad de adherencia está complementada por otros factores de virulencia, tal como la hidrofobicidad de la superficie celular, la cual se ve afectada por condiciones del medio y puede afectar la adherencia específica basada en interacciones de los receptores de

adhesina. La presencia de receptores de fibronectina y laminina, proteínas de unión de fibrinógeno, y manoproteínas de adhesina, se considera también como un elemento importante en la adhesión a las células epiteliales y/o endoteliales.

Las fosfolipasas que producen un daño a la membrana extracelular son consideradas como factores de virulencia de *C. albicans* (18). Aunque estas enzimas no se han estudiado de forma extensa, la fosfolipasa A y B y la lisofosfolipasa-transacilasa son producidas por cepas de *C. albicans*. Estas cepas productoras de fosfolipasas también son las que más fuertemente se adhieren a las células epiteliales. Además, la producción de fosfolipasas mostró una correlación con la patogenicidad de la cepa productora y fue predictiva con la mortalidad en los modelos animales (18, 3). Otro factor de virulencia es la inestabilidad fenotípica inespecífica de *C. albicans*, la cual permite que las cepas cambien el fenotipo de la colonia sin afectar el genotipo identificable, lo que se denomina en inglés como "phenotypic switching" (33). Aunque este factor se ha estudiado ampliamente como un fenómeno *in vitro*, existe alguna evidencia de cambios fenotípicos *in vivo* y una asociación de estos fenotipos cambiados con la virulencia. También se ha reportado el cambio fenotípico en cepas aisladas de mujeres con vaginitis recurrente por *C. albicans* (34).

### **1.3.2 Factores predisponentes**

Existen muchos factores que causan cambios en el medio ambiente vaginal o en la secreción de la misma, dichos factores juegan un papel muy importante en el desarrollo de vaginitis por *Candida*. El embarazo predispone tanto a una infección primaria como, de forma más importante, a las recurrencias. La infección en esta situación conlleva un reto terapéutico importante debido al alto nivel de glucógeno producido por el epitelio vaginal

estimulado por los altos niveles estrogénicos gestacionales. Esto facilita la multiplicación micótica. Además, los niveles elevados de progesterona tienen efectos supresores de la inmunidad celular. Del mismo modo la utilización de anticonceptivos orales lleva a la aparición de micosis vaginal. Cualquier alteración en los niveles de glucosa (especialmente en situaciones de hiperglucemia y en cualquier estado en el que se produce una elevación del glucógeno vaginal) puede promover una candidosis vulvovaginal. El glucógeno además promueve la capacidad de adhesión de los hongos (28).

La terapia con antibióticos de amplio espectro provoca la disminución de la flora vaginal que es el principal mecanismo de defensa contra los hongos, ya que ésta mantiene un nivel de pH ácido (36). De igual manera una condición de inmunocompromiso, el uso de corticosteroides, antivirales y antifúngicos (fluconazol), promueven una candidosis vaginal.

### **1.3.3 Defensa del huésped**

La flora vaginal constituida por lactobacilos (*Lactobacillus acidophilus*) elaboran productos ácidos manteniendo así un ambiente inhabitable para muchos microorganismos, además producen peróxido de hidrógeno. Las candidinas, bacteriocinas y lactocinas, podrían estar involucradas en la regulación de la incidencia de hongos levaduriformes en la flora vaginal (23). Los lactobacilos actúan en dos diferentes niveles. En primer lugar compiten con los hongos por los nutrientes, en segundo mediante un proceso de coagregación, en donde los lactobacilos son capaces de bloquear los receptores epiteliales, compitiendo de esta forma la adhesión al epitelio vaginal. Este mecanismo de defensa es considerado el más importante. El papel defensivo de los lactobacilos puede explicar el

hecho de que un tratamiento con antibióticos pueda desencadenar una micosis vaginal por depleción de la flora vaginal (36).

Por otra parte en pacientes inmunodeprimidas que presentan candidosis vulvovaginal recurrente, es evidente que los anticuerpos locales, IgA, juegan un papel crucial en la defensa del huésped ya que los niveles bajos de IgA pueden provocar una menor respuesta inflamatoria y la disminución cuantitativa y cualitativa de los linfocitos T, este es un hecho que explica su alta frecuencia en pacientes con VIH, neoplasias o transplantados.

Se ha descrito una cantidad considerable de trabajos sobre las defensas del huésped en contra de *C. albicans*. Gracias a ello, actualmente se comprenden ligeramente los mecanismos contra infecciones por esta levadura, tanto superficiales como sistémicas. Observaciones clínicas y estudios experimentales sugieren que los leucocitos polimorfonucleares son el tipo de célula predominante que protege en contra de candidemias y candidosis sistémicas. Esta información está fundamentada clínicamente por el hecho de que los pacientes neutropénicos son particularmente sensibles a las infecciones por *C. albicans* (9, 10, 11, 12).

## **1.4 Manifestaciones Clínicas**

### **1.4.1 Candidosis vulvovaginal**

El 40% de las mujeres con vaginitis por *Candida* spp., sufren de una situación clínica no complicada, un 30% experimentan episodios esporádicos de severidad bajo o moderada y un 20% son portadoras asintomáticas sin factores predisponentes. En contraste, aproximadamente de un 5-10% de las mujeres sufren de vaginitis complicada

en la que los accesos son de una severidad más alta o suceden de manera recurrente (37). Las pacientes con candidosis vulvovaginal generalmente reportan uno o varios de los siguientes síntomas: prurito vulvovaginal (50%), hinchazón vulvovaginal (24%) y disuria (33%). La descarga vaginal característica es espesa y de color blanco, comúnmente comparada con el queso cottage (38). Debido a que estos síntomas no son exclusivos de la candidosis vulvovaginal, el clínico deberá tomar en cuenta el diagnóstico del laboratorio para la identificación precisa del agente etiológico.

#### **1.4.2 Candidosis vulvovaginal recurrente**

Se define como la aparición confirmada de 4 o más episodios de candidosis vulvovaginal en un período de un año. Este tipo de candidosis es más difícil de tratar que una infección no complicada por *Candida* spp. Sobel y col. demostraron que las tasas de curación en mujeres con un historial de 4 o más episodios de candidosis vulvovaginal en los 12 meses anteriores, eran significativamente menores que las observadas en mujeres con 3 episodios o menos (54.1% vs. 75.1%) (31). Por lo tanto, es importante que la infección actual sea tratada correctamente, para evitar la recurrencia. Se recomienda que las mujeres con candidosis vulvovaginal recurrente se sometan a un tratamiento más prolongado, lo que ha disparado una diversidad de opiniones en cuanto a la duración del tratamiento, ya que en períodos largos de tratamiento, los aspectos más importantes a considerar es la toxicidad del fármaco (por ejemplo hepatotoxicidad) y la posible resistencia que la levadura pueda generar al antifúngico. La duración del tratamiento se ve modificada por el fármaco de elección y su modo de empleo, sin embargo, es importante mantener una observación constante para evaluar la evolución del episodio y determinar posibles modificaciones al tratamiento de la vaginitis.

## 1.5 Resistencia antifúngica

La resistencia antifúngica puede dividirse en dos categorías: resistencia clínica y resistencia microbiológica. La resistencia clínica se refiere a la falta de respuesta clínica al agente antifúngico utilizado. Esto puede deberse a la presencia de bajos niveles de la droga en suero y/o tejidos por numerosas razones. Otra razón significativamente importante es el estado inmunosuprimido del paciente, en el cual el agente antifúngico por sí solo, a pesar del empleo de altas concentraciones, no es suficiente para eliminar la infección.

La resistencia microbiológica puede a su vez subdividirse en resistencia primaria y resistencia secundaria. A la resistencia primaria también se le puede llamar resistencia innata o intrínseca y ocurre cuando el organismo es naturalmente resistente al agente antifúngico (por ejemplo, *C. krusei* es universalmente resistente a fluconazol) (35). Por otro lado, la resistencia secundaria o resistencia adquirida, se refiere a las cepas que se convierten en resistentes a la droga durante el tratamiento, esto debido a un mal manejo del antifúngico como lo es: la duración del tratamiento, la dosis indicada por el médico y los intervalos de tiempo entre una dosis y otra. Esta forma de resistencia, la cual era rara en el pasado, es la forma más frecuentemente reportada en pacientes con SIDA con candidosis orofaríngea y su frecuencia varía según el fármaco y condiciones del paciente. Un número de estudios ha estimado que la incidencia de la resistencia clínica al fluconazol va de 6 a 36%, dependiendo del grupo de pacientes estudiado y el tipo de caso tratado. Se observó que los factores de riesgo eran de importancia en el desarrollo de infecciones por *Candida* spp., resistentes durante la exposición al fluconazol y el grado de inmunosupresión (1, 7, 19).

### **1.5.1 Antecedentes**

La resistencia en especies de *Candida* era virtualmente inexistente antes de la llegada del VIH. Actualmente, se han descrito numerosos reportes de diversas candidosis que presentan resistencia a todo tipo de agente antifúngico tanto azoles como polienos. La resistencia ha emergido también debido a la presión ejercida por la acción de los numerosos fármacos que existen actualmente, dando lugar a numerosas cepas de levaduras que producen enfermedades fúngicas invasivas y debilitantes muy difíciles de erradicar. Por mucho, la forma más común de resistencia encontrada en cepas aisladas es la secundaria; a pesar de que se han encontrado casos de resistencia primaria en aislados vaginales, la tasa de ocurrencia no se compara con la resistencia secundaria. Los mecanismos mediante los cuales la resistencia secundaria es producida se desconocen a ciencia cierta, pero se han realizado estudios *in vitro* que demuestran el desarrollo de la resistencia secundaria y su posterior eliminación de la resistencia (32).

## **1.6 Tratamiento**

### **1.6.1 Antifúngicos convencionales.**

Después de 1980 los agentes tópicos fueron aprobados por la FDA para el tratamiento de candidiasis vulvovaginal entre los que se encuentran: miconazol, clotrimazol, miconazol, butoconazol, el terconazol y la nistatina, entre otros. Estos han dado buenos resultados en la terapia proporcionando una eficiencia del 80 al 90 % en terapias de corto plazo.

### 1.6.1.1 Antifúngicos tópicos más comunes en el tratamiento de la

#### vulvovaginitis

Butoconazol: Posee un espectro de actividad frente a *Candida spp.*, así como dermatofitos, su efectividad frente a candidosis vaginal es mejor que el Clotrimazol y Miconazol.

Clotrimazol: Fue el primero de los imidazoles en comercializarse. Posee actividad contra levaduras del género *Candida*, dermatofitos y algunas amebas. Su espectro de acción supera a la Griseofulvina y Nistatina frente a o los hongos filamentosos, por vía tópica es seguro y eficaz en candidosis vaginal y cutáneas, puede presentar efectos adversos como ardor leve, eritema, edema, vesículas, descamación, prurito y urticaria.

Miconazol: Su actividad *in vitro* abarca hongos dermatofitos, dimórficos, filamentosos, levaduras, etc. Es útil en el tratamiento de *P. versicolor*, dermatofitos y candidosis cutánea y vaginal. Su aplicación tópica se caracteriza por una buena penetración en el estrato córneo permaneciendo por 4 horas y produciendo una absorción mínima en la piel. Puede presentar irritación local y efectos adversos poco relevantes. La tasa de recuperación es de 75 a 100 % a las 4 semanas de tratamiento.

Terconazol: Ha demostrado ser altamente eficaces contra cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis*, y *C. glabrata*, levaduras que con mayor frecuencia son las causantes de las candidosis vulvovaginales. Además, no afecta la flora vaginal normal (lactobacilos). Por ser antimicótico de uso local (vaginal y cutáneo), tanto en forma de óvulos como en forma de crema, no posee niveles de absorción sistémica significativa. Después de la administración tópica ya sea de óvulos o de crema, la absorción en ambos casos es lenta y limitada. El terconazol se elimina a través de la orina y las heces, en las primeras horas posteriores a la administración.

Tioconazol: Posee amplio espectro de acción *in vitro* contra levaduras y dermatofitos. Es más activo que el Miconazol frente a *Candida* spp., y *C. neoformans*. Su absorción es despreciable por vía cutánea o vaginal incluso si se emplea al 28%. Es eficaz en el tratamiento cuando existe una sobre infección por bacterias sensibles al mismo (39).

#### **1.6.1.2 Polienos**

La nistatina es un antifúngico que se obtiene a partir de *Streptomyces noursei*. Está indicada en el tratamiento de las candidiasis en las mucosas oral, vulvovaginal e intestinal, así como en el tratamiento de las infecciones micóticas cutáneas y mucocutáneas. La nistatina es fungistática y fungicida *in vitro* contra una variedad de levaduras; no se absorbe a través de la piel o membranas mucosas intactas. Actúa al unirse con esteroides en la membrana celular de los hongos, en donde ocasiona cambios en la permeabilidad de la misma, que ocasionan la salida de componentes intracelulares, no tiene actividad apreciable en contra de bacterias, protozoarios o virus.

La nistatina es generalmente bien tolerada en todas las edades, inclusive por infantes debilitados o en tratamientos prolongados. No es tóxica ni sensibilizante. Rara vez, puede ocurrir irritación y sensibilización, hay que discontinuar el tratamiento si esto ocurre.

Con dosis muy elevadas se ha informado ocasionalmente diarrea, náusea, vómito y dispepsia. En raras ocasiones se ha observado exantema y urticaria. Muy raras veces se ha reportado síndrome de Stevens-Johnson.

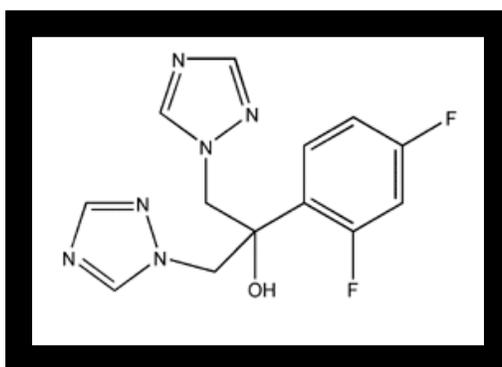
#### **1.6.1.3 Azoles**

Son un grupo de fármacos fungistáticos sintéticos que se caracterizan por poseer un anillo imidazólico que contienen 2 o 3 nitrógenos. El principal efecto es la inhibición de

la esterol C-14  $\alpha$  desmetilasa en los hongos, que es un sistema de enzimas que depende del citocromo p450 microsomal, de este modo, estos fármacos bloquean la biosíntesis de lanosterol a ergosterol en la membrana citoplásmica y permiten la acumulación de los 14- $\alpha$ -metilesteroles. Estos metilesteroles pueden alterar la disposición de las cadenas acil-fosfolipidos 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 los hongos (40).

#### 1.6.1.3.1 Fluconazol

El fluconazol es un triazol que fue aprobado para su uso en la práctica clínica en 1990. Sus excelentes propiedades farmacocinéticas y su escasa toxicidad le han convertido en un fármaco excelente para la prevención y el tratamiento de la infección por *Candida* spp. y *Cryptococcus* spp. El fluconazol es hidrosoluble. Su absorción oral es muy rápida y completa (85 -90%). Posee una elevada penetración en los líquidos biológicos de todo el organismo, se elimina principalmente por orina, aunque en gran parte se reabsorbe en lo túbulos renales. Un 10 % se recupera en la orina como glucurónido y el 2% en las heces.



**Figura.2** Estructura molecular del fluconazol

Es muy eficaz en el tratamiento de las infecciones por *Candida* spp., y se considera el antifúngico de elección para muchas de ellas como *C. albicans* en la candidosis vulvovaginal, ya que más de 80% de las pacientes tratadas presentan una recuperación satisfactoria. Desafortunadamente, algunas especies como *C. glabrata* y *C. krusei* no son sensibles al fluconazol; en este sentido, se debe evitar el uso del mismo en el tratamiento inicial de candidosis en pacientes que reciben profilaxis con azoles (41).

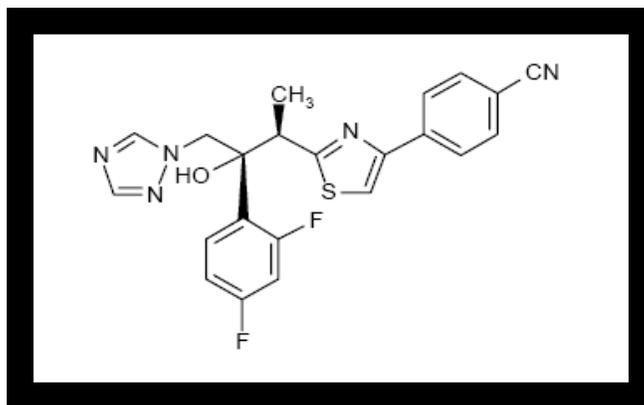
### **1.6.1.3.2 Nuevos antifúngicos**

Las resistencias y las limitaciones de tolerabilidad de los triazoles actuales ha promovido el desarrollado de nuevas alternativas terapéuticas frente a un amplio rango de agentes etiológicos y frente a una amplia variedad de situaciones clínicas como es el caso de la candidosis vulvovaginal. Los nuevos triazoles como el ravuconazol es un candidato atractivo para el tratamiento de la candidosis vulvovaginal.

#### **1.6.1.3.2.1 Ravuconazol**

El ravuconazol (BMS 207147), es un derivado triazólico fluorado, relacionado estructuralmente con el fluconazol y voriconazol, el núcleo fundamental es el triazol, que presenta tres átomos de nitrógeno, además la molécula posee átomos de flúor que le confiere una mayor capacidad inhibitoria de las enzimas de la vía de síntesis de los esteroides, especialmente la 14  $\alpha$  desmetilasa del lanosterol, cuya enzima es la responsable de la formación del ergosterol. La disminución del ergosterol, junto con el acúmulo de precursores esterol metilados, resulta en la inhibición del crecimiento de la célula fúngica, muerte celular o ambas.

Posee una vida media de más de 120 horas, una capacidad de unión a proteína mayor del 90% y es insoluble en agua. La estructura se muestra en la Figura 3.



**Figura.3** Estructura molecular del ravuconazol

Es altamente activo *in vitro* frente a *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, así como en otras especies de levaduras incluyendo aquellas que no son susceptibles al fluconazol. También ha mostrado un buen espectro de actividad *in vitro* frente a cepas resistentes al fluconazol e itraconazol como lo son *C. albicans* y *C. dubliniensis*. El ravuconazol presenta buenos parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos: 8 horas después de la administración oral de 10mg/Kg de peso en ratas, la máxima concentración de droga en plasma fue de 1.68 µg/mL, y la concentración en tejidos fue dos veces más alta que la concentración correspondiente en sangre. Se encuentra actualmente en estudios clínicos fase III de investigación.

El ravuconazol puede ser bien tolerado en dosis únicas de hasta 400 mg/día y a 800 mg/día por 14 días. El efecto adverso más reportado fue cefalea. Dado lo anterior este fármaco puede ser un buen candidato para el tratamiento de infecciones fúngicas causadas por *Candida* spp., *Aspergillus* spp., y *Cryptococcus neoformans* (45, 46, 47).

#### **1.6.1.3.2.1.1 Actividad *in vitro***

El espectro antifúngico del ravuconazol es amplio e incluye agentes de infecciones fúngicas invasivas y en mucosas como levaduras entre las que se encuentran *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Pichia* spp., *Geotrichum* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula* spp., y *Trichosporon* spp. También es activo frente a hongos filamentosos entre los que se incluyen *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Paecilomyces* spp., *Scedosporium apiospermum*, *Chaetomium*, *Microsporum* e hifomicetos hialinos y dermatofitos (46,48, 49).

#### **1.6.1.3.2.1.2 Actividad *in vivo*.**

Su actividad *in vivo* ha sido probada en modelos de candidosis orogástrica por *Candida albicans* en ratones, en abscesos intrabdominales causados por *C. albicans* en ratas, en aspergilosis diseminada en cobayos, en modelos murinos de histoplasmosis sistémica, así como también en modelos animales inmunocomprometidos con aspergilosis pulmonar, candidosis sistémica, cryptococosis intracraneal e histoplasmosis (46, 48).

### **1.7 Pruebas de susceptibilidad *in vitro***

El objetivo primario de todas las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* es ayudar a predecir el efecto terapéutico *in vivo* del agente antimicrobiano de interés en la infección que es causada por un patógeno específico. Esto es válido para cualquiera de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* llevadas a cabo tanto para el cuidado de pacientes, como para el desarrollo o ensayo de fármacos nuevos o para el seguimiento de estudios

epidemiológicos (42). Los métodos que se utilizan para realizar las pruebas de susceptibilidad a antifúngicos incluyen los métodos de dilución en caldo (macro y micro dilución), el método de dilución en agar y la prueba de difusión en disco. Los métodos de dilución en caldo son los más ampliamente usados y son los métodos de referencia para organismos levaduriformes (43). La aparición de resistencia a agentes antifúngicos ha producido impacto clínico y epidemiológico. Estos factores han creado la necesidad de establecer métodos de susceptibilidad antifúngica *in vitro* estandarizados, reproducibles y con relevancia clínica que ayuden en la toma de decisiones terapéuticas, permitan el estudio de nuevas drogas y proporcionen un medio para monitorear el desarrollo de resistencia en estudios epidemiológicos.(44). El objetivo del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) fue desarrollar un método eficaz de referencia para pruebas de susceptibilidad de levaduras *in vitro* y buscar que se correlacionara con la respuesta clínica. Como resultado, el CLSI propuso el método de referencia M27-A2 para levaduras como *Candida* spp. y *Cryptococcus neoformans*, el cual provee resultados cuantitativos en base a la concentración mínima inhibitoria (CMI) (43).

## **1.8 Objetivos**

### **1.8.1 Objetivo general**

Evaluar la actividad *in vitro* e *in vivo* del ravuconazol frente a *Candida albicans* y compararla con la del fluconazol.

### **1.8.2 Objetivos específicos**

1. Determinar la actividad *in vitro* del ravuconazol y fluconazol contra aislamientos clínicos de *Candida albicans*.
2. Evaluar la actividad *in vivo* del ravuconazol en un modelo de vaginitis murina.

## 1.9 Justificación

Dado el aumento en la incidencia de *C. albicans* en la vulvovaginitis y su resistencia a los antifúngicos convencionales, surge la necesidad de llevar a cabo una evaluación *in vitro* e *in vivo* ante nuevos antifúngicos para determinar su posible utilidad en la terapia de la vulvovaginitis por *Candida albicans*.

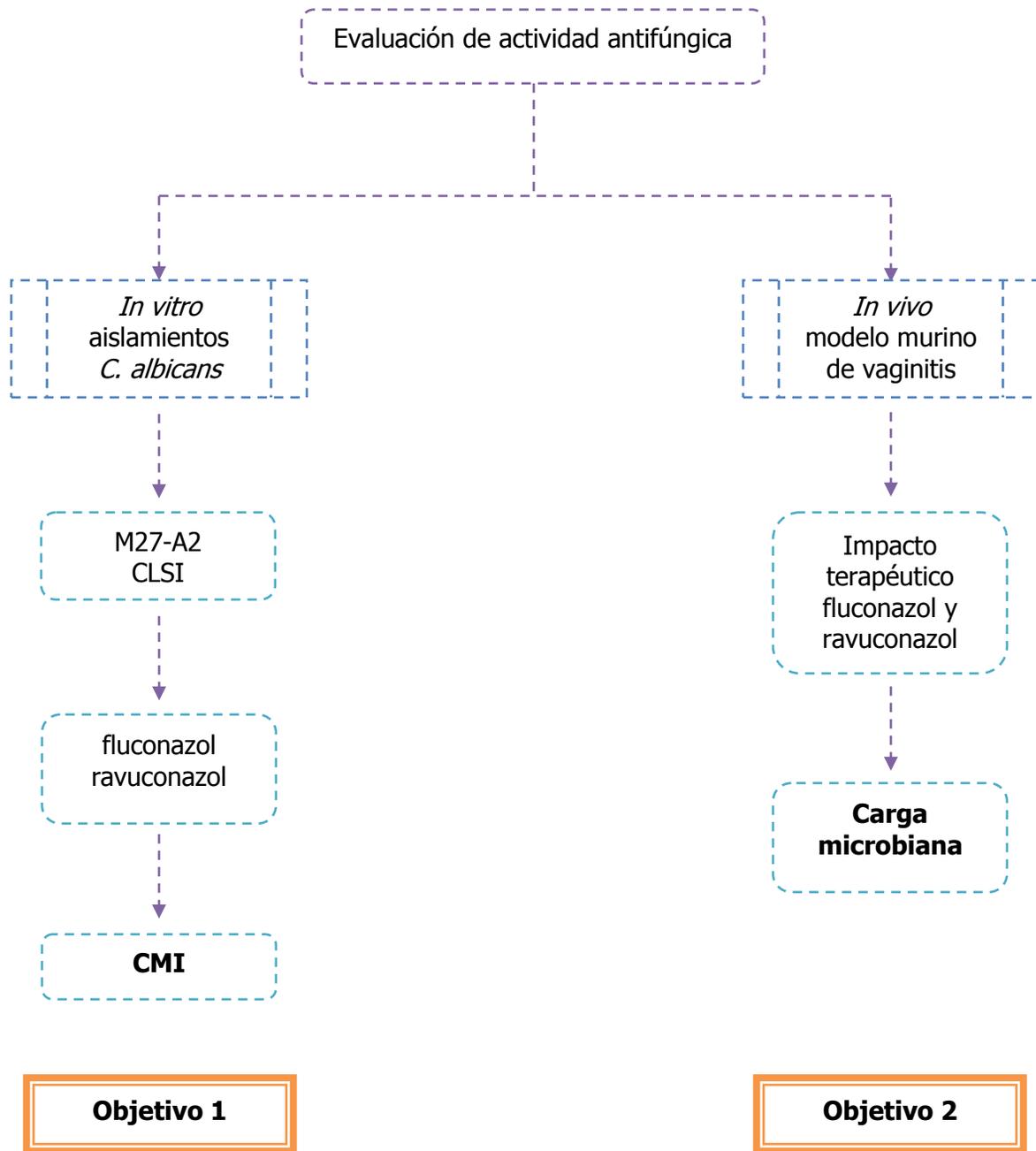
## **CAPÍTULO 2**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **2.1 Estrategia general**

En la Figura 4 se muestra la estrategia general que se siguió para cumplir con los dos objetivos que se plantearon en el presente estudio. Se evaluó la actividad antifúngica *in vitro* a partir de aislamientos clínicos de *C. albicans* y siguiendo el protocolo M27-A2 del CLSI se evaluó la actividad del fluconazol y ravuconazol. En el estudio *in vivo* en un modelo murino de vaginitis se evaluó el impacto terapéutico del fluconazol y ravuconazol tomando como parámetro la carga microbiana.

**Figura 4.** Esquema de la estrategia general



## **2.2 Estudios *in vitro***

### **2.2.1 Aislamientos clínicos de *Candida albicans***

Se obtuvieron 40 aislamientos de *C. albicans* (ver Tabla 2) a partir de un estudio realizado en colaboración con la Consulta Externa de Ginecología del Hospital Universitario " Dr. José Eleuterio González" y el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UANL en el cual se estudiaron 100 pacientes con síntomas de vulvovaginitis. Las cepas se aislaron en el laboratorio de Micología del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas. Los aislamientos se realizaron en agar Sabouraud o agar papa dextrosa, fueron incubadas a 37 °C por 48 horas. Se realizaron pruebas morfológicas como filamentación y producción de clamidosporas así como pruebas fisiológicas en el sistema API 20C AUX para su identificación precisa.

Las cepas se mantuvieron en suspensión con agua destilada estéril a temperatura ambiente hasta que los ensayos se llevaron a cabo.

### **2.2.2 Agentes antifúngicos**

El polvo puro de ravuconazol se utilizó para los estudios de susceptibilidad *in vitro* y se obtuvo del instituto de investigaciones Bristol Mayer Squibb. El fluconazol, se obtuvo en su forma comercial Diflucan de solución inyectable en presentación de frasco ampula de 50 ml y con una concentración de 2 mg/ml.

Se prepararon diluciones seriadas con concentraciones diferentes para cada fármaco (ver tabla 3), de las cuales 0.1 ml fueron transferidos a tubos de ensayo estériles para el fluconazol y 0.01 ml fueron transferidos a tubos de ensayo estériles para el ravuconazol, fueron almacenados a una temperatura de -70 °C hasta su empleo. Debido a que

ravuconazol es insoluble en agua, las diluciones fueron realizadas con dimetil sulfóxido (DMSO) como disolvente.

Tabla 2. **Concentraciones empleadas en los ensayos *in vitro***

Fármaco	Concentraciones ( $\mu\text{g/ml}$ )
Ravuconazol	8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.06, 0.03, 0.015.
Fluconazol	64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125.

### 2.2.3 Prueba de macrodilución

Los aislamientos de *C. albicans* fueron evaluados siguiendo los criterios establecidos en el protocolo M27-A2 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Los cultivos jóvenes de cada cepa se obtuvieron en agar Sabouraud y las cepas se resuspendieron en solución salina estéril y ajustadas a  $85 \pm 1\%$  de transmitancia a una longitud de onda de 530 nm. Las suspensiones fueron diluidas 1:100 en solución salina y posteriormente fueron diluidas 1:20 en RPMI-1640 para ambos fármacos. A los tubos previamente preparados con 0.1 ml y 0.01 ml respectivamente del fármaco se les inoculó 0.9 ml de las suspensiones. Los tubos fueron incubados a  $37^\circ\text{C}$  por 48 horas después se realizaron visualmente las lecturas de CMI, la cual se definió como la concentración más baja del fármaco que mostrara un 80% de reducción en el crecimiento en comparación con el tubo control libre de droga.

Para cada ensayo de ravuconazol se incluyó un tubo adicional con 0.01 ml de DMSO en ausencia de fármaco como control del efecto inhibitorio del solvente.

### 2.2.4 Control de calidad

Para el control de calidad de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* se incluyeron las cepas de *Candida krusei* ATCC 6258 y *Candida parapsilosis* ATCC 22019. Los rangos de susceptibilidad aceptados para los antifúngicos correspondientes se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. **Cepas de control de calidad y su rango de susceptibilidad *in vitro***

Antifúngico	<i>Candida krusei</i> (ATCC 6258) ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 22019) ( $\mu\text{g/mL}$ )
Fluconazol	16 – 64	2 - 8
Ravuconazol	0.06 – 0.5	0.015 – 0.25

### 2.2.5 Análisis estadístico

Se determinó el rango, media geométrica, CMI50% y CMI90% de los resultados obtenidos con las pruebas de susceptibilidad *in vitro*.

## 2.3 Estudios *in vivo*

### 2.3.1 Cepa de ratones

Se adquirieron 80 ratones hembras BALB/cAnNHsd (Harlan México S. A. de C.V.) de 4 a 6 semanas de edad y con 18 a 20 g de peso. Se formaron grupos de 10 ratones para cada tratamiento incluyendo al grupo control. Se colocaron 5 ratones por caja con alimento y agua *ad libitum*.

### **2.3.2 Preparación del inóculo**

A partir de los resultados obtenidos en las pruebas de susceptibilidad *in vitro* se seleccionó una cepa de *C. albicans* (HU-5891) resistente al fluconazol (CMI de 64 µg/ml). La cepa de *C. albicans* seleccionada fue sembrada en placas Petri con agar Sabouraud a 37°C por 48 horas. Con ayuda de asas estériles la cepa fue transferida a matraces con medio RPMI-1640 enriquecido con dextrosa y peptona (10gr/L) respectivamente, que fueron incubados en agitación por 48 horas a 37°C. Posteriormente la cepa fue concentrada mediante centrifugación y se desechó el sobrenadante. El precipitado fue cuantificado por medio de un hematocitómetro y su viabilidad fue confirmada con resiembras en placa Petri con agar Sabouraud a 37°C por 48 horas.

### **2.3.3 Modelo murino**

Se preparó un inóculo de  $2.54 \times 10^8$  UFC/ml de *C. albicans*. La concentración fue confirmada mediante cultivos a partir de diluciones. Los ratones fueron anestesiados con 0.2 ml de ketamina, administrada intraperitonealmente. Cada ratón recibió 20 µl de la suspensión de *C. albicans* intravaginalmente. 3 días antes y los días 4, 11 y 18 después de la infección, los ratones recibieron una inyección subcutánea de 0.1 ml de valerato de estradiol (Delestrogen, King Pharmaceuticals) en una concentración de 5 mg/ml con el fin de inducir un estado de pseudoestro y asegurar el establecimiento de la infección.

### **2.3.4 Regímenes terapéuticos**

Se emplearon regímenes de 20 mg/kg administrados una vez y dos veces al día para el fluconazol y 1, 5, 10 y 20 mg/kg administrados una vez al día y de 20 mg/kg aplicado dos veces al día para ravuconazol, los tratamientos fueron administrados vía oral

en un volumen de 0.2 ml durante 5 días, iniciando 24 horas después de la infección. El grupo control recibió 0.2 ml de una suspensión de dimetil sulfóxido al 10%/carboximetilcelulosa al 0.5% (10%DMSO/0.5%CMC) por vía oral. Se mantuvo un tiempo de 4 horas entre cada administración para los grupos que recibieron tratamiento dos veces al día.

### **2.3.5 Cuantificación de la carga microbiana**

Los días 1, 6 y 20 después de la infección, se realizaron estudios cuantitativos de la carga microbiana vaginal. Se utilizaron aplicadores de algodón estériles ultra finos con alginato de calcio (Fisherbrand) para realizar los exudados vaginales. Cada aplicador fue posteriormente colocado en un tubo con 0.9 ml con solución salina. Los tubos fueron agitados en vortex y se realizaron diluciones a partir del tubo inicial, de las cuales 0.1 ml fueron sembrados en placas Petri con agar Mycosel por 48 horas a 37°C para determinar la cantidad de UFC/mL presentes. Los muestreos del día 1 post-infección se realizaron antes de la administración del fármaco. Todas las siembras se realizaron por duplicado. El día 21 los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical.

#### **2.3.5.1 Análisis estadístico**

Para evaluar la eficacia terapéutica del estudio de carga microbiana se utilizó la prueba de Mann-Whitney  $U$ -test con un valor  $P < 0.05$  que determinó el nivel de significancia de las diferencias con respecto al control.

## CAPÍTULO 3

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Actividad *in vitro*

En la Tabla 4 se muestran los resultados de los ensayos de susceptibilidad antifúngica *in vitro* de 40 aislamientos clínicos de *C. albicans*. Los datos están reportados como rango, media geométrica y CMI ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) necesarios para inhibir el 50% y 90% de los aislamientos de *C. albicans* ensayados. A partir de los resultados obtenidos en la pruebas de susceptibilidad *in vitro*, se evidenció la potencia del ravuconazol.

Tabla 4. **Actividad *in vitro* de ravuconazol y fluconazol contra *C. albicans***

Fármaco	MIC 48 h ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )			
	Rango	MG <sup>a</sup>	50% <sup>b</sup>	90% <sup>c</sup>
<i>C. albicans</i> (n=40)				
Fluconazol	0.125 - 64	0.5	0.25	2
Ravuconazol	0.015 - 8	0.053	0.03	2

<sup>a</sup> MG, media geométrica

<sup>b</sup> CMI que inhibe al 50% de la cepas

<sup>c</sup> CMI que inhibe al 90% de las cepas

### 3.2 Actividad *in vivo*

En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos en los ensayos de impacto terapéutico del fluconazol y ravuconazol en el modelo murino de vaginitis de la cepa resistente al fluconazol de *C. albicans*. Los datos están reportados como Log base 10 de la media de las unidades formadoras de colonias (UFC) por grupo antes del tratamiento y en los días 6 y 20 después de la infección. Los resultados se analizaron en base a la prueba de Mann-Whitney donde la  $P < 0.05$  fue estadísticamente significativo al comparar con el grupo control.

En la columna de la izquierda los resultados pre-tratamiento nos indican que la infección se estableció en todos los grupos de tratamiento. En el día 6 después de la infección se puede observar que el grupo control mantuvo la infección y en los grupos de tratamiento tanto con el fluconazol y el ravuconazol hubo un decremento en la carga microbiana conforme aumentó la dosis del antifúngico. El día 20 después de la infección se observó que el grupo control sigue manteniendo la infección inclusive con un ligero incremento en la carga microbiana y los grupos tratados con fluconazol la carga microbiana se mantuvo muy semejante a la del día 6 después de la infección. Sin embargo, los grupos tratados con ravuconazol continuó la disminución en la carga microbiana de manera dependiente de la dosis con respecto al control libre de fármaco.

Tabla 5. **Resultados del estudio *in vivo***

Tratamiento (dosis [mg/kg])	LOG <sub>10</sub> de la media de UFCs por grupo		
	Día 1 Post-infección	Día 6 Post-infección	Día 20 Post-infección
Control	5.673	5.674	6.597
FLU (20)	5.608	3.866	3.874
FLU (20) 2 veces/día	5.829	3.173	3.441
RAVU (1)	5.609	4.567	3.749
RAVU (5)	5.656	4.732	3.565
RAVU (10)	5.467	4.464	3.471
RAVU (20)	5.389	4.169	3.205
RAVU (20) veces/día	5.779	3.744	3.00

El ravuconazol mostró una mejor actividad antimicótica *in vivo* que el fluconazol en el modelo murino de vaginitis por *Candida albicans*.

## CAPÍTULO 4

### DISCUSIÓN

La candidosis vulvovaginal recurrente supone, por su frecuencia y difícil tratamiento, un problema sanitario de indudable importancia, ya que es considerada un problema mundial afectando a millones de mujeres.

Históricamente las mujeres con infección vaginal por *C. albicans* han respondido satisfactoriamente al tratamiento con antifúngicos convencionales como el fluconazol, sin embargo, diversos autores han observado el incremento en la incidencia y resistencia de *C. albicans* al fluconazol (50, 51, 52, 53).

En nuestro trabajo se logró visualizar la susceptibilidad variable del fluconazol y ravuconazol, debido a que se obtuvo un rango de actividad de 0.125 – 64 µg/mL para el fluconazol y 0.015 – 8 µg/mL para el ravuconazol abarcando desde cepas susceptibles hasta resistentes. En este estudio, determinamos la actividad *in vitro* del fluconazol y ravuconazol, demostrando que nuevos triazoles como el ravuconazol tienen mayor actividad antifúngica que fármacos convencionales como el fluconazol. Estos resultados son similares a los reportados por Estrella y cols, (46) donde en 569 aislamientos clínicos de *C. albicans* susceptibles al fluconazol y 92 resistentes al mismo, utilizando el método M27-A2 de CLSI evaluaron la actividad *in vitro* y obtuvieron para el ravuconazol un rango de 0.01 – 0.5 µg/mL para las cepas susceptibles y un rango de 0.01 – 16 µg/mL para las resistentes. Estos datos confirman que el ravuconazol posee una buena actividad *in vitro* frente a cepas resistentes al fuconazol de *C. albicans*.

Para llevar a cabo nuestro estudio *in vivo* nos basamos en el modelo murino de vaginitis realizado por Calderon y col., (54) el cual consiste en mantener la infección vaginal con un inóculo de  $2.5 \times 10^8$  UFC/mL de *C. albicans* durante 6 días administrando 0.5 mg/mL de estradiol vía subcutánea el día -3 y +4 después de la infección, obteniéndose una carga microbiana en  $\log_{10}$  de la media de UFC/mL de 4.79 el día 1 a 5.16 el día 6. Sin embargo, para la finalidad de nuestro estudio fué necesario mantener la infección durante 21 días para establecer la actividad *in vivo* del ravuconazol después de 15 días de haber administrado el tratamiento para lo cual se decidió llevar a cabo dicho modelo solo con la diferencia de que la carga microbiana se mantuvo por 21 días post-infección para lo cual se administró la hormona estradiol cada 7 días bajo las mismas condiciones ya mencionadas y los resultados obtenidos nos demuestran que la infección se logró mantener durante todo el ensayo *in vivo* obteniéndose una carga microbiana de 5.67 el día 1 a 6.6 el día 21 valores muy semejantes a los reportados por Calderon y cols.

En un estudio *in vivo* realizado por Clemons y cols., (47) utilizaron un inóculo de  $5 \times 10^7$  UFC/mL de *C. albicans* y un esquema de tratamiento de 5 y 25 mg/Kg peso para el fluconazol y 1,5 y 25 mg/Kg peso para el ravuconazol, un grupos control con tratamiento de DMSO/CMC, investigaron la eficacia terapéutica del ravuconazol en la candidosis orogástrica y encontraron que el ravuconazol es más efectivo que el fluconazol a dosis menores y que el grupo tratado con DMSO/CMC no es tóxico para el hongo por lo que se mantiene la infección, esto concuerda con los resultados obtenidos en nuestro trabajo donde el ravuconazol fue más efectivo *in vivo* que el fluconazol a dosis menores y el grupo grupo control mantiene la infección.

Nuestro trabajo *in vivo* concuerda con resultados muy similares a los obtenidos por González y colaboradores (55) en el 2007, quienes obtuvieron una carga microbiana de 4.9 para el grupo tratado con 20 mg/Kg de peso de fluconazol y de 3.8 para el grupo tratado con 20 mg/Kg peso de fluconazol administrado dos 2 veces al día en un modelo murino de vaginitis por *C. albicans* resistente al fluconazol.

## **CAPÍTULO 5**

### **CONCLUSIONES**

- ✓ El ravuconazol fue más activo *in vitro* que el fluconazol.
  
- ✓ El ravuconazol resultó efectivo en los estudios *in vivo*, disminuyendo la carga microbiana en una forma dependiente de la dosis.
  
- ✓ Este estudio sugiere que el ravuconazol pudiera ser efectivo para el tratamiento de la candidosis vulvovaginal.

## CAPÍTULO 6

### REFERENCIAS

1. Baily, G. G., F. M. Perry, D. W. Denning, and B. K. Mandal. Fluconazole-resistant candidosis in an HIV cohort. *AIDS*. 1994; 8:787–792.
2. Banerjee, S. N., T. G. Emori, D. H. Culver, R. P. Gaynes, W. R. Jarris, and T. Horan. Secular trends in nosocomial primary blood stream infections in the United States. *Am. J. Med.* 1991; 91:86S–89S.
3. Barret-Bee, K., Y. Hayes, R. G. Wilson, and J. F. Ryley. A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. *J. Gen. Microbiol.* 1985; 131:1217–1221.
4. Beck-Sague, C. M., and T. R. Jarvis. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States. *J. Infect. Dis.* 1993; 167:1247–1251.
5. Boerlin, P., F. Boerlin-Petzold, J. Goudet, C. Durussel, J. Pagani, J. Chave, and J. Bille. Typing *Candida albicans* oral isolates from human immunodeficiency virus-infected patients by multilocus enzyme electrophoresis and DNA fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 35:1235–1248.

6. Cassone, A., F. DeBernardis, F. Mondello, T. Ceddia, and L. Agatensi. Evidence for a correlation between proteinase secretion and vulvovaginal candidosis. *J. Infect. Dis.* 1987; 156:777–783.
7. Chavanet, P., J. Lopez, M. Grappin, A. Bonnin, M. Duong, A. Waldner, M. Buisson, P. Camerlynck, and H. Portier. Cross-sectional study of the susceptibility of *Candida* isolates to antifungal drugs and *in vitro-in vivo* correlation in HIV-infected patients. *AIDS.* 1994; 8:945–950.
8. DeBernardis, F., L. Agatensi, I. K. Ross, G. W. Emerson, R. Lorenzini, P. A. Sullivan, and A. Cassone. Evidence for a role for secreted aspartate proteinase of *Candida albicans* in vulvovaginal candidiasis. *J. Infect. Dis.* 1990; 161:1276–1283.
9. Fidel, P. L., Jr., M. E. Lynch, D. H. Conaway, L. Tait, and J. D. Sobel. Mice immunized by primary vaginal *C. albicans* infection develop acquired vaginal mucosal immunity. *Infect. Immun.* 1995; 63:547–553.
10. Fidel, P. L., Jr., M. E. Lynch, V. Redondo-Lopez, J. D. Sobel, and R. Robinson. Systemic cell-mediated immune reactivity in women with recurrent vulvovaginal candidiasis (RVVC). *J. Infect. Dis.* 1993; 168:1458–1465.
11. Fidel, P. L., Jr., M. E. Lynch, and J. D. Sobel. Effects of pre-induced *Candida*-specific systemic cell-mediated immunity on experimental vaginal candidiasis. *Infect. Immun.* 1994; 62:1032–1038.

12. Fidel Jr., P. L., Sobel, J. D. Immunopathogenesis of Recurrent Vulvovaginal Candidiasis, *Clinical Microbiology Reviews*. 1996; 335-348.
13. Fleury, F. J. Adult Vaginitis. *Clin. Obstet. Gynecol.* 1981; 24:407 – 438.
14. Fraser, V. J., J. Dunkel, S. Storfer, G. Medoff, and W. C. Dunagan. Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology, risk factors, and predictors of mortality. *Clin. Infect. Dis.* 1992; 15:414–421.
15. Geiger, A. M., B. Forman, and J. D. Sobel. Chronic vulvovaginal candidiasis: characteristics of women with *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and no *Candida*. *Genitorum. Med.* 1995; 71:304 – 307.
16. Haefner HK. Current evaluation and management of vulvovaginitis. *Clin Obstet Gynecol* 1999; 42: 184–95.
17. Harris AD, Castro J, Sheppard DC, et al. Risk factors for nosocomial candiduria. 1999.
18. Ibrahim, A. S., F. Mirbod, S. G. Filler, B. Yoshiko, G. Cole, Y. Kitajima, J. E. Edwards, Jr., Y. Nosawa, and M. A. Ghannoum. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 1995; 63:1993–1998.

19. Johnson, E. M., D. W. Warnock, J. Luker, S. R. Porter, and C. Scully. Emergence of azole drug resistance in *Candida* species from HIV-infected patients receiving prolonged fluconazole therapy for oral candidosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 1995; 35:103–114.
20. Kaufman, R. N., Freidrich E. G., Gardner, H. L. Benign diseases of the vulva and vagina. 3rd ed. Chicago: Year Book Medical Publishers, 1989:361-418.
21. Kent, H. L. Epidemiology of Vaginitis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1991; 165:1168-1175.
22. Komshian, S. V., A. K. Uwaydah, and J. D. Sobel. Fungemia caused by *Candida* species and *Torulopsis glabrata* in the hospitalized patient: frequency, characteristics, and evaluation of factors influencing outcome. *Rev. Infect. Dis.* 1989; 11:379–390.
23. Mardh, P-A. The vaginal ecosystem. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1991; 165:1163-1168.
24. Mardh P, Rodriguez A, Genc M, Novikova N, Martinez-de-Oliveira J, Guaschino S. Facts and myths on recurrent vulvovaginal candidosis: a review on epidemiology, clinical manifestations, pathogenesis and therapy. *Int J STD AIDS* 2002; 13: 522–39.

25. NCCLS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. NCCLS document M27-A2. NCCLS Wayne, PA; 2002.
26. Odds, F. C. *Candida and candidosis*. 2nd ed. London: Bailliere-Tindall. 1988; 124-135.
27. Odds, F. C. Ecology and epidemiology of candidiasis. 1988; 89. In *Candida and candidosis*. University Park Press, Baltimore, Md.
28. Barrenetxea Z.G. Vulvovaginitis candidásica. *Rev. Iberoam. Micol.* 2000; 19: 22-24.
29. Redondo, L. V., Lynch, M., Schmitt C. *Torulopsis glabrata* vaginitis: clinical aspects and susceptibility to antifungal agents. *Obstet Gynecol.*1990; 76: 651-655.
30. Sobel, J. D. Pathogenesis and epidemiology of vulvovaginal candidiasis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1988; 544:547-557.
31. Sobel JD, Brooker D, Stein GE, et al. Gynecology: single dose fluconazole compared with conventional clotriamazole topical therapy of candida vaginitis. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172:1263–8.
32. Sobel J, Faro S, Force RW, et al. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178:203–11.

33. Soll, D. R. High-frequency switching in *Candida albicans*. Clin. Microbiol. Rev. 1992; 5:183–203.
34. Soll Y., Galask R., Isley S. Switching of *Candida albicans* during successive episodes of recurrent vaginitis. J. Clin. Microbiol. 1989; 27:681–690.
35. Wingard, J. R., W. G. Merz, M. G. Rinaldi, T. R. Johnson, J. E. Karp, and R. Saral. Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. N. Engl. J. Med. 1991; 18:1274–1277.
36. Oriel J.D., Partridge B.M., Denny M.J., Coleman J.C. Genital yeast infections. Br Med J. 1972; 4: 761.
37. Buscemi L., Arechavala A., Negroni R. Estudio de las vulvovaginitis agudas en pacientes adultas sexualmente activas. Rev Iberoam Micol. 2004; 21: 177-181.
38. Egan M.E. Diagnosis of vaginitis. Am Fam Physican. 2000; 62:1095.
39. Carrillo M.J. Antifúngicos tópicos en micosis superficiales. Actualidad Dermatológica. 2000. 361-372.
40. Bidart, T. Voriconazol and caspofungin in antifungal therapy. Revista Chilena de Infectología. 2004; 21 (Suppl. 1): S13-19.

41. Lumbreras C., Lizasoain M., Aguado J.M. Antifúngicos de uso sistémico. *Microbiol Clin.* 2003; 2(7): 366-380.
42. Perfect J., Cox G., Dogde R., Schell W. *In vitro* and *in vivo* efficacies of the azole SCH56592 against *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40: 1910-1913.
43. Mendez J., Herrera M. Métodos de susceptibilidad antifúngica. Revisión metodológica. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños.* Vol. 36.
44. Pfaller M., Messer S., Jones R. Activity of new triazole SCH56592, compared with those of four other antifungal agents tested against clinical isolated of *Candida* spp. And *Saccaromyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41: 233-235.
45. Ernest E.J. Investigational Antifungal Agents. *Pharmacotherapy.* 2001; 21(8): 165-174.
46. Cuenca E.M., Gomez A., Mellado E., García G., Rodríguez J.L. In vitro activities of ravuconazol and four other antifungal agents against fluconazol resistant or susceptible clinical yeast isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:3107-3111.

47. Clemons K.V., Stevens D.A. Efficacy of ravuconazol in tratament of mucosal candidosis in SCID mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45: 3433-3436.
48. Walsh T.J., Efficacy, safety and plasma pharmacokinetics of escalating dosages of intravenously administered ravuconazol lysine phosphoester for treatment of experimental pulmonary aspergillosis in persistently neutropenic rabbits. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 1188-1196.
49. Cuenca E.M., Gomez A., Mellado E., García G., Rodríguez J.L. *In vitro* activity of ravuconazol against 923 clinical isolates of nondermatophyte filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 5136-5138.
50. Lynch M.E., Sobel J.D., Fidel Jr. P.L. Role of antifungal drug resistance in the pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *J Med Vet Mycol.* 1996; 34: 337-339.
51. Saporiti A.M., Gómez D., Levalle S., Galeano M., Davel G., Vivot W., Rodero L. Vaginal candidiasis: etiology and sensitivity profile to antifungal agents in clinical use. *Rev Argent Microbiol.* 2001; 33(4): 217-222.
52. Nelis J. Prevalence of vulvovaginal candidiasis and susceptibility to fluconazol in women. *Am J Obstet Gynecol.* 2002; 187: 569-74

53. Sojakova M., Liptajova D., Borovsky M., Subik J. Fluconazole and itraconazole susceptibility of vaginal yeast isolates from Slovakia. *Mycopathol.* 2004; 157: 163-169.
54. Calderon L., Williams R., Martinez M., Clemons K.V. Stevens D.A. Genetic susceptibility to vaginal candidiasis. *Med Mycol.* 2003; 41: 143-147.
55. Gonzalez G.M., Robledo E., Saldivar D., Gonzalez G., Bosques F., Garza E. Therapeutic efficacy of posaconazol against isolates of *Candida albicans* with different susceptibilities to fluconazole in a vaginal model. *Med Mycol.* 2007; 45: 221-224.