

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



EVALUACION DE LA CORRELACION ENTRE LAS
PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD *IN VITRO* DE
Coccidioides immitis Y EL TRATAMIENTO
ANTIFUNGICO EN UN MODELO MURINO DE
COCCIDIOIDOMICOSIS SISTEMICA

Por

GLORIA MARIA GONZALEZ GONZALEZ

Como requisito para obtener el Grado de DOCTOR EN
CIENCIAS con especialidad en Microbiología Médica

JULIO DE 2002

GLORIA MARIA GONZALEZ GONZALEZ

TD
RC136
.3
.G6
2002
c.1



1080114221

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES MÉDICAS LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA

TR
PC 132
M.
QV
2002



Por el presente se certifica que la Lic. GLORIA MARIA GONZALEZ GONZALEZ ha concluido satisfactoriamente el curso de ESPECIALIDAD EN CIENCIAS DE LA SALUD con especialidad en MICROBIOLOGIA MEDICA, correspondiente al programa de estudios de ESPECIALIDAD EN CIENCIAS DE LA SALUD con especialidad en MICROBIOLOGIA MEDICA, impartido por el INSTITUTO DE INVESTIGACIONES MEDICAS LEON, de la FACULTAD DE MEDICINA, de la UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON, en el periodo de mayo a junio de 2002.

Por
GLORIA MARIA GONZALEZ GONZALEZ



Como requisito para obtener el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS con especialidad en Microbiología Médica

JULIO DE 2002

TD

RC136

.3

.GL

2002



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA

EVALUACIÓN DE LA CORRELACIÓN ENTRE LAS PRUEBAS DE
SUSCEPTIBILIDAD *IN VITRO* DE *Coccidioides immitis* Y EL
TRATAMIENTO ANTIFÚNGICO EN UN MODELO MURINO
DE COCCIDIOIDOMICOSIS SISTÉMICA

Por

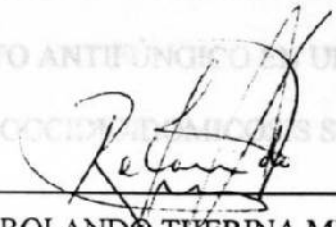
GLORIA MARÍA GONZÁLEZ GONZÁLEZ

Como requisito para obtener el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS
con especialidad en Microbiología Médica


JULIO DE 2002

EVALUACIÓN DE LA CORRELACIÓN ENTRE LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD *IN VITRO* DE *Coccidioides immitis* Y EL TRATAMIENTO ANTIFÚNGICO EN UN MODELO MURINO DE COCCIDIOIDOMICOSIS SISTÉMICA

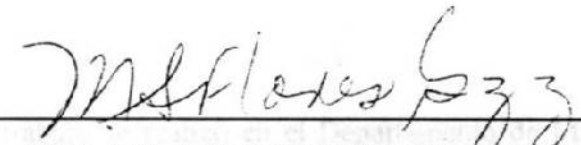
Aprobación de la Tesis:




DR. ROLANDO TIJERINA MENCHACA
Director de Tesis



DR. MICHAEL GEORGE RINALDI
Co-Director de Tesis



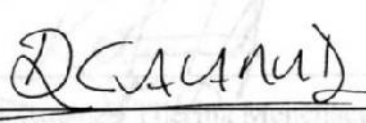
DRA. MA. DEL SOCORRO FLORES GONZÁLEZ
Comisión de Tesis



DRA. MARTHA GUERRERO OLAZARÁN
Comisión de Tesis



DRA. HERMINIA G. MARTÍNEZ RODRÍGUEZ
Comisión de Tesis

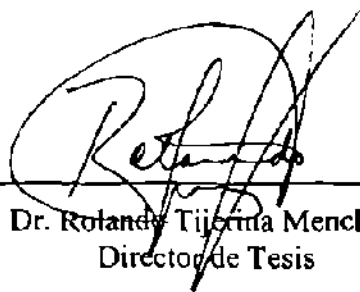


DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector
de Investigación y Estudios de Posgrado

EVALUACIÓN DE LA CORRELACIÓN ENTRE LAS PRUEBAS DE
SUSCEPTIBILIDAD *IN VITRO* DE *Coccidioides immitis* Y EL
TRATAMIENTO ANTIFÚNGICO EN UN MODELO MURINO
DE COCCIDIOIDOMICOSIS SISTÉMICA

Presentado por: Q. F. B. y M. C. Gloria María González González

Este trabajo se realizó en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Rolando Tijerina Menchaca y en los Departamentos de Patología y Medicina de la Universidad de Texas en San Antonio, Texas, EUA bajo la co-dirección del Dr. Michael G. Rinaldi.



Dr. Rolando Tijerina Menchaca
Director de Tesis

DEDICATORIA

A ti,
a ellos dos,
y al resto de mis González

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Rolando Tijerina Menchaca

Al Dr. Michael George Rinaldi

Al Dr. John Richard Graybill

Al Dr. Jesús Ancer Rodríguez

A los miembros de la comisión de tesis

A mis compañeros y amigos

TABLA DE CONTENIDO

| CAPÍTULO | Página |
|--------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1. INTRODUCCIÓN. | 1 |
| 1.1 Antecedentes históricos. | 1 |
| 1.2 Características microbiológicas de <i>Coccidioides immitis</i> . . . | 2 |
| 1.3 Ecología y distribución de <i>C. immitis</i> | 3 |
| 1.4 Infección clínica. | 4 |
| 1.4.1 Aspectos epidemiológicos. | 4 |
| 1.5 Métodos de diagnóstico para <i>C. immitis</i> | 5 |
| 1.5.1 Examen directo. | 5 |
| 1.5.2 Cultivo. | 5 |
| 1.5.3 Pruebas confirmatorias. | 6 |
| 1.5.3.1 Infección en animales. | 6 |
| 1.5.3.2 Cultivo de esférulas. | 7 |
| 1.5.3.3 Prueba de inmuno identificación. | 7 |
| 1.5.3.4 Prueba de ácido desoxirribonucleico. | 8 |
| 1.6 Tratamiento | 8 |
| 1.6.1 Antifúngicos convencionales. | 9 |
| 1.6.1.1 Polienos. | 9 |

| CAPÍTULO | Página |
|----------------------------------------------------------|--------|
| 1.6.1.2 Azoles. | 11 |
| 1.6.2 Antifúngicos en investigación. | 12 |
| 1.6.2.1 Polienos. | 12 |
| 1.6.2.2 Triazoles. | 13 |
| 1.6.2.3 Péptidos. | 15 |
| 1.7 Pruebas de susceptibilidad <i>in vitro</i> | 15 |
| 1.8 Objetivos. | 19 |
| 1.8.1 Objetivo general. | 19 |
| 1.8.2 Objetivos específicos. | 19 |
| 1.9 Hipótesis. | 21 |
| 1.10 Justificación. | 21 |
| | |
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS. | 22 |
| | |
| 2.1 Estrategia general. | 23 |
| 2.2 Estudios <i>in vitro</i> | 24 |
| 2.2.1 Estandarización de los inóculos. | 24 |
| 2.2.1.1 Cepas de <i>C. immitis</i> | 24 |
| 2.2.1.2 Condiciones de cultivo. | 24 |
| 2.2.1.3. Suspensiones de los inóculos. | 25 |

| CAPÍTULO | Página |
|-----------|-------------------------------------------------------------------|
| 2.2.1.4 | Determinación de UFC/mL. 25 |
| 2.2.1.5 | Análisis estadístico. 25 |
| 2.2.2 | Susceptibilidad antifúngica. 26 |
| 2.2.2.1 | Cepas de <i>C. immitis</i> 26 |
| 2.2.2.2 | Agentes antifúngicos. 26 |
| 2.2.2.3 | Prueba de macrodilución. 27 |
| 2.2.2.4 | Análisis estadístico. 29 |
| 2.2.2.5 | Clasificación de cepas. 31 |
| 2.3 | Estudios <i>in vivo</i> 32 |
| 2.3.1 | Determinación de DL ₅₀ y DL ₉₀ 32 |
| 2.3.1.1 | Cepa de ratones. 32 |
| 2.3.1.2 | Preparación de los inóculos. 32 |
| 2.3.1.3 | Inoculación de los ratones. 33 |
| 2.3.1.4 | Registro de mortalidad. 33 |
| 2.3.2 | Determinación de eficacia terapéutica. 33 |
| 2.3.2.1 | Estudios de supervivencia. 33 |
| 2.3.2.1.1 | Modelo animal. 33 |
| 2.3.2.1.2 | Regímenes terapéuticos. 34 |
| 2.3.2.1.3 | Registro de mortalidad. 36 |
| 2.3.2.1.4 | Análisis estadístico. 36 |

| CAPÍTULO | Página |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 2.3.2.2 Estudios de carga microbiana. | 36 |
| 2.3.2.2.1 Modelo animal. | 36 |
| 2.3.2.2.2 Regímenes terapéuticos. | 37 |
| 2.3.2.2.3 Registro de mortalidad. | 37 |
| 2.3.2.2.4 Análisis estadístico. | 37 |
| | |
| 3. RESULTADOS. | 39 |
| 3.1 Variabilidad de los inóculos | 39 |
| 3.1.1 Variación intra e inter días en inóculos con cultivos de 4, 10 y 20 días de crecimiento. | 39 |
| 3.2 Actividad <i>in vitro</i> | 43 |
| 3.2.1 Clasificación de cepas. | 46 |
| 3.3 Actividad <i>in vivo</i> | 48 |
| 3.3.1 DL ₅₀ y DL ₉₀ | 48 |
| 3.3.2 Determinación de eficacia terapéutica. | 49 |
| 3.3.2.1 Estudios de supervivencia. | 49 |
| 3.3.2.1.1 Tratamiento con caspofungina. | 49 |
| 3.3.2.1.2 Tratamiento con posaconazol. | 51 |

| CAPÍTULO | Página |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| 3.3.2.1.3 Tratamiento con las formulaciones lipídicas de anfotericina B. | 56 |
| 3.3.2.2 Estudios de carga microbiana. | 59 |
| 3.3.2.2.1 Tratamiento con caspofungina. | 59 |
| 3.3.2.2.2 Tratamiento con posaconazol. | 60 |
| 3.3.2.2.3 Tratamiento con las formulaciones lipídicas de anfotericina B. | 62 |
| 4. DISCUSIÓN. | 64 |
| 5. CONCLUSIONES. | 70 |
| 6. PERSPECTIVAS. | 71 |
| 7. REFERENCIAS. | 72 |

LISTA DE TABLAS

| Tabla | Página |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1. Cepas de <i>C. immitis</i> y sus orígenes obtenidas del laboratorio de Micología de la Universidad de Texas. | 28 |
| 2. Condiciones empleadas en las pruebas de susceptibilidad <i>in vitro</i> | 30 |
| 3. Cepas de control de calidad y su rango de susceptibilidad <i>in vitro</i> | 31 |
| 4. Regímenes terapéuticos utilizados en los estudios de supervivencia. | 35 |
| 5. Regímenes terapéuticos seguidos en los estudios de carga microbiana. | 38 |
| 6. Concentración de los inóculos a partir de cultivos de <i>C. immitis</i> de 4 días de crecimiento ajustados espectrofotométricamente y la variación intra día. | 40 |
| 7. Concentración de los inóculos a partir de cultivos de <i>C. immitis</i> de 4 días de crecimiento ajustados espectrofotométricamente y la variación inter días. | 40 |
| 8. Concentración de los inóculos a partir de cultivos de <i>C. immitis</i> de 10 días de crecimiento ajustados espectrofotométricamente y la variación intra día. | 41 |
| 9. Concentración de los inóculos a partir de cultivos de <i>C. immitis</i> de 10 días de crecimiento ajustados espectrofotométricamente y la variación inter días. | 41 |

| Tabla | Página |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 10. Concentración de los inóculos a partir de cultivos de <i>C. immitis</i> de 20 días de crecimiento ajustados espectrofotométricamente y la variación intra día. | 42 |
| 11. Concentración de los inóculos a partir de cultivos de <i>C. immitis</i> de 10 días de crecimiento ajustados espectrofotométricamente y la variación inter días. | 42 |
| 12. CMI de las cepas de <i>C. immitis</i> en varios estadios morfológicos de su fase sapróbica. | 44 |
| 13. CML de las cepas de <i>C. immitis</i> en varios estadios morfológicos de su fase sapróbica. | 45 |
| 14. Clasificación de cepas de <i>C. immitis</i> seleccionadas para los estudios <i>in vivo</i> de acuerdo a la CMI. | 47 |
| 15. Clasificación de cepas de <i>C. immitis</i> seleccionadas para los estudios <i>in vivo</i> de acuerdo a la CML | 47 |
| 16. Mortalidad en animales infectados con las cepas de <i>C. immitis</i> de diferente susceptibilidad antifúngica. | 49 |
| 17. Recuperación de <i>C. immitis</i> en ratones tratados con POSA e ITRA del estudio de supervivencia. | 55 |
| 18. Supervivencia y recuperación de <i>C. immitis</i> en ratones infectados con la cepa 98-1037 y tratamiento con las formulaciones lipídicas de anfotericina B. | 57 |

| Tabla | Página |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 19. Sobrevivencia y recuperación de <i>C. immitis</i> en ratones infectados con la cepa 98-293 y tratamiento con las formulaciones lipídicas de anfotericina B. | 58 |
| 20. Carga microbiana en bazo, hígado y pulmones de ratones tratados con caspofungina. | 60 |
| 21. Carga microbiana en bazo, hígado y pulmones de ratones tratados con posaconazol | 61 |
| 22. Carga microbiana en bazo hígado y pulmones de ratones tratados con las preparaciones lipídicas de anfotericina B. | 63 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | Página |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1. Esquema de la estrategia general seguida para la determinación de la correlación entre las pruebas de susceptibilidad <i>in vitro</i> de <i>C. immitis</i> y el tratamiento antifúngico en un modelo animal. | 23 |
| 2. Estudio de supervivencia de los ratones infectados con <i>C. immitis</i> cepa 98-449 (CMI=8 µg/mL) y su tratamiento con caspofungina. | 50 |
| 3. Estudio de supervivencia de los ratones infectados con <i>C. immitis</i> cepa 98-571(CMI=64 µg/mL) y su tratamiento con caspofungina. | 51 |
| 4. Estudio de supervivencia de los ratones infectados con <i>C. immitis</i> cepa 97-960 (CMI=0.25 µg/mL) y su tratamiento con posaconazol. | 53 |
| 5. Estudio de supervivencia de los ratones infectados con <i>C. immitis</i> cepa 97-2036 (CMI=1µg/mL) y su tratamiento con posaconazol. | 54 |

ABREVIATURAS

| | |
|------------------|------------------------------------|
| ADN | Acido desoxirribonucleico |
| ANFB | Anfotericina B |
| ANFBCL | Anfotericina B complejo lipídico |
| ANFBDC | Anfotericina B dispersión coloidal |
| ANFBL | Anfotericina B liposomal |
| ARN | Acido ribonucleico |
| CAS | Caspofungina |
| CV | Coefficiente de variación |
| ° C | Grados centígrados |
| cm | Centímetros |
| DL ₅₀ | Dosis letal 50 |
| DL ₉₀ | Dosis letal 90 |
| FLU | Fluconazol |
| 5-FC | 5-Fluorocitosina |
| g | Gramos |
| h | Horas |
| ITRA | Itraconazol |
| IP | Intraperitoneal |
| IV | Intravenoso |
| KETO | Ketoconazol |
| µg | Microgramos |

| | |
|---------------|------------------------------------------------------------|
| MICO | Miconazol |
| μL | Microlitros |
| mg | Miligramos |
| mL | Militros |
| NaCl | Cloruro de sodio |
| NCCLS | National Committee of Clinical Laboratory Standards |
| NIS | Nistatina |
| NISL | Nistatina liposomal |
| pH | Potencial de hidrógeno |
| % | Por ciento |
| %T | Por ciento de transmitancia |
| POSA | Posaconazol |
| R | Cepa resistente |
| r.p.m. | Revoluciones por minuto |
| S | Cepa susceptible |
| UFC | Unidades formadoras de colonia |
| VORI | Voriconazol |

RESUMEN

Gloria María González González Fecha de obtención del Grado: **Julio de 2002**

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Título del Estudio: EVALUACIÓN DE LA CORRELACIÓN ENTRE LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD *IN VITRO* DE *Coccidioides immitis* Y EL TRATAMIENTO ANTIFÚNGICO EN UN MODELO MURINO DE COCCIDIOIDOMICOSIS SISTÉMICA.

Número de Páginas: 87

Candidato al Grado de Doctor en Ciencias con Especialidad en Microbiología

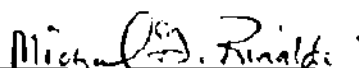
Área de estudio: Microbiología.

Propósito y Método de estudio: La terapia antifúngica convencional contra la coccidioidomycosis está asociada con fracasos terapéuticos, recaídas y toxicidad. Nuevas opciones terapéuticas incluyen péptidos (casposfungina), triazoles (voriconazol y posaconazol) y los polienos convencionales empaquetados en vehículos lipídicos (anfotericina B complejo lipídico, anfotericina B dispersión coloidal, anfotericina B liposomal y nistatina liposomal). El objetivo principal de este trabajo fue establecer correlaciones de las susceptibilidades *in vitro* de *C. immitis* a diversos antifúngicos con la respuesta al tratamiento en un modelo animal. Para realizar este estudio probamos susceptibilidad *in vitro* en 25 cepas de *C. immitis*, las pruebas se llevaron a cabo siguiendo las normas del documento M38-P del National Committee for Clinical Laboratory Standards para así obtener información de CMI y CML. Aislamientos de *C. immitis* con diferentes susceptibilidades *in vitro* fueron seleccionados para los estudios en animales. Ensayos de supervivencia y de carga microbiana fueron utilizados como marcadores de respuesta ante los diversos antifúngicos.

Contribuciones y Conclusiones: En este estudio se determinó que la casposfungina presentó una pobre actividad antifúngica *in vitro*. Sin embargo, la casposfungina fue altamente efectiva en el tratamiento de la coccidioidomycosis experimental. Posaconazol exhibió una potente actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* contra los aislamientos de *C. immitis*. Las formulaciones lipídicas de los polienos mostraron actividades variables *in vitro* en términos de CMI y CML al compararlos con el compuesto antecesor. *In vivo* las tres formulaciones lipídicas de anfotericina B fueron eficaces en la prolongación de la supervivencia y la reducción de la carga microbiana en los ratones infectados. La comparación de anfotericina B convencional con las anfotericinas B asociadas con lípidos mostró que en ratones se puede administrar una concentración mas alta de éstas últimas sin observar efectos adversos.



Dr. Rolando Tijerina Menchaca
Directo de Tesis



Dr. Michael George Rinaldi
Co-Director de Tesis