

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



ACTIVIDAD DE CASPOFUNGINA CONTRA *P. boydii*:  
ESTUDIOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

POR:

SANDRA VERONICA AGUILAR GONZALEZ

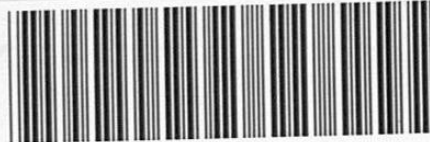
COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACION  
EN MICROBIOLOGIA MEDICA

SEPTIEMBRE 2006

2886

SANDRA VERONICA AGUILAR GONZALEZ

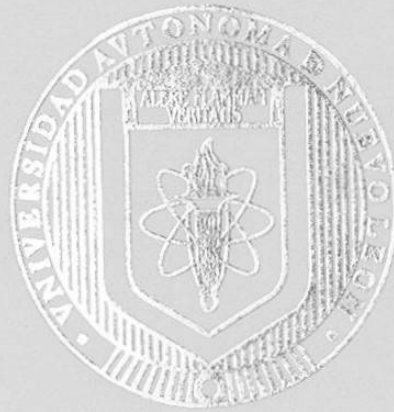
FM  
OR82  
P7848  
A48  
2006



1080130340

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



ACTIVIDAD DE CASPOFUNGINA CONTRA *P. boydii*:  
ESTUDIOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

POR:

SANDRA VERONICA AGUILAR GONZALEZ

SANDRA VERONICA AGUILAR GONZALEZ

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACION  
EN MICROBIOLOGIA MEDICA

SEPTIEMBRE 2006

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA

ACTIVIDAD DE CASPOFUNGINA CONTRA *P. boydii*:  
ESTUDIOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

Por

SANDRA VERÓNICA AGUILAR GONZÁLEZ

Como requisito para obtener el Grado de MAESTRO EN  
CIENCIAS con orientación en Microbiología Médica.

SEPTIEMBRE DE 2006



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA

ACTIVIDAD DE CASPOFUNGINA CONTRA *P. boydii*:  
ENSAYOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

Por

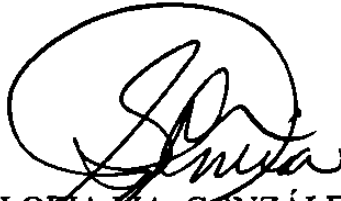
SANDRA VERÓNICA AGUILAR GONZÁLEZ.

Como requisito para obtener el Grado de MAESTRO EN  
CIENCIAS con orientación en Microbiología Médica.

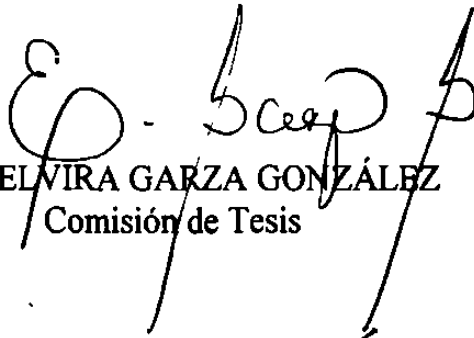
SEPTIEMBRE DE 2006

ACTIVIDAD DE CASPOFUNGINA CONTRA *P. boydii*: ENSAYOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

Aprobación de Tesis:



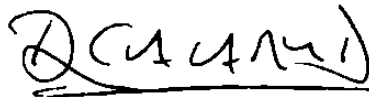
DRA. GLORIA MA. GONZÁLEZ GONZÁLEZ  
Director de Tesis



DRA. ELVIRA GARZA GONZÁLEZ  
Comisión de Tesis



DR. MED. ROLANDO TIERINA MENCHACA  
Comisión de Tesis



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



ACTIVIDAD DE CASPOFUNGINA CONTRA *P. boydii*:  
ENSAYOS *IN VITRO* E *IN VIVO*.

Presentado por: Q.C.B. Sandra Verónica Aguilar González.

Este trabajo se realizó en el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Gloria María González González y en la comisión de tesis la Dra. Elvira Garza González y el Dr. Rolando Tijerina Menchaca.



Dra. Gloria María González González  
Director de Tesis

## DEDICATORIA

### A MI MADRE

Es y será por siempre, la mayor inspiración de mi vida para ser una mejor persona.

### A MIS HERMANOS: LOLIS, MIGUEL Y EDITH

Porque me han demostrado que todo en esta vida se puede lograr incluso en los peores momentos.

### A MIS TIOS Y PRIMOS

Por estar siempre en cada una de sus oraciones.

### A LA DRA. GLORIA GONZÁLEZ.

Por confiar en mí a pesar de mis errores. Mil gracias....aún falta más.

### A MIS AMIGOS

Claudia, Sara, Diana, Bricehidy, Berenice, Patricia, Felipe, Ramiro, Iván, Francisco y Adrián.

Por permitirme ser parte de su vida y por su apoyo incondicional.

### A MIS AMIGOS DE BIORREMEDIACIÓN AMBIENTAL

Marco, Nora, Brenda y Miriam.

Porque a pesar de la distancia han estado siempre a mi lado y....por ayudarme a salir de mi burbuja.

## **AGRADECIMIENTO**

Dra. Elvira Garza González.

Dra. Gloria Maria González González.

Dr. Rolando Tijerina Menchaca.

Al equipo del Laboratorio de Micología  
Q. C. B. Diana Rodríguez  
Q. C. B. Lidia Oviedo

## TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO	Página
1. INTRODUCCIÓN. . . . .	1
1.1    Antecedentes históricos. . . . .	1
1.2    Características microbiológicas de <i>P. boydii</i> . . . . .	2
1.3    Ecología y epidemiología de <i>P. boydii</i> . . . . .	3
1.4    Infección clínica. . . . .	3
1.5    Factores de riesgo. . . . .	4
1.6    Respuesta del huésped. . . . .	5
1.7    Modelo murino de pseudallescheriasis sistémica. . . . .	5
1.8    Diagnóstico. . . . .	6
1.8.1 Histopatología. . . . .	7
1.8.2 Características del cultivo. . . . .	7
1.8.3 Métodos moleculares. . . . .	7
1.9    Tratamiento. . . . .	8
1.9.1 Antifúngicos convencionales. . . . .	8
1.9.1.1 Polienos. . . . .	8
1.9.1.2 Triazoles. . . . .	9
1.10    Nuevas opciones terapéuticas. . . . .	11

CAPÍTULO	Página
1.10.1 Caspofungina. . . . .	12
1.10.1.1 Actividad <i>in vitro</i> . . . . .	14
1.10.1.2 Actividad <i>in vivo</i> . . . . .	16
1.10.1.2.1 Candidiasis. . . . .	16
1.10.1.2.2 Aspergillosis. . . . .	16
1.10.1.2.3 Otros hongos oportunistas. . . . .	17
1.11 Pruebas de susceptibilidad <i>in vitro</i> . . . . .	17
1.12 Objetivos. . . . .	20
1.12.1 Objetivo general. . . . .	20
1.12.2 Objetivos específicos. . . . .	20
1.13 Justificación. . . . .	20
2. MATERIALES Y MÉTODOS. . . . .	21
2.1 Estrategia general. . . . .	21
2.2 Estudios <i>in vitro</i> . . . . .	23
2.2.1 Aislamientos clínicos de <i>P. boydii</i> . . . . .	23
2.2.2 Agentes antifúngicos. . . . .	23
2.2.3 Preparación del inóculo. . . . .	25
2.2.4 Pruebas de macrodilución. . . . .	25

CAPÍTULO	Página
2.2.4.1 Control de calidad. . . . .	26
2.2.4.2 Análisis de los datos. . . . .	26
2.3 Estudios <i>in vivo</i> . . . . .	29
2.3.1. Cepa de ratones. . . . .	29
2.3.2 Aislamiento de <i>P. boydii</i> . . . . .	29
2.3.3 Producción de neutropenia. . . . .	30
2.3.4 Inoculación a los ratones. . . . .	30
2.3.5 Determinación de eficacia terapéutica. . . . .	30
2.3.5.1 Estudio de supervivencia. . . . .	30
2.3.5.1.1 Registro de muerte. . . . .	32
2.3.5.1.2 Análisis estadístico. . . . .	32
2.3.5.2 Estudio de carga microbiana. . . . .	33
2.3.5.2.1 Regímenes terapéuticos. . . . .	33
2.3.5.2.2 Registro de mortalidad. . . . .	34
2.3.5.2.3 Análisis estadístico. . . . .	34

CAPÍTULO	Página
3. RESULTADOS. . . . .	35
3.1 Actividad <i>in vitro</i> . . . . .	35
3.1.1 Pruebas de macrodilución. . . . .	35
3.2 Actividad <i>in vivo</i> . . . . .	37
3.2.1 Determinación de la eficacia terapéutica. . . . .	37
3.2.1.1 Estudio de supervivencia. . . . .	37
3.2.1.2 Estudio de carga microbiana. . . . .	39
4. DISCUSIÓN. . . . .	41
5. CONCLUSIONES. . . . .	46
6. PERSPECTIVAS. . . . .	47
7. BIBLIOGRAFIA. . . . .	48

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Cepas de <i>P. boydii</i> y sus orígenes, obtenidas del laboratorio de Micología del departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León y del Laboratorio de Micología de la Universidad de Texas. . . . .	24
2. Condiciones empleadas en las pruebas de macrodilución. . . . .	27
3. Límites de las CMI recomendadas para las cepas de control de calidad en las pruebas de susceptibilidad. . . . .	28
4. Regímenes terapéuticos utilizados en los estudios de supervivencia. .	32
5. Regímenes terapéuticos utilizados en los estudios de carga microbiana. . . . .	33
6. Actividad <i>in vitro</i> de CAS, FLU y ANF B contra los 11 aislamientos de <i>P. boydii</i> . . . . .	35
7. CME de CAS contra los aislamientos de <i>P. boydii</i> . . . . .	36
8. Carga microbiana de bazo riñón y cerebro de los ratones infectados con la cepa 00-180 de <i>P. boydii</i> . . . . .	40



## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Fórmula estructural de caspofungina. . . . .	12
2. Esquema de la estrategia general seguida para la determinación de la actividad de CAS, ANF B y FLU en las pruebas de susceptibilidad <i>in vitro</i> y la eficacia terapéutica de caspofungina en un modelo murino de pseudallescheriasis sistémica. . . . .	22
3. Estudio de supervivencia de los ratones infectados con <i>P. boydii</i> cepa 00-180 y su tratamiento con CAS, FLU y ANF B. . . . .	40

## **ABREVIATURAS**

ANF B	Anfotericina B
ATCC	American Type Culture Collection
CAS	Caspofungina
°C	Grados Centígrados
CLSI	Clinical Laboratory Standard Institute
CME	Concentración mínima efectiva
CMI	Concentración mínima inhibitoria
FLU	Fluconazol
h	Hora
ICR	Institute Cancer Research
IP	Intraperitoneal
ITRA	Itraconazol
IV	Intravenoso
KETO	Ketoconazol
kg	Kilogramo
µg	Microgramos
MA3	Medio para antibióticos # 3
ml	Mililitros
NCCLS	Nacional Comité of Clinical Laboratory Standards
pH	Potencial de Hidrógeno

%	Por ciento
%T	Por ciento de transmitancia
POSA	Posaconazol
RAVU	Ravuconazol
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute
UFC	Unidades formadoras de colonia
VORI	Voriconazol

## RESUMEN

**Sandra Verónica Aguilar González. Fecha de obtención del grado: Septiembre de 2006**

**Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina.**

**Título del estudio: ACTIVIDAD DE CASPOFUNGINA CONTRA *P. boydii*:  
ENSAYOS *IN VITRO* E *IN VIVO*.**

**Número de Páginas: 63**

Candidato al Grado de Maestro en Ciencias con Especialidad en Microbiología.

**Área de estudio: Microbiología.**

**Propósito y Método de estudio:** El surgimiento de nuevas opciones terapéuticas con un nuevo mecanismo de acción distinto a los antifúngicos convencionales (polienos y triazoles), como los péptidos (caspofungina) han incrementado la necesidad de realizar ensayos *in vitro* e *in vivo* para poder determinar su probable actividad en la terapia antifúngica. El objetivo principal de este trabajo fue determinar la susceptibilidad *in vitro* e *in vivo* de *P. boydii* contra diversos antifúngicos y el tratamiento antifúngico en un modelo murino de pseudallescheriasis sistémica. Para efectuar este estudio probamos susceptibilidad *in vitro* con 11 cepas de *P. boydii*, las pruebas se llevaron a cabo siguiendo el método de referencia M38-A del Clinical Laboratory Standards Institute para obtener así datos de la CMI y CME. Un aislamiento de *P. boydii* fue utilizado para el estudio *in vivo*. Ensayos de supervivencia y de carga microbiana fueron utilizados para valorar la respuesta del tratamiento de una pseudallescheriasis murina con caspofungina, fluconazol y anfotericina B.

### **Contribuciones y Conclusiones:**

En los estudios *in vitro* caspofungina, fluconazol y anfotericina B mostraron poca actividad en contra de *P. boydii*. Los valores que se obtuvieron de CMI y CME para caspofungina fueron muy similares. La anfotericina B mostró valores de CMI  $\geq 16$   $\mu\text{g/ml}$ . En el estudio *in vivo* anfotericina B fue inefectiva para prolongar la supervivencia comparada con el grupo control. La caspofungina y fluconazol fueron efectivas sólo en las dosis más alta ensayadas (20mg/kg dos veces al día). Sin embargo ningún antifúngico fue capaz de erradicar al hongo de los tejidos.



Dra. Gloria María González González.  
Director de tesis

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes históricos.

El hongo *Pseudallescheria boydii* fue aislado por primera vez por Tarozzi en un paciente italiano que padecía micetoma (77). Tarozzi aisló la forma asexual o imperfecta del hongo que posteriormente fue nombrada como *Monosporium apiospermum* por Saccardo en 1911 (2). En 1921, Boyd y Crutchfield aislaron un hongo que era capaz de producir cleistotecios (reproducción sexual) a partir de un aislamiento clínico de un paciente de Texas, en Estados Unidos de América (14). Shear, clasificó una nueva especie del género *Allescheria* a la cual denominó como *A. boydii* (73). En los siguientes 20 años, este microorganismo fue generalmente aceptado como 2 distintos agentes causales de micetoma. Fue hasta 1944, cuando Emmons demostró que este hongo podía presentar distintas fases de reproducción, siendo *Scedosporium apiospermum* la forma anamórfica (asexual) y *P. boydii* la forma teleomórfica (sexual) (27). Algunos años después en 1951, este hongo fue aislado del suelo por Libero Ajello, estableciendo la naturaleza saprofítica de este hongo (3). Creitz y Harris describieron el primer caso de infección por *Allescheria boydii* a partir de un aislamiento clínico de una expectoración en un paciente con signos y síntomas muy similares a la tuberculosis (18). A mediados de los años 70's se reportaron diversos casos clínicos implicando a *P. boydii* en enfermedades pulmonares graves y otras infecciones en vías respiratoria bajas (6). Hasta 1990, este microorganismo era conocido como

un patógeno poco frecuente, sin embargo para el año 2000, *P. boydii* surgió como un patógeno oportunista emergente asociado con una significativa morbi-mortalidad en pacientes inmunocomprometidos (83).

## **1.2 Características microbiológicas de *P. boydii*.**

*P. boydii* es un hongo homotálico, que crece rápidamente en medios de cultivo estándar como agar Sabouraud o agar papa dextrosa, madurando en aproximadamente de 7-10 días. Produce una colonia de apariencia algodonosa de color blanco que con el transcurso del tiempo cambia a un color café claro o gris (40). El estado sexual conocido como *P. boydii* está caracterizado por la presencia de cuerpos fructíferos en el medio de cultivo denominados cleistotecios (órgano sexual de reproducción) los cuales tienen un color marrón o café, con un tamaño de 140-250  $\mu\text{m}$  de diámetro, generalmente son abundantes al madurar el cultivo, y en su interior se encuentra una célula reproductora (ascocarpo) la cual madura dentro del cleistotecio. La pared del ascocarpo (cuerpo fructífero que en su interior contiene ascosporas) esta compuesta de sencillas paredes de células poligonales. La ascospora, tienen una medida de 4-5  $\mu$  por 7-8  $\mu$  de diámetro. Al abrirse cada ascocarpo, son liberadas hacia el exterior una gran cantidad de ascosporas (76). Difícilmente las ascosporas son confundidas con las conidias (esporas asexuales producidas en las puntas o sobre la hifa) porque las ascosporas contienen en su interior gotas de aceite y además carecen de una base truncada. Algunos aislamientos clínicos no producen esta estructura sexual en los cultivos primarios por lo que se requieren períodos de

incubación prolongados de 2 a 3 semanas y resiembras en medios de agar papa dextrosa (70).

Morfológicamente, *Scedosporium apiospermum* produce hifas septadas y hialinas de aproximadamente 2-4  $\mu\text{m}$  de diámetro. Tiene conidióforos largos y rectos que terminan en una aneloconidia, pueden presentarse de manera simple o en pequeños grupos. Las conidias son pequeñas y de forma ovalada con el extremo más ancho hacia el ápice y un aspecto truncado en la base (80). Este hongo puede presentar además otro estado anamórfico (asexual) denominado *Graphium eumorphum*, esta fase está caracterizada por la presencia de agregados de hifas fusionadas desde el talo, conocidas como sinemata. Cada sinemata termina en un racimo de conidias cilíndricas y hialinas (52).

### **1.3 Ecología y epidemiología de *P. boydii*.**

*P. boydii* se ha establecido firmemente como un hongo saprofitico, con una amplia distribución a nivel mundial. Usualmente se encuentra sobre sustratos ricos en nutrientes y es capaz de crecer en condiciones anaerobias (21). Además se ha aislado del suelo, en aguas contaminadas, aguas residuales, estiércol de ganado, entre otros (17, 85). Este microorganismo presenta una marcada variación genética en cepas aisladas de un medio ambiente similar, sin embargo se han encontrado cepas con genotipos muy similares de diversas regiones geográficas (69).

### **1.4 Infección clínica.**

El espectro clínico de las infecciones por *P. boydii* presenta un rango muy amplio que varía desde una infección localizada hasta una enfermedad

sistémica. La pseudallescheriasis puede presentarse en casi cualquier sitio. La extensión y la severidad de la infección dependerán fundamentalmente del estado inmune del paciente (87). En general, una enfermedad localizada ocurre tanto en pacientes inmunocompetentes como inmunosuprimidos, y usualmente resulta por la implantación por material contaminado debido a una herida. La enfermedad más frecuente reportada es el micetoma (51). Otras enfermedades ocasionadas por *P. boydii* son: osteomielitis (46), artritis, sinusitis (79), abscesos cerebrales (59), enfermedades pulmonares invasivas (6), enfermedades oftálmicas como una queratitis y endoftalmitis (91), endocarditis (61), prostatitis crónica y enfermedades de diseminación sistémica (47). El tracto respiratorio es el principal portal de entrada de infecciones invasivas en sujetos inmunocomprometidos (88). El espectro clínico de una pseudallescheriasis pulmonar es muy similar a una infección pulmonar por *Aspergillus spp.* Las manifestaciones incluyen: enfermedades pulmonares alérgicas, abscesos pulmonares y neumonía. Recientemente se reportó un 8.6 % de colonización pulmonar por *P. boydii* en secreciones de individuos con fibrosis quística (72).

### **1.5 Factores de riesgo.**

El incremento en la incidencia de las infecciones por *P. boydii* parece estar atribuido principalmente a la prevalencia de pacientes inmunocomprometidos, debido a la infección con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), la administración de medicamentos antineoplásicos o inmunosupresivos, el desarrollo de enfermedades crónicas



tales como la diabetes y tuberculosis, pacientes trasplantados, el uso de instrumentos de cateterización. Otras de las posibles razones por las cuales se ha incrementado la incidencia de las infecciones por *P. boydii* incluyen un alto número de pacientes a los que se les realiza algún procedimiento invasivo, y en individuos con frecuentes hemodiálisis (83).

### **1.6 Respuesta del huésped.**

Estudios sobre las defensas del huésped contra *P. boydii* han recibido poca atención. Al igual que *Aspergillus fumigatus*, los macrófagos han mostrado un papel importante en la fagocitosis de conidias de *P. boydii*. Los leucocitos polimorfonucleares actúan en presencia de hifas. Sin embargo, existe una variable actividad en la susceptibilidad a la mieloperoxidasa en algunos aislamientos clínicos. Condiciones como una inmunidad defectuosa y una disfuncionalidad fagocítica así como casos de neutropenia parecen ser los factores más importantes de riesgo para la adquisición de una infección por este hongo (29).

### **1.7 Modelo murino de pseudallescheriasis sistémica.**

Actualmente se cuenta con un reporte de un modelo murino de pseudallescheriasis sistémica (34). Este modelo de diseminación sistémica fue desarrollado principalmente para evaluar la eficacia terapéutica de diversos antifúngicos. Ratones ICR con y sin ciclofosfamida fueron infectados con el aislamiento clínico de *P. boydii* 00-180. Se prepararon inóculos, los cuales fueron evaluados en un rango de  $1 \times 10^3$  a  $5 \times 10^6$  UFC/ml. Al incrementarse la concentración del inóculo se disminuyó el porcentaje de supervivencia en los ratones infectados inmunosuprimidos en comparación con los animales no inmunosuprimidos. Fue observada una

mortalidad del 100% con la dosis de  $5 \times 10^6$  UFC/ratón en las primeras 24 h posteriores a la infección. Todos los ratones que fueron inoculados con la concentración de  $1 \times 10^6$  y  $5 \times 10^5$  UFC / ratón murieron al 3 día post-infección. En la concentración de  $1 \times 10^5$  UFC / ratón, el 100 % de los ratones murieron al sexto día post-infección. El cincuenta por ciento de los ratones que fueron inoculados con la menor concentración de conidias de *P. boydii*  $1 \times 10^3$  UFC por ratón, sobrevivieron al finalizar el estudio. Los resultados del estudio de carga microbiana mostraron la diseminación rápida de *P. boydii* hacia distintos órganos y su establecimiento *in situ* exceptuando el corazón en donde el microorganismo fue eliminado al quinto día. El pulmón, riñón, bazo e hígado mostraron una reducción progresiva sobre el tiempo en las UFC por gramo de órgano. Sin embargo, el cerebro mostró un incremento en las UFC por gramo de órgano. En cambio, los estudios cuantitativos de los órganos en ratones inmunosuprimidos mostraron la infección persistente en la mayoría de los órganos estudiados en los ratones ( $p > 0.0001$ ). El cerebro fue el órgano más afectado confirmando con este estudio el neurotropismo de este hongo patógeno.

### **1.8 Diagnóstico.**

El diagnóstico de una infección fúngica invasiva debe estar basada idealmente en la combinación de los hallazgos histopatológicos, microbiológicos y clínicos (89).

### **1.8.1. Histopatología.**

La identificación de *P. boydii* no puede ser dada sólo por histopatología debido a las similitudes con otro tipo de hongos filamentosos, particularmente de los géneros de *Aspergillus spp* y *Fusarium spp* (76). Es por esto que el diagnóstico definitivo depende de la identificación del hongo en el cultivo.

### **1.8.2 Características del cultivo.**

La identificación de la fase sexual y/o asexual en el cultivo de este hongo facilita la diferenciación de *P. boydii* de otros hongos. La especie más relacionada con *P. boydii* es *Scedosporium prolificans*; este hongo produce cultivos oscuros y presenta conidias pequeñas y anchas. A diferencia de *S. apiospermum*, esta especie no asimila el ribitol, xylitol y L-arabitol. Es de vital importancia poder distinguir estas dos especies ya que *S. prolificans* muestra un patrón de resistencia *in vitro* diferente a *S. apiospermum* (71).

### **1.8.3 Métodos moleculares.**

Nuevos métodos de diagnóstico molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han comenzado a desarrollarse y serán de gran ayuda en el futuro para poder distinguir a *P. boydii* de otros hongos. Wedder y colaboradores diseñaron los primers basados en la secuencia interna de transcripción (90). La secuenciación SSU fue transformada por Issakainen y colaboradores en 1997 (45). Las especies del género de *Pseudallescheria*

presentan una variabilidad infraespecífica. Los mapas de restricción SSU e ITS se basaron en las secuencias NCBI U43913, U43914 y CBS 101.22

## **1.9 Tratamiento.**

### **1.9.1 Antifúngicos convencionales.**

Las opciones disponibles para el tratamiento de las pseudallescheriasis son muy limitadas y la tasa de supervivencia es muy baja en los pacientes con este tipo de infecciones. Constantemente existe la búsqueda de nuevas moléculas que ayuden en el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas. La terapia convencional durante los últimos 25 años, para el tratamiento primario de las infecciones sistémicas se han enfocado principalmente a agentes que atacan directa o indirectamente la integridad de la membrana celular: Los polienos como la anfotericina B (ANF B) y los triazoles tales como fluconazol (FLU) e itraconazol (ITRA). Estos dos grupos de agentes antifúngicos ejercen su efecto alterando la osmosis de la membrana celular fúngica, ocasionando posteriormente la lisis celular (31).

#### **1.9.1.1 Polienos.**

La ANF B es un polieno macrólido producido por un actinomiceto del suelo llamado *Streptomyces nodosus*. Es un potente antifúngico con un amplio efecto fungicida y ha sido por mucho tiempo la droga de elección para el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas. Es un compuesto anfotérico que posee una cadena hidrocarbonada poliénica lipofílica (74) Es poco soluble

en agua y la formulación clínica (Fungizone) consiste de micelas de ANF B acomplejadas con desoxicolato de sodio como agente solubilizante. La ANF B ejerce su acción al unirse al ergosterol de la membrana plasmática fúngica, incrementando la permeabilidad celular promoviendo la pérdida de sustancias celulares, en especial la pérdida de potasio ocasionando así la muerte celular (27). La ANF B convencional y sus nuevas formulaciones presentan un amplio espectro de actividad contra muchos hongos patógenos (74). La ANF B, sin embargo, interactúa con esteroides de la membrana celular animal como el colesterol lo cual contribuye a diferentes efectos adversos; entre estos se encuentran los denominados efectos agudos como son: fiebre, escalofríos, tromboflebitis y cefalea. Los efectos crónicos más importantes son insuficiencia renal en asociación con azoemia, acidosis tubular renal y desequilibrio electrolítico (10). El daño de la función renal generalmente aparece a la segunda semana del tratamiento y puede presentarse en alrededor del 80% de los pacientes (74).

#### **1.9.1.2 Triazoles.**

Los triazoles inhiben la enzima lanosterol dimetilasa, bloqueando la síntesis del ergosterol. Además proveen un mejor perfil de tolerabilidad que la ANF B, pero su actividad antifúngica es dependiente de la concentración administrada. La introducción de los triazoles como FLU e ITRA, han provisto una nueva estrategia en el tratamiento de micosis sistémicas desde el comienzo de los 80's. Estas drogas difieren de los imidazoles por la presencia de tres nitrógenos insertados en el anillo azólico en lugar de dos nitrógenos

(38). En la actualidad existen pocos triazoles en etapas finales de experimentación clínica. Entre ellos se encuentran el posaconazol (POSA) y el ravuconazol (RAVU) (67). El VORI ha mostrado una alta actividad *in vitro* en contra de algunas especies de hongos patógenos, incluyendo a *P. boydii* (53). Torre-Cisneros y colaboradores, describieron que 3 de 10 pacientes con pseudallescheriasis se recuperaron satisfactoriamente después del tratamiento con VORI (78). *Scedosporium apiospermum* presenta una variable susceptibilidad a ITRA, VORI y POSA (19, 25,89). González y colaboradores (32) evaluaron la actividad del POSA con sus antecesores (FLU e ITRA) *in vitro* e *in vivo* en el modelo de pseudallescheriasis sistémica antes mencionado. Se realizaron pruebas de susceptibilidad *in vitro* con 30 aislamientos clínicos de *P. boydii* usando el método de referencia para las pruebas de susceptibilidad para hongos filamentos M38-A del Clinical Laboratory of Standards Institute (CLSI). Para los ensayos *in vivo* POSA fue administrada oralmente en dosis de 0.5, 1, 5, 10, 30 y 50 mg/kg una vez al día (UD) y 25 mg/kg dos veces al día (DD), FLU fue administrada por vía oral en la dosis de 20 mg/kg (DD) e ITRA se administró en la dosis de 30 mg/kg tres veces al día. Los resultados obtenidos en el estudio *in vitro* mostraron rangos de CMI para POSA, ITRA y FLU de 0.125 a 1, 0.5 a 4 y de 32 a >64µg/ml respectivamente. Este estudio demostró que POSA fue más activo *in vitro* contra *P. boydii* que ITRA y FLU. Sin embargo en los estudios *in vivo* POS fue efectivo sólo a dosis más altas ( $\geq 25$  mg/kg) confirmando la alta resistencia de este microorganismo a esta droga. FLU no fue activa en los estudios *in vitro*, pero en los estudios de carga microbiana los resultados obtenidos fueron muy similares a los obtenidos con POSA.

La importancia de *P. boydii* a nivel médico, radica en que este hongo es altamente resistente a los antifúngicos utilizados convencionalmente en las micosis sistémicas: ANF B, FLU e ITRA.

### **1.10 Nuevas opciones en la terapia antifúngica.**

Las equinocandinas pertenecen a una nueva familia de agentes antifúngicos que tienen un nuevo mecanismo de acción. Este mecanismo de acción difiere de los agentes antifúngicos antes mencionados, los cuales actúan a nivel de la membrana celular. El primer compuesto del cual se derivaron las equinocandinas fue la pneumocandina B0 la cual fue identificada en el año 1974 (65). En 1989 se reportó, el compuesto MK-0991 conocido actualmente como caspofungina (CAS) (39), y el compuesto (FK463), ahora conocido como micafungina fue identificado hasta el año 1990 (43). Se han descrito otros compuestos similares a las equinocandinas, algunos de ellos son también derivados semisintéticos de la fermentación natural de microorganismos, incluyendo enfumafungina, las arbocandinas, papulacandinas, arundinfungina y HMR 3270. Un análogo de la pneumocandina B0 que se estudió a nivel clínico fue la cilofungina, la cual mostró actividad en contra de *Candida spp*, esta molécula en particular resultó difícil de preparar y su formulación resultó ser altamente tóxica (84). La pared celular fúngica es una estructura rígida que consiste de grandes polisacáridos:  $\beta$ -(1,3)-D-glucanas (componente esencial de la pared celular de numerosas especies fúngicas.),  $\beta$ -(1,4)-D-glucanas,  $\beta$ -(1,6)-D-glucanas, quitina, mananas o galactomananas y  $\alpha$  glucanas y glicoproteínas (28). El blanco de todas las equinocandinas es un

complejo enzimático en la síntesis de la pared celular, la  $\beta$ -1,3-D-glucana sintetasa. Aunque los hongos son eucariotes, las células de mamíferos no contienen  $\beta$ (1,3)-D-glucanas, sugiriendo que estos compuestos son selectivamente activos en contra de células fúngicas por lo tanto representan un fuerte blanco de acción para la terapia antifúngica (28, 41).

### 1.10.1 Caspofungina

CAS (MK-0991), (L-743,872) fue la primera equinocandina aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento de infecciones fúngicas. Es un lipopéptido semisintético soluble en agua, producto de la fermentación del hongo *Glarea lozoyensis*. Es un derivado de la pneumocandina B0 (1). La fórmula estructural de CAS se muestra en la figura 1.

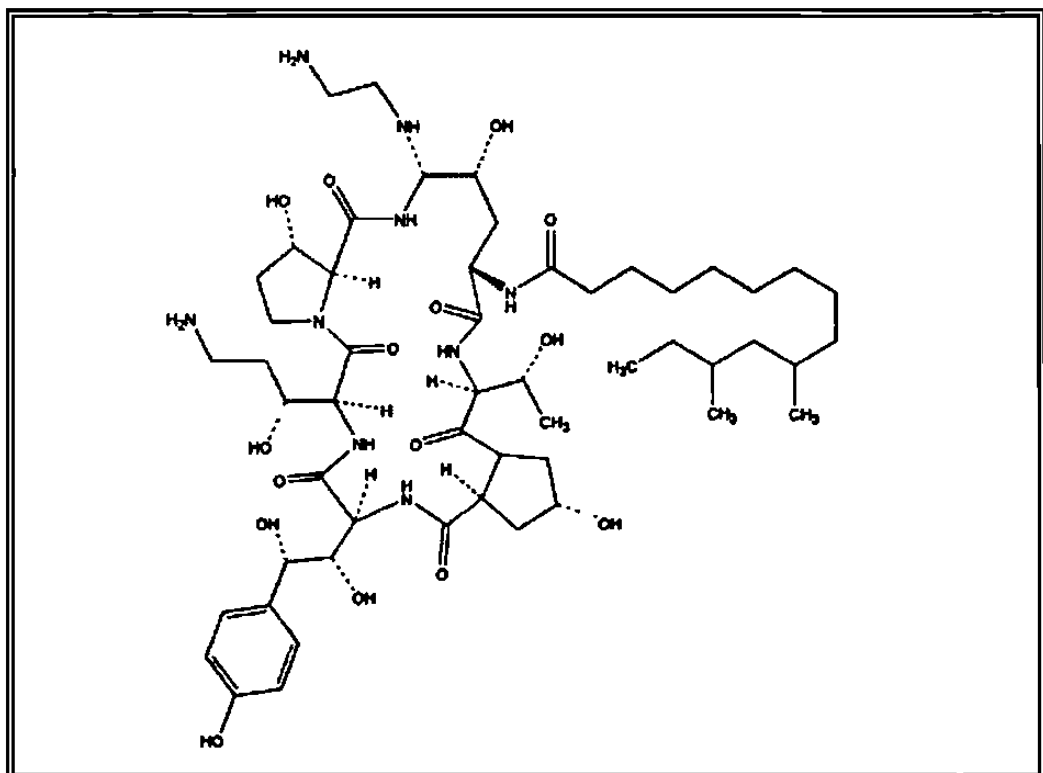


Figura 1 Fórmula estructural de caspofungina.



Las cadenas de  $\beta$  (1,3)-D-glucanas forman una sólida matriz tridimensional, la cual provee de forma y estructura mecánica a la pared celular. El bloqueo de la síntesis de la  $\beta$  (1,3)-D-glucana de la pared celular, mediante la inhibición no competitiva de la enzima  $\beta$ (1,3)-D-glucana sintetasa ocasiona la lisis celular. La inhibición de la síntesis de las  $\beta$  (1,3)-D-glucanas produce un doble efecto, fungistático y fungicida. El efecto fungistático resulta del bloqueo en la síntesis de la pared celular, reduciendo el crecimiento del hongo. La actividad fúngica de CAS se ha demostrado sólo en especies de *Candida spp* (9, 12). En estudios *in vitro* este compuesto mostró un efecto antifúngico poco convencional en contra de especies de *Aspergillus*, actuando selectivamente sobre las extremidades de la hifa, sitio principal de la síntesis de la pared celular. Este efecto fungistático se observó por primera vez en un cultivo de *A. fumigatus* con CAS en donde hubo una reducción en el crecimiento y los cambios anormales en la morfología de las hifas fueron observados en el microscopio electrónico (13).

La CAS fue aprobada por la FDA para el tratamiento empírico de infecciones fúngicas ocasionadas por los géneros de *Candida spp* y *Aspergillus spp*. En enero del 2001 se aprobó para el tratamiento de las aspergilosis invasivas refractarias o intolerantes a la ANF B (80). Posteriormente en septiembre del 2002 fue aprobado su uso para el tratamiento de candidiasis esofágica (81) y en enero del 2003 para el tratamiento de las candidemias e infecciones por *Candida* como abscesos intraabdominales, peritonitis e infecciones en el espacio pleural (82).

La biodisponibilidad de CAS por vía oral es muy baja, requiriendo de la administración por vía parental. La unión de este compuesto a las proteínas (albúmina) es muy alta, con rangos de 96-99 %, la eliminación en plasma es de 9-11 h y es metabolizada en compuestos activos en el hígado (39). En un estudio multicéntrico aleatorio, con doble ciego Villanueva y colaboradores compararon a CAS y ANF B en el tratamiento de esofagitis por *Candida spp* en pacientes adultos. La CAS fue mejor tolerada y más efectiva que ANF B en el tratamiento de candidiasis esofágica en este estudio. Otro estudio, comparó a CAS con FLU en el tratamiento de esofagitis por *Candida* en un estudio multicéntrico, aleatorio y triple ciego. La incidencia de efectos adversos fue similar en ambos grupos: El porcentaje de efectos adversos observados para el grupo de CAS y FLU fue de 54% y 51 % respectivamente. No se observó una diferencia significativa entre ambos grupos (86).

#### **1.10.1.1 Actividad *in vitro*.**

El espectro teórico de la actividad de CAS se extiende a todos los microorganismos que poseen  $\beta$ -(1,3)-D-glucana. Los estudios de susceptibilidad *in vitro* con CAS se han realizado utilizando los métodos de referencia del CLSI. Sin embargo estos métodos no ha sido estandarizado para las equinocandinas, ya que el punto de corte de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) empleado en las pruebas de susceptibilidad no muestra una correlación entre los estudios *in vitro* y los *in vivo*. La CAS muestra una actividad fungicida *in vitro* dependiente de la concentración y es activa en

contra de especies de *Candida*, incluyendo especies azoles y ANF B resistentes. Las CMI obtenidas con CAS oscilan entre 0.15 y 4 µg/ml dependiendo de la especie (20, 78). Se han realizado estudios en donde se han comparado los resultados de CMI usando el método de microdilución con puntos de corte del 100% de inhibición, en donde *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* mostraron  $CMI_{90\%} \leq 1 \mu\text{g/ml}$  (en un rango de 0.125-1 µg/ml). *Candida krusei*, *Candida guilliermondii* y *Candida famata* presentaron  $CMI \geq 1 \mu\text{g/ml}$  (en un rango de 1-2 µg/ml) (20, 78, 6). CAS al igual que otras equinocandinas, no es activa contra *Cryptococcus neoformans*, debido a la composición de la pared celular de este hongo, donde se llegan a obtener CMIs de  $\geq 32 \mu\text{g/ml}$  (48,1).

La actividad de CAS se ha evaluado contra una gran cantidad de hongos filamentosos patógenos principalmente en aquellos que son responsables de un gran número de infecciones. Este compuesto es activo en contra de *Aspergillus spp.* La actividad de CAS contra otros hongos filamentosos puede variar entre especies. La CAS es activa en contra de *Paecilomyces variotii* ( $CMI \leq 0.5 \mu\text{g/ml}$ ) pero no contra *Paecilomyces lilacinus* ( $CMI \geq 3 \mu\text{g/ml}$ ) y es activo en contra de *S. apiospermum* pero no contra *S. prolificans* (65,20). El problema en determinar la actividad de CAS es que no muestra las clásicas CMI (100 % de inhibición) en los métodos de dilución en caldo contra hongos filamentosos. Las CMIs son difíciles de determinar con exactitud debido a la reducción persistente del crecimiento. Así, CAS presenta una actividad fungicida contra las especies de *Aspergillus* debido a que blanco de acción de CAS, las β (1,3)-D-glucanas son incorporadas activamente en las puntas y ramificaciones de las hifas, CAS sólo lisa las

células que están creciendo activamente en las puntas y las ramificaciones de las hifas produciendo característicos cambios morfológicos (observados sólo microscópicamente) y agrupamientos del crecimiento fúngico en los tubos utilizados en las pruebas de susceptibilidad (27).

#### **1.10.1.2 Actividad *in vivo*.**

##### **1.10.1.2.1 Candidiasis.**

Algunos estudios han demostrado la eficacia de CAS en modelos de candidosis diseminada en ratones inmunocompetentes e inmunosuprimidos (1). Datos experimentales han confirmado su eficacia en ratones inmunosuprimidos infectados con cepas de *Candida krusei*, *C. glabrata* y *C. albicans* resistentes al FLU (35). En este estudio se observó que el tratamiento de FLU a la dosis de 5 mg/kg administrada dos veces al día no prolongó el tiempo de supervivencia y tampoco redujo la carga microbiana en los órganos de los ratones infectados comparados con aquellos animales que no recibieron tratamiento, pero el tratamiento con CAS administrada a dosis de 0.05-5 mg/kg una vez al día por vía intraperitoneal prolongó el tiempo de supervivencia significativamente y redujo la carga microbiana en bazo y riñón.

##### **1.10.1.2.2 Aspergillosis.**

En el caso de hongos filamentosos como el género de *Aspergillus spp* existe un estudio de aspergillosis invasiva en ratones inmunocomprometidos tratados con CAS a dosis mayores de 0.125 mg/kg/día, durante un período de 10 días y un tratamiento a una dosis mayor de 0.5 mg/kg/día durante un

periodo prolongado (28 días) En ambos modelos, dosis de 0.5-1 mg/kg/día de CAS fueron requeridas para obtener un 70 % de supervivencia (35).

#### **1.10.1.2.3 Otros hongos oportunistas.**

La actividad de CAS ha sido también estudiada en el tratamiento de las infecciones murinas con *Histoplasma capsulatum* y *Coccidioides immitis* (36). CAS ha mostrado una variable actividad *in vitro* contra *H. capsulatum* y presenta limitaciones sobre el tratamiento de la infección. En un modelo de coccidiomicosis sistémica murina, el tratamiento con CAS a dosis  $\geq 0.5$  mg/kg fue efectivo en la prolongación de la supervivencia y en la reducción de la carga microbiana comparada con el grupo control (33).

#### **1.11 Pruebas de susceptibilidad *in vitro*.**

Las pruebas de susceptibilidad tienen como objetivo colaborar en la predicción del efecto de una droga de interés contra un patógeno en específico. Desafortunadamente son poco utilizadas en los laboratorios de rutina para medir susceptibilidad con hongos. Las pruebas de susceptibilidad con antifúngicos son utilizadas para el desarrollo de nuevas drogas y actualmente son empleadas para la detección de aislamientos clínicos de hongos resistentes a diversos antifúngicos por el uso desmedido e incontrolado de estos (66).

La presencia de hongos oportunistas, emergentes y la aparición de aislamientos clínicos resistentes a los antifúngicos convencionales disponibles

han hecho de las pruebas de susceptibilidad una herramienta indispensable en la terapia antifúngica. Las pruebas de susceptibilidad para antifúngicos tienen un diseño muy semejante a las utilizadas para antibacterianos pero, existen diversos factores que han impedido la rápida estandarización de las pruebas de susceptibilidad con antifúngicos. (62) Entre los factores implicados en la estandarización de las pruebas de susceptibilidad se encuentran: la concentración y preparación del inóculo, el medio de cultivo empleado, la temperatura y el tiempo de incubación, la utilización de buffers, el pH en los medios empleados y la determinación del punto de corte. Otros factores que se tiene que tomar en cuenta en la estandarización de las pruebas son los relacionados con las características propias del hongo: diferentes estructuras reproductivas, el dimorfismo, la producción de pigmentos y exudados durante el crecimiento, la tasa de crecimiento y los requerimientos específicos de temperatura para su crecimiento. Además, existen las variables relacionadas con las propiedades químicas de los antifúngicos como la capacidad de disolverse en diversos medios, la estabilidad química, la fotosensibilidad y la tendencia de diversos antifúngicos de producir una limitada inhibición del crecimiento sobre un amplio rango de concentración (26).

En el año de 1992 el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recientemente nombrado como CLSI desarrolló el documento M27-P (55). Este método de referencia fue diseñado sólo para levaduras de los géneros de *Candida spp.* y *Cryptococcus neoformans*. Este documento fue aprobado en 1997 (56). En 1998, el documento de referencia para la realización de pruebas de susceptibilidad con hongos filamentosos se

encontraba sólo a nivel de propuesta (57). Hasta la fecha, el documento M38-A esta aprobado para los siguientes hongos filamentosos: *Aspergillus spp*, *Fusarium spp*, *Rhizopus arrhizus*, *P. boydii* (*Scedosporium apiospermum*) y *Sporothrix schenckii*.

Las pruebas de susceptibilidad *in vitro* con CAS para levaduras y hongos filamentosos aun no han sido estandarizadas. Para determinar el punto de corte en las pruebas de susceptibilidad con CAS se ha empleado el parámetro de la CMI siendo este un parámetro que no logra una correlación de los estudios obtenidos *in vitro* con los resultados en la clínica. Por lo tanto, la CMI no parece ser el parámetro adecuado para medir susceptibilidad con CAS en hongos filamentosos. Para poder determinar el daño que se produce con las equinocandinas sobre las hifas fue necesario introducir un nuevo parámetro que cuantificara el efecto de este nuevo compuesto antifúngico. Para lo cual se introdujo el parámetro de la concentración mínima efectiva (CME). Este parámetro ha correlacionado los resultados *in vitro* con los estudios *in vivo* en especies de *Aspergillus spp*, *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum*. Los valores de CME obtenidos en las pruebas de susceptibilidad con los hongos antes mencionados son más bajos que los obtenidos con la CMI además, la CME parece no modificarse al incrementar el tiempo de incubación. (44)

Por lo tanto, ha sido necesaria la estandarización de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* con CAS en contra de hongos filamentosos como *P. boydii* que son altamente resistentes a la terapia convencional. Además, debido a la limitación en la terapia de la pseudallescheriasis es indispensable estudiar la eficacia terapéutica *in vivo* con CAS.

## **1.12 Objetivos**

### **1.12.1 Objetivo general**

Evaluar la actividad *in vitro* e *in vivo* de caspofungina contra *P. boydii*.

### **1.12.2 Objetivos específicos**

1. Determinar la CMI y la CME de caspofungina contra aislamientos clínicos de *P. boydii*.
2. Definir la CMI de FLU y de ANF B contra *P. boydii*
3. Determinar la eficacia terapéutica de caspofungina, en un modelo animal de pseudallescheriasis sistémica.

## **1.13 Justificación.**

Se considera que la terapia de la pseudallescheriasis tiene limitaciones significativas en términos de su resistencia a los antifúngicos convencionales. Ante el surgimiento de nuevos antifúngicos, existe la necesidad de evaluar su actividad *in vitro* e *in vivo*, para determinar su probable utilidad en el tratamiento de la pseudallescheriasis humana.



## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS

#### 3.1 Actividad *in vitro*.

##### 3.1.1 Pruebas de macrodilución.

En la tabla 6 se muestran los resultados de las pruebas de susceptibilidad antifúngica *in vitro* de los 11 aislamientos clínicos de *P. boydii*. Los datos están reportados como la media geométrica y rangos de la CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) necesarios para inhibir el 50% y 90% de los aislamientos de *P. boydii* ensayados. A partir de los resultados obtenidos en las pruebas de susceptibilidad *in vitro* se infirió que la actividad antifúngica de CAS, FLU y ANF B frente a los aislamientos de *P. boydii* fue poco potente. De los tres antifúngicos ensayados, ANF B fue el que presentó una menor actividad antifúngica *in vitro*.

---

	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	50% <sup>a</sup>	90% <sup>b</sup>	Rango	MG
<b>CAS</b>	16	32	4-32	17.45
<b>FLU</b>	64	64	8 - >64	51.98
<b>ANF B</b>	16	>16	16->16	29.63

---

a CMI Inhibición en el 50 % de los aislamientos.

b CMI Inhibición en el 90 % de los aislamientos.

MG Media Geométrica.

Tabla 6. Actividad *in vitro* de CAS, FLU y ANF B contra los 11 aislamientos de *P. boydii*.

La tabla 7 muestra los valores obtenidos de las CMEs ( $\mu\text{g/ml}$ ) al microscopio óptico en los ensayos *in vitro* de CAS contra los 11 aislamientos de *P. boydii*. Los datos están reportados como la media geométrica y rangos de la CME ( $\mu\text{g/ml}$ ) necesarios para inhibir el 50% y 90% de los aislamientos de *P. boydii* ensayados. Al determinar la CME de CAS en los 11 aislamientos de *P. boydii*, en los tubos de las pruebas de susceptibilidad de las diferentes concentraciones empleadas de esta antifúngico se observó un cambio en la morfología de las hifas, las hifas se observaron dilatadas en las puntas y con un gran número de ramificaciones. Este efecto se magnificó en las concentraciones mayores a 16  $\mu\text{g/ml}$ . Los resultados obtenidos de CME fueron ligeramente diferentes a los obtenidos con el parámetro de la CMI. Los resultados de este estudio demostraron una pobre actividad *in vitro* de CAS contra los aislamientos de *P. boydii* al determinar su actividad con los parámetros de CMI y CME.

	CME ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	50% <sup>a</sup>	90% <sup>b</sup>	Rango	MG
CAS	16	16	4-32	13.24

Tabla 7. CME de CAS contra los 11 aislamientos de *P. boydii*.

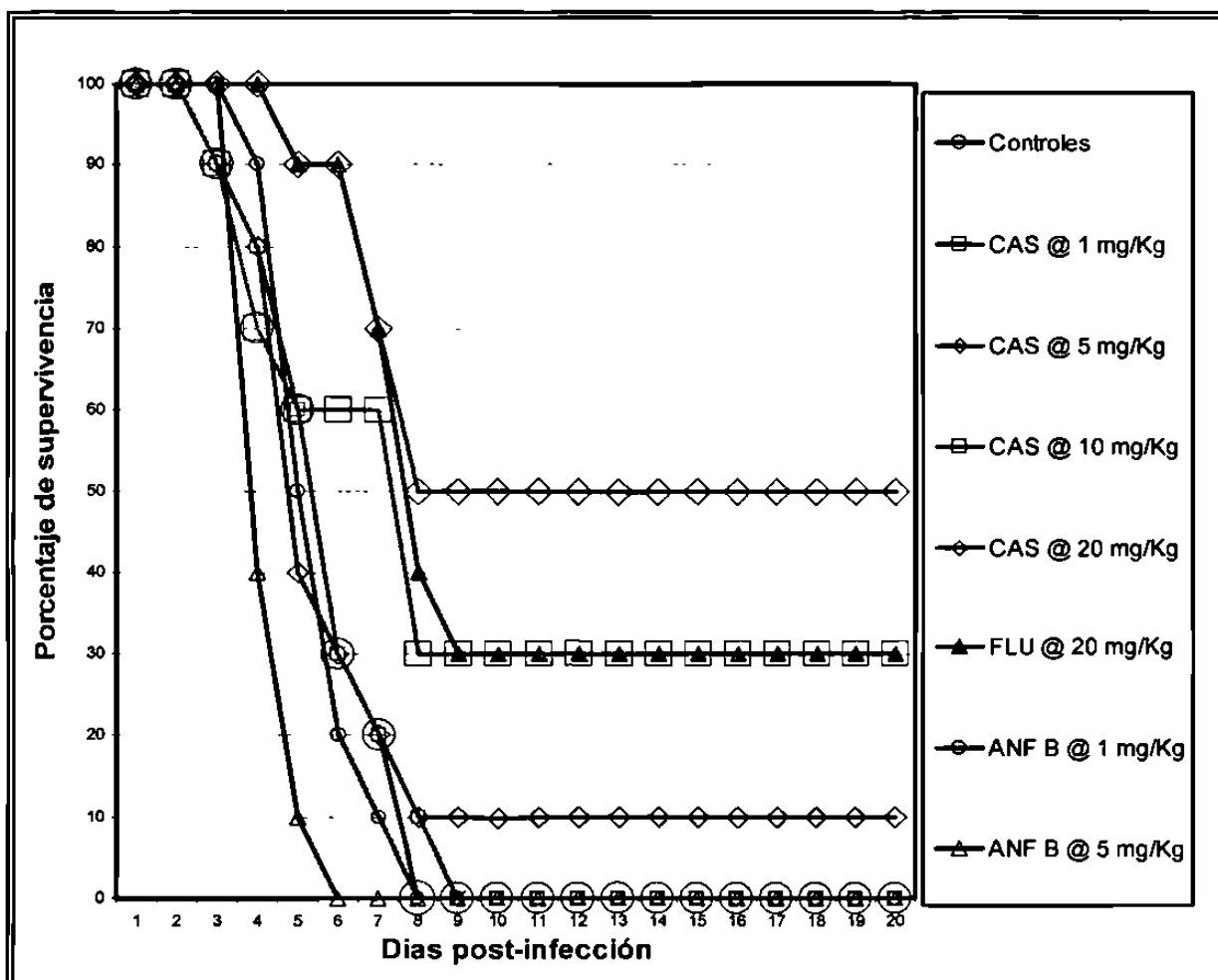
## **3.2 Actividad *in vivo***

### **3.2.1 Determinación de la eficacia terapéutica.**

#### **3.2.1.1 Estudios de supervivencia.**

Los resultados del estudio de supervivencia con la cepa 00-180 de *P. boydii* se muestran en la Figura 3. Todos los ratones del grupo control murieron entre los días 3 y 8. Se obtuvo una mortalidad del 100% y 90 % con el tratamiento de CAS a dosis de 1 mg/kg (UD) y 5 mg/kg (UD) respectivamente. Un 70% y 50% de mortalidad se obtuvo de los ratones que fueron tratados con CAS a las dosis de 10 mg/kg (UD) y 20 mg/kg (DD) respectivamente al finalizar el estudio. Sólo un 30% de los ratones tratados con FLU a dosis de 20 mg/kg (DD) sobrevivieron hasta los 20 días del estudio. Todos los ratones sometidos al tratamiento con ANF B a dosis de 1 y 5 mg/kg murieron durante el estudio.

Figura 3. Estudio de supervivencia de los ratones infectados con *P. boydii* cepa 00-180 y su tratamiento con CAS, FLU y ANF B.



### 3.2.1.2 Estudio de carga microbiana.

La carga microbiana de los animales infectados con la cepa 00-180 fue determinada el día que murieron los ratones y en el día 12 post-infección para aquellos que sobrevivieron al final del estudio. El tratamiento con CAS a dosis de 10 mg/kg no redujo la carga microbiana y no hubo una diferencia significativa cuando se comparó con el grupo control ( $P \leq 0.05$ ). Los ratones tratados con CAS a dosis de 20 mg/kg (DD) significativamente redujeron la carga microbiana en bazo, riñón y cerebro comparada contra el grupo control. El tratamiento con FLU a dosis de 20 mg/kg (DD) disminuyó significativamente las UFC en los tres órganos estudiados en comparación con el grupo control. El tratamiento con ANF B a dosis de 1 mg/kg fue inefectivo en la reducción de la carga microbiana y tampoco mostró diferencia significativa con respecto al grupo control ( $P \leq 0.05$ ). En este estudio se demostró que sólo a dosis altas de CAS y FLU (20 mg/kg) tuvieron efecto en la reducción de la carga microbiana. En ninguno de los tratamientos utilizados en este estudio se observó un 100 % de esterilidad de los órganos estudiados. Estos resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Carga microbiana en bazo, riñón y cerebro de ratones infectados con la cepa 00-180 *P. boydii*.

Tratamiento (mg/kg)	Media log <sub>10</sub> CFU / órgano		
	Bazo	Riñón	Cerebro
Grupo control	3.87	4.64	4.67
ANF B 1	3.77	4.38	4.50
CAS 10	3.84	4.65	4.64
CAS 20	3.58*	4.38*	4.34*
FLU 20	3.10*	3.70*	3.71*

\* $P \leq 0.05$  en comparación con el grupo control.

## DISCUSIÓN

Actualmente la terapia antifúngica de las micosis sistémicas se encuentra restringida a azoles y polienos. Sin embargo, la terapia de las pseudallescheriasis con ANF B resulta ineficaz e inclusive esta droga se encuentra relacionada con una alta toxicidad y una serie de efectos secundarios. Es por este hecho que ha surgido la necesidad de buscar nuevas moléculas que presenten actividad contra *P. boydii*.

Los componentes de la pared celular fúngica como quitina, mananas y glucanas surgen como un fuerte blanco de investigación para el desarrollo de nuevas drogas. CAS pertenece a este grupo y parece ser un compuesto promisorio en la terapia de infecciones fúngicas sistémicas. Se han realizado estudios de actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* con CAS con hongos filamentosos y levaduras, sin embargo la mayoría de éstos se encuentran particularmente enfocados a *Candida spp* y *Aspergillus spp*. En los estudios iniciales de la determinación de actividad *in vitro* de CAS contra especies del género de *Aspergillus* no se observó una clara correlación con los estudios *in vivo* (64). Debido al mecanismo de acción que presenta CAS fue preciso establecer un parámetro que pudiera correlacionarse con los ensayos *in vivo*. Arinka y colaboradores reportaron valores altos de CMI (> 16 µg/ml) para CAS contra *Aspergillus spp* (3). Sin embargo, ellos realizaron revisiones microscópicas y establecieron como punto de corte aquellas diluciones donde se observara un crecimiento anormal en los filamentos hifales, describiendo a esta determinación como la CME, los resultados reportados con

este parámetro fueron significativamente más bajos que los obtenidos con la CMI. Los valores de CME fueron considerados también como punto de corte válido para determinar la actividad de CAS contra *Aspergillus spp* y otros hongos filamentosos.

En este estudio, determinamos la actividad *in vitro* e *in vivo* de CAS contra *P. boydii* comparada con FLU y ANF B. Algunos autores han empleado diferentes métodos para el desarrollo de las pruebas de susceptibilidad con CAS, como los ensayos de difusión en disco (4) y el E- test (17). No obstante, este trabajo se realizó utilizando el documento de referencia M38-A del CLSI debido a que este es el único método que se encuentra actualmente estandarizado para hongos filamentosos como *P. boydii*. Esta metodología sólo está estandarizada para medir susceptibilidad contra agentes antifúngicos como la 5-Fluorocitosina, ANF B, ITRA, FLU, VORI, POSA y RAVU (59).

Para la determinación del punto de corte en las pruebas de susceptibilidad *in vitro* con los tres compuestos antifúngicos empleamos la CMI y para CAS además determinamos la CME. Los resultados de nuestro trabajo en el estudio *in vitro* demostraron la pobre actividad de los compuestos antifúngicos empleados contra los aislamientos de *P. boydii*. Estos resultados coinciden con estudios previos donde se reportó la relativa resistencia de 23 aislamientos de *S. apiospermum* a varios agentes antifúngicos (20). Sin embargo, con CAS observamos importantes discrepancias. Espinel Ingroff (24) realizando ensayos de susceptibilidad empleando el método de microdilución en caldo y utilizando un rango de concentración de inóculo  $0.9 \times 10^4$  -  $4.7 \times 10^4$  UFC/ml reportó un rango



de CMI 0.5 a 4  $\mu\text{g/ml}$  contra *P. boydii*. En contraste, con nuestro estudio, utilizamos el método de macrodilución en caldo y un rango de concentración de inóculo de  $0.4 - 5 \times 10^4$  UFC/ml, los resultados obtenidos de CMI fueron consideradamente más altos (4-32  $\mu\text{g/ml}$ ). Estas discrepancias pudieran ser explicadas, en parte, por las diferencias en la metodología de los procedimientos. Por otro lado, en nuestro trabajo los valores obtenidos de CMI y CME a partir de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* con CAS fueron muy semejantes. Estos valores altos de CMI y CME estuvieron ampliamente reflejados en los resultados del estudio de eficacia terapéutica.

Actualmente, existe sólo un modelo murino de pseudallescheriasis sistémica diseñado para evaluar el impacto terapéutico de diversos compuestos antifúngicos (35). Este modelo murino fue utilizado en esta investigación para evaluar la eficacia terapéutica de CAS en comparación con FLU y ANF B.

Los resultados *in vivo* de este trabajo mostraron que CAS fue efectiva sólo a la dosis más alta ensayada (20 mg/kg DD) para los estudios de supervivencia y carga microbiana. Pocos estudios han evaluado la actividad de esta nueva equinocandina contra especies del género de *Scedosporium spp.* Bocanegra y colaboradores (12) evaluaron la actividad de CAS y ANF B liposomal (ANFB L) individualmente y en combinación en el tratamiento de la scedosporiosis sistémica. Ellos emplearon un aislamiento clínico de *Scedosporium prolificans* y en los estudios de supervivencia utilizaron diferentes concentraciones de inóculo ( $2.3 \times 10^6$  y  $2.4 \times 10^5$  conidias / ratón). Ellos mostraron que la terapia con CAS fue efectiva en el estudio de supervivencia sólo a las dosis de 10 y 20 mg/kg

comparada con el grupo control, en ambas concentraciones de inóculos. La situación fue idéntica cuando ANFBL fue administrada a las dosis de 10 y 20 mg/kg prolongando la supervivencia significativamente sobre el grupo control. Se realizaron dos estudios de carga microbiana con diferentes concentraciones de inóculo ( $8.7 \times 10^4$  y  $2.7 \times 10^5$  conidias / ratón) para los cuales se emplearon las dosis de CAS y ANFB L más altas (CAS 20 mg/kg y ANFBL 30 mg/kg). Sólo la monoterapia con ANFB L al igual que la terapia combinatoria ANFBL con CAS redujeron significativamente la carga microbiana con ambas concentraciones de inóculo del hongo. Estos autores no encontraron sinergismo alguno entre CAS y ANFBL a las dosis ensayadas en ambos estudios de eficacia terapéutica. Este estudio dejó clara la necesidad de evaluar la monoterapia con CAS y en combinación con otras drogas antifúngicas.

Un estudio semejante al nuestro reportó la actividad *in vitro* e *in vivo* de VORI en contra de *Scedosporium apiospermum*. Capilla y colaboradores (16) evaluaron la eficacia terapéutica de VORI utilizando el modelo murino de pseudallescheriasis sistémica previamente desarrollado por González y colaboradores. Ellos demostraron que VORI fue efectivo en las dosis más altas empleadas (40 mg/kg) en el estudio de supervivencia. VORI redujo significativamente la carga microbiana en cualquiera de las dosis empleadas (5, 20 y 40 mg/kg) en cerebro y bazo pero no para riñón, donde sólo fue estadísticamente significativa con la dosis de 20 mg/kg y no la de 40 mg/kg. En contraste con nuestro trabajo, ellos utilizaron una dosis letal diferente ( $1 \times 10^4$  conidias/ratón) y una cepa más virulenta. VORI es actualmente una de las

primeras opciones en la terapia de las pseudallescheriasis, sin embargo, dada la resistencia de *P. boydii* inclusive a esta droga, deben buscarse otras opciones para el tratamiento de estas infecciones. Nuevos triazoles como POSA, han resultado ser moderadamente efectivos *in vitro* e *in vivo* contra este hongo. González y colaboradores (33) evaluaron la actividad *in vitro* e *in vivo* de POSA contra *P. boydii*. Ellos determinaron que POSA resultó ser efectivo sólo a dosis  $\geq$  25 mg/kg, en el control de la pseudallescheriasis sistémica. Reiterando con esto el empleo de dosis altas en la terapia antifúngica de las pseudallescheriasis así como la resistencia de este hongo a nuevos agentes antifúngicos como los convencionales.

## CONCLUSIÓN

1. En los estudios *in vitro* se determinó que la actividad de CAS, FLU, y ANF B frente a los aislamientos de *P. boydii* fue poco potente.
2. Los resultados de CMI y CME para CAS fueron muy semejantes.
3. En los estudios *in vivo*, CAS y FLU fueron efectivas solo a las dosis más altas ensayadas (20 mg/kg dos veces al día). Sin embargo ningún antifúngico fue capaz de erradicar al hongo de los tejidos.
4. Los resultados obtenidos en el estudio de eficacia terapéutica se relacionaron con los valores de mostrados de CMI y CME en los ensayos *in vitro* para los antifúngicos probados.
5. Este estudio confirma la resistencia de *P. boydii* a los antifúngicos y sugiere que dosis altas de CAS pudieran ser efectivas en los pacientes.

## PERSPECTIVAS

Los resultados de este trabajo indican que debe evaluarse la posible utilidad de la terapia combinatoria para el tratamiento de la pseudallescheriasis sistémica murina. Además, surge la necesidad de evaluar la actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* de nuevas moléculas contra *P. boydii*.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abruzzo GK, Gill CJ, Flattery AM, Kong L, Leighton C, Smith JG, Pikounis VB, Bartizal K, Rosen H. Efficacy of the echinocandin caspofungin against disseminated aspergillosis and candidiasis in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; 44 (9): 2310-2318.
2. Ajello L. The isolation of *Allescheria boydii* shear, an etiologic agent of mycetomas, from soil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1952; 1(2):227-238.
3. Ajello L, Zeidberg LD. Isolation of *Histoplasma capsulatum* and *Allescheria boydii* from soil. *Science* 1951; 113 (2945): 622-663.
4. Arinka S, Lozano-Chiu M, Paetznick V and Rex JH. *In vitro* susceptibility testing methods for caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 45:327-330.
5. Arikan S, Paetznick V, Rex JH. Comparative evaluation of disk diffusion with microdilution assay in susceptibility testing of caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46(9):3084-7.
6. Arnett JC, Hatch HB. Pulmonary allescheriasis. Report of case and review of the literature. *Arch. Intern. Med.* 1975; 135(9): 1250-1253.

7. Barchiesi F, Schimizzi AM, Fothergill AW, Scalise G, Rinaldi MG. *In vitro* activity of the new echinocandin antifungal, MK-0991, against common and uncommon clinical isolates of *Candida* species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1999; 18 (4): 302-304.
8. Barrett-Bee K, Dixon G. Ergosterol biosynthesis inhibitions: A target for antifungal agents. *Acta Biochim Pol.* 1995; 42(4): 465-479.
9. Bartizal K, Gill CJ, Abruzzo GK, Flattery AM, Kong L, Scott PM, Smith JG, Leighton CE, Bouffard A, Dropinski JF, Balkovec J. *In vitro* preclinical evaluation studies with the echinocandin antifungal MK-0991(L-743,872). *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997; 41(11): 2326-2332.
10. Bates DW, Su L, Yu DT, Chertow GM, Seger DL, Gomez DR, Dasbach EJ, Platt R. Mortality and costs of acute renal failure associated with amphotericin B therapy. *Clin. Infect. Dis.* 2001; 32(5): 686-693.
11. Bocanegra R, Najvar LK, Hernández S, McCarthy DI, and Graybill JR. Caspofungin and liposomal amphotericin B therapy of experimental murine scedosporiosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49 (12):5139-5141.
12. Bouffard FA, Zambias RA, Dropinski JF, Balkovec JM, Hammond ML, Abruzzo GK, Bartizal KF, Marrinan JA, Kurtz MB, McFadden DC. Synthesis and antifungal

activity of novel cationic pneumocandin B0 derivatives.  
J. Med. Chem. 1994 Jan 21; 37(2):222-5.

13. Bowman JC, Hicks PS, Kurtz MB, Rosen H, Schmatz DM, Liberator PA, Douglas CM. The antifungal echinocandin caspofungin acetate kills growing cells of *Aspergillus fumigatus in vitro*. Antimicrob. Agents Chemother. 2002; 46(9):3001-3012.
14. Boyd MF, Crutchfield ED. A contribution to the study of mycetoma in North America. Am. J. Trop. Med. 1921; 1, 215-289.
15. Capilla J, Serena C, Pastor FJ, Ortoneda M and Guarro J. Efficacy of voriconazole in treatment of systemic scedosporiosis in neutropenic mice. Antimicrob. Agents Chemother. 2003; 47 (12):3976-3978.
16. Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M. Comparison of antifungal of susceptibility testing of subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing proposed standard and the E-test with the NCCLS broth microdilution method for voriconazole and caspofungin susceptibility testing of yeast species. J. Clin. Microbiol. 2002; 40(10):3841-4.
17. Cooke WB, Kabler P. Isolation of potentially pathogenic fungi from polluted water and sewage. Public Health Rep. 1995; 70 (7): 689-694.



18. Creitz J, Harris HW. Isolation of *Allescheria boydii* from sputum. Am. Rev. Tuberc. 1955; 71 (1): 126-130.
19. Cuenca-Estrella M, Ruiz-Diez B, Martínez-Suárez JV, Monzon A, Rodríguez-Tudela JL. Comparative in-vitro activity of voriconazole (UK-109,496) and six other antifungal agents against clinical isolates of *Scedosporium prolificans* and *Scedosporium apiospermum*. J. Antimicrob Chemother. 1999; 43(1):149-51.
20. Del Poeta M, Schell WA, Perfect JR. *In vitro* activity of pneumocandin (L-743, 872) against a variety of clinically important mold. Antimicrob. Agents Chemother. 1997; 41(8): 1832-1836.
21. de Hoog GS, Marvin –Sikkema FD, Lahpoor GA, Gottschall JC, Prins RA, Gueho E. Ecology and physiology of the emerging opportunistic fungi. *Pseudallescheria boydii* and *Scedosporium prolificans*. Mycoses. 1994; 37(3-4):71-78.
22. Emmons CW. *Allescheria boydii* and *Monosporium apiospermum*. Mycologia 1944; 36:188-193.
23. Espinel-Ingroff A. Comparison of *in vitro* activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeast. J. Clin. Microbiol. 1998; 36: 2950-2956.

24. Espinel-Ingroff A and Kerkering TM. Spectrophotometric method of inoculum preparation for the *in vitro* susceptibility testing of filamentous fungi. J. Clin. Microbiol. 1991; 29: 393-394.
25. Fays S, Di Cesare MP, Antunes A, Truchetet F. Cutaneous and osteoarticular *Scedosporium apiospermum* infection. Ann. Med. Interne (Paris). 2002; 153(8):537-539.
26. Galgiani JN, Susceptibility testing of fungi: current status of the standardization process. Antimicrob. Agents Chemother. 1993; 37: 2517-2521.
27. Gallis, H. A. Amphotericin B: A commentary on its role as an antifungal agent and as a comparative agent in clinical trial. Clin. Infect. Dis. 1996; 22 (Suppl. 2): S145-147.
28. Georgopapadakou NH, Tkacz JS. The fungal cell wall as a drugs target. Trends Microbiol. 1995; 3:98-104.
29. Gil-Lamaignere C, Roidiles E, Lyman CA. Human fagocytic cell responses to *Scedosporium apiospermum* (*Pseudallescheria boydii*): variable susceptibility to oxidative injury. Infect. Immun. 2003; 71: 6472-6478.

30. Ginter G, Petutschnig B , Pierer G , Soyer HP, Reischle S, Kern T, de Hoog S. Atypical cutaneous pseudallescheriosis refractory to antifungal agents. *Mycoses* 1998; 42: 507-511.
31. Girmenia C, Martino P. New antifungal drugs and new clinical trials: interpreting results may be difficult. *Curr Opin Oncol.* 2003; 15: 283-288.
32. González GM, Tijerina R, Najvar LK. Activity of posaconazole against *Pseudallescheria boydii*: *in vitro* and *in vivo* assays. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47: 1436-1438.
33. González GM, Tijerina R, Najvar LK. Correlations between antifungal susceptibilities of *Coccidioides immitis in vitro* and antifungal treatment with caspofungin in mouse model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 45:1854-1859.
34. Gonzalez GM, Tijerina R, Najvar LK, Rinaldi M, Yeh IT and Graybill JR. Experimental murine model of disseminated pseudallescheria infection. *Med. Mycol.* 2002; 40:243-248.
35. Graybill JR, Najvar LK, Luther MF, Fothergill AW. Treatment of murine disseminated candidiasis with L-743, 872. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41:1775-1777.

36. Graybill JR, Najvar LK, Montalbo EM. Treatment of histoplasmosis with MK-991(L-743,872). *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998; 42: 151-153.
37. Grigg AP, Phillips P, Durham S, Sherpherd JD. Recurrent *Pseudallescheria boydii* sinusitis in acute leukemia. *Scand. J. Infect. Dis.* 1993; 25: 263-267.
38. Groll AH, Walsh TJ. Antifungal chemotherapy: advances and perspective. *Swiss Med. Wkly.* 2002; 132: 303-311.
39. Hajdu R, Thompson R, Sundelof JG, et al. Preliminary animal pharmacokinetics of the parental antifungal agent MK-0991 (L-743,872) *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997; 41; 2339-2344.
40. Hay RJ. Agent of eumycotic mycetomas. In: Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infection (Novena Edición, Volume 4) Editorial Collier L, Balows A, Sussman M . Arnold, London, UK, 487-496 (1998).
41. Hector RF. Compounds active against cell wall of medically important fungi. *Clin. Microbiol. Rev.* 1993; 6:1-21.
42. Husain S, Muñoz P, Forrest G et al. Infections due to *Scedosporium apiospermum* and *Scedosporium prolificans* in transplant recipients: clinical characteristics and impact on antifungal therapy on outcome. *Clin. Inf. Dis.* 2005; 40: 89-99.

43. Ikeda F, Wakai Y, Matsumoto S, Maki K, Watabe E, Tawara S, Goto T, Watanabe Y, Matsumoto F, Kuwahara S. Efficacy of FK463, a new lipopeptide antifungal agent, in mouse models of disseminated candidiasis and aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; 44(3):614-8.
44. Imhof A, Balajee SA, Marr KA. New methods to assess susceptibilities of *Aspergillus* isolates to caspofungin. *J. Clin Microbiol.* 2003; 41(12):5683-5688
45. Issakainen J, Jalava J, Eerola E, Campbell CK. Relatedness of *Pseudallescheria*, *Scedosporium* and *Graphium* pro part based on SSU rDNA sequences. *J. Med. Vet. Mycol.* 1997; 35: 389-98.
46. Kanafani ZA, Comair Y, Kanj SS. *Pseudallescheria boydii* cranial osteomyelitis and subdural empyema successfully treated with voriconazole: A case report and literature review. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2004; 23: 836-840.
47. Kirkpatrick WR, McAtee RK, Fothergill AW, Loebenberg d, Rinaldi M, and Patterson TF. Efficacy of SCH56592 in rabbit model of invasive aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; 44:780-782.
48. Krishnarao TV, Galgiani JN. Comparison of the *in vitro* activities of the echinocandin LY303366, the pneumocandin MK-0991, and fluconazole against

*Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. Ant. Agent. Chemother. 1997; 41: 1957-1960.

49. Kurshid A, Barnett VT, Sekosan M, Ginzburg AS, Onal E. Disseminated *Pseudallescheria boydii* infection in a nonimmunocompromised host. Chest. 1999; 116: 572-574.
50. Larone DH. Medically Important Fungi: A guide to identification (Segunda Edición) Elsevier, Ny, USA (1987).
51. Lutwick LI, Galgiani JN, Johnson RH, Stevens DA. Visceral fungal infections due to *Petriellidium boydii* (*Allescheria boydii*); *In vitro* drug sensitivity studies. Am. J. Med. 1976; 61:632-40
52. Mc Ginnis MR, Padhye AA. Fungi causing eumycotic mycetoma. In : Manual of clinical Microbiology (Octava edición )Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (Eds) .ASM Press, Washington DC, USA, 1848-1856. (2003)
53. Meletiadis J, Meis JF, Mouton JW. *In vitro* activities of new and conventional antifungal agents against clinical *Scedosporidium* isolates. Antimicrob. Agents Chemother.2002; 46: 62-68.

54. Miyamoto T, Sasaoka R, Kawaguchi M. *Scedosporium apiospermum* skin infection: a case report and review of the literature. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1998; 39: 498-500.
55. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1992. Reference method for broth dilution susceptibility testing of yeast; Approved standard. NCCLS document M27-a. NCCLS, 771 E. Lancaster Avenue, Villanova, PA, 19085.
56. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1992. Reference method for broth dilution susceptibility testing of yeast; Proposed standard. NCCLS document M27-P. NCCLS, 771E. Lancaster Avenue, Villanova, PA, 19085.
57. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1992. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Proposed standard. NCCLS document M38-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
58. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
59. Nesky MA, Mc Dougal Ec, Peacock JE. *Pseudallescheria boydii* brain abscess successfully treated with voriconazol and surgical drainage: case report and

literature review of central nervous system pseudallescheriasis. Clin. Infect. Dis. 2000; 31: 673-677.

60. Nyfeler R, Keller SW. Metabolites of microorganisms. 143. Echinocandin B, a novel polypeptide-antibiotic from *Aspergillus nidulans* var. *echinulatus*: isolation and structural components. Helv. Chim. Acta. 1974; 57(8):2459-77.
61. O`Brian TA, Browne FA, Schonder JF. *Scedosporium apiospermum* (*Pseudallescheria boydii*) endocarditis. J. Infect. 2002; 44:189-192.
62. Perfect JR, Cox GM, Dodge RK, Schell WA. *In vitro* and *in vivo* efficacies of the azole SCH 56592, against *Cryptococcus neoformans*. Antimicrob. Agents Chemother. 1996; 40: 1910-1913.
63. Petraitien R, Petraitis V, Groll AH, Sein T, Schaufele RL, Francesconi A, Bacher J, Avila NA and Walsh TJ. Antifungal efficacy of caspofungina (MK-0991) in experimental pulmonary aspergillosis in persistently neutropenic rabbits: pharmacokinetics, drugs disposition, and relationship to galactomannan antigenemia. Antimicrob. Agents Chemother. 2002; 46:12-23.
64. Pfaller MA, Marco F, Messer SA, Jones RN. *In vitro* activity of two echinocandins derivaties, LY303366 and MK-0991 (L-743, 792), against clinical isolates of



*Aspergillus, Fusarium, Rhizopus*, and others filamentous fungi. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1998; 30: 251-5.

65. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Rice C, Tendolkar S, Hollis RJ, Diekema DJ. Caspofungin activity against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida*. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(12):5729-5731.
66. Pfaller MA, Messer S, Jones RN. Activity of new triazole, SCH 56592, compared with those of four other antifungal agents tested against clinical isolated of *Candida* spp and *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997; 41: 233-235.
67. Piper JP, Golden J, Brown D, Broestler J. Successfully treatment of *Scedoporium apiospermum* suppurative arthritis with itraconazole. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1990; 9: 674-675.
68. Posteraro P, Frances C, Didona B, Dorent R, Posteraro B, Faffa G. Persistent Subcutaneous *Scedoporium sipospermum* infection. *Eur. J. Dermatol.* 2003; 13, 603-605.
69. Rainer GS, de Hoog GS, Wedde M Graser Y, Gilges S. Molecular variability of *Pseudallescheria boydii*, a neutropenic opportunist. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38, 3267-3273.

70. Rippon JW. Medical Mycology (Tercera edición). WB Saunders Company, Pa, USA, 651-680 (1988).
71. Salkin IF, McGinnis MR, Dykstra MJ, et al: *Scedosporium inflatum*, an emerging pathogen. J. Clin. Microbiol. 1988; 26:498-503.
72. Scherr GR, Evans SG. *Pseudallescheria boydii* infection in the acquired immunodeficiency syndrome. Arch. Pathol. Med. 1992; 116: 535-536
73. Shear CL, Life history of an undescribed ascomycete isolated from a granular mycetoma of man, Mycologia. 1992; 14:239-243.
74. Storm G and Etten V. Biopharmaceutical aspects of lipid formulations of amphotericin B. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.1997; 16: 64-73.
75. Sutton DA, Fothergill AW, Rinaldi MG. Guide to clinically significant fungi. Baltimore: Williams & Wilkins, pp 332-427, 1998.
76. Tadros TS, Workowski KA, Siegel RJ, Hunter S, Schwartz DA. Pathology of hyalohyphomycosis. Hum. Pathol.1998; 29: 1266-1272.
77. Tarozzi, G. Ricerche anatome-pathologiche, bacteriologiche e sperimentali sopra un caso di actinomicosi del piede. Arch. Sci. Med. 33:553-632, 1909.

78. Torre-Cisneros J, González-Ruiz A, Hodges MR, Lutsar I. Voriconazole for treatment of *S. apiospermum* and *S. prolificans* infection (abstract 305, p 93). 38<sup>th</sup> Annual Meeting of the Infection Diseases Society of America, September 7-10, 2000.
79. Travis LB, Roberts GD, Wilson WR. Clinical significance of *Pseudallescheria boydii*: a review of 10 year's experience. Clin. Proc.1985; 60: 531-537.
80. US Food and Drug Administration. Cancidas<sup>TM</sup> (casposfungin acetate for intravenous injection) Merck corporation, NDA 21-227. Background document for antiviral Drugs Products Advisory Committee Meeting, January 10, 2001. Available at: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/cder01.htm> Accessed May 10, 2001.
81. US Food and Drug Administration. Cancidas<sup>TM</sup> (casposfungin acetate for intravenous injection) Merck corporation, NDA 21-227. Efficacy supplements approved in calendar year 2002 (sel-se7)\* <http://www.fda.gov/cder/rdmt/ESCY02AP.HTM>
82. US Food and Drug Administration. Cancidas<sup>TM</sup> (casposfungin acetate for intravenous injection) Merck corporation, NDA 21-227. Efficacy supplements and calendar year 2003 (sel se7)\* <http://www.fda.gov/cder/rdmt/ESCY03AP.HTM>
83. Varrivarian SE, Anaissie EJ, Bodey GP. Emerging fungal pathogens in immunocompromised patient: classification, diagnosis and management. Clin. Infect. Dis.1993; 17 (suppl 2): 487-491.

84. Vazquez JA, Lynch M, Boikov D, Sobel JD. In vitro activity of a new pneumocandin antifungal, L-743,872, against azole-resistant *Candida* species. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 1997; 41: 1612-4.
85. Vicente MF, Basilio A, Cabello A, Pelaez F. Microbial natural products as a source of antifungal. *Clin. Microbiol. Infect.* 2003; 9(1):15-32. Review.
86. Villanueva A, Gotuzzo E, Arathoon E. The efficacy, safe and tolerability of caspofungina vs fluconazol in the treatment of esophageal candidiasis. In: Program and abstract of the 41<sup>st</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; December 16-19, 2001; Chicago III, abstract 675.
87. Walsh T J, Groll AH. Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. *Transpl. Infect. Dis.* 1999; 1: 247-261.
88. Walsh TJ, Groll A, Hiemenz J, Fleming R, Roilides E, Anaissie E. Infection due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004; 10: 48-66.
89. Walsh TJ, Peter J, Mc Gough DA, Fothergill AW, Rinaldi MG, Pizzo PA. Activity of amphotericin B and antifungal azoles alone and in combination against *Pseudallescheria boydii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995; 39: 1361-1364.

90. Wedde M, Muller D, Tintelnot K, de Hoog GS, Stahl U. PCR-based identification of clinically relevant *Pseudallescheria/Scedosporium* strains. *Med. Mycology*. 1998; 36: 61-67.
91. Wu Z, Ying H, Yiu S, Irvine J, Smith R. Fungal keratitis caused by *Scedosporium apiospermum*: Report of two cases and review of treatment. *Cornea*. 2002; 21: 519-523.



