



# Sinergismo entre ajoeno y ketoconazol en aislamientos de *Microsporium canis*. Un estudio preliminar mediante la determinación de la concentración inhibitoria fraccional (CIF)

Eliades Ledezma<sup>1</sup>, Maria Teresa Maniscalchi<sup>2</sup>, Druvic Lemus Espinoza<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Avda. Medina Angarita sector Carmona, edificio Doña Lucia, planta baja, Trujillo, Estado Trujillo; <sup>2</sup>Grupo de Micología Aplicada, Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui, Venezuela

## Resumen

Las enfermedades infecciosas originadas por hongos son, probablemente, las que más frecuentemente afectan al ser humano. Aunque una variedad de agentes antifúngicos están disponibles para su control, la existencia de resistencia a diversas clases de antifúngicos, así como también la biodisponibilidad de la droga en el sitio de la infección, representan un problema serio durante su tratamiento. Una aproximación en la búsqueda de soluciones efectivas ha sido la combinación de dos o más agentes antifúngicos con la finalidad de obtener algún efecto aditivo o sinérgico que potencie sustancialmente la actividad antifúngica de las drogas. En este estudio evaluamos si el efecto producido por la combinación de ajoeno y ketoconazol sobre el crecimiento y la proliferación de hongos filamentosos es de naturaleza aditiva, antagónica o sinérgica. Para ello, se investigaron sus interacciones in vitro en tres aislamientos de *Microsporium canis* mediante un estudio preliminar, utilizando la técnica de microdilución, siguiendo las recomendaciones descritas en el documento NCCLS M-38A con algunas modificaciones. Los resultados de concentración inhibitoria fraccional obtenidos para cada una de las tres cepas estudiadas (valores de 0,18 - 0,36  $\mu$ M) demuestran la existencia de un efecto sinérgico muy potente cuando se combinan estas drogas, y configura un panorama muy prometedor para la realización de futuros estudios clínicos, donde se utilicen para el tratamiento de infecciones causadas por *M. canis*, tradicionalmente de difícil tratamiento.

## Palabras clave

*Microsporium canis*, Ajoeno, Ketoconazol, Antifúngicos, Dermatofitos, *Tinea capitis*

## Synergy between ajoene and ketoconazole in isolates of *Microsporium canis*. A preliminary study using fractional inhibitory concentration technique (FIC)

## Summary

Fungal infections are probably the most frequent infectious diseases affecting human being. Resistance to different anti-fungal drugs, and their bioavailability in the infection site, represent a problem for treatment. Looking for effective solutions, combination of two or more antifungal drugs to obtain an additive effect or synergic effect that potent antifungal activity has been investigated. In this study, the effect (additive, antagonist or synergistic) of ajoene and ketoconazole combination was evaluated in the growth and proliferation of filamentous fungi. Interactions in vitro were investigated in three isolates of *Microsporium canis* through a preliminary study using micro dilution, according to recommendations of NCCLS M-38A, with several modifications. Results obtained for CIF of each isolates studied (CIF = 0,18 - 0,36  $\mu$ M), demonstrate that exists a very potent synergistic effect, when they are combined, and it represents a hope for future clinic trials to treat resilient fungal infections caused by *M. canis*.

## Key words

*Microsporium canis*, Ajoene, Ketoconazole, Antifungal, Dermatophytes, *Tinea capitis*

## Dirección para correspondencia:

Dr. Eliades Ledezma  
Fundacite-Trujillo  
Avda. Medina Angarita, sector Carmona  
Edificio Doña Lucia, planta baja  
Trujillo, Estado Trujillo, Venezuela  
Tel.: +58 2722365275  
Fax: +58 2722363503  
E-mail: eliadesl@yahoo.es

Aceptado para publicación el 8 de abril de 2008

En la búsqueda de mejores opciones y esquemas terapéuticos con mayor eficacia en el tratamiento de las infecciones micóticas, diversos autores han estudiado el efecto de combinaciones de dos o tres clases de agentes antifúngicos que actúan como inhibidores en la misma o en distintas rutas metabólicas (combinaciones de azoles, azoles y alilaminas en la ruta de la biosíntesis del ergosterol y azoles y anfotericina B en rutas diferentes) [7,22,24,25,27]. Sin embargo, a pesar de que la actividad antifúngica de los compuestos ajoeno y ketoconazol se encuentra ampliamente documentada en la literatura [8,26], no se ha realizado ningún estudio del efecto combinado de estas dos drogas sobre el crecimiento y la proliferación de estos agentes patógenos. El ajoeno es un compuesto órgano-sulfurado originalmente obtenido de extractos alcohólicos del ajo [2] que ha demostrado una potente actividad antifúngica tanto *in vitro* como *in vivo* [9-11] y cuyo mecanismo de acción parece estar asociado a la inhibición de la biosíntesis de fosfolípidos [21]. El ketoconazol es un agente antimicótico que afecta el crecimiento de los hongos mediante la inhibición de la ruta biosintética de los esteroides; esta ruta constituye un objetivo principal en la mayoría de las drogas antifúngicas disponibles en la actualidad. Teniendo estos dos agentes antifúngicos diferente mecanismo de acción dentro de la síntesis de lípidos, y siendo los esteroides y los fosfolípidos los principales componentes de la membrana plasmática, de cuya asociación no covalente dependen sus propiedades biofísicas y fisiológicas, la combinación de ambos compuestos constituye una clara aproximación racional en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas.

## Materiales y métodos

**Aislamientos.** Las cepas de *Microsporium canis* Mc543 y Mc548 fueron obtenidas de pacientes con *tinea capitis* que acudieron a la consulta de Dermatología del Hospital Clínico Universitario de Caracas, y fueron cedidas gentilmente por la Dra. Ángela Ruiz para la realización de este estudio. La cepa Mc1 proviene de un paciente de la consulta del Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Escuela de Ciencias de la Salud de la Universidad de Oriente.

**Antifúngicos.** El ajoeno fue sintetizado y purificado como se ha descrito en trabajos anteriores [4] y después suspendido en dimetilsulfoxido (DMSO, Sigma). El ketoconazol fue donado gentilmente por el Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel y disuelto en dimetil sulfoxido. Ambos compuestos se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Ajoeno y ketoconazol se utilizaron a diferentes concentraciones y la concentración final del DMSO en los cultivos nunca fue mayor del 1%.

**Ensayos *in vitro*. Método de microdilución.** Se siguieron los procedimientos recomendados por el *National Committee for Clinical Laboratory Standards* en el documento NCCLS M-38A [16] para hongos filamentosos, con algunas modificaciones según se explica a continuación [1,5,6,19,13].

**Medio RPMI 1640.** Para realizar los ensayos de susceptibilidad a los antifúngicos, el medio que se utilizó fue RPMI 1640 con L-glutamina y sin bicarbonato sódico (Sigma). Se añadió glucosa al 2% (modificación EUCAST-AFST 2002) para mejorar el crecimiento del dermatofito. Se utilizó Hepes (Sigma) como tampón, se ajustó el pH a 7, se esterilizó con filtro de  $0,2\ \mu\text{m}$  y se conservó a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

**Preparación del inóculo.** Las colonias maduras de cultivos puros bien crecidos, incubados durante 13-15 días

a temperatura ambiente, fueron cubiertas con 3-5 ml de solución fisiológica estéril, se agitó en vórtex (Maxi-Mix) durante aproximadamente un minuto y la suspensión se colocó en un tubo de ensayo igualmente estéril. Posteriormente se realizó recuento de macro y microconidias en hemocitómetro con microscopio óptico (Olympus 300 Bx). Se prepararon diluciones con medio RPMI 1640 suplementado con 2% de glucosa, hasta obtener una concentración final del inóculo entre  $1$  y  $2 \times 10^4$  conidias/ml.

**Efecto de la combinación de ajoeno y ketoconazol en el crecimiento y proliferación de los aislamientos de *M. canis*.** Se sembraron 200  $\mu\text{l}$  de la suspensión de conidias por pocillo en microplacas de 96 pozos con fondo plano. Los cultivos se realizaron en presencia de ajoeno a concentraciones crecientes de 1 a 100  $\mu\text{M}$  más ketoconazol a 50 o 100  $\mu\text{M}$ . Se incubaron las placas en cámara húmeda a  $28^{\circ}\text{C}$  durante 13 días, midiendo diariamente la densidad óptica a 630 nm en un lector de ELISA (Elx 800, Bio-Tek Instruments®).

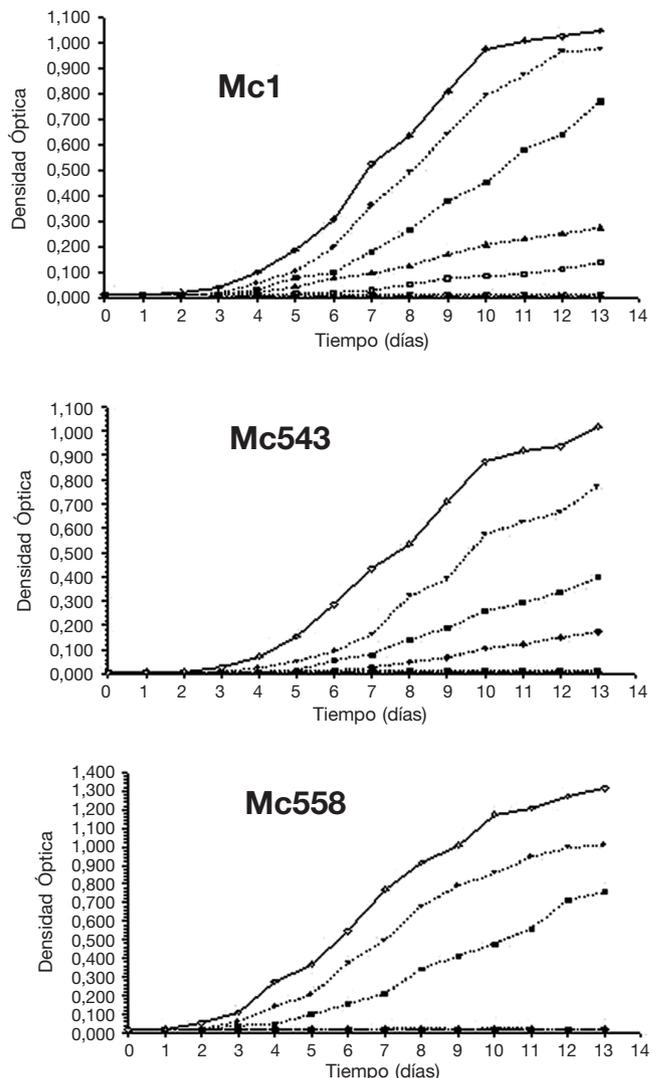


Figura 1. Efecto de la concentración de ajoeno en la proliferación de los aislamientos Mc1, Mc543, Mc558, de *Microsporium canis*. Los aislamientos fueron cultivados como se ha descrito en la metodología y cada valor en la gráfica corresponde al promedio de los valores de tres cultivos independientes. Las concentraciones de la droga utilizadas fueron las siguientes: ●, 1  $\mu\text{M}$ ; ■, 10  $\mu\text{M}$ ; ▲, 30  $\mu\text{M}$ ; □, 60  $\mu\text{M}$ ; ▽, 100  $\mu\text{M}$ ; ◆, 300  $\mu\text{M}$ ; ◇, control de crecimiento. El día cero corresponde al día de inicio del cultivo y al momento de adición de la droga.

**Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Inhibitoria 50% (CI<sub>50</sub>).** Para el cálculo de este valor se tomaron los datos obtenidos para la densidad óptica a 630 nm a los nueve días de crecimiento, en cada uno de los pocillos [19]. La concentración mínima inhibitoria (CMI) es la menor concentración de la droga capaz de producir el máximo efecto inhibitorio. Un gráfico DO versus log [antifúngico] fue elaborado para calcular el valor CI<sub>50</sub> como se ha descrito previamente [14] muy brevemente, aplicando la fórmula:  $[\text{antifúngico}]_{50} = \text{antilog}(\text{DO}^{\text{CI}_{50}} - b)/m$ , donde  $\text{DO}^{\text{CI}_{50}}$  es la densidad óptica que corresponde a la mitad del valor máximo alcanzado en el control de crecimiento a los nueve días y  $m$  es la pendiente,  $b$  es el corte en el eje 'Y'. Para la realización de curvas dosis respuesta a los fármacos ensayados, los procedimientos de regresión lineal, cálculos de los valores CMI y CI<sub>50</sub> se usó el paquete estadístico Sigma Plot, versión 8.0 (Jandel Scientific Software, California).

**Sinergismo.** En este trabajo el sinergismo es definido como el efecto que es producido por una combinación de drogas y que resulta mayor a la suma de los efectos producidos por cada uno de los componentes por separado.

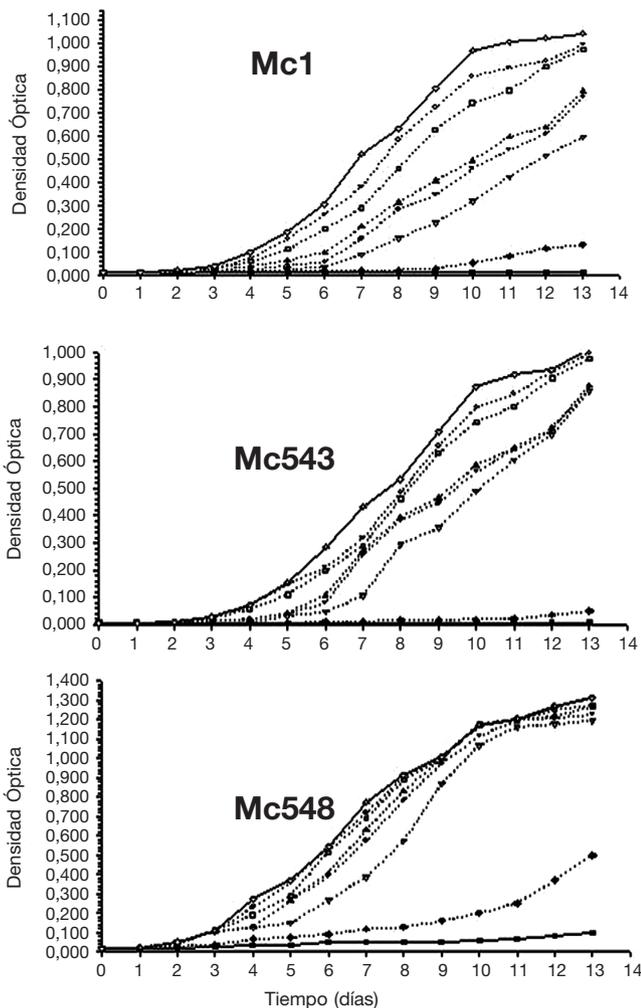


Figura 2. Efecto de la concentración de ketoconazol en la proliferación de los aislamientos Mc1, Mc543, Mc558 de *Microsporium canis*. Los aislamientos fueron cultivados como se ha descrito en la metodología y cada valor en la gráfica corresponde al promedio de los valores de tres cultivos independientes. Las concentraciones de la droga utilizadas fueron las siguientes: ○, 50 µM; □, 100 µM; ▲, 300 µM; ●, 500 µM; ▽, 1 µM; ◆, 3 µM; ■, 10 µM; ◇, control de crecimiento. El día cero corresponde al día de inicio del cultivo y al momento de adición de la droga.

La interacción de las drogas es clasificada sobre la base del índice de la concentración inhibitoria fraccional (CIF), que puede ser obtenido al definir como punto final o punto de corte la inhibición completa del crecimiento del hongo. Dicho índice es determinado como ha sido previamente descrito [15]. La fórmula para su cálculo es la siguiente:

$$\text{CIF} = [a] / \text{CMI}a + [b] / \text{CMI}b;$$

donde  $[a]$  es la concentración de la droga A y  $[b]$  es la concentración de la droga B cuando son usadas en combinación, cada una dividida entre el valor CMI de dicha droga cuando es usada sola; el efecto es sinérgico si el valor del índice obtenido es  $\leq 0,5$ ; aditivo si el índice es  $> 0,5$ ; indiferente si es  $> 1$  y antagónico si es  $> 2$ . Además, el efecto de la combinación de ajoeno con ketoconazol es expresado mediante la realización de un isoblograma aritmético: si la línea representada deja un espacio cóncavo sobre ella, el efecto es sinérgico [23].

## Resultados

El efecto in vitro producido por diversas concentraciones de ajoeno en los tres aislamientos de *M. canis* Mc1, Mc543, Mc558 es mostrado en la figura 1, donde se observa para todos ellos un comportamiento dosis-dependiente, presentando el aislamiento Mc558 la mayor susceptibilidad y la cepa Mc1 la menor. En la figura 2 observamos el efecto generado por el ketoconazol, resultando las cepas Mc1 y Mc558 las de mayor y menor sensibilidad respectivamente. Los valores CMI y CI<sub>50</sub> para cada uno de los

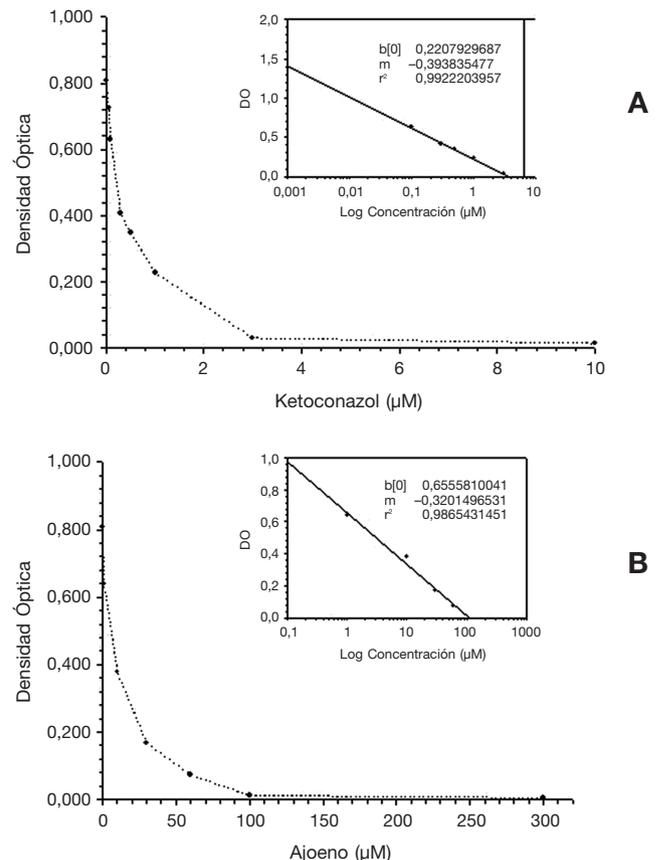


Figura 3. Cálculo de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y de la concentración inhibitoria 50% (CI<sub>50</sub>). Ketoconazol (A) y ajoeno (B), en el aislamiento Mc1 de *Microsporium canis*. El gráfico inserto muestra la curva logarítmica (concentración de la droga vs DO) utilizada para calcular el CI<sub>50</sub>. Gráficos similares a éstos fueron obtenidos para los otros dos aislamientos.

aislamientos, fueron obtenidos mediante la realización de gráficas similares a las observadas en la figura 3. El valor CMI para el ajoeno en la cepa Mc1 resultó de 100  $\mu\text{M}$ , mientras que para las cepas Mc543 y Mc558 los valores fueron de 60  $\mu\text{M}$  y 30  $\mu\text{M}$ ; los valores  $\text{CI}_{50}$  resultaron de 0,767; 0,149 y 0,620. Para el ketoconazol se obtuvo un valor de 3  $\mu\text{M}$  en las cepas Mc1 y Mc543, y un valor de 10  $\mu\text{M}$  para la cepa Mc558, con unos valores  $\text{CI}_{50}$  de 0,497; 0,300 y 0,136 respectivamente. Estos resultados son consistentes con los descritos en trabajos anteriores [14], y muestran a la cepa Mc1 como la menos susceptible a la acción antifúngica del ajoeno, y a la cepa Mc558 como la más resistente al ketoconazol. La combinación de diversas concentraciones de ajoeno con ketoconazol produjo un incremento significativo de su efecto citotóxico. En la cepa Mc1 una concentración 10  $\mu\text{M}$  de solo ajoeno produjo a los nueve días de cultivo una inhibición cercana al 50%, pero en presencia de 50  $\eta\text{M}$  de ketoconazol (una concentración que, por sí sola, no produce ningún efecto) se amplificó significativamente la acción del ajoeno. El umbral para producir el 100% de mortalidad se redujo en un orden de magnitud (figura 4), mostrando una potenciación muy fuerte en el efecto producido por la droga. Un resultado análogo para esta combinación fue obtenido en la cepa Mc543, que presentó ante el ketoconazol un comportamiento similar a la cepa Mc1. Sin embargo, en la cepa Mc558 el efecto en la potenciación no fue tan pronunciado cuando se usó ketoconazol en concentración 50  $\eta\text{M}$ . Dicho efecto se hizo más evidente en presencia de una concentración 100  $\eta\text{M}$  de ketoconazol (figura 5). El establecimiento de un punto final mediante el seguimiento cuantitativo de la curva de crecimiento garantizó la alta reproducibilidad de estos resultados, que fueron la resultante de una búsqueda sistemática de la concentración de la droga, que sola o en combinación produjo una supresión completa del crecimiento de los hongos estudiados. Ello nos permitió, por una parte, expresar cuantitativamente la interacción de ambos compuestos mediante la elaboración de isobologramas, utilizando, para ello, las concentraciones de ambas drogas, cuya actividad fue similar (figura 6), y por la otra, obtener la concentración inhibitoria fraccional para cada cepa. En este estudio, los valores CIF obtenidos (Mc1: 0,20  $\mu\text{M}$ ; Mc543: 0,183  $\mu\text{M}$ ; Mc558: 0,367  $\mu\text{M}$ ) indican, en todos los casos, la existencia de un efecto sinérgico muy pronunciado.

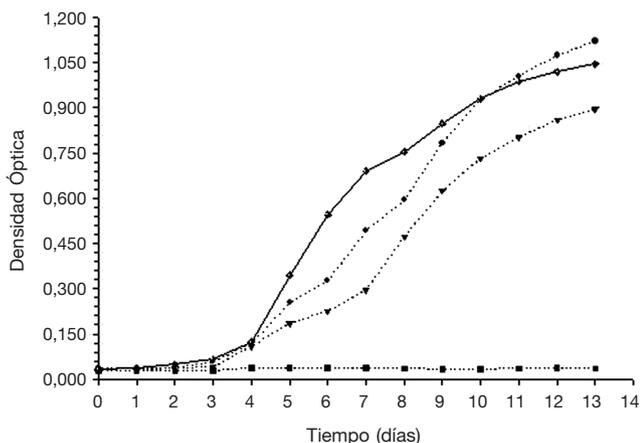


Figura 4. Efecto de la combinación de ajoeno y ketoconazol en el crecimiento del aislamiento Mc1 de *Microsporium canis*. Las concentraciones de las drogas fueron las siguientes:  $\nabla$  control de crecimiento;  $\bullet$ , ajoeno 1  $\mu\text{M}$ ;  $\nabla$ , ajoeno 3  $\mu\text{M}$ ;  $\blacksquare$ , ajoeno 10  $\mu\text{M}$ . Todas las concentraciones de ajoeno se añadieron en presencia de 50  $\eta\text{M}$  ketoconazol.

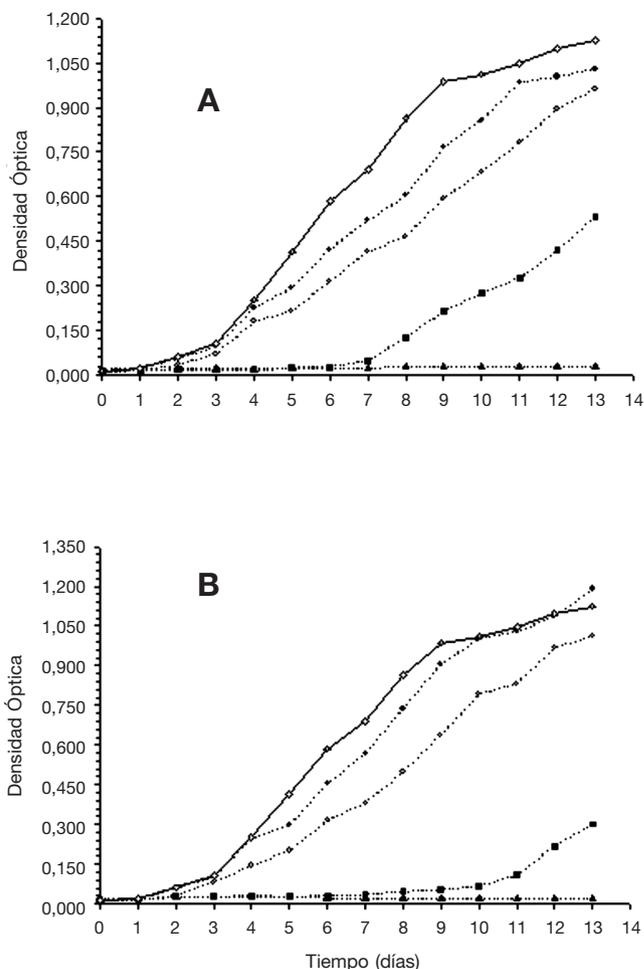


Figura 5. Efecto de la combinación de ajoeno y ketoconazol en el crecimiento del aislamiento Mc558 de *Microsporium canis*. Las concentraciones de las drogas fueron las siguientes:  $\nabla$  control de crecimiento;  $\bullet$ , ajoeno 1  $\mu\text{M}$ ;  $\nabla$ , ajoeno 3  $\mu\text{M}$ ;  $\blacksquare$ , ajoeno 10  $\mu\text{M}$ ,  $\blacktriangle$ , ajoeno 30  $\mu\text{M}$ . Todas las concentraciones de ajoeno se añadieron en presencia de A, 50  $\eta\text{M}$  ketoconazol (A) y 100  $\eta\text{M}$  ketoconazol (B).

## Discusión

*Tinea capitis* es una enfermedad frecuente en niños y cuyo tratamiento habitual consiste en la administración de griseofulvina oral durante aproximadamente ocho semanas. Sin embargo, algunos pacientes, especialmente los infectados por *M. canis*, no responden adecuadamente a esta terapia y requieren dosis mayores de este antifúngico durante periodos de tiempo más prolongados, o bien la administración de otros antifúngicos, como terbinafina o itraconazol. En estudios anteriores evaluamos la actividad del compuesto ajoeno sobre varios aislamientos de *M. canis* demostrando el potencial que esta molécula posee para el tratamiento de las patologías producidas por este agente [14,20]. Aunque esta es la primera publicación que demuestra la existencia de un efecto sinérgico entre el ajoeno y el ketoconazol frente a los hongos, distintos trabajos han mostrado tanto in vitro como in vivo la capacidad sinérgica de ambos compuestos en otros sistemas biológicos [3,17,18].

En este trabajo evaluamos el efecto de la combinación de ajoeno y ketoconazol en el crecimiento de *M. canis*. Los resultados demuestran que la combinación de ajoeno con concentraciones de ketoconazol que no producen ningún efecto en el crecimiento potencian por un factor de 10 su acción fungicida. Este efecto sinérgico

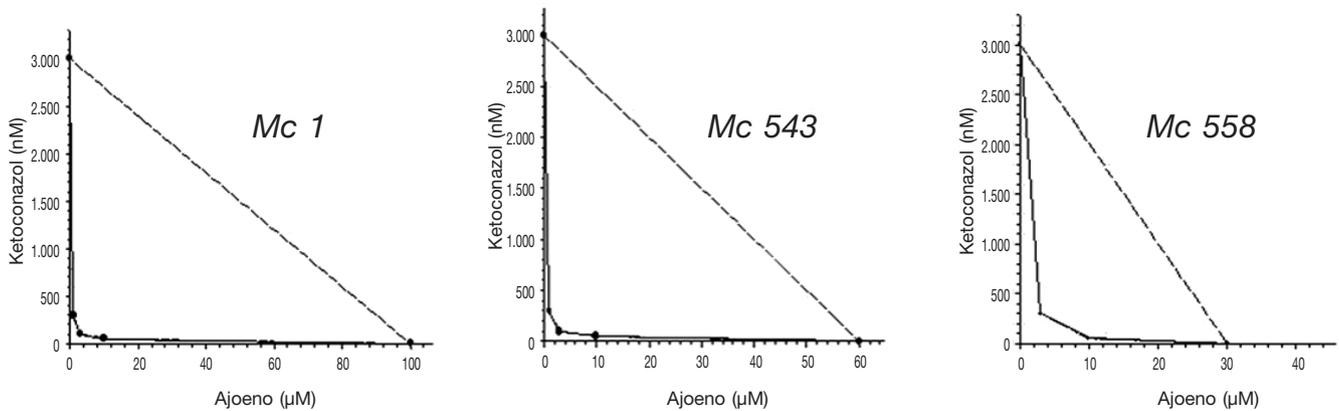


Figura 6. Isobologramas mostrando el efecto sinérgico del ajoeno y el ketoconazol en los tres aislamientos de *Microsporium canis*. La gráfica es construida con las concentraciones que solas o en combinación producen la inhibición total del crecimiento a los nueve días de cultivo. La línea segmentada que conecta el efecto observado para cada dosis en particular, se conoce como línea de aditividad y nos denota la zona donde todos los pares de combinaciones tendrían un mismo efecto.

muestra el potencial de esta combinación en el tratamiento antifúngico, reduciendo tanto el tiempo de tratamiento como la resistencia a los antifúngicos, así como también el riesgo de toxicidad al disminuir la cantidad y la frecuencia de las drogas administradas.

La marcada potenciación del efecto de las drogas cuando son utilizadas en combinación es debido, muy probablemente, a que actúan en diversas rutas metabólicas. El ajoeno modifica la fluidez de las membranas celulares y ello podría facilitar la entrada del ketoconazol al interior de la célula, tornando al hongo más sensible a este antifúngico. Además, se ha descrito que el ajoeno afecta a la biosíntesis de fosfatidilcolina, alterando la relación fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina, muy probablemente mediante la inhibición de la enzima transmetilasa que participa de la transformación de fosfatidiletanolamina en fosfatidilcolina [21], impidiendo la biosíntesis y la generación de nuevas membranas, que resultan absolutamente necesarias para la división celular. Asimismo, interfiere en el metabolismo redox reaccionando con los grupos sulfhidrilos de las proteínas de las membranas, lo que afecta a los procesos de adhesión y señalización [12]. Por su parte, el ketoconazol actúa inhibiendo la enzima 14 $\alpha$ -desmetilasa, una enzima dependiente del citocromo P-450 que es responsable de la desmetilación del lanosterol, inhibiendo así la biosíntesis del ergosterol, amplificando los efectos bioquímicos y comprometiendo aún más los requerimientos moleculares en unas células que poseen una elevada actividad metabólica, al encontrarse en un proceso activo de proliferación.

Estos resultados demuestran la existencia de un efecto sinérgico muy potente entre el ajoeno y el ketoconazol, y configuran un cuadro muy alentador para la realización de futuros estudios quimioterapéuticos mediante la utilización de una terapia combinada con estos dos agentes antifúngicos.

*Nuestro agradecimiento al Dr. Rafael Apitz-Castro, investigador emérito del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) y al Profesor Mahendra K Jain, Department of Chemistry and Biochemistry, University of Delaware, Newark, por su permanente apoyo tanto material como intelectual en el desarrollo de los estudios descritos.*

## Bibliografía

- Alló A, Mendoza M, Zambrano E, Diaz E, Cavallera E. Susceptibility and resistance testing in vitro of dermatophytes with broth microdilution method guided by their growth curve. *Mycoses* 2001; 44: 3-83 (S).
- Apitz-Castro R, Cabrera S, Cruz M, Ledezma E, Jain M. Effects of garlic extract and of three pure components isolated from it on human platelet aggregation, arachidonate metabolites, release reaction and platelet ultrastructure. *Thromb Res* 1983; 32: 155-169.
- Apitz-Castro R, Ledezma E, Escalante J, Jorquera A, Piñate F, Moreno-Rea J, Carrilo G, Leal O, Jain M K. Reversible prevention of platelet activation by (E,Z)-4,5,9-trithiadodeca-1,6,11-triene 9-oxide (ajoene) in dogs under extracorporeal circulation. *Arzneimittelforschung* 1988; 38: 901-904.
- Apitz-Castro R, Escalante J, Vargas R, Jain M K. Ajoene, the antiplatelet principle of garlic, synergistically potentiates the antiaggregatory action of prostacyclin, forskolin, indomethacin acid, dipyridamol on human platelets. *Thromb Res* 1986; 42: 303-311
- EUCAST-AFST. European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing. Subcommittee of Antifungal Susceptibility Testing. Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Germany, 2002.
- Guarro J, Llop C, Aguilar C, Pujol I. Comparison of in vitro antifungal susceptibilities of conidia and hyphae of filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2760-2762.
- Gupta A K, Kohli Y. In vitro susceptibility testing of ciclopirox, terbinafine, ketoconazole and itraconazole against dermatophytes and nondermatophytes, and in vitro evaluation of combination antifungal activity. *Br J Dermatol* 2003; 149: 296-305.
- Ledezma E, Apitz-Castro R. Ajoene, el principal compuesto activo derivado del ajo (*Allium sativum*), un nuevo agente antifúngico. *Rev Iberoam Micol* 2006; 23: 75-80.
- Ledezma E, De Sousa L, Jorquera A, Sanchez J, Lander A, Rodriguez E, Apitz-Castro R, Jain M K. Efficacy of ajoene, an organosulphur derived from garlic in the short-term therapy of tinea pedis. *Mycoses* 1996; 39: 393-395.
- Ledezma E, López J C, Marin P, Romero H, Ferrara G, De Sousa L, Jorquera A, Apitz-Castro R. Ajoene in the topical short-term treatment of tinea cruris and tinea corporis in humans. Randomized comparative study with terbinafine. *Drug Research* 1999; 49: 544-547.
- Ledezma E, Marcano K, Jorquera A, De Sousa L, Padilla M, Pulgar M, Apitz-Castro R. Efficacy of ajoene in the treatment of tinea pedis: a double-blind and comparative study with terbinafine. *J Am Acad Dermatol* 2000; 43: 829-832.
- Ledezma E, Apitz-Castro R. Del folklore al mecanismo molecular: el ejemplo del ajoene. *Interciencia* 1998; 23: 227-231.
- Llop C, Pujol I, Aguilar C, Sala J, Riba D, Guarro J. Comparison of three methods of determining MICs for filamentous fungi using different end point criteria and incubation periods. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 239-242.
- Maniscalchi M T, Lemus D, Ledezma E, Sánchez J, Vivas J, Apitz-Castro R. Estudio de la susceptibilidad in vitro de aislados de *Microsporium canis* al ajoene, terbinafina y griseofulvina, utilizando el método de microdilución. *Rev Soc Ven Microbiol* 2004; 24: 40-45.
- Mosquera J, Sharp A, Moore C B, Warn P A, Denning D W. In vitro interaction of terbinafine with itraconazole, fluconazole, amphotericin B and 5-fluorocytosine against *Aspergillus* spp. *J Antimicrob Chemother*. 2002; 50: 189-194
- NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A, Wayne, Pa. 2002; Vol. 22.
- Pérez G, Ruiz E, Vivas J. Efectos antiproliferativos de ketoconazol y ajoene en promastigotes de *Leishmania mexicana*. Efectos sinérgicos. XV Congreso Latinoamericano de Parasitología, São Paulo, Brasil, octubre de 2001.
- Ramírez C, Ruiz E, Vivas J. Efectos antiproliferativos de ketoconazol y ajoene en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Efectos sinérgicos. XV Congreso Latinoamericano de Parasitología, São Paulo, Brasil, octubre de 2001.
- Rojas G C, Vivas J, Guerrero O. Estandarización del inóculo de *Cladophialophora carrionii* por el método espectrofotométrico para estudios de sensibilidad in vitro de hongos filamentosos. *Rev Soc Ven Microbiol* 2004; 24: 89-94.
- Romero H, Vivas J, Chalbaud V, Ledezma E, Apitz-Castro R. In vitro antiproliferative effect of ajoene on *Microsporium canis*. *J Mycol Med* 2000; 10: 152-155.
- San Blas G, Urbina J, Marchán E, Contreras L, Sorais F, San Blas F. Inhibition of *Paracoccidioides brasiliensis* by ajoene is associated with blockade of phosphatidylcholine biosynthesis. *Microbiology* 1997; 143: 1583-1586.
- Sud I J, Feingold D S. Effect of Ketoconazole in combination with other inhibitors of sterol synthesis on fungal growth. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 28: 532-534
- Tallarida RJ. Drug synergism: its detection and applications. Perspectives in pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 298: 865-872.
- Vazquez JA. Combination antifungal therapy against *Candida* species: the new frontier--are we there yet? *Med Mycol* 2003; 41: 355-368.
- Vitale RG, Afeltra J, Dannaoui E. Antifungal combinations. *Methods Mol Med* 2005; 118: 143-152.
- Yoshida S, Shigeo K, Norihiro H, Tsuyoshi U, Hiromichi M, Shizutoshi N. Antifungal activity of ajoene derived from garlic. *Appl Environ Microbiol* 1987; 53: 615-617.
- Zhang L, Yan K, Zhang Y, Huang R, Bian J, Zheng C, Sun H, Chen Z, Sun N, An R, Min F, Zhao W, Zhuo Y, You J, Song Y, Yu Z, Liu Z, Yang K, Gao H, Dai H, Zhang X, Wang J, Fu C, Pei G, Liu J, Zhang S, Goodfellow M, Jiang Y, Kuai J, Zhou G, Chen X. High-throughput synergy screening identifies microbial metabolites as combination agents for the treatment of fungal infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 13; 104: 4606-4611.