

**Facultad de Medicina y Enfermería**

Departamento de Inmunología,  
Microbiología y Parasitología

**Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea**

Immunologia, Mikrobiologia  
eta Parasitologia Saila

# Actividad antifúngica de la combinación de fluconazol con otros fármacos: Un enfoque terapéutico alternativo de las candidiasis

**Tesis Doctoral**

**Juan Daniel Carton Herrán**

**Leioa, 2018**

Este trabajo de Tesis de doctorado ha sido parcialmente financiado por los proyectos de investigación Grupo de Investigación Consolidado del Sistema Universitario Vasco (GIC 15/78 IT-990-16 y GIC12 210-IT-696-13) «Candidiasis y otras infecciones humanas asociadas a biopelículas microbianas» (Consejería de Educación, Universidades e Investigación, Gobierno Vasco-Eusko Jaurlaritza) y Unidad de formación e investigación multidisciplinar sobre enfermedades microbianas para la promoción de una vida y un envejecimiento saludables, «Microbios y salud», UFI 11/25 (Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea).



# ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....	v
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vii
ÍNDICE DE TABLAS .....	ix
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
1.1. <i>Candida</i> y candidiasis .....	3
1.2. Fármacos antifúngicos .....	8
1.2.1. Polienos .....	9
1.2.2. Azoles .....	10
1.2.2.1. Clotrimazol.....	11
1.2.2.2. Ketoconazol .....	11
1.2.2.3. Fluconazol.....	12
1.2.2.4. Isavuconazol .....	13
1.2.2.5. Itraconazol .....	14
1.2.2.6. Posaconazol .....	14
1.2.2.7. Voriconazol .....	15
1.2.3. Equinocandinas .....	16
1.2.3.1. Anidulafungina .....	16
1.2.3.2. Caspofungina .....	17
1.2.3.3. Micafungina .....	18
1.2.4. Otros fármacos antifúngicos.....	19
1.2.4.1. Alilaminas .....	19
1.2.4.2. Morfolinas .....	20
1.2.4.3. 5-fluorocitosina .....	20
1.2.4.4. Griseofulvina .....	20
1.3. Resistencia a los fármacos antifúngicos.....	21
1.3.1. Mecanismos de resistencia .....	23
1.3.1.1. Mecanismos de resistencia a los polienos .....	23
1.3.1.2. Mecanismos de resistencia a los azoles.....	24
1.3.1.3. Mecanismos de resistencia a las equinocandinas.....	27
1.3.2. Métodos para estudiar la sensibilidad a los fármacos antifungicos.....	28

1.4. Tratamientos en combinación con fármacos no antifúngicos.....	32
1.4.1. Fármacos no antifúngicos.....	33
1.4.1.1. Fármacos antibacterianos .....	33
1.4.1.2. Inhibidores de la calcineurina .....	36
1.4.1.3. Reguladores de la homeostasis del calcio .....	41
1.4.1.4. Fármacos antiinflamatorios no esteroideos.....	44
1.4.1.5. Otros compuestos .....	45
1.4.2. Métodos para determinar la eficacia in vitro de las combinaciones de fármacos ...	47
1.4.2.1. Método del tablero de ajedrez .....	48
1.4.2.1.1. Teoría de la aditividad de Loewe .....	49
1.4.2.1.2. Teoría de la independencia de Bliss .....	51
1.4.2.2. Curvas de letalidad .....	52
1.4.2.3. Método E-test .....	53
1.4.3. Métodos para determinar la eficacia in vivo de las combinaciones de fármacos ....	54
1.4.3.1. Modelos alternativos .....	58
1.4.3.1.1. <i>Acanthamoeba castellanii</i> .....	59
1.4.3.1.2. <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	60
1.4.3.1.3. <i>Drosophila melanogaster</i> .....	62
1.4.3.1.4. <i>Galleria mellonella</i> .....	64
1.4.3.1.5. <i>Danio rerio</i> .....	67
<b>2. JUSTIFICACIÓN y OBJETIVOS .....</b>	<b>73</b>
2.1. Justificación.....	73
2.2. Objetivos.....	75
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>79</b>
3.1. Microorganismos.....	79
3.2. Fármacos .....	81
3.3. Estudios in vitro.....	81
3.3.1. Estudio de la sensibilidad y de la interacción entre fármacos.....	81
3.3.1.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	83
3.3.1.1.1. Determinación de la CMI utilizando el método recomendado por el CLSI .....	84
3.3.1.1.2. Determinación de CMI utilizando el método recomendado por el EUCAST....	87
3.3.1.1.3. Interpretación .....	89

3.3.1.1.4. Comparación de los resultados entre los métodos del CLSI y el EUCAST.....	90
3.3.2. Tablero de ajedrez .....	90
3.3.2.1. Teoría aditiva de Loewe .....	92
3.3.2.2. Teoría de la independencia de Bliss .....	93
3.3.3. Curvas de letalidad .....	94
3.4. Estudios in vivo.....	96
3.4.1. Infección de <i>Galleria mellonella</i> con <i>Candida</i> .....	96
3.4.2. Evaluación de la eficiencia de los compuestos .....	97
3.4.3. Análisis de los datos.....	98
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>101</b>
4.1. Análisis in vitro .....	101
4.1.1. Estudio de la sensibilidad de los aislamientos <i>Candida</i> al fluconazol y a los fármacos no antifúngicos.....	101
4.1.2. Estudio de la eficacia de las combinaciones entre el fluconazol y los agentes no antifúngicos .....	111
4.1.2.1. Método del tablero de ajedrez .....	111
4.1.2.1.1. Combinación de fluconazol y amiodarona .....	112
4.1.2.1.2. Combinación de fluconazol y ciclosporina A .....	118
4.1.2.1.3. Combinación de fluconazol e ibuprofeno .....	124
4.1.2.1.4. Combinación de fluconazol y lactoferrina.....	130
4.1.3. Curvas de letalidad .....	136
4.1.3.1. Combinación de fluconazol y amiodarona .....	136
4.1.3.2. Combinación fluconazol y ciclosporina A.....	138
4.1.3.3. Combinación de fluconazol e ibuprofeno .....	140
4.1.3.4. Combinación de fluconazol y lactoferrina.....	142
4.2. Análisis in vivo del tratamiento de la candidiasis en <i>Galleria mellonella</i> .....	144
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>151</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>177</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>181</b>



## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AGS	Agar glucosado de Sabouraud
ABC	<i>ATP-Binding cassette</i>
ARTEMIS	Programa mundial de vigilancia antifúngica
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CaN	Calmodulina
CBS	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i>
CBP	Puntos de corte clínicos
CECT	Colección española de cultivos tipo
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CnA	Subunidad catalítica A de la calcineurina
CnB	Subunidad reguladora B de la calcineurina
DMSO	Dimetil sulfóxido
ECV	Puntos de corte epidemiológicos
E-test	<i>Epsilometer strip test</i>
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FICI	Índice de concentración inhibitoria fraccionaria
Hsp90	Proteína de shock térmico de 90 kDa
IC $\alpha$	Coefficiente de interacción alfa
MFS	Superfamilia de facilitadores mayores
MOPS	ácido morfolino propano sulfónico
NCPF	<i>National Collection of Pathogenic Fungi</i>
OTA	<i>Office of Technologies Assessment</i>
PBS	Tampón fosfato salino
RPMI	Medio del Roswell Park Memorial Institute
RSM	Metodología de superficies de respuesta
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
UFC	Unidades formadoras de colonias
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

XTT	hidróxido de 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfonil)-5- [(fenilamino) carbonil]-2H-tetrazolio
YPD	Medio extracto de levadura- peptona-dextrosa
$\Delta E$	Variación del porcentaje de crecimiento

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1:</b> Principales dianas de los fármacos antifúngicos y mecanismos de resistencia. ....	<b>9</b>
<b>Figura 1.2:</b> Estructura química de la anfotericina B.....	<b>10</b>
<b>Figura 1.3:</b> Estructura química del clotrimazol.....	<b>11</b>
<b>Figura 1.4:</b> Estructura química del ketoconazol. ....	<b>12</b>
<b>Figura 1.5:</b> Estructura química del fluconazol. ....	<b>13</b>
<b>Figura 1.6:</b> Estructura química del isavuconazol. ....	<b>13</b>
<b>Figura 1.7:</b> Estructura química del itraconazol.....	<b>14</b>
<b>Figura 1.8:</b> Estructura química del posaconazol.....	<b>15</b>
<b>Figura 1.10:</b> Estructura química de la anidulafúngina. ....	<b>17</b>
<b>Figura 1.11:</b> Estructura química de la caspofungina.....	<b>18</b>
<b>Figura 1.12:</b> Estructura química de la micafungina. ....	<b>19</b>
<b>Figura 1.13:</b> Representación esquemática de la importancia de algunas proteínas en la resistencia de <i>Candida albicans</i> a los fármacos antifúngicos.. ....	<b>28</b>
<b>Figura 1.14:</b> Dianas potenciales de los fármacos no antifúngicos en los hongos .....	<b>34</b>
<b>Figura 1.15:</b> Representación esquemática de la ruta de la calcineurina y de la actividad de la ciclosporina A y el tacrolimus. ....	<b>39</b>
<b>Figura 1.16:</b> Diagrama del ciclo del calcio en levaduras.....	<b>42</b>
<b>Figura 1.17:</b> <i>Caenorhabditis elegans</i> . Microscopía de contraste interferencial.....	<b>62</b>
<b>Figura 1.18:</b> <i>Drosophila melanogaster</i> . ....	<b>64</b>
<b>Figura 1.19:</b> Larva de <i>Galleria mellonella</i> .....	<b>67</b>
<b>Figura 1.20:</b> Embrión, larva y adulto de <i>Danio rerio</i> .....	<b>70</b>
<b>Figura 3.1:</b> Realización de las diluciones seriadas en el método de CLSI .....	<b>85</b>
<b>Figura 3.2:</b> Preparación de las placas para el método de CLSI .....	<b>86</b>
<b>Figura 3.3:</b> Preparación del inóculo de levaduras según el método de CLSI .....	<b>87</b>
<b>Figura 3.4:</b> Preparación de las diluciones seriadas de fluconazol en el método de EUCAST .....	<b>88</b>

<b>Figura 3.5:</b> Distribución de las diferentes concentraciones de fármaco en una placa de combinación..	<b>92</b>
<b>Figura 3.6:</b> Interpretación de las curvas de letalidad en el estudio de las combinaciones de fármacos.....	<b>926</b>
<b>Figura 3.7:</b> Dos grupos de larvas de <i>Galleria mellonella</i> .....	<b>97</b>
<b>Figura 4.1:</b> Actividad in vitro de la combinación de fluconazol y amiodarona .....	<b>137</b>
<b>Figura 4.2:</b> Actividad in vitro de la combinación de fluconazol y amiodarona .....	<b>138</b>
<b>Figura 4.3:</b> Actividad in vitro de la combinación de fluconazol y ciclosporina A.....	<b>139</b>
<b>Figura 4.4:</b> Actividad in vitro de la combinación de fluconazol e ibuprofeno.....	<b>141</b>
<b>Figura 4.5:</b> Actividad in vitro de la combinación de fluconazol e ibuprofeno.....	<b>142</b>
<b>Figura 4.6:</b> Actividad in vitro de la combinación de fluconazol y lactoferrina .....	<b>143</b>
<b>Figura 4.7:</b> Actividad in vitro de la combinación de fluconazol y lactoferrina .....	<b>144</b>
<b>Figura 4.8:</b> Actividad terapéutica de la combinación de fluconazol y amiodarona.....	<b>145</b>
<b>Figura 4.9:</b> Actividad terapéutica de la combinación de fluconazol y ciclosporina A.....	<b>146</b>
<b>Figura 4.10:</b> Actividad terapéutica de la combinación de fluconazol e ibuprofeno .....	<b>147</b>
<b>Figura 4.11:</b> Actividad terapéutica de la combinación de fluconazol y lactoferrina .....	<b>148</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.1:</b> Características de un buen modelo in vivo de candidiasis. ....	<b>56</b>
<b>Tabla 3.1:</b> Aislamientos clínicos y cepas de referencia de <i>Candida</i> estudiadas.....	<b>79</b>
<b>Tabla 3.2:</b> Fármacos utilizados.....	<b>81</b>
<b>Tabla 3.3:</b> Aislamientos y cepas de <i>Candida</i> estudiadas.....	<b>82</b>
<b>Tabla 3.4:</b> Puntos de corte clínicos y epidemiológicos de fluconazol .....	<b>89</b>
<b>Tabla 3.5:</b> Concentraciones de los fármacos ensayados para obtener las curvas de letalidad..	<b>95</b>
<b>Tabla 3.6:</b> Fármacos ensayados en los diferentes estudios. ....	<b>98</b>
<b>Tabla 4.1:</b> Actividad anticandidiásica in vitro de diferentes fármacos.....	<b>103</b>
<b>Tabla 4.1:</b> (continuación) Actividad anticandidiásica in vitro de diferentes fármacos.....	<b>104</b>
<b>Tabla 4.2:</b> Actividad anticandidiásica in vitro del fluconazol.....	<b>106</b>
<b>Tabla 4.3:</b> Actividad anticandidiásica in vitro de la amiodarona. ....	<b>106</b>
<b>Tabla 4.4:</b> Actividad anticandidiásica in vitro de la ciclosporina.....	<b>107</b>
<b>Tabla 4.5:</b> Actividad anticandidiásica in vitro del ibuprofeno. ....	<b>107</b>
<b>Tabla 4.6:</b> Actividad anticandidiásica in vitro de la lactoferrina. ....	<b>108</b>
<b>Tabla 4.7:</b> Clasificación de las especies de <i>Candida</i> según su sensibilidad al fluconazol por el método CLSI.....	<b>109</b>
<b>Tabla 4.8:</b> Clasificación de las especies de <i>Candida</i> según su sensibilidad al fluconazol por el método EUCAST.....	<b>109</b>
<b>Tabla 4.9:</b> Concordancia de la sensibilidad al fluconazol entre los métodos EUCAST y CLSI. ..	<b>110</b>
<b>Tabla 4.10:</b> Concordancia de la sensibilidad a la lactoferrina entre los métodos EUCAST y CLSI. ....	<b>111</b>
<b>Tabla 4.11:</b> Actividad antifúngica in vitro del fluconazol y de la amiodarona por el método del CLSI. ....	<b>114</b>
<b>Tabla 4.12:</b> Interacción in vitro entre el fluconazol y la amiodarona por el método del CLSI..	<b>115</b>
<b>Tabla 4.13:</b> Actividad antifúngica in vitro del fluconazol y de la amiodarona por el método del EUCAST.....	<b>116</b>

<b>Tabla 4.14:</b> Interacción in vitro entre el fluconazol y la amiodarona por el método del EUCAST.....	<b>117</b>
<b>Tabla 4.15:</b> Actividad antifúngica in vitro del fluconazol y de la ciclosporina A por el método del CLSI. ....	<b>120</b>
<b>Tabla 4.16:</b> Interacción in vitro entre el fluconazol y la ciclosporina A por el método del CLSI. ....	<b>121</b>
<b>Tabla 4.17:</b> Actividad antifúngica in vitro del fluconazol y de la ciclosporina A por el método del EUCAST.....	<b>122</b>
<b>Tabla 4.18:</b> Interacción in vitro entre el fluconazol y la ciclosporina A por el método del EUCAST. ....	<b>123</b>
<b>Tabla 4.19:</b> Actividad antifúngica in vitro del fluconazol y del ibuprofeno por el método del CLSI. ....	<b>126</b>
<b>Tabla 4.20:</b> Interacción in vitro entre el fluconazol y el ibuprofeno por el método del CLSI. ..	<b>127</b>
<b>Tabla 4.21:</b> Actividad antifúngica in vitro del fluconazol y del ibuprofeno por el método del EUCAST.....	<b>128</b>
<b>Tabla 4.22:</b> Interacción in vitro entre el fluconazol y el ibuprofeno por el método del EUCAST.....	<b>129</b>
<b>Tabla 4.23:</b> Actividad antifúngica in vitro del fluconazol y de la lactoferrina por el método del CLSI. ....	<b>132</b>
<b>Tabla 4.24:</b> Interacción in vitro entre el fluconazol y la lactoferrina por el método del CLSI. .	<b>133</b>
<b>Tabla 4.25:</b> Actividad antifúngica in vitro del fluconazol y de la lactoferrina contra <i>Candida</i> por el método del EUCAST. ....	<b>134</b>
<b>Tabla 4.26:</b> Interacción in vitro entre el fluconazol y la lactoferrina por el método del EUCAST.....	<b>135</b>

# **INTRODUCCIÓN**



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. *Candida* y CANDIDIASIS

Las infecciones oportunistas causadas el genero *Candida* son las infecciones fúngicas más frecuentes en los seres humanos. Presentan una tasa de mortalidad muy elevada, que varía según el tipo de enfermedad y el perfil del hospedador, pudiendo llegar al 30-50% (Puig-Asensio et al., 2015). La candidiasis está asociada con varios factores predisponentes, tales como el cáncer, la neutropenia, el tratamiento con corticoides, la cateterización y la administración de antibióticos de amplio espectro (Pemán y Salavert, 2012). También cabe destacar que los avances médicos han aumentado la probabilidad de supervivencia de los pacientes graves, incrementando así el riesgo de padecer una infección fúngica. De los pacientes hospitalizados más de un 5% desarrollan una infección nosocomial, de la cual, más o menos el 5% podría estar causada por *Candida* (Almirante et al., 2005).

Se han descrito más de 150 especies de *Candida*, aunque sólo un pequeño grupo son capaces de provocar patología en el ser humano. En personas sanas, *Candida* forma parte de la microbiota gastrointestinal, oral y vaginal (d'Enfert, 2009). Sin embargo, cuando el estado inmunológico del hospedador y/o la microbiota se ven alterados, *Candida* puede colonizar las mucosas (gastrointestinal, genitourinaria y respiratoria) y la piel, así como diseminarse por el organismo. En estos casos, se pueden producir infecciones que comprenden desde lesiones superficiales leves, hasta micosis sistémicas. El 95-97% de las candidiasis están causadas por cinco especies: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis*. El 3-5% restante se encuentra representado por un grupo de 15-18 especies diferentes entre las que destacan *Candida guilliermondii*, *Candida lusitaniae* y *Candida rugosa* (Pfaller y Diekema, 2010; Pemán y Salavert, 2012). *Candida* puede ser el cuarto agente etiológico de bacteriemias y fungemias adquiridas en las instituciones sanitarias de diferentes países (Tragiannidis et al., 2014; Lamoth et al., 2018).

## Introducción

Aunque el origen de la infección es principalmente endógeno, como consecuencia de la transición de una fase comensal a una fase de patógeno oportunista, también pueden transmitirse a través de material infectado, personal sanitario u otros pacientes (Pemán y Salavert, 2013). La infección endógena se produce tras una alteración de la microbiota bacteriana habitual por cirugías o tratamiento con fármacos antimicrobianos de amplio espectro, que facilitan la proliferación de las levaduras afectando a las mucosas. En ocasiones, estas infecciones pueden pasar al torrente sanguíneo, mediante un proceso de translocación intestinal, y diseminarse por el organismo, permitiéndoles infectar tanto la sangre como otros órganos. Además, la capacidad de estos hongos para producir diferentes factores de virulencia favorece la invasión y el desarrollo de la infección. Entre estos factores destacan los siguientes (Mavor et al., 2005; Mayer et al., 2015):

- **Las adhesinas** facilitan a las células de *Candida* su unión con las células epiteliales, endoteliales y fagocíticas del hospedador. Además, les permiten adherirse a diversas superficies (material quirúrgico, implantes médicos) que en ocasiones favorecen la formación de biopelículas (Williams et al., 2011).
- **Las enzimas hidrolíticas**, proteasas, fosfolipasas, lipasas, fosfomonoesteras y hexominidasas, pueden favorecer la invasión generando daño en los tejidos del hospedador.
- **La morfogénesis**, que es la capacidad de algunos de estos hongos de presentar polimorfismo con alternancia de morfologías y que depende de las condiciones ambientales. Cada morfología tiene una importancia en la infección y puede aumentar la virulencia (Bastidas y Heitman, 2009).
- **El *switching* fenotípico** o cambio en la morfología de la colonia, está desencadenado por numerosos factores ambientales. Ayuda a la supervivencia en diferentes ambientes y a la evasión de la respuesta inmune del hospedador. Además, afecta al resto de factores de virulencia (Sudbery et al., 2004)
- **La formación biopelículas**, que constituyen comunidades microbianas adheridas a superficies abióticas o bióticas, dentro de una matriz de polisacáridos extracelulares

generada por los microorganismos. Las biopelículas pueden proporcionar resistencia a los fármacos antifúngicos y al sistema inmunitario del hospedador. Se trata de un mecanismo de patogenicidad complejo en el que intervienen diferentes factores como la adhesión, el crecimiento y las variaciones morfológicas.

Los factores de virulencia que son expresados o utilizados por *Candida* para generar la infección pueden variar según el tipo de infección, el lugar donde se produce, el estado de la infección y la naturaleza de la respuesta del hospedador.

La enfermedad fúngica invasora más frecuente en todas las latitudes geográficas es la infección diseminada producida por *Candida*, con o sin candidemia asociada (Pemán y Salavert, 2012). Gran parte de las investigaciones sobre las candidiasis invasoras se centran en infecciones con candidemia debido a la dificultad para diagnosticar la candidiasis sin candidemia (Clancy et al., 2018). La incidencia de la candidemia varía según las regiones geográficas, en Australia, Canadá, Europa y Estados Unidos de América (EEUU) la incidencia de la candidiasis invasiva se ha mantenido similar o ha disminuido ligeramente en los últimos años debido a las mejoras diagnósticas y terapéuticas. Por el contrario, en América Latina y el resto del mundo ha aumentado. La incidencia de las candidemias en los EEUU es significativamente mayor que Australia, Canadá, Europa y América Latina. En la mayoría de los estudios poblacionales realizados se han mostrado incidencias de 6-10 por 100.000 habitantes (Diekema et al., 2012). Por el contrario, la mayoría de las encuestas europeas muestran incidencias de 1,4-5,7 por 100.000 habitantes (Odds et al., 2007; Asmundsdotti et al., 2013). Sin embargo, hay dos excepciones notables: Dinamarca y, más recientemente, España, donde la incidencia de la candidiasis invasiva es mayor que en otros países europeos como Islandia y Finlandia (2,86 y 5,7 por 100.000 habitantes respectivamente). Las tasas de candidemia en Australia (1,8 casos por 100.000 habitantes) y Canadá (2,9 por 100.000 habitantes) son similares a las europeas (Laupland et al., 2005; Chen et al., 2006; Quindós, 2014).

Hoy en día, no existen criterios establecidos para definir un denominador común que permita conocer la incidencia mundial de candidemia debido a que solo unos pocos países realizan una vigilancia exhaustiva de la población. Además, se ha de tener en cuenta que la tasa de incidencia

## Introducción

puede aumentar o disminuir dependiendo del momento en el que se realiza el estudio, lo que dificulta aún más la determinación de una incidencia global (Lamoth et al., 2018).

En la actualidad, la epidemiología de estas infecciones se analiza en los estudios multicéntricos, entre los que podemos destacar el estudio FUNGEMYCA realizado en España (2009-2010). En este estudio se analizaron 1.357 episodios de fungemias en 44 centros hospitalarios y con una incidencia de 0,92 episodios por 1.000 ingresos (Pemán et al., 2011). Los resultados de este estudio presentaron a *Candida albicans* como la especie predominante (44,6%), seguida de *Candida parapsilosis* (26,6%), *Candida glabrata* (11,4%), *Candida tropicalis* (8,2%) y *Candida krusei* (1,9%). En el estudio CANDIPOP, realizado también en España, se detectaron 773 episodios de candidemia provenientes de 29 centros hospitalarios entre 2010-2011, lo que correspondió a una incidencia de 0,89 episodios por 1.000 ingresos. *Candida albicans* fue la especie más frecuentemente aislada (45,4%), seguida de *Candida parapsilosis* (24,9%), *Candida glabrata* (13,4%), *Candida tropicalis* (7,7%) y *Candida krusei* (2%) (Puig-Asensio et al., 2014). En el análisis realizado por Nieto y colaboradores de forma prospectiva, sobre pacientes ingresados en 26 centros hospitalarios entre el 2011-2012, se detectaron 705 casos de candidiasis invasivas. Los resultados mostrados en este estudio fueron similares a los presentados en el estudio anterior, *Candida albicans* (50,1%), *Candida parapsilosis* (22,7%), *Candida glabrata* (13,3%), *Candida tropicalis* (6,2%) y *Candida krusei* (2,3%) (Nieto et al., 2015). Comparando estos resultados con otros estudios multicéntricos europeos o americanos se observan algunas diferencias, ya que *Candida glabrata* se aísla con mayor frecuencia que *Candida parapsilosis* en EEUU y en muchos países de Europa (Arendrup et al., 2011).

El aumento en la incidencia de las candidiasis se ha acompañado de un cambio en la distribución de las distintas especies de *Candida*. El agente etiológico más frecuente de las candidiasis continúa siendo *Candida albicans*, representando el 85-95% de los aislamientos clínicos procedentes de muestras de mucosa y piel, y el 45-70% de los aislamientos de hemocultivos y otras muestras clínicas. Sin embargo, este cambio epidemiológico ha supuesto un importante incremento de la proporción de infecciones causadas por especies diferentes de *Candida albicans*, principalmente asociado al uso frecuente de profilaxis antifúngica (Arendrup et al., 2013). En las últimas décadas, la proporción de infecciones causadas por estas especies

representaron el 35-65% de todas las candidiasis sistémicas (Sadeghi et al., 2017). En pacientes mayores de 65 años con otras enfermedades de base, se aíslan en sangre con mayor frecuencia *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei* (Quindós, 2014). En recién nacidos y niños, *Candida parapsilosis* se aísla con más frecuencia que *Candida albicans* y en algunos países de Europa es la segunda especie en frecuencia (Dotis et al., 2012). También se ha relacionado esta especie con las candidemias asociadas a catéteres (Tragiannidis et al., 2014).

La distribución de las especies de *Candida* diferentes de *Candida albicans* varía según la localización geográfica. En Australia, América Latina y en los países de la zona mediterránea pertenecientes a África, Asia y Europa se observa un predominio de *Candida parapsilosis*. Por el contrario, en EEUU, en los países de Europa central y nórdicos el agente etiológico predominante después de *Candida albicans* es *Candida glabrata* (Quindós, 2014). Como la distribución de las especies causantes de estas infecciones muestra variabilidad geográfica y como la sensibilidad de estas especies a los fármacos antifúngicos no es uniforme, se requiere disponer de un conocimiento epidemiológico del entorno antes de establecer un tratamiento.

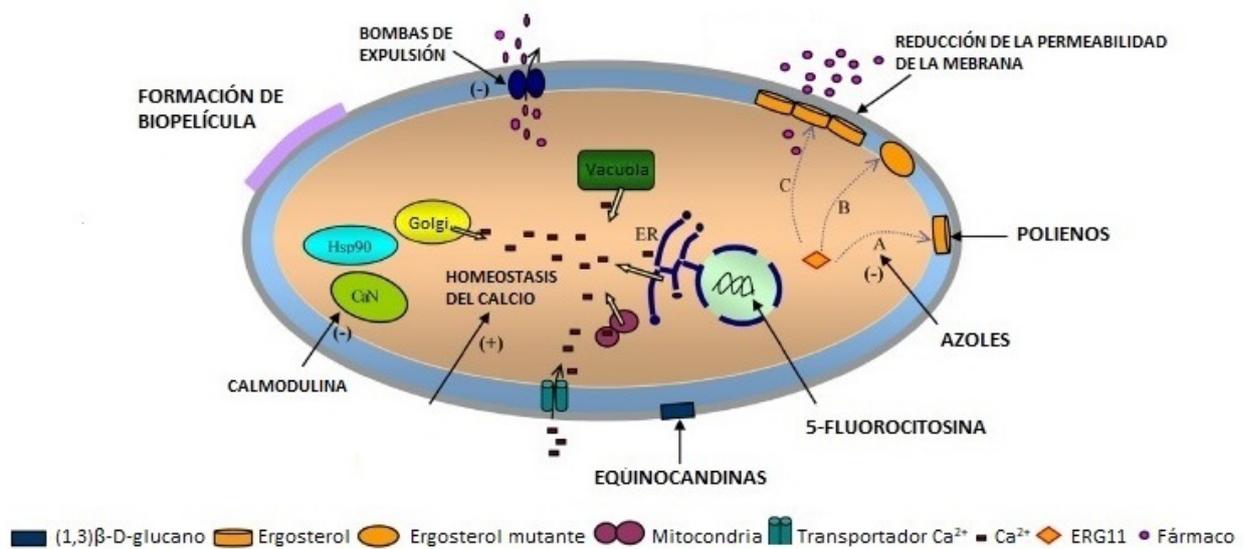
La gravedad de las infecciones producidas por *Candida*, se ha visto incrementada debido a la aparición de aislamientos con resistencias microbiológicas o con sensibilidad reducida a los fármacos antifúngicos de uso habitual. Para controlar este problema ha sido necesario el desarrollo de comités, que han estandarizado distintos métodos para la evaluación de la sensibilidad a los fármacos antifúngicos, lo que ha permitido realizar estudios globales de vigilancia antifúngica y obtener datos de sensibilidad útiles. Algunos estudios sobre las infecciones nosocomiales, como el SENTRY, mostraron que las resistencias a los azoles y a las equinocandinas fueron más frecuentes en *Candida glabrata*. Mientras que, *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis* solo presentaron resistencia a los azoles, al contrario que *Candida albicans* donde solo se observó resistencia a las equinocandinas y en bajas frecuencias (Pfaller et al., 2011). Por otro lado, en el estudio ARTEMIS, en el que sólo se vigilaron las resistencias al fluconazol y al voriconazol, se observó que el 90,2% de los aislamientos de *Candida* fueron sensibles al fluconazol. Sin embargo, 13 de las 31 especies identificadas mostraron una sensibilidad reducida. El 95% de los aislamientos de *Candida* estudiados fueron sensibles con voriconazol y el 3% resistentes. Además, aproximadamente el 30% de los

aislamientos resistentes al fluconazol fueron sensibles al voriconazol (Pfaller et al., 2010). Nieto y colaboradores mostraron en su estudio bajos porcentajes de aislamientos de *Candida albicans* (1,5%), *Candida glabrata* (1,1%) y *Candida parapsilosis* (0,6%) resistentes al fluconazol. En este estudio, se observaron más aislamientos de *Candida albicans* resistentes al voriconazol, 12 aislamientos de los 353 mostraron resistencia (3,4%) (Nieto et al., 2015).

## 1.2. FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS

La disponibilidad de fármacos para el tratamiento de las infecciones fúngicas es limitada en comparación con los fármacos disponibles para el tratamiento de las infecciones bacterianas. El tratamiento antifúngico se realiza según distintos criterios clínicos, microbiológicos y farmacológicos. Los criterios más relevantes a la hora de tomar una decisión terapéutica adecuada son: el estado inmunitario del paciente, las características concretas de la micosis (la etiología, la diseminación, la sensibilidad a los fármacos antifúngicos, etc.) y las características farmacológicas de los agentes antifúngicos disponibles (la administración, la eliminación, la interacción con otros fármacos, el metabolismo y la toxicidad).

Los fármacos antifúngicos se clasifican en base a su estructura química, a su origen (natural o de síntesis química), a su espectro (amplio o restringido) y a su mecanismo de acción (inhibición de ergosterol, inhibición del 1,3- $\beta$ -D-glucano, unión al ergosterol, inducción de síntesis incorrecta de ARN, interferencia con la replicación de ADN y alteración de la integridad de la membrana celular) (Chabner, 2011). Los fármacos antifúngicos que se utilizan con mayor frecuencia están agrupados en tres grandes familias: los azoles, las candinas (anidulafungina, caspofungina y micafungina) y los polienos o macrólidos poliénicos (anfotericina B y nistatina) (**Figura 1.1**). Los azoles constituyen el grupo más amplio y están divididos en imidazoles (ketoconazol y miconazol) y triazoles (fluconazol, isavuconazol, itraconazol, posaconazol y voriconazol).



**Figura 1.1:** Principales dianas de los fármacos antifúngicos y algunos mecanismos de resistencia (Modificado de Li et al., 2014).

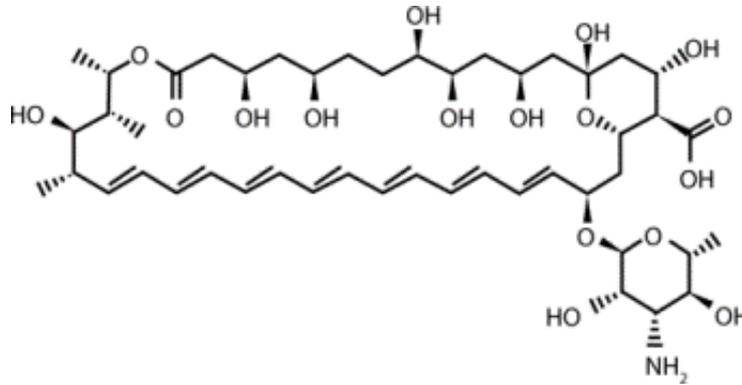
### 1.2.1. POLIENOS

Los polienos son compuestos que poseen un efecto fungistático o fungicida según la concentración y la sensibilidad del hongo. Fueron los primeros agentes antifúngicos que se desarrollaron. Se conocen más de 100 compuestos, siendo los más importantes la anfotericina B y la nistatina (Brunton, 2012).

La anfotericina B se obtuvo a partir de *Streptomyces nodosus* (Figura 1.2). Este fármaco ejerce su efecto sobre la membrana plasmática fúngica ya que tiene afinidad por el ergosterol al cual se une, interfiriendo en la permeabilidad y en el transporte. Esta unión provoca la formación de canales que facilitan la salida de pequeñas moléculas y la entrada de otras sustancias a través de la membrana. Aunque la afinidad de la anfotericina B por el ergosterol de la membrana de los hongos es mayor, también interacciona con el colesterol de las membranas celulares humanas lo que provoca efectos tóxicos (nefrotoxicidad). La anfotericina B es eficaz tanto contra hongos levaduriformes como filamentosos y es el tratamiento de referencia en las infecciones fúngicas diseminadas producidas por *Aspergillus* o *Candida*. Se han desarrollado nuevas formulaciones (anfotericina B liposómica y anfotericina B en complejo lipídico) para

## Introducción

reducir los efectos adversos, como la nefrotoxicidad, permitir la administración de dosis más elevadas y mejorar sus características farmacocinéticas (Brunton, 2012).



**Figura 1.2:** Estructura química de la anfotericina B.

La nistatina se obtuvo a partir de *Streptomyces noursei*. La estructura y el mecanismo de acción son similares al de la anfotericina B. Presenta una mala absorción por eso su uso es exclusivamente tópico. La nistatina es efectiva en candidiasis de la piel y la mucosa.

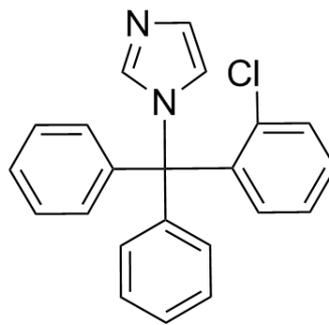
### 1.2.2. AZOLES

Los azoles son compuestos sintéticos heterocíclicos de cinco átomos con dos (imidazoles) o tres (triazoles) átomos de nitrógeno en su anillo azólico. Actúan inhibiendo la síntesis del ergosterol, bloqueando la enzima lanosterol demetilasa que depende del citocromo fúngico P450 (14- $\alpha$  desmetilasa del lanosterol) esta enzima transforma el lanosterol en ergosterol por escisión de un grupo metilo del lanosterol (Pappas et al., 2018). Esta inhibición genera un aumento importante de la permeabilidad de la membrana, inhibe el crecimiento celular, así como su multiplicación. La acción de los azoles es fungistática contra *Candida* y *Cryptococcus*, y fungicida contra *Aspergillus*. El uso de los imidazoles está limitado a las micosis superficiales, siendo los más utilizados el clotrimazol, el ketoconazol y el miconazol. Los triazoles son moléculas con un amplio espectro de acción, más estables metabólicamente y con una menor toxicidad que los

imidazoles. Son útiles para tratamientos de micosis invasivas. En este grupo podemos encontrar el fluconazol, el isavuconazol, el itraconazol, el posaconazol y el voriconazol.

#### 1.2.2.1. CLOTRIMAZOL

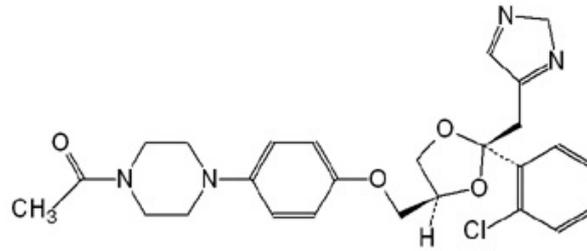
El clotrimazol es un agente antifúngico imidazólico (**Figura 1.3**). Presenta actividad frente a infecciones superficiales causadas por *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, hongos filamentosos y dermatofitos. Este fármaco no está indicado en el tratamiento de las micosis sistémicas. El clotrimazol se administra tanto por vía oral como por vía tópica (crema, loción y solución, crema vaginal al 1 o 2%, o comprimidos vaginales). Debido a que el clotrimazol se fija a las mucosas, se pueden detectar concentraciones del fármaco hasta tres días después de su administración. Su biodisponibilidad por vía oral es baja.



**Figura 1.3:** Estructura química del clotrimazol.

#### 1.2.2.2. KETOCONAZOL

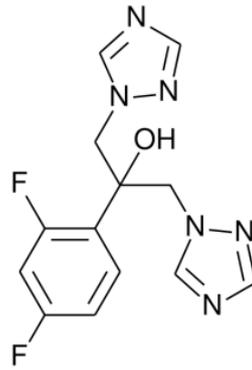
El ketoconazol es un fármaco antifúngico perteneciente a la familia de los imidazoles (**Figura 1.4**). Es un compuesto lipofílico, lo que le permite alcanzar concentraciones altas en los tejidos grasos. Presenta actividad frente a infecciones causadas por *Candida* y hongos dimorfos. El ketoconazol se administra principalmente por vía oral, salvo en infecciones producidas por dermatofitos en las que su administración puede ser por vía tópica. Su biodisponibilidad por vía oral depende de la acidez gástrica, por ello es necesario un medio ácido para su absorción (Allen et al., 2015). La administración del ketoconazol se realiza junto con la comida para favorecer así su absorción, gracias al aumento de las secreciones biliares.



**Figura 1.4:** Estructura química del ketoconazol.

### 1.2.2.3. FLUCONAZOL

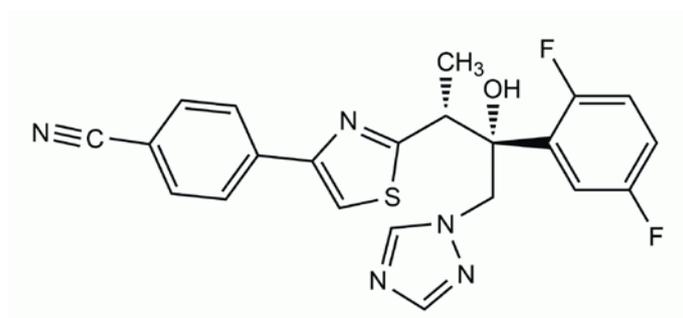
El fluconazol es un bistriazol fluorado, que se caracteriza por su buena biodisponibilidad y por su baja toxicidad (**Figura 1.5**). Se encuentra entre los fármacos antifúngicos más utilizados tanto por vía intravenosa como oral, mostrando una buena absorción por esta última vía (Mensa et al., 2017). Presenta una buena actividad fungistática contra la mayoría de especies de *Candida*, *Cryptococcus*, así como hongos dimorfos (*Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides posadasii*, etc). El fármaco se distribuye por todos los órganos y tejidos, mostrando concentraciones similares en el plasma, en el líquido cefalorraquídeo, en la saliva, en el esputo y en la vagina. Presenta una semivida de 30 h y alcanza una  $C_{máx}$  de 6  $\mu\text{g/ml}$  con 100 mg por vía oral y de 20-30  $\mu\text{g/ml}$  con 400 mg por vía intravenosa. El fluconazol interacciona con numerosos fármacos porque inhibe las isoenzimas hepáticas CYP3A4 y CYP2C9, aumentando su concentración plasmática. El fluconazol es el fármaco de elección en el tratamiento de candidiasis de la piel y de la mucosa, así como en el tratamiento de candidiasis invasoras en pacientes sin neutropenia. En algunos pacientes con elevado riesgo de padecer candidiasis invasora, debido a que presentan otras enfermedades de base, se utiliza como profilaxis por su fácil administración y su baja toxicidad. También es el fármaco de elección en el tratamiento de las coccidioidomicosis, sobre todo con afectación meníngea (Quindós, 2015).



**Figura 1.5:** Estructura química del fluconazol.

#### 1.2.2.4. ISAVUCONAZOL

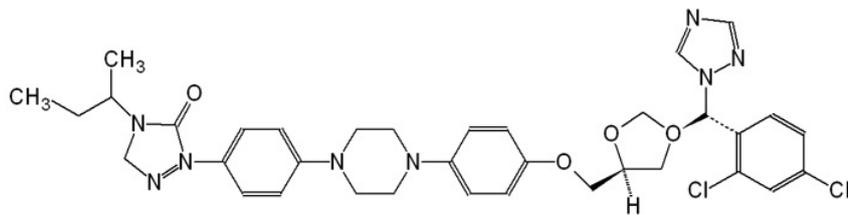
El isavuconazol es un triazol activo que se obtiene a partir de la hidrolisis del sulfato de isavuconazonio, profármaco soluble en agua con actividad antifúngica, mediante las esterasas plasmáticas (**Figura 1.6**). Este fármaco tiene actividad similar a la del fluconazol, fungistática contra la mayoría de especies de *Candida*, *Cryptococcus* y algunos hongos dimorfos y fungicida frente a distintas especies de *Aspergillus*. El isavuconazol se emplea en el tratamiento de pacientes adultos con aspergilosis invasiva y mucormicosis invasiva para los que la anfotericina B no es apropiada. También se utiliza en el tratamiento primario de candidiasis esofágicas (Sanglard y Coste, 2016). Este fármaco se puede administrar tanto por vía oral como intravenosa, aunque en el caso de esta última se debe realizar a través de un filtro (0,2-1,2 mm) durante una hora. El isavuconazol presenta menos interacciones con otros fármacos que el resto de azoles, tiene una elevada biodisponibilidad y se distribuye ampliamente por los tejidos.



**Figura 1.6:** Estructura química del isavuconazol.

### 1.2.2.5. ITRACONAZOL

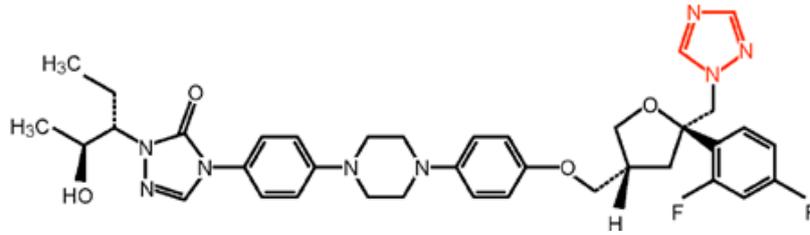
El itraconazol es un triazol altamente lipofílico de primera generación con un amplio espectro de acción (**Figura 1.7**). Este fármaco se utiliza como alternativa al tratamiento en pacientes infectados por aislamientos de *Candida* resistentes al fluconazol (Pappas et al., 2016). El itraconazol presenta una excelente eficacia en infecciones causadas por especies del género *Aspergillus* y *Candida*, por algunos dermatofitos y por hongos dimorfos. Se administra en forma de cápsula y de solución oral e intravenosa. Es útil en el tratamiento de las candidiasis cutáneas y de las mucosas. Dado que la biodisponibilidad de la solución oral no es buena, en el tratamiento de las micosis invasivas se utiliza la formulación intravenosa.



**Figura 1.7:** Estructura química del itraconazol.

### 1.2.2.6. POSACONAZOL

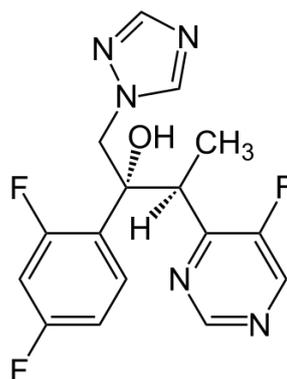
El posaconazol es un triazol lipófilo que presenta una potente actividad antifúngica y amplio espectro (**Figura 1.8**). Es efectivo frente a la mayoría de especies de *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus* y otros hongos filamentosos. Muestra también una buena actividad frente a cepas de *Candida albicans* resistentes a fluconazol. El posaconazol es fungicida frente a *Aspergillus* y fungistático frente a *Candida*. El posaconazol presenta una baja solubilidad en medios acuosos. Su absorción oral está limitada, por lo que se recomienda una administración conjunta con la comida (preferentemente grasa) para aumentarla significativamente (Morris, 2010).



**Figura 1.8:** Estructura química del posaconazol.

### 1.2.2.7. VORICONAZOL

El voriconazol es un triazol con estructura similar a la del fluconazol, pero con un espectro más amplio, poco soluble en agua y con una mayor actividad *in vitro* (**Figura 1.9**). Se utiliza como tratamiento frente a infecciones causadas por especies resistentes al fluconazol, ya que presenta muy buena actividad. Está indicado en el tratamiento de infecciones sistémicas producidas por *Aspergillus*, *Candida*, *Fusarium* y *Scedosporium apiospermum*. El voriconazol es fungicida contra *Aspergillus* y *Fusarium*, mientras que contra *Candida* y otras levaduras es fungistático. Este fármaco presenta una elevada biodisponibilidad, buena distribución por los tejidos y una baja toxicidad, lo que permite una correcta administración tanto oral como intravenosa (Heeres, 2010).



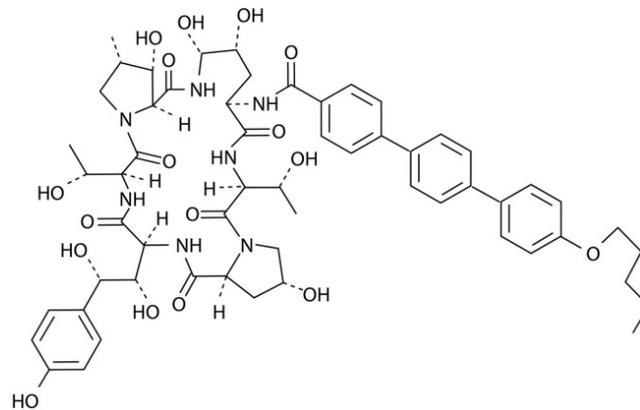
**Figura 1.9:** Estructura química del voriconazol.

### 1.2.3. EQUINOCANDINAS

Las equinocandinas son un grupo de fármacos lipopéptidos semisintéticos cíclicos (anillo de 6 aminoácidos unidos a una cadena lateral lipófila) que bloquean la síntesis del 1,3-β-D-glucano, polímero principal de la pared fúngica, que le confiere la morfología a la célula fúngica además de protegerla de los cambios osmóticos ambientales (Perlin, 2014). Estos fármacos inhiben la enzima 1,3-β-D-glucano sintasa, generando una inestabilidad que impide el crecimiento y la reproducción de la célula fúngica. Dicha enzima constituye una buena diana terapéutica debido a su ausencia en las células de los mamíferos, presentando así escasas interacciones farmacológicas y una baja toxicidad. Por eso, las equinocandinas se utilizan como fármacos de elección para el tratamiento y la profilaxis de las candidiasis invasivas en pacientes con inmunodeficiencias, en enfermos críticos, así como en pacientes con probabilidad alta de interacciones entre medicamentos (Bassetti et al., 2016). Las equinocandinas son activas frente a todas las especies de *Candida*, para las que su acción es fungicida, sin embargo, frente a *Aspergillus* su acción es fungistática. Presentan una biodisponibilidad oral muy limitada y su uso clínico es únicamente intravenoso. En este grupo podemos encontrar la anidulafungina, la caspofungina y la micafungina.

#### 1.2.3.1. ANIDULAFUNGINA

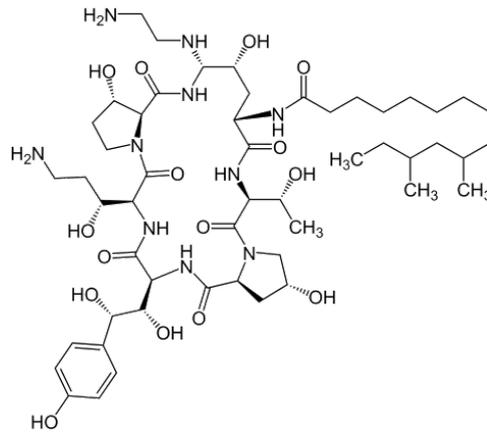
La anidulafungina es un lipopéptido semisintético que presenta alcoxitrifenoilo como cadena lateral (**Figura 1.10**). Se obtuvo a partir de un producto de fermentación de *Aspergillus nidulans*. La anidulafungina muestra actividad frente a *Candida* y frente a las regiones de crecimiento activo de las hifas de *Aspergillus*. Está indicada en el tratamiento de las candidiasis esofágicas y de las candidiasis invasivas. Presenta una escasa interacción con diferentes fármacos, como el voriconazol, la anfotericina B, la ciclosporina, el tacrolimus o la rifampicina. La administración combinada con anfotericina B, puede mostrar un efecto aditivo o sinérgico frente a *Aspergillus*, *Candida*, *Fusarium* y *Zygomycetes*. También puede presentar un efecto aditivo contra *Candida* la administración conjunta con un azol, mientras que su combinación con itraconazol, posaconazol o voriconazol puede ser sinérgica contra *Aspergillus* y otros hongos filamentosos (Gobernado y Cantón, 2008).



**Figura 1.10:** Estructura química de la anidulafúngina.

### 1.2.3.2. CASPOFUNGINA

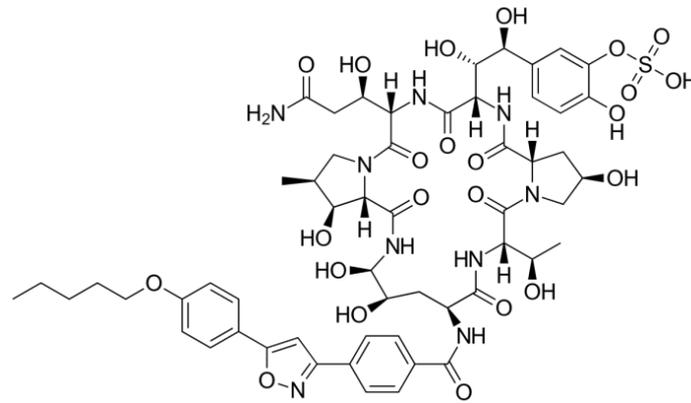
La caspofungina es un lipopéptido semisintético que tiene como cadena lateral un ácido graso y se administra por vía intravenosa en forma de acetato (**Figura 1.11**). Este fármaco fue el primer inhibidor de la 1,3-β-D-glucano sintasa aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) para el tratamiento de las micosis y se obtuvo a partir del hongo *Glarea lozoyensis*. La caspofungina ha mostrado actividad dependiente de la concentración contra *Candida* (fungicida), *Aspergillus* (fungistática/fungicida) y hongos dimórficos (*Blastomyces* y *Coccidioides*). Está indicada contra la candidiasis invasiva, contra la candidiasis esofágica y orofaríngea y la aspergilosis invasiva, cuando los pacientes no toleren otros agentes antifúngicos o no respondan correctamente a los fármacos, ocurriendo lo mismo en los tratamientos de aspergilosis invasiva. Presenta interacción al ser administrada en pacientes tratados con tacrolimus, reduciéndose las concentraciones plasmáticas del mismo. La administración combinada con anfotericina B o con un azol puede mostrar un efecto aditivo o sinérgico contra *Mucor* y hongos multiresistentes (Chen et al., 2011).



**Figura 1.11:** Estructura química de la caspofungina.

### 1.2.3.3. MICAFUNGINA

La micafungina es un lipopéptido semisintético que presenta un complejo aromático 3,5-difenilisoaxazol sustituido como cadena lateral y es sintetizada a partir de *Coleophoma empetri* (Figura 1.12) (Wasmann et al., 2018). La micafungina muestra un espectro de acción análogo al de la caspofungina. La actividad in vitro frente a hongos dimorfos (*Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*) es variable, sensible cuando se encuentran en forma filamentosa y resistente cuando están en forma de levadura. Este fármaco está indicado frente a la candidiasis invasiva, candidiasis esofágica y en aquellas candidiasis orofaríngeas recalcitrantes a otras terapias antifúngicas. Cuando se administra conjuntamente con sirolimus o nifedipina presenta un aumento de las concentraciones plasmáticas de los mismos. No se han descrito otras interacciones.



**Figura 1.12:** Estructura química de la micafungina.

#### 1.2.4. OTROS FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS

La utilización de otros fármacos está limitada al uso tópico, para tratar micosis cutáneas y de las mucosas, aunque en algunos casos pueden administrarse en combinación con otros fármacos antifúngicos para el tratamiento de las aspergilosis, criptococosis o mucormicosis invasivas resistentes a las terapias de primera elección (Adimi et al., 2013; Quindós, 2015).

##### 1.2.4.1. ALILAMINAS

Las alilaminas son un grupo de fármacos antifúngicos que bloquean la biosíntesis del ergosterol por la inhibición de la escualeno epoxidasa, una enzima no dependiente del citocromo P450. Al inhibir esta enzima se produce una disminución de la concentración de ergosterol mientras que los niveles de escualeno aumentan, causando un aumento en la permeabilidad de la membrana celular e interrumpiendo la organización celular, lo que genera una disminución en el crecimiento del hongo. Dentro de este grupo podemos encontrar la terbinafina y la naftifina. Se ha observado actividad contra *Aspergillus*, algunas especies de *Candida*, dermatofitos, *Cryptococcus neoformans* y hongos dimorfos. La terbinafina se puede administrar por vía oral o tópica y su uso está relacionado principalmente con la onicomicosis, mientras que la naftifina se administra exclusivamente por vía tópica y se emplea en las dermatofitosis.

#### **1.2.4.2. MORFOLINAS**

Las morfolinas son un grupo de fármacos que inhiben la síntesis del ergosterol a nivel de la membrana plasmática del hongo. Dentro de este grupo podemos encontrar la amorolfina, fármaco que inhibe la reductasa D14 y la isómeras D7-D8 agotando así el ergosterol y acumulando el ignosterol, responsable de la actividad fungicida de estos compuestos. Posee una actividad antifúngica potente contra dermatofitos. Comercializada exclusivamente en forma de laca al 5% para el tratamiento tópico de la onicomycosis. Otro fármaco presente en este grupo es el fenpropimorf, aunque este agente no se emplea para el tratamiento en los seres humanos si no que se utiliza como plaguicida en las cosechas.

#### **1.2.4.3. 5-FLUOROCITOSINA**

Este fármaco es una pirimidina fluorada que se incorpora al ARN impidiendo la síntesis proteica. La 5-fluorocitosina penetra en la célula fúngica mediante una permeasa específica para la citosina y una vez en el citoplasma es alterada enzimáticamente convirtiéndose en 5-fluoruracilo (antimetabolito que inhibe la timidato sintasa) que se incorpora al ARN. También se puede convertir en 5-fluordeoxiuridina monofosfato que se incorpora en el ADN e inhibe la síntesis de ADN y la división celular. Presenta actividad fungistática frente a la mayoría de las especies de *Candida* y *Cryptococcus*. Su uso se encuentra relacionado con la administración conjunta con anfotericina B o azoles, ya que muestra un efecto aditivo o sinérgico frente a *Candida* y *Cryptococcus*. La 5-fluorocitosina se administra por vía oral o intravenosa. La resistencia a este fármaco en monoterapia puede desarrollarse durante el tratamiento de infecciones causadas por *Candida* y *Cryptococcus* si se emplea como monoterapia (Mensa et al, 2017).

#### **1.2.4.4. GRISEOFULVINA**

Es un policétido aromático, sintetizado a partir de *Penicillium griseofulvum*, que inhibe la mitosis. Para ello, la griseofulvina bloquea la tubulina que interrumpe la actividad de los microtúbulos polimerizados, inhibiendo así la división del hongo. Tiene actividad fungistática frente a dermatofitos.

### 1.3. RESISTENCIA A LOS FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS

Las micosis invasoras se observan con mayor frecuencia en personas con enfermedades subyacentes graves, con un deterioro de los mecanismos defensivos o una inmunosupresión debido a los tratamientos frente a esas enfermedades. La mortalidad de estas infecciones sigue siendo demasiado alta. Por ello, es importante limitar las muertes asociadas a las micosis invasoras con un diagnóstico precoz y una utilización correcta del agente antifúngico. El fracaso terapéutico, es decir, cuando un paciente con una micosis que recibe un tratamiento adecuado no se cura ni mejora, se puede atribuir a muchas razones. Los factores más relevantes que influyen en la respuesta del paciente a la terapia son los siguientes:

- Factores relacionados con el fármaco entre los que se encuentran, la variabilidad farmacocinética del fármaco (una exposición excesiva que podría conducir a toxicidad), el régimen de dosis y la penetración del fármaco, la estabilidad, la unión a proteínas, las interacciones con otros fármacos, así como la naturaleza fungistática del agente utilizado.
- Factores relacionados con el hospedador: la respuesta inmune, la gravedad y el lugar de la infección, el estado de enfermedad subyacente.
- Factores relacionados con hongos: la virulencia del organismo infectante y su interacción con el hospedador y el agente terapéutico.
- Factores relacionados con el manejo del paciente, como el drenaje del absceso o la presencia de catéter intravascular o válvula cardíaca protésica.

La resistencia de los hongos a los agentes antifúngicos, es un factor importante en el fracaso terapéutico. Se define como resistencia microbiológica la falta de sensibilidad relativa in vitro de un hongo a un fármaco antifúngico concreto. La resistencia intrínseca es aquella resistencia microbiológica in vitro de todos los aislamientos de una especie a un determinado fármaco. Mientras que la resistencia primaria hace referencia a aquella resistencia que se observa cuando algunos aislamientos clínicos o cepas de referencia que de forma habitual son sensibles al fármaco antifúngico presentan resistencia y no han sido expuestos previamente a él

(Quindós, 2015). El uso generalizado de fármacos antifúngicos azólicos se ha asociado con la aparición de especies resistentes o con menos sensibilidad en muchas regiones del mundo y en poblaciones concretas de pacientes (Arendrup y Patterson, 2017). Por otro lado, se define como resistencia adquirida o secundaria a la aparición de resistencia *in vitro* a un determinado agente antifúngico tras la exposición de un aislamiento, previamente sensible, a dicho agente. *Candida glabrata* y *Candida parapsilosis* representan las dos especies más prevalentes con sensibilidad reducida a azoles y a equinocandinas respectivamente. La resistencia adquirida es menos común que la intrínseca, ya que los hongos no intercambian genes a través de plásmidos. Algunas especies con resistencia intrínseca al fluconazol tienen también menor sensibilidad a las equinocandinas (resistencia múltiple), entre ellas destaca *Candida auris*, una especie que se ha convertido en una causa importante de infección asociada a la asistencia sanitaria. La resistencia múltiple de *Candida* a fármacos antifúngicos, se produce generalmente como una adquisición de resistencia a un agente antifúngico en especies con resistencia intrínseca a otro agente, pero ocasionalmente este tipo de resistencia sucede en especies sensibles a los fármacos antifúngicos (Arendrup y Patterson, 2017). Dentro de los factores que influyen en la selección de especies resistentes se incluye la exposición previa a los fármacos antifúngicos, la elección del compuesto, así como la dosificación y la duración de la exposición.

Pfaller y colaboradores mostraron en un estudio en el que analizaron 201.653 aislamientos procedentes de 133 centros médicos diferentes, que el porcentaje de aislamientos de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* resistentes al fluconazol con concentraciones mínimas inhibitorias elevadas (CMI  $\geq 16$   $\mu\text{g/ml}$ ) fue bajo, del 2,0% y 3,9% respectivamente. Estas concentraciones corresponden a la concentración mínima del fármaco que inhibe el crecimiento del microorganismo después de su incubación. El porcentaje de aislamientos de *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis* fue de 6,8% y 9,0% respectivamente (Pfaller et al., 2010). Oxman y colaboradores informaron que de 243 aislamientos procedentes de candidemias 45 de ellos (19%) involucraban a aislamientos resistentes al fluconazol con CMI mayores o iguales a 16  $\mu\text{g/ml}$ , y en un tercio de los casos estudiados la resistencia fue adquirida (Oxman et al., 2010). Otros autores observaron que de los 1.239 aislamientos de *Candida* estudiados, la resistencia a los azoles y a las equinocandinas fue destacada contra los aislamientos de *Candida glabrata* mostrando tasas de resistencia similares tanto para el

fluconazol (16,7%) como para las equinocandinas (16,7) entre el grupo de edad comprendido entre los 20-39 años (Pfaller et al., 2012).

### **1.3.1. MECANISMOS DE RESISTENCIA**

La resistencia microbiológica está incluida dentro de los factores que influyen en el éxito de la respuesta a la terapia antifúngica. Se han descrito diversos mecanismos de resistencia, la mayoría de ellos obtenidos en estudios realizados con *Saccharomyces cerevisiae* y diferentes especies de *Candida*. Se pueden distinguir tres grandes grupos a la hora de clasificar los mecanismos de resistencia: según la modificación de la diana de acción (por superproducción, por alteración estructural o supresión); según la modificación de la ruta metabólica implicada en el mecanismo de acción del agente antifúngico y según la disminución de la concentración intracelular del fármaco antifúngico (bloqueando su entrada o expulsándolo al exterior) (Cowen et al., 2015; Quindós, 2015; Revie et al., 2018).

#### **1.3.1.1. MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS POLIENOS**

La resistencia a los polienos es muy infrecuente, aunque han sido fármacos de uso generalizado y continuado durante las últimas décadas. Los mecanismos de resistencia a la anfotericina B son poco conocidos pero se han asociado:

- Con la disminución o ausencia en el contenido de ergosterol de la membrana celular de los hongos como resultado de mutaciones en los genes *pol1*, *pol2*, *pol3* y *pol5* por carencias de la enzima 7,8- $\Delta$ -esterol isomerasa.
- Con la acumulación de otros esteroides (por sustitución del ergosterol) de menor afinidad, como el lanosterol por mutaciones en los genes *ERG2*, *ERG3* o *ERG6* que codifican la esteroil C8-isomerasa, C5-desaturasa y C25-metiltransferasa, respectivamente.
- Con factores estéricos o termodinámicos que enmascaran o dificultan la unión de los polienos al ergosterol.
- Con el aumento de la actividad de la catalasa junto a una disminución del daño oxidativo.

Se han descrito resistencias primarias a la anfotericina B en aislamientos de *Candida krusei* y *Candida glabrata* con CMI altas, y en algunos aislamientos de *Candida lusitanae*.

### 1.3.1.2. MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS AZOLES

El uso generalizado de los azoles como tratamiento y profilaxis de las micosis ha generado una mayor frecuencia de aislamientos de *Candida albicans* con resistencias secundarias a los azoles en. Otras especies como *Candida dubliniensis* y *Candida glabrata* incluyen aislamientos con resistencia primaria, aunque en mayor medida, presentan aislamientos con resistencia adquirida a los azoles. En general, los porcentajes de aislamientos de *Candida* resistentes a azoles siguen siendo bajos (1,0-2,1% en *Candida albicans*, 0,4-4,2% en *Candida parapsilosis*, 1,4-6,6% en *Candida tropicalis* y 7-12% en *Candida glabrata*) (Pemán et al., 2009).

Los mecanismos de resistencia a los azoles han sido ampliamente estudiados y se han descrito varios:

- Las alteraciones de la composición de la membrana plasmática pueden afectar a la entrada del fármaco en la célula fúngica. Estas alteraciones afectan a la fluidez de la membrana y provocan asimetrías que tienen como resultado una menor captación de los fármacos. También se ha observado una disminución del ergosterol y un menor cociente fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina en la membrana plasmática de algunos aislamientos de *Candida albicans* resistentes al fluconazol.
- Un mecanismo común de resistencia en especies de *Candida* es la adquisición de mutaciones puntuales en el gen que codifica la diana enzimática (*ERG11*) alterando el sitio diana y dando como resultado una enzima con afinidad reducida o con incapacidad para unirse a los azoles. Se han descrito más de 140 sustituciones en el gen *ERG11* de *Candida albicans*, lo que indica que esta enzima es muy permisiva para los cambios estructurales (Morio et al., 2010). La mayoría de estas sustituciones se encuentran en distintas regiones denominadas *hot spot* dentro de la proteína (Marichal et al., 1999). Una de las mutaciones más habituales es la sustitución de arginina por lisina en la posición 467 (Quindós, 2015). En aislamientos distintos a *Candida albicans* se ha observado una variabilidad mucho menor en la secuencia del gen *ERG11*. En

aislamientos clínicos de *Candida parapsilosis* resistentes se ha observado una sustitución de tirosina por fenilalanina (Berkow et al., 2015). La adquisición de estas mutaciones puede agravarse por medio de la sobreexpresión o por la regulación positiva de la enzima diana alterada. Una mayor expresión de *ERG11*, produce un aumento de la diana y una mayor producción de ergosterol, diluyendo la actividad de los azoles. Se ha demostrado que la regulación positiva de la enzima diana produce resistencia al fluconazol en *Candida albicans* (MacPherson et al., 2005). También se ha demostrado que las mutaciones en el factor de transcripción de clúster de zinc (Upc2) encargado de regular la expresión de genes implicados en la síntesis del ergosterol, induce la sobreexpresión del gen y por consiguiente una disminución de la sensibilidad al fluconazol (Flowers et al., 2012). Además, se ha observado la sobreexpresión del gen *ERG11* en varios aislamientos resistentes de *Candida parapsilosis* (Souza et al., 2015). Recientemente se ha observado que el nivel de sobreexpresión de la enzima con la diana alterada puede ser mínimo o estar presente en combinación con otras mutaciones de resistencia, lo que dificulta la evaluación del impacto directo de dicho mecanismo en el fenotipo resistente (Berkow y Lockhart, 2017).

- Otro mecanismo asociado con la disminución de la sensibilidad o la resistencia de *Candida* a los fármacos antifúngicos azólicos es la activación de bombas de eyección o expulsión que conducen a una disminución en la concentración del fármaco dentro de la célula fúngica. Esta activación está regulada por dos bombas específicas, los transportadores *ATP-Binding cassette* (ABC) codificados por los genes *CDR* y los *Major Facilitators Superfamily* (MFS) codificados por los genes *MDR*. La inducción de las bombas de eyección o expulsión codificadas por los genes *CDR* tienden a afectar a todos los fármacos azólicos. Por el contrario, aquellas codificadas por genes *MDR* suelen ser selectivas para el fluconazol (Pemán et al., 2009). La regulación de las bombas codificadas por genes *MDR* o *CDR* se ha asociado con la resistencia a los azoles en *Candida albicans* (*MDR1*, *CDR1* y *CDR2*), *Candida dubliniensis* (*CdMDR1*, *CdMDR2*) y *Candida glabrata* (*CgCDR1*, *CgCDR2*).
- Los mecanismos de resistencia asociados con la formación de biopelículas son variados e incluyen entre ellos:

## Introducción

- Los cambios en los estados metabólicos y fisiológicos de las células.
- La presencia de una matriz extracelular rica en glucano que actúa como barrera impidiendo la entrada de los azoles al interior de la célula.
- La elevada densidad celular con presencia de subpoblaciones capaces de tolerar concentraciones elevadas de fármaco antifúngico.
- La sobreproducción de sistemas de bombeo que reducen la concentración intracelular del fármaco.

Se han descrito otros mecanismos que confieren resistencia a los azoles, como por ejemplo uno observado en *Candida albicans*. Este mecanismo infrecuente, le otorga resistencia al fluconazol mediante el desarrollo de otras rutas dentro de la biosíntesis de esteroides. Se produce principalmente por mutaciones en el gen *ERG3* que inactivan la enzima 5,6- $\Delta$ -esterol desaturasa permitiendo a la célula eludir la producción de esteroides metilados tóxicos en presencia del fármaco. Este mecanismo minimiza el efecto del fármaco ya que se acumula el 14 $\alpha$ -metilfecosterol que permite que siga creciendo la célula fúngica (Miyazaki et al., 2006; Martel et al., 2010). También se han identificado mecanismos adicionales de resistencia al fluconazol que implican la amplificación génica. La aneuploidía o el cambio en el número cromosómico puede desarrollarse en cepas de referencia o en aislamientos clínicos de *Candida albicans* después del cultivo de rutina o de la manipulación genética. Dichas alteraciones en el número de copias del gen facilitan la variación genética sin deterioro del crecimiento celular. Se ha observado que en aislamientos clínicos de *Candida albicans* resistentes al fluconazol los cromosomas aneuploides eran siete veces más comunes que en los aislamientos sensibles (Selmecki et al., 2006; Perlin et al., 2017).

La resistencia intrínseca de *Candida krusei* al fluconazol se ha asociado tanto a la baja concentración intracelular de fluconazol por cambios en la permeabilidad de la célula fúngica, como por la baja afinidad del fármaco por la enzima diana 14- $\alpha$  desmetilasa de esta especie (Orozco et al., 1998).

### 1.3.1.3. MECANISMOS DE RESISTENCIA A LAS EQUINOCANDINAS

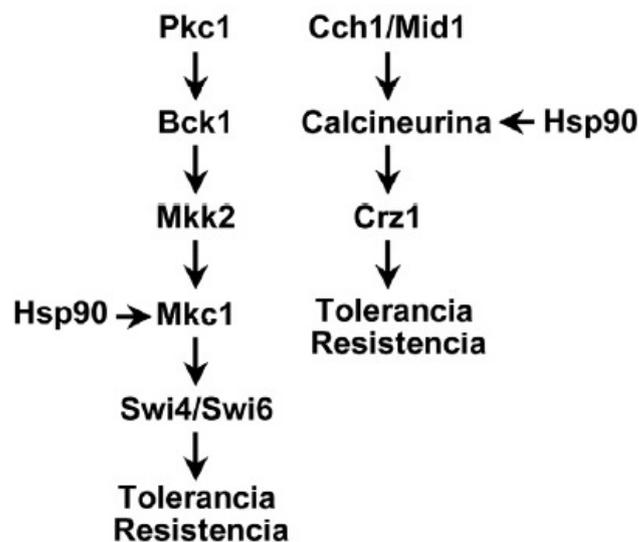
La prevalencia general de la resistencia a las equinocandinas sigue siendo baja (0,3-1% de los aislamientos clínicos de *Candida*), aunque el aumento de su uso para la profilaxis y de los regímenes de tratamiento prolongado ha dado lugar a una mayor incidencia de resistencias clínicamente relevantes. Las equinocandinas inhiben la 1,3- $\beta$ -D-glucano sintasa, codificada por el gen *FKS*, que interrumpe la biosíntesis del 1,3- $\beta$ -D-glucano, un componente clave de la pared celular fúngica. Esta inhibición genera una pared celular defectuosa, perdiendo su integridad y produciendo un fuerte estrés celular.

El mecanismo de resistencia de *Candida* a las equinocandinas implica la adquisición de mutaciones en dos regiones *hot spot* altamente conservadas (HS1 y HS2) en los genes *FKS*, que codifican la subunidad catalítica de la glucano sintasa. La resistencia de *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* y *Candida tropicalis* a las equinocandinas está asociada con las mutaciones en el gen *FKS1*, mientras que las mutaciones en el gen *FKS2* se relacionan únicamente con la resistencia de *Candida glabrata* a estos fármacos (Perlin, 2011; Pfaller, 2012). Las mutaciones en el gen *FKS* alteran la cinética enzimática de la 1,3- $\beta$ -D-glucano sintasa, disminuyendo la sensibilidad de la enzima por el fármaco (Arendrup y Perlin, 2014). Este patrón de disminución de la sensibilidad enzimática a la inhibición se extiende a las tres equinocandinas, lo que confiere resistencia en toda la clase. Las infecciones por *Candida glabrata* resistentes a las equinocandinas han aumentado drásticamente y ahora suponen una preocupación importante ya que muchos aislamientos muestran resistencia cruzada a los azoles (Perlin, 2015 a).

Una de las mutaciones más frecuente en el gen *FKS1* observado en *Candida albicans* tiene como consecuencia la sustitución de prolina por alanina. Además, casi el 90% de las cepas resistentes muestran sustituciones de aminoácidos en las posiciones Fks1p-S641 y Pfs1p-S645 (Perlin, 2015 b). Por otra parte, el 88% de las cepas de *Candida glabrata* resistentes a equinocandinas muestran sustituciones en las posiciones Fks1p-F625, Fks1p-S629, Fks1p-D632, Fks2p-F659 y Fks2p-S663 (Dudiuk et al., 2015).

## Introducción

Los microorganismos están provistos de rutas complejas que les permiten dar respuestas al estrés celular, incluida la exposición a fármacos antifúngicos. En estas rutas celulares que permite la resistencia a los agentes antifúngicos la proteína del shock térmico (Hsp90) tiene un papel destacable. Esta proteína es una chaperona esencial en todos los eucariotas y regula la estabilidad y la activación de diversas proteínas que tienen un gran impacto en la señalización celular. La Hsp90 favorece tanto la tolerancia a los fármacos antifúngicos como la evolución de la resistencia de *Candida* y *Aspergillus* a los azoles y las equinocandinas mediante la estabilización de reguladores de las respuestas al estrés celular, entre los que podemos encontrar la proteína fosfatasa calcineurina y la proteína quinasa terminal activada por el mitógeno Mkc1. Esta última proteína está incluida en la cascada de señalización de la proteína quinasa C, Pkc1 (**Figura 1.13**). La inhibición de la señalización de Hsp90, calcineurina o Pkc1 reduce la resistencia a los azoles, a las equinocandinas y a los polienos (Singh et al., 2009; LaFayette et al., 2010; Robbins et al., 2011).



**Figura 1.13:** Representación esquemática de la importancia de algunas proteínas en la resistencia de *Candida albicans* a los fármacos antifúngicos. Pkc1, proteína quinasa C; Bck1, Mkk2 y Mkc1, serie lineal de proteínas quinastas; Swi4/Swi6, factores de transcripción terminal; Hsp90, proteína de shock térmico de 90 kDa; Cch1/Mid1, canal de calcio activado por voltaje; Crz1, factor de transcripción (Modificada de LaFayette et al., 2010).

### 1.3.2. MÉTODOS PARA ESTUDIAR LA SENSIBILIDAD A LOS FÁRMACOS ANTIFUNGICOS

Para el estudio de la sensibilidad a los fármacos antifúngicos es necesario el desarrollo de métodos reproducibles que faciliten tanto el análisis de un gran número de agentes antifúngicos, como la identificación de las resistencias a dichos fármacos. La clasificación de los hongos según la resistencia o la sensibilidad a un agente antifúngico requiere la utilización de técnicas estandarizadas para el estudio del espectro de acción y en función del establecimiento de las concentraciones consideradas puntos de corte clínico que señalan el límite entre los aislamientos sensibles y resistentes. Un concepto que se ha de tener en cuenta a la hora de estudiar la sensibilidad *in vitro* a los fármacos antifúngicos es el de la CMI, ya que permite adecuar la dosis que se ha de administrar al paciente para que la terapia sea exitosa. Sin embargo, una CMI baja no pronostica un éxito terapéutico puesto que en la evolución clínica de una infección fúngica intervienen numerosos factores.

Existen dos métodos estandarizados de microdilución en caldo para el estudio de la sensibilidad de *Candida* a los agentes antifúngicos: el método descrito en el protocolo M27-A3 propuesto por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) y el método descrito en el documento E.DEF 7.3 propuesto por el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (*Clinical and Laboratory Standards Institute* M27-A3, 2008; Arendrup et al., 2017). Estos métodos se realizan según la técnica de microdilución en caldo, aunque existen algunas diferencias en el tamaño del inóculo o en la determinación de los puntos de corte entre otros. Los dos métodos se han armonizado para que haya una concordancia entre los resultados de CMI obtenidos cuando se analizan los azoles y las equinocandinas (Pfaller et al., 2010). Además, se ha demostrado que en ambos casos se obtienen resultados clínicamente útiles y una correcta discriminación entre las cepas de población salvaje (*wild type*, sin mecanismos de resistencia adquiridos) y cepas resistentes que muestran mecanismos de resistencia intrínsecos o adquiridos (Jang et al., 2013).

Otro método estandarizado para dicho estudio es la técnica de difusión en agar (Balouri et al., 2016). El método de difusión en agar está basado en el estudio de la sensibilidad en función del halo de inhibición producido por la difusión del antifúngico en un medio de cultivo sólido. Este método se estandarizó en 2004 por el CLSI bajo el documento M44-A (*Clinical and Laboratory Standards Institute* M44-A., 2009). La utilidad de los métodos basados en la difusión del fármaco

## Introducción

antifúngico presenta algunos inconvenientes para determinar la CMI debido a los problemas para cuantificar la cantidad de fármaco difundido en el agar. Aunque se pueden calcular gracias a unos puntos de corte y equivalencia diámetro-CMI.

Por otra parte, se han desarrollado métodos comerciales para estudiar la sensibilidad a los fármacos antifúngicos con el fin de evitar trabajos laboriosos o complejos y hacer más sencilla la lectura. Estas técnicas se realizan según los métodos de difusión en agar y microdilución en caldo con alguna modificación, lo que les proporciona una serie de ventajas para compararlos con los métodos estandarizados y de facilidades tanto de uso, como de flexibilidad y de rapidez en la obtención de resultados.

- *E-test*: Método que emplea tiras de plástico con un gradiente continuo de las concentraciones de un agente antifúngico que se depositan sobre la placa de agar. En esta técnica la CMI se define como la concentración más baja a la cual el borde elíptico de la zona de inhibición de crecimiento cruza la escala en la tira.
- *Vitek 2*: Sistema automático que utiliza unas tarjetas colorimétricas que son inoculadas con una suspensión de cultivo puro. Cada tarjeta consta de 64 pocillos y cada uno contiene un sustrato que permite medir varias actividades metabólicas (la acidificación, alcalinización, hidrólisis enzimática, el desarrollo en presencia de sustancias inhibidoras) para facilitar su identificación y un rango de concentración de distintos agentes antifúngicos, para estudiar la sensibilidad a los mismos.
- *Sensititre YeastOne*: Método de microdilución en caldo con un indicador colorimétrico de crecimiento. El color rosa o púrpura en el pocillo indica crecimiento celular, mientras que la ausencia de crecimiento viene indicada por el color azul en el pocillo.
- *Neo-Sensitabs*: Método adecuado para el estudio de los fármacos antifúngicos solubles al agua, que emplea discos con una única concentración de un fármaco antifúngico y que son depositados sobre la placa de agar.

Los métodos comerciales han demostrado una buena correlación con los métodos propuestos por el CLSI y el EUCAST. Emplean los puntos de corte interpretativos establecidos por el CLSI

(Alexander et al., 2007; Pfaller et al., 2007; Pfaller et al., 2008). También se han desarrollado otros métodos más rápidos que permiten obtener resultados en pocas horas (citometría de flujo, métodos turbidimétricos y radiométricos) pero todavía no han sido validados.

Las concentraciones que permiten establecer el límite entre los aislamientos sensibles y resistentes se denominan puntos de corte y se definen teniendo en cuenta la distribución de las CMI para determinadas especies fúngicas, los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de cada agente antifúngico, los mecanismos de resistencia y la correlación entre los valores de CMI obtenidos en laboratorio y los observados en los ensayos clínicos. Un aislamiento se define como perteneciente a la población salvaje (*wild type*, WT) de una especie determinada por la ausencia de mutaciones adquiridas o de mecanismos de resistencia. Inicialmente, para evaluar la actividad del fluconazol el CLSI no permitió puntos de corte clínicos (CBP) especie-específicos y asignó valores de  $\leq 8$   $\mu\text{g/ml}$  como sensible, 16-32  $\mu\text{g/ml}$  como sensible dosis dependiente y  $\geq 64$   $\mu\text{g/ml}$  como resistente para todas las especies independientemente de la distribución de la CMI de la población salvaje (Pfaller et al., 2006). Esta asignación generó algunos problemas, ya que el valor de sensibilidad  $\leq 8$   $\mu\text{g/ml}$  es demasiado alto para proporcionar un método sensible que prediga la aparición de resistencia entre las especies más sensibles, tales como *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* o *Candida tropicalis*. Con el fin de solucionar esta limitación, el CLSI utilizó la base de datos *The global antifungal surveillance MIC*. Esta información les permitió establecer puntos de corte epidemiológicos (ECV) que facilitan la evaluación de la aparición de cepas con menor sensibilidad al fluconazol de manera más efectiva. Además, sirve de ayuda para establecer los puntos de corte especie-específicos, ya que separa la población salvaje, sin mecanismos de resistencia, de los aislamientos con algún mecanismo de resistencia. Se calculan para cada fármaco antifúngico y especie a partir de la distribución de la CMI y teniendo en cuenta la variabilidad inherente a la técnica. Además, pueden servir como un indicador más sensible de la aparición de cepas con sensibilidad reducida por la adquisición de mecanismos de resistencia (Pfaller & Diekema, 2012). Por otro lado, el EUCAST adoptó un enfoque más conservador a la hora de determinar los puntos de corte, proponiendo puntos de corte especie específicos que garantizaban una mayor sensibilidad para detectar la aparición de resistencias. Además, el EUCAST defendió la utilización de los ECV para las cinco especies de *Candida* más comunes

(Pfaller et al, 2010). Cabe señalar que los ECV no siempre son similares a los puntos de corte clínico (Pfaller y Diekema, 2012). Estos últimos se utilizan para distinguir aquellos aislamientos que probablemente respondan al tratamiento de aquellos que no lo hagan (con la administración de un agente antimicrobiano concreto y su consiguiente régimen de dosificación). Los aislamientos solo se pueden clasificar como resistentes a un fármaco antifúngico cuando se ha determinado el punto de corte clínico.

### **1.4. TRATAMIENTOS EN COMBINACIÓN CON FÁRMACOS NO ANTIFÚNGICOS**

La búsqueda de nuevos agentes antifúngicos, el desarrollo de nuevas formulaciones de agentes establecidos o la combinación de fármacos se han propuesto como soluciones para resolver el problema generado por el fracaso de los tratamientos. En los últimos años, el uso de combinaciones de fármacos ha tomado mayor importancia como medida resolutoria al problema generado, ya que puede suponer una mejora en la eficacia y una disminución de la toxicidad y del desarrollo de resistencias a los fármacos. Sin embargo, el elevado coste, los graves efectos secundarios en algunos casos y los resultados contradictorios observados en la literatura han limitado las combinaciones entre fármacos antifúngicos (Chaturvedi et al., 2011; Tragiannidis et al., 2013). Estos impedimentos han facilitado que la investigación por resolver este problema se centre en el estudio de la combinación entre fármacos antifúngicos y no antifúngicos. Algunos fármacos dirigidos al tratamiento de infecciones causadas por otros patógenos o utilizados para tratar otras afecciones exhiben actividad antifúngica, ya que los hongos y las células humanas comparten vías metabólicas comunes (Liu et al., 2014). Por lo tanto, estos fármacos pueden ser útiles para el tratamiento de infecciones fúngicas utilizándolos solos o en combinación o para interactuar con objetivos potencialmente nuevos. Los compuestos empleados en el tratamiento combinado contra aislamientos resistentes pueden desarrollar mecanismos de sinergismo que bien superen la resistencia del hongo o bien potencien el efecto antifúngico. La potenciación de este efecto, mediante la combinación con diferentes agentes antimicrobianos tales como antibacterianos, inhibidores de la calcineurina,

inhibidores de la proteína de choque térmico 90 (Hsp90) o los reguladores de la homeostasis del calcio, podrían ser una estrategia útil para tratar las infecciones fúngicas.

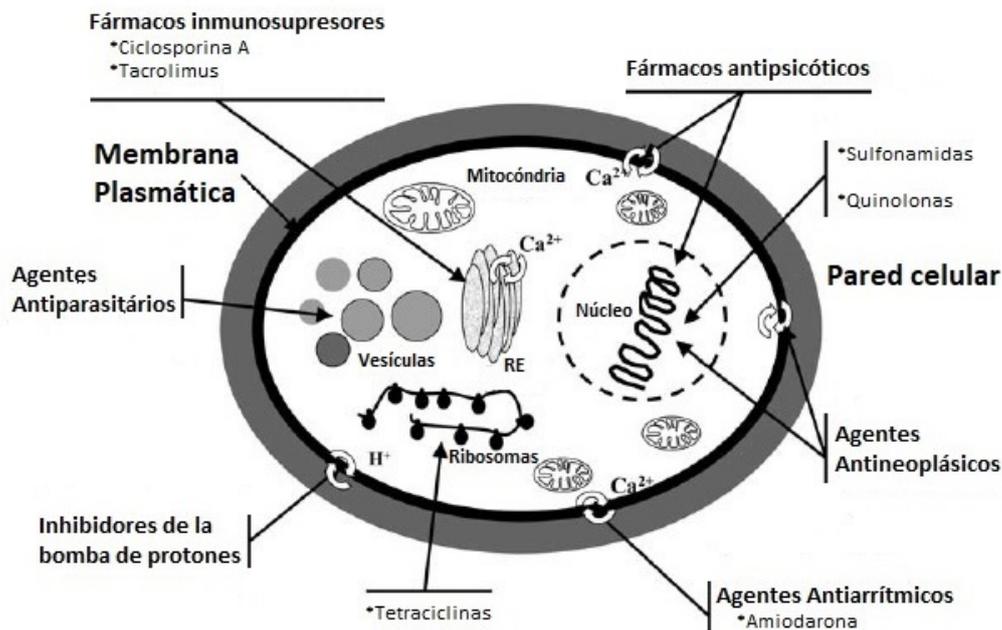
### **1.4.1. FÁRMACOS NO ANTIFÚNGICOS**

La concentración de calcio libre en la célula es esencial para la multiplicación, el transporte, el alargamiento y el crecimiento de las células. Las bombas de calcio pueden ser bloqueadas por fármacos antiarrítmicos, bloqueadores beta, inhibidores de la bomba de protones y agentes inmunosupresores. Otros compuestos pueden interferir con la división o formación del ADN y alterar la síntesis de proteínas, entre ellos podemos encontrar las quinolonas, sulfonamidas y fármacos antineoplásicos. La síntesis de proteínas se puede neutralizar mediante la inhibición del ARN codificante, especialmente por fármacos que interactúan con estas dianas, como la rifampicina, la tetraciclina y los macrólidos. Dado que estos agentes podrían tener múltiples sitios de acción, los efectos pueden observarse simultáneamente o de manera dependiente de la concentración (**Figura 1.14**). En general, los fármacos que inhiben el crecimiento del hongo a altas concentraciones in vitro, se consideran ineficaces in vivo.

#### **1.4.1.1. FÁRMACOS ANTIBACTERIANOS**

Las infecciones fúngicas a menudo van acompañadas de infecciones bacterianas en pacientes que reciben antibióticos de amplio espectro o una terapia inmunosupresora en un periodo prolongado de tiempo, lo que aumenta las posibilidades de que se usen los fármacos antifúngicos en combinación con los antibacterianos. Por lo tanto, la identificación de agentes antibacterianos que puedan aumentar la efectividad de los agentes antifúngicos resulta interesante.

Las tetraciclinas son fármacos antimicrobianos con un amplio espectro de actividad antibiótica que atraviesan la membrana externa por las porinas. El paso se realiza en forma de catión (tetraciclina-Mg) y una vez en el espacio periplásmico se disocia liberando la tetraciclina que difunde a través de la membrana en un proceso dependiente de energía. Las tetraciclinas se unen a la subunidad 30S del ribosoma e impiden la interacción de este con el ARNt con el consiguiente bloqueo de la síntesis proteica.



**Figura 1.14:** Dianas potenciales de los fármacos no antifúngicos en los hongos (Modificado de Afeltra et al., 2003).

La minociclina es un derivado de la tetraciclina con un amplio espectro de actividad que se usa con frecuencia para evitar infecciones bacterianas y fúngicas (Sherertz et al., 2006). Se ha observado que tiene efecto antifúngica cuando se usa sola o en combinación con otros fármacos antifúngicos (Fernandes de Oliveira et al., 2006). Shi y colaboradores han demostrado que la combinación entre el fluconazol y la minociclina puede tener actividad sinérgica in vitro contra aislamientos de *Candida albicans* resistentes al fluconazol (Shi et al., 2010). La administración conjunta de los fármacos redujo la CMI del fluconazol hasta 8 µg/ml cuando la concentración de la minociclina fue de 4 µg/ml. Cabe destacar que las dos concentraciones de los fármacos se encontraban dentro del rango de dosis terapéutica en el ser humano. Por otra parte, se ha observado que la doxiciclina, otra tetraciclina, combinada con el fluconazol muestra una actividad sinérgica, potenciando la actividad antifúngica tanto contra aislamientos de *Candida albicans* resistentes al fluconazol en forma planctónica como en biopelícula (Gao et al., 2013). Además, la adición de doxiciclina al medio de crecimiento permite regular la expresión génica de *Candida albicans*.

Las sulfonamidas interfieren en la síntesis del ácido fólico y su disminución y la de los nucleótidos microbianos inhiben el crecimiento. La combinación de ketoconazol con sulfametoxazol ha mostrado un efecto sinérgico contra *Candida albicans* (Beggs, 1982).

Las quinolonas son agentes antibacterianos de amplio espectro que actúan sobre la ADN girasa (topoisomerasa II) y la topoisomerasa IV, inhibiendo así la replicación, la recombinación y la transcripción del ADN, produciendo por consiguiente la muerte bacteriana (Van Bambeke et al., 2005). Aunque las quinolonas no presentan actividad antifúngica intrínseca, se han observado niveles elevados de topoisomerasa I y II en hongos patógenos, por lo que estos organismos tienen una diana de acción y un mecanismo potencial de interacción con agentes antifúngicos (Shen, 1994). En la literatura se han descrito interacciones farmacodinámicas in vitro significativas entre los agentes antifúngicos y las fluoroquinolonas contra *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus* (Stergiopoulou et al., 2008 a). Este estudio mostró actividad sinérgica en combinación con los siguientes agentes: ciprofloxacino o levofloxacino con anfotericina B contra *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus*; ciprofloxacino con voriconazol contra *Aspergillus fumigatus*; levofloxacino o moxifloxacino con caspofungina contra *Candida albicans*; y ciprofloxacino o levofloxacino con caspofungina contra *Aspergillus fumigatus*. Por otra parte, se encontraron interacciones antagónicas entre levofloxacino o moxifloxacino con fluconazol contra *Candida albicans*. Aunque Stergiopoulou y colaboradores en un estudio de combinación in vitro entre el ciprofloxacino y agentes antifúngicos obtuvieron buenas interacciones sinérgicas la mayoría de los estudios de combinación in vitro no han mostrado una buena actividad sinérgica para esta interacción. Sin embargo, los datos obtenidos in vivo han demostrado una mejoría de la terapia antifúngica contra la candidiasis experimental (Sugar et al., 1997; Sasaki et al., 2000; Stergiopoulou et al., 2008 b). Otra fluoroquinolona, el agente DU-6859a, no mostró actividad antifúngica in vivo o in vitro, pero si mejoró la actividad del fluconazol contra *Candida albicans* cuando se combinaron (Nakajima et al., 1995). El ofloxacino tampoco mostró un buen efecto en el estudio in vitro al combinarlo con el fluconazol, ya que no incremento la sensibilidad del fluconazol (Sasaki et al., 2000). Por el contrario, en el análisis in vivo observado por estos autores, se redujo el número colonias de aquellos aislamientos que estaban tratados con la combinación de fármacos. Además, en este trabajo demostraron que

la combinación de estos compuestos puede reducir la sobreexpresión del gen *CDR1* y por tanto las bombas de expulsión en *Candida albicans*.

### 1.4.1.2. INHIBIDORES DE LA CALCINEURINA

En los últimos años, los mecanismos de transducción de señales que involucran al calcio como mensajero están siendo más estudiados debido a la necesidad de éste para la adaptación y la supervivencia de múltiples hongos a diferentes entornos. La calcineurina, ha sido identificada como un regulador importante en la homeostasis del calcio, pero también se ha relacionado con el metabolismo neuronal, la proliferación de linfocitos T, la inmunosupresión y con diversas enfermedades humanas (Reese y Tagliatela, 2011). La calcineurina es una proteína fosfatasa específica de serina-treonina dependiente del calcio y estimulada por la calmodulina, conservada en eucariotas. Forma una proteína heterodímera que se compone de una subunidad catalítica A y una reguladora B. Además, está directamente regulada por el calcio en los procesos de señalización y toma parte en la desfosforilación (**Figura 1.15**). En los hongos, se encarga de regular los ciclos celulares, el crecimiento vegetativo, la formación de biopelículas, la homeostasis de los cationes, la síntesis de la pared celular y la extensión de las hifas. Recientemente se ha observado que la calcineurina es esencial en la virulencia, en la supervivencia y en la respuesta al estrés de *Candida albicans* (Blankenship et al., 2003; Jia et al., 2016). En esta respuesta, el factor de transcripción Crz1 es desfosforilado por la calcineurina y trasladado al núcleo con el fin de controlar la expresión de los genes implicados en la regulación de la respuesta al estrés, la integridad de la pared celular, el crecimiento y la resistencia a los fármacos (Stie y Fox, 2008; Juvvadi et al., 2016). El papel que desempeña la calcineurina en el crecimiento de las hifas de *Candida albicans* no está totalmente claro, en la literatura se presentan discrepancias entre los que muestran una relación directa (Sanglard et al., 2003; Karababa et al., 2006) y aquellos que no encuentran dicha relación (Bader et al., 2006; Chen et al., 2011). Por otra parte, *Candida dubliniensis* y *Candida tropicalis* requieren calcineurina para el crecimiento de hifas, mientras que *Candida lusitanae* solo la necesita para regular el crecimiento de las pseudohifas. La calcineurina toma parte también en la regulación de la sensibilidad a los fármacos antifúngicos. Además, ha demostrado ser crítica en la resistencia de *Candida albicans* a los azoles, ya que bloquea la capacidad del fluconazol para alterar la

membrana plasmática y reduce la sensibilidad in vitro de las células al fluconazol por medio de la ruta Rta2p (Jia et al., 2012). El estudio de Baillie y Douglas ha mostrado que la actividad de la calcineurina puede estar implicada en la resistencia a un gran número de fármacos antifúngicos de algunas biopelículas formadas por *Candida albicans* (Baillie y Douglas, 2000).

La inhibición de la calcineurina puede ser un enfoque terapéutico potencial contra las infecciones fúngicas resistentes al tratamiento. Estudios experimentales han demostrado que los inhibidores de la calcineurina pueden aumentar la sensibilidad de *Candida albicans* a los azoles (Marchetti et al., 2000; Jia et al., 2016). También, se ha observado que la inhibición de la calcineurina junto con un tratamiento con fluconazol tiene un efecto sinérgico contra aislamientos de *Candida albicans* resistentes al fluconazol (Li et al., 2008). Además, las combinaciones sinérgicas de los azoles y los inhibidores de la calcineurina han conseguido inhibir tanto el crecimiento de las células plantónicas como de las biopelículas de *Candida albicans* (Uppuluri et al., 2008; Li et al., 2015 a). Todavía no se conoce completamente el mecanismo subyacente por el cual un inhibidor de la calcineurina aumenta la sensibilidad de *Candida albicans* al fluconazol.

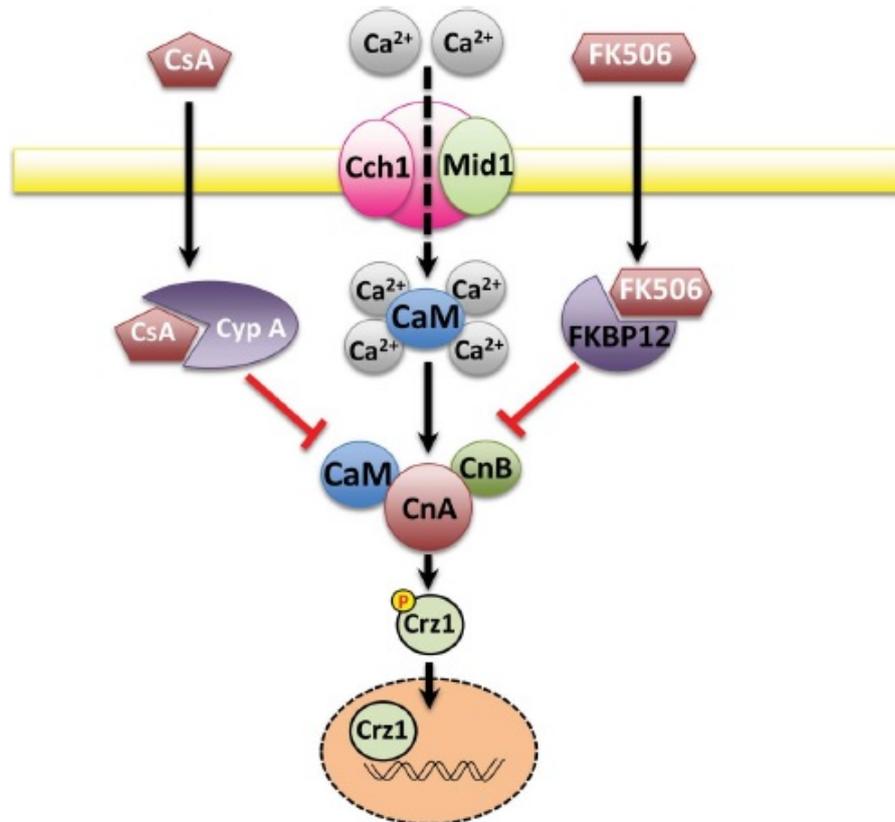
Los inhibidores de la calcineurina, como la ciclosporina A o el tacrolimus, poseen propiedades inmunosupresoras que inhiben la actividad de la misma a través de la interacción a inmunofilinas (ciclofilina A o FK506 intracelular 12, respectivamente) formando un gran complejo y permitiendo así modificar la activación de los linfocitos T. Esta inhibición actúa dañando las membranas celulares, dando como resultado un aumento de la permeabilidad y de la concentración intracelular de azoles para lograr un efecto fungicida (Cruz et al., 2002). Además, la alteración que sufre la membrana como resultado de la actividad de los azoles respecto a la biosíntesis del ergosterol también incrementa la concentración intracelular del inhibidor de la calcineurina.

La ciclosporina A es un péptido cíclico producto del hongo *Tolypocladium inflatum*, que posee actividad inmunosupresora ya que inhibe la transducción de señales necesarias para la activación de los linfocitos tras la presentación del antígeno (Brunton, 2012). La ciclosporina A penetra en la célula por difusión y se asocia con la ciclofilina A, un receptor intracelular perteneciente a una familia de proteínas encargadas de catalizar la isomerización de cis-trans

## Introducción

peptidil-prolilo que participa en el plegamiento de las proteínas (Juvvadi et al., 2016). Además, este complejo tiene como objetivo la inhibición de la calcineurina. La ciclosporina A no ha presentado ningún efecto sobre el crecimiento ni la viabilidad de *Candida* cuando se utiliza solo, sin embargo, su combinación con distintos fármacos antifúngicos ha mostrado una reducción de las CIM de estos fármacos. Además, ha demostrado que su combinación es sinérgica contra diferentes aislamientos de *Candida*.

Algunos estudios recogidos en la literatura analizan la actividad de la ciclosporina A en combinación con distintos fármacos antifúngicos, como en el estudio de Cordeiro y colaboradores, donde la ciclosporina A es capaz de interferir en el crecimiento de *Candida parapsilosis sensu stricto* en forma planctónica (Cordeiro et al., 2014). Sus resultados mostraron una mejora de la actividad in vitro de los fármacos contra *Candida parapsilosis* al combinarlos con la ciclosporina A, observándose sinergismo entre el inhibidor de la calcineurina y los distintos fármacos antifúngicos estudiados. Estos mismos autores, analizaron las mismas combinaciones contra biopelículas, mostrando una inhibición de la formación de biopelículas, así como una reducción significativa en las biopelículas maduras.



**Figura 1.15:** Representación esquemática de la ruta de la calcineurina y de la actividad de la ciclosporina A y el tacrolimus. Los iones de calcio ingresan a la célula por los canales de calcio Cch1 y Mid1. Estos iones se unen a la calmodulina (CaM) y producen un cambio conformacional en la proteína. Este complejo se une al heterodímero de la calcineurina (CnA y CnB) y potencia su actividad fosfatasa. El complejo de calcineurina defosforila el factor de transcripción (Crz1) y este es translocado al núcleo. La actividad de la calcineurina es inhibida por la ciclosporina A (CsA) o el tacrolimus (FK506) mediante la unión a las inmunofilinas (Cyp A y FKBP12) formando los complejos inmunosupresores CsA-CypA y FK506-FKB12 (Juvvadi et al., 2016).

Shinde y colaboradores mostraron los efectos de la combinación de ciclosporina A con cinco agentes antifúngicos pertenecientes a tres clases (azoles, polienos y equinocandinas) contra células planctónicas y biopelículas de *Candida albicans* (Shinde et al., 2012). En este estudio, se observó como la combinación de los azoles con la ciclosporina A tuvo efecto sinérgico in vitro contra las biopelículas. Del mismo modo, en presencia de ciclosporina A las CMI de la caspofúngina y la anfotericina B se redujeron.

El tacrolimus (FK-506) es un macrólido producto de la bacteria *Streptomyces tsukubaensis*. Presenta una actividad similar a la de la ciclosporina A. Varios estudios han mostrado que la combinación entre distintos azoles y el tacrolimus produce un efecto sinérgico contra

## Introducción

aislamientos de *Candida albicans* resistentes a azoles (Maesaki et al., 1998; Sun et al., 2007). Otros autores, demostraron que la combinación del fluconazol con este inhibidor de la calcineurina también ejercía un efecto sinérgico contra aislamientos de *Candida glabrata* (Li et al., 2015 a). El efecto se observó tanto contra aislamientos dosis dependientes como contra aislamientos resistentes al fluconazol. Además, los resultados obtenidos muestran que la ruta de la biosíntesis del ergosterol puede correlacionarse con la ruta de la calcineurina en *Candida glabrata*. La inhibición de la calcineurina podría potenciar la actividad antifúngica de los fármacos que tienen como objetivo la ruta del ergosterol, como observaron Onyewu y colaboradores en su estudio, donde combinaron la ciclosporina A y el tacrolimus con inhibidores de la biosíntesis del ergosterol contra aislamientos de *Candida*, mostrando un enfoque alternativo para reducir la resistencia a los fármacos (Onyewu et al., 2003).

Se ha observado que la combinación de tacrolimus con las equinocandinas contra *Candida glabrata* revierte la resistencia mediada por las mutaciones en el gen *FKS2*, debido a que la calcineurina es necesaria para la actividad del gen en *Candida glabrata* (Katiyar et al., 2012). Debido a ello, los aislamientos que causan infección por dicha especie en pacientes trasplantados con terapia de tacrolimus son menos propensos a desarrollar resistencia a las equinocandinas. Este inhibidor ejerció un efecto sinérgico en combinación con la caspofungina contra aislamientos de *Candida dubliniensis* y *Candida lusitaniae* resistentes a las equinocandinas (Chen et al., 2011; Zhang et al., 2012). En *Candida dubliniensis*, la calcineurina cumple un papel importante en el control de la integridad de la pared celular, así como en el crecimiento de las hifas. Además, cabe la posibilidad de que la tolerancia a las equinocandinas esté regulada por la ruta de señalización de la proteína-kinasa C, que puede funcionar en coordinación con la ruta de la calcineurina (LaFayette et al., 2010). Zhang y colaboradores han observado que en presencia de tacrolimus, *Candida lusitaniae* presenta un crecimiento de las pseudohifas defectuoso (Zhang et al., 2012).

En la actualidad, no se conocen inhibidores de la calcineurina específicos para los hongos, por lo que la acción de los inhibidores previamente citados, también está dirigida contra la calcineurina humana. Con el objetivo de disminuir la actividad inmunosupresora de dichos compuestos para ofrecer un tratamiento más específico se han desarrollado una serie de

análogos, ( $\gamma$ -OH) MeLeu4-Cs (211-810) y D-Sar ( $\alpha$ -SMe)<sup>3</sup> Val2-DH-Cs (209-825), que han mostrado actividad antifúngica sin actividad inmunosupresora (Odom et al., 1997; Cruz et al., 2000).

#### 1.4.1.3. REGULADORES DE LA HOMEOSTASIS DEL CALCIO

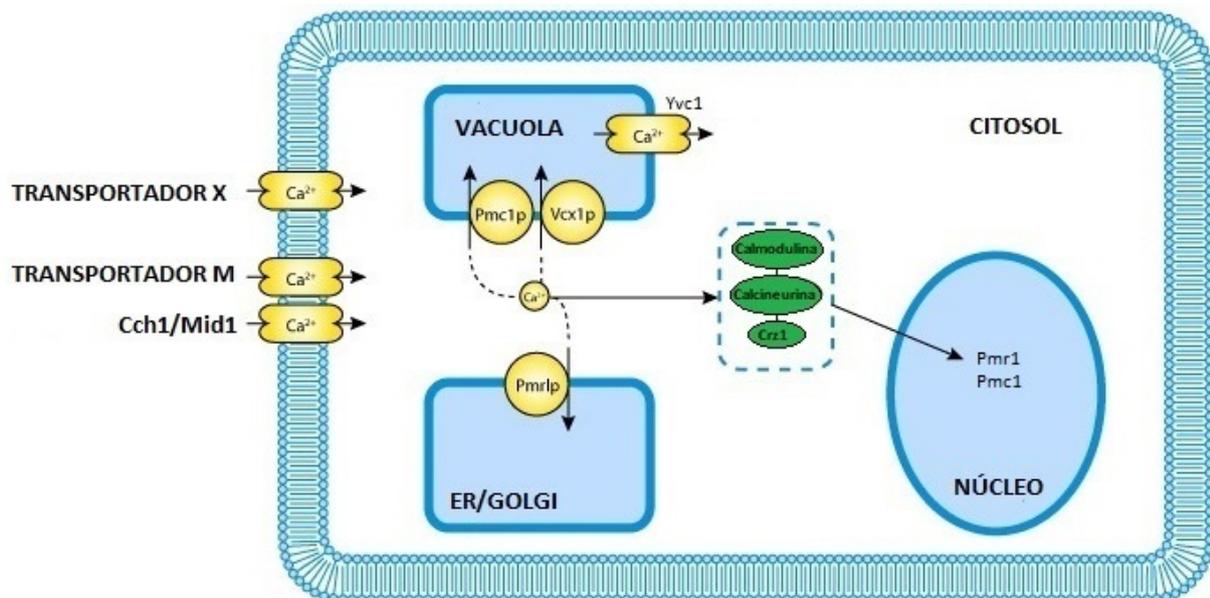
El ion calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) es un mensajero intracelular muy importante en el organismo, ya que participa en numerosos procesos biológicos, como el crecimiento celular, la proliferación, la morfogénesis y la apoptosis. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la levadura es crítica para su supervivencia en algunas condiciones, como el estrés celular (choque h́iper e hipoosmótico) y la administración de fármacos antifúngicos (Cruz et al., 2002). El exceso de calcio intracelular se ha relacionado con el daño celular. Los sistemas de homeostasis de calcio son rutas metabólicas muy reguladas que son empleadas por las células para mantener el calcio en el rango de concentración óptimo en el citosol y en otros orgánulos. Un aumento repentino de la concentración citosólica provocado por estímulos extracelulares activa las proteínas efectoras que producen una respuesta celular, con el fin de mantener las concentraciones en su rango óptimo.

Existen distintos mecanismos que regulan las variaciones de concentración de calcio, por un lado, puede ingresar al interior de la levadura a través del transportador X (**Figura 1.16**). También mediante el transportador M, presente en la membrana plasmática, que permite la entrada del calcio en respuesta a una alta concentración extracelular del mismo. Por último, un canal de calcio activado por voltaje (Cch1/Mid1) que solo se activa en determinadas situaciones (despolarización de la membrana, agotamiento del calcio secretor, choque hipotónico) (Cui et al., 2009). Cuando la concentración en el citosol aumenta se puede transportar a grandes vacuolas a través de una ATPasa vacuolar de calcio (Pmc1) y un transportador  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  vacuolar (Vcx1). También puede ser bombeado por otra ATPasa, denominada Pmr1 dentro del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi. Otro de los mecanismos para regular el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol, es la unión del mismo con la calmodulina y activar así la calcineurina. Esta activación inhibe la función de Vcx1 e induce la expresión de Pmc1 y Pmr1 a través de la activación del factor de transcripción Crz1 y su translocación al núcleo. Por otro lado, se puede producir una liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  vacuolar en el citosol a través de Yvc1p en respuesta al choque

## Introducción

hipertónico extracelular y lo que genera también la inhibición de la actividad de los transportadores X y M (**Figura 1.16**). El exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  sigue la vía secretora liberándose mediante exocitosis.

La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde la reserva intracelular debe ser compensada mediante la estimulación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, a este fenómeno se le denomina entrada capacitiva del calcio. Los niveles excesivos o no regulados del  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma también pueden desencadenar la muerte celular. Por ello, el aumento en la concentración citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  para desencadenar la muerte celular se está convirtiendo en un enfoque terapéutico prometedor en el tratamiento contra distintos hongos (Courchesne, 2002).



**Figura 1.16:** Diagrama del ciclo del calcio en levaduras. Cch1/Mid1, canal de calcio activado por voltaje; Pmc1 y Pmr1, Bomba ATPasa; Vcx1, transportador de  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ ; Yvc1, canal de calcio vacuolar; Crz1, factor de transcripción (Modificada de Cui et al., 2009).

La amiodarona es un fármaco antiarrítmico, que en bajas concentraciones (0,1-2  $\mu\text{M}$ ) puede provocar una hiperpolarización de la membrana, que causa la apertura de los canales de calcio y la liberación de las reservas internas (del retículo endoplásmico, las mitocondrias y las vacuolas) para regular la entrada del mismo (Muend S. y Rao R., 2008). Además, su efecto citotóxico parece estar mediado por el calcio, ya que aumenta la concentración del calcio en el

citosol después de la toma del fármaco (Courchesne y Ozturk, 2003). Aunque tiene actividad antifúngica débil, ha mostrado un potente efecto sinérgico en combinación con el fluconazol contra aislamientos de *Candida albicans* resistentes al fluconazol (Guo et al., 2008). También, se ha demostrado que la combinación, a concentraciones bajas, de amiodarona con un fármaco azólico (miconazol y fluconazol) muestra un importante efecto sinérgico, lo que sugiere que la suplementación del tratamiento antifúngico convencional con amiodarona puede ser una medida para transformar el efecto fungistático de los azoles en fungicida (Gupta et al., 2003). No se dispone de información concluyente sobre el mecanismo de acción de la amiodarona en *Candida albicans*, aunque podría actuar de la misma manera que en *Saccharomyces cerevisiae*, en la cual la adición de amiodarona se ha relacionado con el estrés por calcio, con la regulación de las vías de la calcineurina, con la homeostasis del calcio y con la virulencia por la inhibición de la forma filamentosa (Zhang y Rao, 2007). Gamarra y colaboradores estudiaron los genes clave de la ruta del calcio para examinar las respuestas celulares a la amiodarona y al tratamiento de fluconazol-amiodarona (Gamarra et al., 2010). El estudio del perfil transcripcional de estos genes sugirió que el efecto antifúngico de la amiodarona contra *Candida albicans* muy probablemente estuviera mediado por estrés del calcio, por la alteración de la organización de la pared celular, por la interrupción de la detección/señalización de nutrientes y por la perturbación de la regulación transcripcional. Sus resultados mostraron que la actividad de la amiodarona estaba relacionada con el calcio, confirmado por la inducción de la expresión de Crz1 en respuesta al fármaco. Además, demostrando que cuando el calcio entra en la célula mediante el canal Cch1, la vía de la calcineurina se activa. También observaron que el efecto sinérgico del tratamiento en combinación podía explicarse por una alteración en la fluidez de la membrana y la función enzimática producida por la reducción del ergosterol, por lo que, la combinación podría mostrar una posible conexión entre la síntesis de ergosterol y la homeostasis del calcio (Gamarra et al., 2010). Otros estudios, mostraron que el efecto sinérgico de la combinación generaba un aumento de los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno en las cepas de *Candida tropicalis* resistentes al fluconazol (Rocha da Silva et al., 2012). Además, estos autores observaron que el tratamiento con fluconazol más amiodarona parecía causar daño en el ADN, además de alterar la membrana plasmática y mitocondrial.

#### 1.4.1.4. FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos son un grupo variado, que presentan una función antiinflamatoria, analgésica y antipirética, es decir, reducen la inflamación, el dolor y la fiebre. Estos fármacos inhiben la actividad de la ciclooxigenasa y por lo tanto la síntesis de las prostaglandinas. Dentro de este grupo podemos encontrar el ácido acetilsalicílico, derivados del ácido propanoico como el ibuprofeno o el naproxeno, derivados del ácido acético y derivados del ácido enólico.

Algunos estudios han documentado que las biopelículas de *Candida albicans* producen prostaglandinas que mejoran significativamente la formación de sus tubos germinales (Els et al., 2011). De esta forma se confirma que las prostaglandinas puede ser un factor de virulencia importante en las infecciones por *Candida*. Otros estudios, han observado el efecto de estos fármacos en la inhibición en el crecimiento del hongo, la activación enzimática y la disminución de la producción de prostaglandina E2 fúngica (Erb-Downward y Noverr, 2007; Trofa et al., 2009). Estos estudios, han mostrado que los fármacos antiinflamatorios no esteroideos tienen actividad antifúngica potencial contra hongos patógenos. La actividad de dichos compuestos, podría estar relacionada con cambios en la producción de prostaglandinas, en los potenciales de membrana, en la formación de biopelículas y en la reducción de polisacárido extracelular (Alem y Douglas, 2004).

El ácido acetilsalicílico es uno de los fármacos antiinflamatorios más antiguo y más utilizado que ha mostrado efectos antifúngicos contra aislamientos en forma planctónica o en biopelícula (Alem y Douglas, 2004; Stepanovic et al., 2004). El estudio realizado por de Quadros y colaboradores mostró que el ácido acetilsalicílico producía una reducción notable de la formación de la biopelícula (inhibición del 95%) y de la producción de prostaglandina (de Quadros et al., 2011). Aunque se ha visto que el ácido acetilsalicílico tiene una actividad antimicrobiana débil y de amplio espectro, puede ser de gran utilidad en las terapias combinadas. Zhou y colaboradores demostraron que la combinación entre el ácido acetilsalicílico y la anfotericina B mejora la actividad antifúngica tanto en aislamientos con crecimiento en forma plantónica como en biopelícula (Zhou et al., 2012).

El ibuprofeno es un compuesto lipofílico que ha mostrado poseer una potente actividad fungicida, causando lesiones en la membrana y una actividad fungistática a bajas concentraciones (Pina-Vaz et al., 2000). Se ha observado también que el ibuprofeno combinado con el fluconazol presenta una actividad sinérgica contra cepas de *Candida albicans* resistentes al fluconazol (Arai et al., 2005; Ricardo et al., 2009). Pina-Vaz y colaboradores demostraron que el ibuprofeno es un potencial inhibidor de las bombas de expulsión, los transportadores ABC (Pina-Vaz et al., 2005). También, estudiaron el efecto del ibuprofeno en la resistencia de *Candida* a los azoles, mostrando un efecto notable sobre ella, ya que reducía las CMI del fluconazol en la mayoría de los aislamientos. En otro estudio del mismo grupo, se observó una interacción sinérgica entre el fluconazol y el ibuprofeno, revirtiendo la resistencia de algunos aislamientos, y una sobreexpresión de los genes que codifican las bombas de expulsión (*CDR1* y *CDR2*) (Ricardo et al., 2009). Por otra parte, en este mismo estudio se observó que aquellos aislamientos en los que no se produjo un cambio en la resistencia mostraron un aumento en la expresión del gen diana para los azoles (*ERG11*) y los genes *CDR*. Otros investigadores demostraron un efecto sinérgico entre la anidulafungina y el ibuprofeno contra diferentes aislamientos del género *Candida*, produciéndose una disminución de las CMI en varios aislamientos con una reducción significativa de la producción de biopelícula (Rosato et al., 2016).

#### **1.4.1.5. OTROS COMPUESTOS**

Además de los fármacos anteriormente citados, existen otros compuestos que han mostrado eficacia contra distintas especies del género *Candida* cuando se usan solos o en combinación con distintos agentes antifúngicos.

La lactoferrina es una glicoproteína fijadora de hierro y perteneciente a la familia de las transferrinas. Este compuesto está presente en la leche, las lágrimas, la saliva y en la mayoría de los fluidos corporales exocritos. La lactoferrina participa en varias funciones fisiopatológicas como en la homeostasis del hierro o en la defensa del hospedador en las mucosas. Tiene actividad antimicrobiana contra bacterias, hongos, virus y protozoos. Por otra parte, la lactoferrina ha mostrado efectos antifúngicos, mediante mecanismos relacionados con la liberación de calcio de las reservas intracelulares, contra diferentes especies de *Candida*, así

## Introducción

como actividad sinérgica en combinación con azoles contra *Candida albicans* (Wakabayashi et al., 1998; Lupetti et al., 2003). La actividad de la lactoferrina frente a *Candida*, se relaciona con su capacidad para unirse y secuestrar el hierro, aunque también se ha descrito que la forma libre de hierro de la lactoferrina tiene actividad antifúngica mediante mecanismos que alteran la permeabilidad de la superficie celular (Nikawa et al., 1993; Kuipers et al., 1999). Lupetti y colaboradores demostraron que los péptidos sintéticos derivados de la lactoferrina presentan un mayor efecto antifúngico in vitro (Lupetti et al., 2000). Estudios más recientes han observado que la combinación entre fluconazol y lactoferrina muestra un potente sinergismo contra aislamientos de *Candida albicans* sensibles y resistentes al fluconazol (Venkatesh y Rong, 2008). Los resultados obtenidos por Kobayashi y colaboradores indicaron que la actividad sinérgica de la combinación del fluconazol y la lactoferrina depende de la sensibilidad al fluconazol y de los mecanismos de resistencia de los aislamientos (Kobayashi et al., 2011). También sugirieron que la lactoferrina no mejora la absorción del fluconazol cuando estos agentes se combinan, por el contrario, el efecto de sinérgico mostrado podría atribuirse a la actividad antifúngica de la lactoferrina consecuencia de su función quelante.

Los péptidos antimicrobianos que se sintetizan en la piel y en las mucosas de las vías aéreas y digestivas están involucrados en la defensa innata contra las infecciones bacterianas, fúngicas y víricas. Estos compuestos modifican la respuesta inflamatoria local y activan los mecanismos de reacción inmunitaria adaptativa. Actúan uniéndose a la bicapa lipídica de las membranas celulares, lo que conduce a la pérdida de la integridad de la membrana y finalmente a la muerte celular. Dentro de este grupo de compuestos se encuentran las histatinas, que son una familia de péptidos ricos en histidina que se secretan en las glándulas parotídea y submandibular humanas. Se ha observado que las histatinas y los derivados de histatina son activos contra distintas especies del género *Candida* resistentes al fluconazol (Tsai y Bobek, 1997; Helmerhorst et al., 1999). Estos compuestos presentan una baja toxicidad para las células humanas, con lo que sumado a su buena actividad antifúngica, se presentan como buenos candidatos para el tratamiento de las candidiasis de las mucosas. La histatina 5 es el compuesto que exhibe una actividad fungicida más potente contra *Candida albicans* y otras especies de *Candida* (Puri y Edgerton, 2014). La histatina 5 al contrario que otros péptidos antimicrobianos actúa intracelularmente para causar la muerte celular (Kavanagh y Dowd, 2004). *Candida albicans*

posee varios mecanismos para evitar la muerte por histatina 5 disminuyendo tanto su concentración extracelular como la intracelular (Hampe et al., 2017). Su actividad antifúngica se ha observado tanto contra células plantónicas como contra biopelículas de *Candida* (Situ y Bobek, 2000; Konopka et al., 2010).

#### **1.4.2. MÉTODOS PARA DETERMINAR LA EFICACIA IN VITRO DE LAS COMBINACIONES DE FÁRMACOS**

La determinación de la actividad de más de un compuesto contra un patógeno pretende evaluar la eficacia in vitro de la combinación con el objetivo de seleccionar una alternativa terapéutica adecuada para el tratamiento de la infección. En muchos casos el tratamiento de las infecciones fúngicas se complica debido a la alta toxicidad, a la baja tolerancia, al estrecho espectro de acción o a la aparición de resistencia a algunos fármacos. La mayoría de los estudios de terapia de combinación se basan en combinar agentes que tienen mecanismos de acción complementarios. La interacción in vitro entre distintos fármacos depende tanto de la metodología, de las especies de hongos que se analizan, del tiempo de exposición, de la temperatura de incubación o de los medios utilizados, como de la forma en que se analizan los datos (Polak, 1999; Meletiadis et al., 2003). En ocasiones, aunque se use la misma metodología, se pueden obtener distintas conclusiones según la forma en que se analicen los resultados obtenidos. Los datos publicados de la mayoría de los estudios que utilizan tratamientos combinados analizan las combinaciones de dos fármacos.

Existen distintas técnicas in vitro que permiten un análisis detallado de las interacciones entre fármacos contra los hongos y que permiten determinar la naturaleza de las interacciones. Estas técnicas se basan en la utilización de concentraciones de fármaco estáticas y la interacción se determina en un punto de tiempo único. Por ello, no siempre es posible una correlación directa entre lo observado in vitro e in vivo. Las interacciones entre fármacos se evalúan mediante el estudio de la CMI. Los valores de la CMI para los diferentes fármacos combinados se pueden obtener utilizando distintos métodos, como, por ejemplo, el tablero de ajedrez, las curvas de letalidad o las pruebas de E-test (Lewis et al., 2002; Mukherjee et al., 2005). Las evaluaciones de las interacciones in vitro se realizan suponiendo que los fármacos en combinación no

interactúan entre sí (teoría de la no interacción). Por ello, se han utilizado diferentes aproximaciones matemáticas para definir la superficie de “no interacción” en un espacio de dimensión “n” y se han realizado diferentes suposiciones para justificar el uso de modelos que tengan en cuenta la presencia simultánea de varios compuestos dentro de un mismo organismo (Goldoni y Johansson, 2007). Cuando el efecto observado es mayor que lo esperado se denomina sinergismo, por el contrario, cuando lo observado es menor que lo esperado se denomina antagonismo. En algunos casos, se han utilizado otras categorías (adición, subadición o indiferencia) pero con el fin de agrupar todas estas evaluaciones bajo una misma, se denominó sin interacción a la categoría que incluye todas las interacciones que no sean sinérgicas o antagónicas (Odss, 2003). Entre las diversas teorías de la no interacción se utilizan principalmente la teoría de la aditividad de Loewe y la teoría de la independencia de Bliss (Greco et al., 1995). La teoría de la aditividad de Loewe se basa en la idea de que un fármaco no puede interactuar consigo mismo, mientras que la teoría de independencia de Bliss se basa en la idea de que dos fármacos actúan de forma independiente. Según las bases de estos conceptos, se han descrito varios modelos de estas dos teorías basados tanto en enfoques paramétricos como no paramétricos (Afeltra et al., 2004).

### **1.4.2.1. MÉTODO DEL TABLERO DE AJEDREZ**

El método de tablero de ajedrez (*checkerboard*) se utiliza para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento de células fúngicas en presencia de diferentes combinaciones de fármacos. Este método nos permite relacionar el crecimiento de las células solas sin fármaco y su crecimiento en presencia de dos fármacos, pudiendo obtener así el porcentaje de inhibición del crecimiento. La técnica es relativamente simple y fácil de realizar, al igual que la interpretación de los resultados, convirtiéndolo en un método útil para una selección extensa de fármacos. Sin embargo, presenta algunas limitaciones importantes:

- Escasa utilidad para detectar cambios en la tolerancia a los antimicrobianos a lo largo del tiempo.
- Los resultados son mediciones relativas y no reales de la eficacia de las combinaciones.

- Todos los fármacos combinados deben poseer curvas idénticas (generalmente lineales de dosis respuesta) y un tiempo comparable de actividad.
- No proporcionan detalles sobre las características farmacodinámicas de las combinaciones antifúngicas

Además, las interpretaciones que se muestran a partir de los datos obtenidos por el método del tablero de ajedrez a veces resultan contradictorias con las obtenidas por otros métodos (Lewis et al., 2002). El análisis de datos en este método se puede realizar según las teorías de la no interacción previamente citadas y según enfoques paramétricos o no paramétricos.

#### **1.4.2.1.1. Teoría de la aditividad de Loewe**

El análisis de datos según esta teoría se puede realizar utilizando un enfoque no paramétrico mediante el uso del índice de concentración inhibitoria fraccional (FICI). La mayoría de los estudios que analizan la eficacia in vitro de la terapia en combinación interpretan los resultados mediante este modelo (Huang et al. 2008; Li et al., 2015 b; Valentin et al., 2016). A lo largo de los años, los investigadores han clasificado las interacciones mediante el uso del FICI en diferentes términos. La facilidad de uso y la simplicidad convierten al FICI en el método de elección para el estudio de la combinación de fármacos. Sin embargo, este modelo presenta algunas desventajas importantes (Te Dorsthorst et al., 2002 a; Meletiadis et al., 2003):

- Depende de la determinación de la CMI, lo que puede generar errores experimentales debido a que en su metodología se realizan varias diluciones.
- No diferencia entre las diluciones, ya que el resultado de cada pocillo se limita a un índice, por lo que en el mismo experimento en algunas concentraciones se puede observar sinergismo y en otras ser indiferente o antagonismo.
- En algunos casos la elección de la CMI no es clara, generando así dificultades para calcular el FICI.
- No es susceptible de análisis estadístico.
- La interpretación varía según los estudios.

## Introducción

También se puede realizar el análisis utilizando un enfoque paramétrico, mediante el uso de la metodología de superficies de respuesta (RSM) descrita por Greco y colaboradores, que se basa en el cálculo del coeficiente de interacción alfa ( $IC\alpha$ ) y el intervalo de confianza del 95% asociado. El método RMS se ha utilizado en algunos estudios in vitro con el fin de caracterizar mejor las interacciones entre fármacos, teniendo en cuenta las concentraciones absolutas y relativas de los agentes en combinación. En los estudios de combinaciones de fármacos con amplios rangos de dosis se observa claramente su potencial. Este modelo también presenta algunos inconvenientes importantes:

- El modelo requiere complicados ajustes de datos matemáticos y su modelado.
- Los resultados obtenidos dependen de los parámetros iniciales, de la forma de calcular la suma de cuadrados, de la varianza y de los parámetros de ponderación.
- Puede mostrar errores cuando ninguna de las combinaciones presenta una inhibición del 50%.

Algunos autores han recomendado usar una combinación de ambos métodos (FICI y RSM) ya que han demostrado que los resultados obtenidos en ambos casos se correlacionan bien (Afeltra et al., 2002; Te Dorsthorst et al., 2002 b). Sin embargo, la propia dificultad del método RSM lo ha hecho menos atractivo como método de elección para la evaluación de las interacciones entre los fármacos, permitiéndole al método FICI seguir siendo la opción principal en la mayoría de los estudios.

La teoría de la aditividad de Loewe facilita la realización de análisis isoblográficos que proporciona la obtención de un análisis estadístico con un enfoque gráfico intuitivo y flexible. Estos análisis permiten detectar pequeñas variaciones de aditividad. La determinación del efecto aditivo para la combinación de fármacos es directa cuando las dosis igualmente efectivas tienen la misma relación en el rango de efectos que se estudian. En los análisis isoblográficos, las curvas dosis-respuesta de los fármacos individuales permiten una determinación de la dosis de cada fármaco que produce un efecto específico (Tallarida, 2006). Además, proporcionan una base fundamental para evaluar si las respuestas biológicas inducidas por la combinación son mayores, iguales o menores de lo esperado por las actividades individuales de los fármacos

(Gessner, 1995). Este análisis combina la teoría de la “no interacción” de Loewe y técnicas de modelado para la descripción estadística de las interacciones farmacodinámicas complejas en todo el rango de concentraciones del fármaco. Este análisis se ha aplicado previamente para estudios farmacodinámicos de varias clases de agentes no antimicrobianos. También se ha aplicado al estudio de las interacciones farmacodinámicas entre azoles y polienos (Meletiadis et al., 2006). El análisis isoblográfico puede ser un método más sensible para determinar interacciones farmacodinámicas in vitro entre agentes antifúngicos y no antifúngicos frente a *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans* (Stergiopoulou et al., 2008 a; Stergiopoulou et al., 2008 b).

#### **1.4.2.1.2. Teoría de la independencia de Bliss**

Los datos se pueden analizar según la teoría de la independencia de Bliss mediante el modelo de variación del porcentaje de crecimiento ( $\Delta E$ ), que describe la interacción como la diferencia entre el porcentaje de crecimiento esperado y el observado para cada combinación de fármaco (Afeltra et al., 2004). Se han descrito varios modelos basados en esta teoría que siguen la metodología de superficies de respuesta, como el modelo no paramétrico descrito por Prichard y colaboradores y el modelo semiparamétrico de Drusano y colaboradores (Prichard et al., 1991; Prichard et al., 1993; Drusano et al., 1998). En el modelo no paramétrico, los valores de  $\Delta E$  se obtienen directamente de los datos del experimento, mientras que los del modelo semiparamétrico derivan del ajuste del modelo de  $E_{MAX}$  con las curvas de concentración-efecto de cada fármaco solo. A partir de los datos, se pueden construir diagramas tridimensionales que dan como resultado un diagrama de superficie. Ambos modelos determinan las interacciones entre fármacos y destacan su naturaleza multidimensional.

La validez del modelo semiparamétrico, como modelo de referencia, se ha cuestionado debido a algunas limitaciones importantes (Greco et al., 1995):

- Tiende a sobreestimar los efectos sinérgicos cuando las curvas de dosis-respuesta de los compuestos individuales son pronunciadas.

## Introducción

- No es efectivo en el estudio de compuestos que tienen un mecanismo de acción en el que pueda suceder una superposición parcial, ya que algunos fármacos pueden tener mecanismos de acción similares entre si y no actuar de forma independiente.

El modelo no paramétrico de Prichard presenta un criterio estadístico más objetivo, además de ajustarse a todas las concentraciones experimentales para construir un gráfico tridimensional, permitiendo así visualizar la naturaleza y la intensidad de las combinaciones de fármacos sin elegir aleatoriamente un punto final. Este modelo no depende del programa de análisis de datos ni de la curva dosis respuesta, ya que se ajusta a los resultados. Numerosos estudios, han utilizado este modelo para evaluar las interacciones entre fármacos, ya que se ha observado que es un instrumento verdaderamente útil para la interpretación de los resultados cuando se utiliza el método de tablero de ajedrez (Sun et al., 2009; Li et al., 2015 c; Lu et al., 2018).

### 1.4.2.2. CURVAS DE LETALIDAD

Las curvas de letalidad (*time-kill*) proporcionan información sobre las características farmacodinámicas de un antimicrobiano y sobre la relación entre la concentración y su actividad. Este método se utiliza para el estudio de la actividad tanto de nuevos antimicrobianos como de los ya establecidos y de las combinaciones de fármacos (sinergismo/antagonismo). Las curvas de letalidad pueden detectar pequeñas diferencias en la tasa y el alcance de la actividad antifúngica a lo largo del tiempo. Estas curvas se realizan bajo la suposición de que los fármacos estudiados en combinación presentan curvas de dosis-respuesta similares, así como un tiempo comparable de actividad. Aunque este método proporciona una información cinética sobre el crecimiento a lo largo del tiempo y una imagen detallada del efecto de las combinaciones de los fármacos sobre la viabilidad celular, también presenta una serie de inconvenientes:

- El método muestra una dependencia del cálculo de unidades formadoras de colonias (UFC), que funciona bien cuando el crecimiento de las células es individual.
- Presenta dificultades para evaluar la inhibición del crecimiento cuando los hongos crecen en forma filamentosa, ya que complica la capacidad del investigador para el conteo de las UFC.
- Son estudios muy laboriosos de realizar.

Las curvas de letalidad se han utilizado en diversos estudios en los últimos años debido a la información que proporcionan (Li et al., 2015 d, Bozo et al., 2016). Algunos estudios han mostrado una sensibilidad y reproducibilidad mejor mediante este método, al compararlo con otros métodos que determinan la actividad de los fármacos en combinación (Petrou y Rogers, 1991). Con el fin de resolver el inconveniente generado por los hongos que crecen en forma filamentosa, se ha evaluado la utilidad del ensayo de la reducción del hidróxido de 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino) carbonil]-2H-tetrazolio (XTT). Este ensayo permite semi-cuantificar las células metabólicamente activas mediante un análisis colorimétrico, ya que son capaces de reducir el tetrazolio (amarillo) a formazan (naranja) por la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial. Algunos estudios mostraron resultados similares al emplear dicha técnica, ya que no se observaron diferencias entre el ensayo XTT y el conteo de colonias (Guo et al., 2008; Sun et al., 2007; Cafini et al., 2012). Además, mostraron que este ensayo sigue siendo una herramienta valiosa para examinar el crecimiento y el metabolismo de las levaduras tanto en forma planctónica o en biopelícula y puede ser un buen sustituto del recuento de colonias por su ahorro de tiempo (Kuhn et al., 2003).

#### **1.4.2.3. MÉTODO E-TEST**

La técnica de E-test (*Epsilometer strip test*), permite determinar tanto la eficacia in vitro de los fármacos antifúngicos frente a levaduras y hongos filamentosos, como la actividad de las combinaciones de fármacos (Kiraz et al., 2010; Wanjare et al., 2016; Salehi et al. 2017). La prueba se basa en el principio de difusión en medio con agar, permitiendo al observador determinar la CMI a partir del punto de intersección de la zona de inhibición del crecimiento. Se dispone una tira calibrada impregnada con un gradiente exponencial predefinido de concentraciones de antifúngico y se aplica sobre una placa de agar previamente sembrada con el microorganismo en estudio. Algunos autores han mostrado resultados en los que se han ensayado fármacos antifúngicos en solitario, observando una buena correlación entre el método de E-test y los métodos estandarizados de microdilución en caldo (Matar et al., 2003).

Aunque el método es fácil, rápido y simple de realizar, esta prueba presenta algunos inconvenientes:

## Introducción

- No es un método estandarizado.
- Se han realizado pocas pruebas utilizando diferentes especies, observando que la determinación de la CMI puede variar según la especie (Sewel et al., 1994).
- No se ha estudiado exhaustivamente el efecto de los diferentes medios de crecimiento.
- El crecimiento en césped suele no ser uniforme en algunos casos.

Se han realizado varios estudios de combinaciones de agentes antifúngicos en los que se ha utilizado este método para analizar su interacción (Planche et al., 2012; Raffetin et al., 2017). Algunos estudios muestran pequeñas variaciones en la concordancia entre el método de E-test y las curvas de letalidad (Kiraz et al., 2009; Kiraz et al., 2010). También, se ha utilizado este método para estudiar combinaciones entre fármacos antifúngicos (azoles y anfotericina B) y otros no antifúngicos (inhibidores de la calcineurina y polimixina B) contra distintos hongos (Dannaoui et al., 2009; Pankey et al., 2014).

Muchos de los estudios que analizan la interacción entre distintos fármacos contra distintas especies de hongos utilizan varios métodos, ya que para evaluar diversas combinaciones y posibles interacciones pueden ser necesarios diferentes modelos, así como para predecir el resultado clínico de una terapia combinada (Meletiadis et al., 2005; Ben-Ami et al., 2011; Shrestha et al., 2015). En algunos casos no se observan grandes variaciones al estudiar el efecto sinérgico por los diferentes métodos previamente citados, ya que presentan una buena correlación para la mayoría de los aislamientos estudiados (Cantón et al., 2005). Mientras que, en otros casos, se observan discrepancias entre tablero de ajedrez y el método E-test (Ben-Ami et al., 2011).

### **1.4.3. MÉTODOS PARA DETERMINAR LA EFICACIA IN VIVO DE LAS COMBINACIONES DE FÁRMACOS**

Considerando la capacidad patógena de las especies del género *Candida*, es necesario desarrollar modelos que faciliten el estudio de las interacciones hospedador-patógeno que suceden durante la infección de *Candida* en el ser humano. La principal ventaja del estudio en los modelos en animales es el control del organismo y de su entorno, que facilita un análisis

más preciso de la relación de causa y efecto de la interacción hospedador-patógeno. Estos modelos, además de facilitar el estudio de la patogénesis, permiten la identificación de los compuestos que modulan la respuesta inmune, así como la de los factores de virulencia de los hongos que solo se expresan durante la infección y facilita el análisis de la eficacia del tratamiento, ya que permite seleccionar el inicio y el final del tratamiento (Capilla et al., 2007).

La evaluación in vivo de la eficacia de la terapia antimicrobiana sola o en combinación se realiza mediante la estimación de la reducción de la carga fúngica detectable en los órganos, el estudio de la supervivencia, así como mediante estudios histopatológicos. En la elección de un buen modelo in vivo es necesario tener en cuenta el mayor número de características posibles (**Tabla 1.1**). No existe un modelo animal único, debido a la dificultad de reproducir todos los aspectos en un mismo modelo. Además, estos modelos requieren de instalaciones y personal especializado, ya que los modelos vivos precisan de un mantenimiento específico y una manipulación precisa. En los estudios sobre la eficacia del tratamiento se ha de tener en cuenta la absorción, la distribución y el metabolismo variable del fármaco o de los fármacos en las especies animales.

Un modelo animal para el estudio de una infección por *Candida* debe reproducir de manera precisa el proceso de colonización e invasión en cualquier sitio anatómico, presentar los defectos inmunes específicos o condiciones hormonales asociadas con la infección, prolongarse lo suficiente en el tiempo para mostrar la aportación de los factores de virulencia de *Candida* y de las células de defensa del hospedador

**Tabla 1.1:** Características de un buen modelo in vivo de candidiasis.

<b>Técnicas de infección</b>	Sencilla
<b>Vía de entrada, colonización, infección local y diseminación sistémica</b>	Idéntica o similar a la situación humana (capacidad de manipulación genética).
<b>Inóculo utilizado</b>	Reproducible en tamaño y virulencia
<b>Efecto tisular, severidad, curso y duración de la enfermedad</b>	Predecible, reproducible y susceptible de ser analizada
<b>Evaluación de la infección</b>	Reproducible. Métodos primarios de evolución cuantitativos fiables. Posible uso de métodos secundarios de evolución semicuantitativos o cualitativos
<b>Coste económico y ético</b>	Razonable y aceptable
<b>Manejo y disponibilidad</b>	Fácil y disponible en grandes cantidades
<b>Utilidad</b>	Versátil. Aplicable al estudio de diferentes aspectos de la infección y su tratamiento

Se han desarrollado varios modelos animales, como, por ejemplo, los modelos de ratas, ratones, conejos, cobayas y monos. De todos ellos, el que se ha utilizado con mayor frecuencia, para distintos tipos de estudio ha sido el modelo murino (Li et al., 2015 d; Sanchis et al., 2015; Zeng et al., 2017). Los modelos murinos presentan una serie de ventajas, entre las que podemos destacar, su bajo peso corporal que facilita su manejo, la disponibilidad de reactivos y métodos para el análisis inmunológico, su capacidad de ser modificados genéticamente lo que permite disponer de organismos mutantes que facilitan la reproducción de las deficiencias inmunitarias específicas del hospedador y su bajo coste económico, que permite utilizar un gran número de individuos. Se han establecido varios modelos murinos clínicamente relevantes para el estudio de las candidiasis sistémicas y mucosas. Cabe destacar que los modelos que estudian la infección sistémica dependen de una inyección intravenosa, ya que al contrario que los seres humanos estos modelos no son colonizados de forma habitual por *Candida*. Las infecciones de

las mucosas imitan más estrechamente el lugar de entrada. Sin embargo, en estos casos es necesario el uso de agentes inmunosupresores o de animales transgénicos o sin gérmenes para el desarrollo de la infección (Naglik et al., 2008). Los modelos murinos se han utilizado para estudiar la virulencia de distintas especies del género *Candida* (Okawa et al., 2008; Nash et al., 2016). Algunos estudios, han logrado imitar el inicio y la progresión de la enfermedad en el ser humano utilizando un modelo de ratón infantil (Guentzel y Herrera, 1982; de Repentigny et al., 1992). Otros estudios, han analizado la infección oroesofágica de *Candida* en ratones transgénicos con el virus de la inmunodeficiencia (VIH), consiguiendo imitar de cerca las características clínicas y patológicas de la infección por *Candida* en pacientes con sida (Deslauriers et al., 1997).

Los mecanismos de defensa de estos modelos frente a las distintas especies de *Candida* se dividen en tres categorías, una defensa inespecífica, una respuesta inmune innata (leucocitos y macrófagos) y una respuesta inmune adaptativa (linfocitos B y T). Los modelos murinos se han empleado para resolver la función que desempeña cada componente específico de la respuesta inmune en la infección, gracias a la disponibilidad de ratones transgénicos o *knockout* con inmunodeficiencias (de Repentigny L., 2004). La investigación de Naglik y colaboradores mostró que la respuesta inmune frente a una infección oral o gastrointestinal está dominada por la acción de los linfocitos T, mientras que en la infección vaginal la respuesta depende de varios componentes (Naglik et al., 2008). Un estudio más reciente realizado en un modelo murino contra una infección intra-abdominal mostró que la respuesta adaptativa no desempeñaba ningún papel en la defensa y que la protección estaba mediada por unos leucocitos similares fenotípicamente a los neutrófilos (Lilly et al., 2018).

Los modelos animales se han utilizado también para el estudio de las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los compuestos: vía de administración, distribución por los tejidos, eliminación y posible interacción con otros fármacos (Lepak et al., 2013). Medir la eficacia in vivo de un compuesto, determinando la tolerancia y toxicidad del mismo, es un objetivo muy importante en el desarrollo de nuevos fármacos o estudios sobre la terapia antifúngica (Sanchis et al., 2015). También se han empleado para el estudio de la terapia en combinación (antifúngico-antifúngico/antifúngico-no antifúngico) (Graybill et al., 2003; Cui et

al., 2015). Li y colaboradores mostraron que la combinación de tetrandina con el itraconazol y el voriconazol in vitro e in vivo, mejoraba la actividad de los agentes antifúngicos en una infección de *Aspergillus fumigatus* (Li et al., 2015 d). Al igual que se observó en otro estudio, donde las combinaciones del posaconazol con la caspofungina y del posaconazol con el tacrolimus, exhibieron un efecto sinérgico en un modelo murino contra *Candida albicans*. Este estudio, mostró una buena correlación entre los resultados obtenidos en el modelo in vitro con el modelo in vivo (Chen et al., 2013).

Por otro lado, el modelo murino también presenta algunos inconvenientes derivados de su pequeño tamaño, ya que este dificulta la obtención de los órganos en perfecto estado para su posterior observación. Por ello, este tipo de modelos requiere la presencia de personal especializado para poder disminuir el error experimental. En el resto de modelos mamíferos, este problema se resuelve con facilidad, debido a su mayor tamaño respecto a los ratones o ratas, por lo que la obtención de los órganos resulta más fácil. Por el contrario, aparecen otros inconvenientes, como el aumento del coste económico debido a un mantenimiento más exigente y una mayor la dificultad de manejo. Por ello, la elección del modelo variará dependiendo del objetivo de estudio.

### **1.4.3.1. MODELOS ALTERNATIVOS**

Los modelos en mamíferos se han seleccionado frecuentemente debido a las ventajas que presentan, aunque en los últimos años, el uso de estos modelos se ha ido limitando debido en primer lugar a los problemas éticos que subyacen de la experimentación con estos animales. En la actualidad, no se considera ético, ni permisible el uso de animales para la experimentación si el resultado se puede obtener utilizando métodos alternativos. En segundo lugar, la dificultad logística de los estudios con modelos mamíferos: instalaciones especializadas para el mantenimiento y la reproducción, un personal cualificado y un aumento del gasto, condicionan su uso. La OTA (*Office of Technologies Assessment* de EEUU) definió el modelo alternativo, como aquel que reemplaza el uso de animales, reduce el número necesario de los mismos o retira protocolos preexistentes para reducir el nivel de sufrimiento que puedan experimentar. Una definición más precisa sería aquel modelo que sustituye el uso de un animal vivo por un sistema no animal, utilizando modelos computacionales, vegetales o microorganismos. Un análisis más

amplio de la definición permite la posibilidad de la experimentación mediante el uso de animales invertebrados y de sangre fría.

Los modelos en animales invertebrados para el estudio de la patogénesis han cobrado importancia, ya que al disponer de una respuesta inmune innata como prototipo de defensa los capacita para ser modelos de las interacciones hospedador-patógeno. Además, disponen de numerosas ventajas respecto a los modelos en animales mamíferos, de las cuales cabe destacar la facilidad de manipulación y de mantenimiento. Por otro lado, estos modelos presentan un tiempo de vida corta que junto con la facilidad de mantenimiento reducen la necesidad de instalaciones especializadas, disminuyendo así el coste económico. Los modelos en hospedadores invertebrados ofrecen tanto ventajas como desventajas, por ello es importante determinar qué modelo se ajusta mejor a los criterios experimentales (Desalermos et al., 2012).

Entre los modelos alternativos que se han utilizado para estudiar las interacciones entre el hospedador y los hongos se encuentran, *Acanthamoeba castellanii*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio* y *Galleria mellonella* (Glavis-Bloom et al., 2012; Arvanitis et al., 2013).

#### **1.4.3.1.1. *Acanthamoeba castellanii***

*Acanthamoeba castellanii* es uno de los protistas más comunes en el suelo y un excelente modelo para los estudios que tienen como objetivo la observación del proceso de fagocitosis. Estas amebas de vida libre son capaces de fagocitar diferentes especies de hongos, tales como *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *Saccharomyces cerevisiae*, envolviendo las células en una vacuola (Steenbergen et al., 2001). La interacción entre *Acanthamoeba castellanii* y el hongo, favorece la activación de sus factores de virulencia (actividad fosfolipasa y la cápsula) que le proporcionan protección. El proceso de fagocitosis es similar al que sucede en los macrófagos de mamíferos, ya que ambos fagocitan las partículas dentro de una vacuola donde secretan enzimas lisosomales para digerirlas (Swanson y Hammer, 2000). *Acanthamoeba castellanii* es un modelo prometedor para estudiar las interacciones entre los macrófagos y los patógenos facultativamente intracelulares (Chrisman et al., 2010).

#### 1.4.3.1.2. *Caenorhabditis elegans*

Este nematodo que se utilizó por primera vez en la década de 1960 por Sydney Brenner como modelo para estudiar el desarrollo y el sistema nervioso de los animales, ha ido ganando popularidad y sirviendo como modelo in vivo para el estudio de una variedad de enfermedades infecciosas e inmunológicas (Brenner, 1974). Algunas de las características de *Caenorhabditis elegans* que facilitan su utilización son:

- Posee un ciclo de vida rápido, una anatomía y fisiología simple y un tamaño pequeño.
- Genera una progenie genéticamente idéntica, debido a su capacidad de auto-fertilización al ser hermafrodita.
- Exhibe una cutícula transparente que permite la observación directa de los procesos que ocurren en el interior del nematodo.
- Muestra un genoma pequeño y totalmente secuenciado, que ha mostrado que comparte más de un 50% de los genes humanos (Harris et al., 2004).
- Presenta un bajo coste y facilidad a la hora de obtener cepas modificadas genéticamente debido a la existencia de diferentes herramientas genéticas para su obtención (Giacomotto y Segalat, 2010).
- El almacenamiento y la conservación de las cepas resulta sencilla.
- Sirve para estudiar los efectos de los fármacos, ya que se alimenta de microorganismos y es susceptible a muchos de los patógenos bacterianos y fúngicos que pueden infectar al ser humano (O'Callaghan y Vergunst, 2010).

*Caenorhabditis elegans* ha mostrado ser un buen modelo para el estudio de la virulencia fúngica y para la identificación de nuevos fármacos antifúngicos, ya que proporciona un modelo de cribado ideal. Debido a su pequeño tamaño, a su simplicidad a la hora de crecer y su bajo coste, se ha utilizado en investigaciones a gran escala. Además, es adecuado para identificar la actividad potencial de diferentes compuestos, permitiendo el estudio del efecto de compuestos que bloquean el crecimiento de los patógenos, así como aquellos que mejoran la inmunidad del hospedador o los que son tóxicos (Moy et al., 2006). Este nematodo se ha utilizado también,

para evaluar los factores de virulencia de *Candida albicans* y para analizar la respuesta inmune frente a este hongo (Pukkila-Worley et al., 2009; Pukkila-Worley et al., 2011). Estos estudios, han mostrado que existen semejanzas entre la patogénesis de estas infecciones en modelos de mamíferos y en los de invertebrados. Breger y colaboradores mediante el modelo en *Caenorhabditis elegans* seleccionaron varios compuestos que exhibían actividad antifúngica in vivo, pero no mostraban un efecto in vitro significativo (Breger et al., 2007).

Aunque este modelo permite estudiar la patogenicidad de *Candida*, evaluar la toxicidad, valorar el efecto antifúngico sobre el desarrollo de la infección candidiásica y la disminución del daño estudiado, los mecanismos y el espectro de actividad de los fármacos, solos o en combinación y de la mortalidad relacionada con la infección, también presenta algunos inconvenientes (Okoli et al., 2009; Ewbank y Zugasti, 2011):

- Presenta dificultad para que algunas infecciones se reproduzcan, ya que el nematodo no dispone de los genes u órganos correspondientes.
- Su sistema inmune innato muestra diferencias respecto al de los mamíferos y los insectos (Irazoqui et al., 2010).
- Presenta una dificultad a la hora de correlacionar la actividad de los fármacos observada en mamíferos, ya que el nematodo presenta una anatomía simple.
- Debido a que se produce un bloqueo de la absorción a causa de su gruesa cutícula es difícil predecir las concentraciones efectivas de los fármacos (Giacomotto y Segalat, 2010).
- Resulta imposible calcular la concentración precisa del inóculo, ya que no se puede conocer la cantidad que comerá el nematodo.



**Figura 1.17:** *Caenorhabditis elegans*. Microscopía de contraste interferencial (Nomarski).

#### **1.4.3.1.3. *Drosophila melanogaster***

La mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, se ha utilizado ampliamente en experimentos de patogénesis fúngica desde el descubrimiento de Lemaitre y colaboradores sobre el papel esencial que la ruta Toll desempeña en la defensa de *Drosophila* contra hongos patógenos (Lemaitre et al., 1996; Ferrandon et al., 2007). Este modelo presenta muchas de las ventajas de *Caenorhabditis elegans*, como el ciclo de vida rápido, el tamaño pequeño, un genoma totalmente secuenciado y la facilidad para obtener organismos modificados genéticamente. Diferentes estudios sobre los distintos mecanismos de inmunidad innata han puesto de manifiesto que la mosca de la fruta presenta genes y rutas similares a las observadas en los mamíferos (Lemaitre y Hoffmann, 2007). Además, es capaz de reconocer elementos de virulencia fúngica y desencadenar la ruta Toll durante las infecciones sistémicas, mientras que la defensa de las infecciones causadas en el epitelio se coordina mediante la ruta de inmunodeficiencia (Charroux y Royet, 2010; Akhouayri et al, 2011). Este modelo reconoce la invasión fúngica, mediante la interacción de los receptores de reconocimiento de patrones y las moléculas presentes en la superficie de hongos y bacterias o por los factores de virulencia secretados. Como consecuencia de esta interacción se desencadena la respuesta inmune, que consta de componentes tanto celulares (llamados hemocitos, células sanguíneas especializadas en fagocitosis) como humorales (péptidos antimicrobianos).

La mosca *Drosophila melanogaster* se ha utilizado también como modelo experimental para estudios de factores de virulencia, de la eficacia compuestos antimicrobianos y de la patogenicidad de distintos hongos (Glavis-Bloom et al, 2012). Alarco y colaboradores, han demostrado que la formación de hifas es un factor de virulencia importante durante la infección por *Candida* en este modelo (Alarco et al., 2004). Por otro lado, el principal factor de virulencia de *Cryptococcus neoformans* en los mamíferos, la formación de cápsula, no contribuye de forma significativa en su virulencia en este modelo (Apidianakis et al., 2004). También se ha utilizado *Drosophila melanogaster* para el estudio de la eficacia de agentes antifúngicos, evaluándose la respuesta del modelo en infecciones por *Aspergillus fumigatus* o *Candida albicans* (Lionakis y Kontoyiannis, 2005; Chamilos et al., 2006). Estos trabajos demostraron que es un modelo adecuado para la evaluación de la actividad de fármacos antifúngicos, además de un modelo potencial para el estudio de las combinaciones de fármacos. En el análisis de Lamarinis y colaboradores se mostró que el tratamiento en combinación de voriconazol y terbinafina administrado de forma oral tuvo un efecto sinérgico en el modelo in vivo en *Drosophila melanogaster*, además de observarse una correlación con lo obtenido en el estudio in vitro (Lamarinis et al., 2007).

El modelo de *Drosophila melanogaster* ofrece ventajas en lo que se refiere a la inmunopatogenia, ya que presenta vías del sistema inmune altamente conservadas. Sin embargo, es importante señalar que existen limitaciones en el uso de este modelo, ya que:

- Requiere capacitación técnica y un equipo especializado para el mantenimiento y la modificación genética.
- Presenta dificultad a la hora de provocar la infección, debido a su tamaño y a que las temperaturas de crecimiento son distintas de las de mamíferos.
- La estimación precisa de la dosis de fármaco que se administra para el tratamiento requiere especialización del equipo, mucho tiempo y técnica.
- No dispone de un sistema inmune adaptativo y de anticuerpos.

## Introducción

- Su sistema inmune innato carece de algunas células especializadas (células dendríticas o linfocitos NK) y de citoquinas, quimiocinas y otras moléculas efectoras que desempeñan un papel importante en la respuesta inmune humana durante la infección.



**Figura 1.18:** *Drosophila melanogaster* (André Karwath).

### 1.4.3.1.4. *Galleria mellonella*

La larva de la polilla de la cera, *Galleria mellonella*, se utilizó por primera vez para el estudio de hongos entomopatógenos. Posteriormente, se demostró su excelente condición como modelo para el estudio de las infecciones fúngicas que afectan al ser humano (Cotter et al., 2000).

Este modelo presenta ventajas únicas, entre las que podemos encontrar:

- Su capacidad para vivir a 37 °C, proporcionando así semejanza con la infección en el ser humano (Mowlds y Kavanagh, 2008).
- Su facilidad tanto para obtenerlas como para almacenarlas, reduciendo el gasto económico.
- Su tamaño suficiente que facilita el desarrollo de la infección mediante una inyección, lo que permite la administración precisa de la dosis y del tratamiento (Kavanagh y Fallon, 2010).

*Galleria mellonella* presenta un sistema inmune innato que dispone de componentes celulares, con seis tipos de hemocitos diferentes, encargados de los procesos de fagocitosis y de

componentes humorales que secretan péptidos antimicrobianos. Al igual que en otros modelos, las moléculas de reconocimiento de patrones desempeñan un papel crucial en la respuesta inmune de *Galleria mellonella*. La respuesta humoral llevada a cabo por la larva frente a hongos patógenos parece ser diferente de la respuesta frente a bacterias patógenas (Mak et al., 2010). Fallon y colaboradores observaron mediante la inoculación de conidios de *Aspergillus fumigatus*, que las larvas podían activar indistintamente la respuesta inmune celular o humoral según el tamaño del inóculo (Fallon et al., 2011). Cabe destacar que los factores ambientales también pueden afectar en la inmunidad de *Galleria mellonella*. Por ejemplo, la incubación de las larvas a 37 °C de temperatura mejora su respuesta inmune (Wojda et al., 2009). Por otro lado, la falta de nutrientes conduce a una reducción de su respuesta inmune tanto celular como humoral, aumentando así la susceptibilidad a la infección (Banville et al., 2012).

Las larvas de *Galleria mellonella* son susceptibles a la infección por *Candida*, pudiendo causar su muerte (**Figura 1.19**). Además, la capacidad patógena de las diferentes especies de *Candida* en este modelo es similar al observado en modelos mamíferos (Cotter et al., 2000). El modelo en *Galleria mellonella*, se ha utilizado en algunos estudios para evaluar las interacciones y los factores de virulencia fúngica que están presentes a 37 °C, mostrando que la formación de hifas desempeña un papel importante en la virulencia (Brennan et al., 2002; Fuchs et al., 2010). El modelo *Galleria mellonella* también se ha empleado para evaluar la eficacia de los fármacos antifúngicos y de los protocolos de tratamiento. Mesa-Arango y colaboradores han demostrado que algunos agentes antifúngicos (anfotericina B, fluconazol, voriconazol y caspofungina) en dosis terapéuticas tienen un efecto protector sobre las larvas infectadas con *Candida tropicalis* (Mesa-Arango et al., 2013). Otros estudios han mostrado una buena correlación entre el resultado obtenido en el tratamiento in vivo ante la infección producida por *Candida parapsilosis* y los datos mostrados en el estudio de sensibilidad in vitro a los fármacos antifúngicos (Souza et al., 2015). Las larvas de *Galleria mellonella* se han utilizado también para evaluar la eficacia de la plata y la 1,10-fenantrolina tras la infección por *Candida albicans*, demostrándose que la combinación de ambos compuestos aumentaba significativamente la supervivencia (Rowan et al., 2009). También se ha utilizado este modelo para identificar compuestos que además de ejercer una actividad antifúngica, presentan un efecto inmunomodulador en el hospedador. Se ha observado que la caspofungina, además de su

## Introducción

actividad antifúngica, mejora la respuesta inmune de *Galleria mellonella* aumentando la supervivencia de las larvas infectadas por *Candida albicans* (Kelly y Kavanagh, 2011). Mylonakis y colaboradores probaron los efectos del fluconazol, 5-fluorocitosina y anfotericina B sobre la supervivencia de este modelo en una infección causada por *Cryptococcus neoformans* (Mylonakis et al., 2005). En el estudio de estos mismos autores se observó una mayor supervivencia con el tratamiento combinado de anfotericina B y 5-fluorocitosina, resultado que concuerda con lo observado en estudios previos en ratones y en humanos. Este hecho demuestra que *Galleria mellonella* es un excelente modelo para el cribado de la eficacia de nuevos fármacos.

Por otro lado, cabe destacar que las larvas de la polilla de la cera se han utilizado para estudiar la combinación entre fármacos antifúngicos y no-antifúngicos. Cowen y colaboradores mostraron que la coinoculación de un inhibidor de la proteína Hsp90 durante la infección por *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus*, mejoraba la eficacia de los azoles y las equinocandinas (Cowen et al., 2009). Estudios recientes han mostrado que el tratamiento combinado entre la fluoxetina y los azoles tiene un papel protector durante la infección por *Candida albicans* mostrando que el tratamiento combinado, en concentraciones equivalentes a las dosis subterapéuticas en el ser humano, prolonga significativamente la supervivencia (Gu et al., 2016). Además, estos mismos investigadores han demostrado que la terapia combinada reduce el número de células de *Candida albicans* presentes en el interior de las larvas y que su muerte depende de la concentración de inóculo inyectada. Este mismo grupo un año más tarde, obtuvo resultados similares al combinar el fluconazol con dos tetraciclinas (minociclina y doxicilina), mostrando una alta efectividad en la protección de las larvas de *Galleria mellonella* infectadas por *Candida albicans* resistente al fluconazol (Gu et al., 2017). Además, en el análisis histológico se observó que aquellas larvas tratadas con la terapia combinada disponían de un menor número de levaduras agrupadas y menos pseudohifas.

Por otro lado, aunque *Galleria mellonella* sea un modelo muy prometedor y fácil de utilizar en estudios de la virulencia y en la detección de nuevos fármacos, también presenta algunas limitaciones, como que no posee un genoma completamente secuenciado, ni un método bien

establecido para la obtención de cepas mutantes, por lo que su aplicación en el estudio de la inmunidad innata está limitada.



**Figura 1.19:** Larva de *Galleria mellonella* (Josef Dvořák 2013).

#### **1.4.3.1.5. *Danio rerio***

La utilización del pez cebra, *Danio rerio*, como modelo alternativo para la investigación biomédica se ha incrementado con el paso del tiempo debido a una serie de ventajas (**Figura 1.20**):

- Un tamaño pequeño, que facilita su almacenamiento y mantenimiento.
- Un bajo coste de mantenimiento.
- Facilidad para mantener una alta densidad de población, 5 peces/litro.
- Una alta tasa de reproducción.
- Disponibilidad completa de la secuencia de su genoma (Howe et al., 2013)
- Una serie de herramientas eficientes para su manipulación genética.
- Tiene mecanismos inmunes innatos y adaptativos (Meeker y Trede, 2008)
- La transparencia óptica de sus embriones, que facilita la visualización a tiempo real de la interacción hospedador-patógeno.
- Una mayor similitud genética, fisiológica y anatómica con los mamíferos.

## Introducción

En los últimos años, se ha utilizado este modelo para el estudio de patógenos humanos, ofreciendo la oportunidad de estudiar grandes poblaciones gracias a su alta tasa de reproducción. Estos estudios se han realizado utilizando o bien peces en su etapa adulto, con un sistema inmune adaptativo, o bien peces en un estado de embrión o larva, con un sistema inmune exclusivamente innato (Meijer y Spaink, 2011). Muchos estudios de enfermedades infecciosas que utilizan este modelo se han concentrado en los periodos embrionario y larval del desarrollo, donde las ventajas del modelo son mayores. Chao y colaboradores demostraron que la muerte de *Danio rerio* por la infección de *Candida albicans* es dependiente de la dosis. Además, dicha especie puede colonizar e invadir múltiples lugares anatómicos, aunque la temperatura fisiológica del pez cebra (28,5 °C) sea menor que la temperatura a la que se desarrolla la infección en el ser humano (Chao et al., 2010). Esta característica podría explicar la necesidad de una dosis mayor para causar la muerte, debido a que a bajas temperaturas este patógeno permanece en forma de levadura, mientras que al aumentar a 37 °C se induce la formación de las hifas. En otros estudios se ha utilizado también el sistema del pez cebra para analizar la patogénesis de diferentes enfermedades infecciosas, incluidas las enfermedades causadas por bacterias, virus y parásitos (Sullivan y Kim, 2008; Kanther y Rawls, 2010).

La larva de *Danio rerio* es un buen modelo para la visualización y la comprensión de las interacciones de los patógenos con el sistema inmune innato, mediante la toma de imágenes por microscopia de contraste de fases con el uso tinciones normales o de células inmunitarias marcadas con moléculas fluorescentes (Meijer y Spaink, 2011). El sistema inmunitario de estos organismos varía durante el desarrollo del embrión lo que permite estudiar la función de diferentes tipos de células de sistema inmune durante la interacción hospedador-patógeno. Algunos estudios, han mostrado que un día después de la embriogénesis, los embriones ya poseen macrófagos funcionales capaces de detectar y responder a las infecciones. Los análisis sobre el sistema inmunitario de *Danio rerio* han revelado que la mayoría de los tipos celulares del sistema inmune humano tienen equivalentes en el modelo del pez cebra (Stachura D.L. y Traver D., 2004). Este modelo presenta una señalización similar a la de los seres humanos mediante los receptores Toll, expresa citocinas similares, tiene macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, mastocitos, eosinófilos y linfocitos B y T (Sullivan y Kim, 2008). En sus primeros cuatro días, *Danio rerio* no muestra marcadores de inmunidad adaptativa, tras los cuales, se

produce la expresión de genes y el desarrollo de linfocitos B y T, sin embargo, la funcionalidad de la respuesta inmune adaptativa tarda en desarrollarse entre 4 y 6 semanas (Lam et al., 2002; Traver et al., 2003; Danilova et al., 2004). Por lo tanto, el modelo del pez cebra facilita el estudio de la respuesta inmune, debido a que la infección se puede observar en varias etapas del ciclo de vida, con una inicial donde se puede estudiar la respuesta exclusivamente innata y otra en la que se estudia la combinación de la respuesta innata y la adaptativa. Además, el estudio de una candidemia en un modelo larval de *Danio rerio* permite la visualización en tiempo real de la infección o la reducción de la expresión de genes mediante el uso de morfolinós (Brothers et al., 2011). Los morfolinós son compuestos químicos orgánicos diseñados para bloquear la traducción o la unión a sitios de corte o de *splicing* de los ARNm específicos y generar genes *knockdown*.

*Danio rerio* se utiliza como un buen modelo en estudios de cribado farmacológico de alto rendimiento y toxicológicos (Kanungo et al., 2014). Bowman y Zon validaron este modelo de forma efectiva para la optimización de fármacos y para el análisis de nuevos agentes (Bowman y Zon, 2008). Otros investigadores han definido al modelo de embriones del pez cebra como una herramienta intermedia adecuada de cribado entre la evaluación preliminar *in vitro* y un análisis en mamíferos concluyente (de Lacorte Singulani et al., 2017). En los embriones, la incorporación de los fármacos se puede hacer a través de la piel, aunque este método ha mostrado ser algo ineficaz, por lo que en la mayoría de los casos se necesita la microinyección (Dananjaya et al., 2017).

Aunque el modelo de pez cebra es útil para los estudios de la biología del desarrollo, de la farmacología, de la genética, de la microbiología, de la neurobiología y de la virología, también presenta una serie de limitaciones que se han de tener en cuenta:

- Escasez de anticuerpos dirigidos a las proteínas de la superficie celular de *Danio rerio*, lo que complica la investigación de células madre (Li et al., 2011).
- La tecnología para la inactivación de los genes es limitada, no se han obtenido líneas de peces cebra knockout o knockin (Gratacab y Wheeler, 2014).



**Figura 1.20:** Embrión, larva y adulto de *Danio rerio* (Modificado de Rojas-Muñoz et al., 2007).

# **JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**



## 2. JUSTIFICACIÓN y OBJETIVOS

### 2.1. JUSTIFICACIÓN

Las candidiasis han adquirido gran relevancia en el ámbito clínico, por su aumento en las últimas décadas, siendo las micosis invasivas más frecuentes y causas importantes de morbilidad y mortalidad. *Candida albicans* es el agente etiológico predominante, aunque se ha observado un cambio epidemiológico en la proporción de infecciones causadas por otras especies de este género, causado en parte por el uso cada vez más frecuente de profilaxis antifúngica. Aunque se han producido avances en la terapia de las infecciones fúngicas, todavía sigue siendo limitado el número de agentes antifúngicos disponibles en comparación con los fármacos existentes para tratar las infecciones bacterianas. Uno de los agentes más utilizados para el tratamiento de las candidiasis es el fluconazol. Este fármaco presenta una serie de ventajas, como una buena actividad antifúngica, baja toxicidad, interacción mínima con otros medicamentos y unas excelentes biodisponibilidades oral y parenteral. Sin embargo, debido a su uso prolongado, están apareciendo un mayor número de candidiasis producidas por aislamientos resistentes o con sensibilidad reducida al fluconazol, incrementando así la gravedad de estas infecciones. A raíz de este problema y con el objetivo de resolverlo, se han sugerido varias soluciones: la búsqueda de nuevos agentes antifúngicos, el desarrollo de nuevas formulaciones de los agentes ya establecidos para reducir su toxicidad, o la combinación de fármacos.

En un principio se realizó mediante la combinación de distintos fármacos antifungicos. Sin embargo, debido a los efectos secundarios observados en algunos casos y a los elevados costes de algunos fármacos, la utilización de esta terapia es limitada. Posteriormente, se propuso una nueva estrategia para aumentar la sensibilidad de *Candida* al fluconazol, combinando este con diferentes agentes no antifúngicos, tales como fármacos antibacterianos, inhibidores de la calcineurina, inhibidores de la proteína de choque térmico 90, reguladores de la homeostasis del calcio o fármacos antiinflamatorios no esteroideos. Algunos agentes antibacterianos han mostrado que pueden interferir en la división o formación del ADN fúngico, alterando así la

## Justificación y objetivos

síntesis proteica. Por otro lado, se ha observado como algunos agentes inmunosupresores, fármacos antiarrítmicos o bloqueadores de la bomba de protones pueden bloquear las bombas de calcio, interfiriendo en procesos biológicos.

La eficacia terapéutica de un agente antifúngico o de la combinación de fármacos se puede valorar realizando tanto estudios *in vitro* como *in vivo*. Los métodos que determinan la sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos, así como los que cuantifican la eficacia de la combinación de distintos fármacos están basados en propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas. Estos métodos permiten seleccionar la alternativa terapéutica más adecuada, detectar la resistencia a los fármacos antifúngicos y observar la actividad sinérgica de las combinaciones de fármacos. La sensibilidad *in vitro* se puede evaluar por varios métodos, sin embargo, la técnica estándar que se emplea de referencia es la microdilución en caldo. Dos comités independientes, el CLSI y el EUCAST, han propuesto protocolos que permiten la obtención de la CMI. Ambos métodos muestran una buena concordancia, obteniendo resultados útiles tanto para la selección de una terapia adecuada, como para la categorización de los diferentes aislamientos clínicos. Por otra parte, la eficacia *in vitro* de la combinación de compuestos puede determinarse utilizando distintos métodos, entre los que podemos encontrar el tablero de ajedrez o las curvas de letalidad. Estos métodos, se interpretan en base a la teoría de la no interacción, es decir, suponiendo que los fármacos combinados no interaccionan. El método de tablero de ajedrez determina el porcentaje de inhibición del crecimiento en presencia de diferentes combinaciones de fármacos de manera relativamente sencilla tanto de realizar como de interpretar. El análisis de datos se puede realizar según dos teorías de la no interacción, la teoría de la aditividad de Loewe y la teoría de la independencia de Bliss. El índice de concentración inhibitoria fraccionada (FICI), un modelo paramétrico de la teoría de la aditividad de Loewe, se ha utilizado con mayor frecuencia a la hora de interpretar los resultados observados mediante este método. Aunque este modelo presenta algunas limitaciones importantes. Por ello, con el objetivo de reducir los errores de interpretación se han empleado otros modelos en el estudio de la combinación de fármacos. El modelo no paramétrico de la teoría de la independencia de Bliss ha mostrado menos limitaciones, además de resultar un instrumento verdaderamente útil en los estudios que utilizan el método del tablero de ajedrez. Las curvas de letalidad proporcionan una información más detallada del efecto de las

combinaciones de fármacos en el tiempo. Este modelo ha mostrado tener una mejor sensibilidad y reproducibilidad que otros métodos utilizados para el análisis de la eficacia de las combinaciones de antifúngicos.

La evaluación in vivo de la eficacia del tratamiento sola o en combinación se realiza mediante el estudio en modelos animales de infección por *Candida*. Esta evaluación se puede realizar observando la supervivencia de los animales, estimando la reducción de la carga fúngica detectable en los órganos y/o estudios histopatológicos. Los modelos no convencionales se han desarrollado como alternativa para evitar los problemas éticos que muestra la experimentación en animales mamíferos. El uso de animales invertebrados, así como de sangre fría, como modelos alternativos ha facilitado la realización de los estudios de la interacción hospedador-patógeno, debido a la disponibilidad de una respuesta inmune innata y en algunos casos adaptativa que los capacita como un modelo adecuado para dichos estudios. Entre los hospedadores no mamíferos empleados en los estudios de eficacia de la terapia combinada cabe destacar a las larvas *Galleria mellonella*, un lepidóptero que proporciona importantes ventajas como modelo experimental. Las más reseñables son su capacidad para sobrevivir a 37 °C de temperatura, permitiendo simular las condiciones de la infección en los seres humanos y su tamaño suficiente que facilita la inoculación de dosis exactas de patógeno y de tratamiento. Los resultados de la viabilidad de las larvas se obtienen con facilidad mediante su observación, ya que las larvas en respuesta a la infección inducen una melanización masiva.

## 2.2. OBJETIVOS

Esta Tesis Doctoral tiene como objetivo principal la evaluación tanto in vitro como in vivo de nuevos enfoques en el tratamiento de las candidiasis mediante la combinación del fluconazol, un agente antifúngico, con fármacos con otras indicaciones.

Los objetivos específicos que se han propuesto para este estudio han sido los siguientes:

- Estudiar la sensibilidad de distintas especies del género *Candida* al fluconazol y a otros fármacos no antifúngicos utilizando las dos técnicas estándar de microdilución en caldo, propuestas por el CLSI y el EUCAST.

## Justificación y objetivos

- Estudiar el efecto in vitro de la combinación del fluconazol y otros compuestos contra *Candida albicans* y otras especies del género *Candida* mediante varios métodos.
- Observar las diferencias entre los distintos modelos de interpretación de los datos obtenidos mediante la técnica de combinación de fármacos denominada tablero de ajedrez.
- Evaluar en modelos experimentales de candidiasis invasora en animales no convencionales la eficacia de la terapia combinada del fluconazol con otros compuestos en el tratamiento de la candidiasis diseminada.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**



# 3. MATERIALES Y MÉTODOS

## 3.1. MICROORGANISMOS

Para evaluar la sensibilidad in vitro a los fármacos se utilizaron un total de 74 cepas pertenecientes a la colección de cultivos de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU) y de los Servicios de Microbiología Clínica de los Hospitales colaboradores (**Tabla 3.1**). También, se emplearon en este estudio cepas de referencia procedentes de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), de la *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS), de la *American Type Culture Collection* (ATCC) y de la *National Collection of Pathogenic Fungi* (NCPF). Los aislamientos clínicos y las cepas de referencia se mantuvieron en placas de agar glucosado de Sabouraud (AGS) a 4 °C, así como en tubos de agua destilada estéril a temperatura ambiente. Para la obtención de los inóculos, las cepas se subcultivaron en SDA y se incubaron a 37 °C durante 24 h.

**Tabla 3.1:** Aislamientos clínicos y cepas de referencia de *Candida* estudiadas.

Especie	Procedencia	Origen anatómico
<i>Candida africana</i>	ATCC 2669	Humano
<i>Candida africana</i>	UPV 97-135	Desconocido
<i>Candida albicans</i>	ATCC 64124	Oral
<i>Candida albicans</i>	ATCC 90028	Sangre
<i>Candida albicans</i>	ATCC 90029	Sangre
<i>Candida albicans</i>	NCPF 3153	Humano
<i>Candida albicans</i>	NCPF 3156	Humano
<i>Candida albicans</i>	UPV 06-100	Celulitis necrotizante
<i>Candida albicans</i>	UPV 06-114	Oral (prótesis)
<i>Candida albicans</i>	UPV 10-166	Humano
<i>Candida albicans</i>	UPV 10-168	Humano
<i>Candida albicans</i>	UPV 10-169	Humano
<i>Candida albicans</i>	UPV 10-170	Humano
<i>Candida albicans</i>	UPV 10-171	Humano
<i>Candida albicans</i>	UPV 15-147	Vaginal
<i>Candida albicans</i>	UPV 15-154	Hemocultivo
<i>Candida albicans</i>	UPV 15-157	Mucosa oral
<i>Candida albicans</i>	UPV 15-176	Humano
<i>Candida bracarensis</i>	NCYC 3133	Sangre catéter
<i>Candida bracarensis</i>	NCYC 3397	Candidiasis humana
<i>Candida dubliniensis</i>	CECT 11473	Sangre
<i>Candida dubliniensis</i>	NCPF 3949	Oral (VIH)
<i>Candida dubliniensis</i>	UPV 00-135	Oral
<i>Candida dubliniensis</i>	UPV 13-017	Orina

## Materiales y métodos

<i>Candida glabrata</i>	ATCC 90030	Sangre
<i>Candida glabrata</i>	UPV 03-282	Sangre
<i>Candida glabrata</i>	UPV 06-097	Aspirado bronquial
<i>Candida glabrata</i>	UPV 07-185	Exudado oral
<i>Candida glabrata</i>	UPV 07-200	Hemocultivo
<i>Candida glabrata</i>	UPV 11-452	Espujo
<i>Candida glabrata</i>	UPV 15-202	Vaginal
<i>Candida glabrata</i>	UPV 16-006	Aislamiento clínico
<i>Candida glabrata</i>	UPV 16-032	Desconocido
<i>Candida glabrata</i>	UPV 16-071	Peritoneo
<i>Candida glabrata</i>	UPV 16-073	Absceso intrabdominal
<i>Candida guilliermondii</i>	NCPF 3099	Desconocido
<i>Candida guilliermondii</i>	UPV 10-045	Sangre
<i>Candida guilliermondii</i>	UPV 96-162	Sangre
<i>Candida guilliermondii</i>	UPV 97-119	Sangre
<i>Candida krusei</i>	ATCC 6258	Espujo
<i>Candida krusei</i>	NCPF 3100	Desconocido
<i>Candida krusei</i>	NCPF 3321	Desconocido
<i>Candida krusei</i>	UPV 03-263	Sangre
<i>Candida lusitanae</i>	ATCC 200950	Desconocido
<i>Candida lusitanae</i>	ATCC 42720	Sangre (leucemia mielógena)
<i>Candida lusitanae</i>	ATCC 66035	Desconocido
<i>Candida metapsilosis</i>	ATCC 96143	Humano
<i>Candida metapsilosis</i>	ATCC 96144	Mano humana
<i>Candida metapsilosis</i>	UPV 07-045	Sangre
<i>Candida nivariensis</i>	CBS 9983	Sangre
<i>Candida nivariensis</i>	CBS 9984	Lavado broncoalveolar
<i>Candida nivariensis</i>	CECT 11998	Desconocido
<i>Candida orthopsilosis</i>	ATCC 96139	Catéter de presión venosa central
<i>Candida orthopsilosis</i>	ATCC 96141	Catéter venoso central
<i>Candida orthopsilosis</i>	UPV 07-035	Sangre
<i>Candida orthopsilosis</i>	UPV 09-242	Sangre
<i>Candida orthopsilosis</i>	UPV 13-050	Orina
<i>Candida orthopsilosis</i>	UPV 15-042	Desconocido
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 22019	Esprue tropical
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 90018	Sangre
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC MYA 4646	Mano de trabajador sanitario
<i>Candida parapsilosis</i>	NCPF 3104	Uña del dedo del pie
<i>Candida parapsilosis</i>	UPV 09-378	Sangre
<i>Candida parapsilosis</i>	UPV 12-241	Vaginal
<i>Candida parapsilosis</i>	UPV 15-043	Humano
<i>Candida parapsilosis</i>	UPV 15-177	Humano
<i>Candida parapsilosis</i>	UPV 16-067	Sangre periférica
<i>Candida parapsilosis</i>	UPV 16-069	Sangre catéter
<i>Candida tropicalis</i>	UPV 05-014	Oral (prótesis)
<i>Candida tropicalis</i>	UPV 07-201	Orina
<i>Candida tropicalis</i>	UPV 09-273	Sangre
<i>Candida tropicalis</i>	UPV 15-164	Oral
<i>Candida tropicalis</i>	UPV 16-080	Sangre periférica

## 3.2. FÁRMACOS

Los fármacos ensayados en las pruebas in vitro fueron el fluconazol, como agente antifúngico, y la amiodarona, la ciclosporina A, el ibuprofeno y la lactoferrina, como compuestos con otras indicaciones. Estos fármacos se obtuvieron en forma de polvo valorado con distintas purezas (**Tabla 3.2**).

**Tabla 3.2:** Fármacos utilizados.

Agente	Farmacología	Procedencia	Pureza	Disolvente	Conservación
Fluconazol	Fármaco Antifúngico	Sigma-Aldrich	98%	DMSO	Temperatura ambiente
Amiodarona	Fármaco Regulador de la homeostasis	Sigma-Aldrich	100%	DMSO	2-6 °C
Ciclosporina A	Fármaco Inhibidor de la calcineurina	Sigma-Aldrich	99,70%	DMSO	2-6 °C
Ibuprofeno	Fármaco Antiinflamatorio no esteroideo	Sigma-Aldrich	100%	DMSO	Temperatura ambiente
Lactoferrina	Glicopeptido antimicrobiano	Sigma-Aldrich	87%	Agua	2-6 °C

DMSO: Dimetilsulfóxido

## 3.3. ESTUDIOS IN VITRO

### 3.3.1. ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD Y DE LA INTERACCIÓN ENTRE FÁRMACOS

El estudio de la sensibilidad in vitro a los fármacos antifúngicos se realizó determinando la CMI mediante el protocolo recomendado por el CLSI, en los documentos M27-A3, M27-S4 y M60 y el protocolo recomendado por el EUCAST, en el documento EDef 7.3.1. El estudio de la interacción entre los distintos compuestos se realizó mediante los métodos de tablero de ajedrez, siguiendo algunas de las directrices de los protocolos citados, y mediante el estudio de las curvas de letalidad (Mukherjee et al., 2005). En la **Tabla 3.3** se muestran las cepas estudiadas en esta Tesis doctoral y los métodos que se han utilizado con cada una de ellas (Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A3, 2008; Clinical and Laboratory Standards Institute M27-S4, 2012; Clinical and Laboratory Standards Institute M60, 2017; Arendrup et al., 2017).

**Tabla 3.3:** Aislamientos y cepas de *Candida* estudiadas con los diferentes métodos empleados.

Aislamientos	Métodos		
	Determinación	Interacción	
	CMI	Tablero de ajedrez	Curvas de letalidad
<i>Candida africana</i> ATCC 2669	x		
<i>Candida africana</i> UPV 97-135	x		
<i>Candida albicans</i> ATCC 64124	x	x	x
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	x		
<i>Candida albicans</i> ATCC 90029	x		
<i>Candida albicans</i> NCPF 3153	x	x	x
<i>Candida albicans</i> NCPF 3156	x		
<i>Candida albicans</i> UPV 06-100	x	x	
<i>Candida albicans</i> UPV 06-114	x	x	
<i>Candida albicans</i> UPV 10-166	x	x	
<i>Candida albicans</i> UPV 10-168	x		
<i>Candida albicans</i> UPV 10-169	x		
<i>Candida albicans</i> UPV 10-170	x	x	
<i>Candida albicans</i> UPV 10-171	x		
<i>Candida albicans</i> UPV 15-147	x	x	x
<i>Candida albicans</i> UPV 15-154	x	x	x
<i>Candida albicans</i> UPV 15-157	x	x	x
<i>Candida albicans</i> UPV 15-176	x	x	
<i>Candida bracarensis</i> NCYC 3133	x		
<i>Candida bracarensis</i> NCYC 3397	x		
<i>Candida dubliniensis</i> CECT 11473	x		
<i>Candida dubliniensis</i> NCPF 3949	x		
<i>Candida dubliniensis</i> UPV 00-135	x		
<i>Candida dubliniensis</i> UPV 13-017	x		
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	x	x	
<i>Candida glabrata</i> NCPF 3203	x		
<i>Candida glabrata</i> UPV 03-282	x		
<i>Candida glabrata</i> UPV 06-097	x		
<i>Candida glabrata</i> UPV 07-185	x	x	
<i>Candida glabrata</i> UPV 07-200	x	x	
<i>Candida glabrata</i> UPV 11-452	x	x	
<i>Candida glabrata</i> UPV 15-202	x	x	
<i>Candida glabrata</i> UPV 16-006	x	x	
<i>Candida glabrata</i> UPV 16-032	x	x	
<i>Candida glabrata</i> UPV 16-071	x		
<i>Candida glabrata</i> UPV 16-073	x		
Aislamientos	Métodos		
	Sensibilidad	Interacción	
	CMI	Tablero de ajedrez	Curvas de letalidad
<i>Candida guilliermondii</i> NCPF 3099	x		
<i>Candida guilliermondii</i> UPV 96-162	x		
<i>Candida guilliermondii</i> UPV 97-119	x		

<i>Candida guilliermondii</i> UPV 10-045	x		
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	x	x	
<i>Candida krusei</i> NCPF 3321	x	x	
<i>Candida krusei</i> UPV 03-263	x	x	
<i>Candida lusitanae</i> ATCC 200950	x		
<i>Candida lusitanae</i> ATCC 42720	x		
<i>Candida lusitanae</i> ATCC 66035	x		
<i>Candida metapsilosis</i> ATCC 96143	x		
<i>Candida metapsilosis</i> ATCC 96144	x		
<i>Candida metapsilosis</i> UPV 07-045	x		
<i>Candida nivariensis</i> CBS 9983	x	x	
<i>Candida nivariensis</i> CBS 9984	x	x	
<i>Candida nivariensis</i> CECT 11998	x		
<i>Candida orthopsilosis</i> ATCC 96139	x		
<i>Candida orthopsilosis</i> ATCC 96141	x	x	
<i>Candida orthopsilosis</i> UPV 07-035	x		
<i>Candida orthopsilosis</i> UPV 09-242	x	x	
<i>Candida orthopsilosis</i> UPV 13-050	x		
<i>Candida orthopsilosis</i> UPV 15-042	x		
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	x	x	x
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	x	x	
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC MYA 4646	x	x	
<i>Candida parapsilosis</i> NCPF 3104	x	x	x
<i>Candida parapsilosis</i> UPV 09-378	x		
<i>Candida parapsilosis</i> UPV 12-241	x	x	
<i>Candida parapsilosis</i> UPV 15-043	x	x	
<i>Candida parapsilosis</i> UPV 15-177	x		
<i>Candida parapsilosis</i> UPV 16-067	x		
<i>Candida parapsilosis</i> UPV 16-069	x		
<i>Candida tropicalis</i> UPV 05-014	x	x	
<i>Candida tropicalis</i> UPV 07-201	x		
<i>Candida tropicalis</i> UPV 09-273	x	x	
<i>Candida tropicalis</i> UPV 15-164	x		
<i>Candida tropicalis</i> UPV 16-080	x		

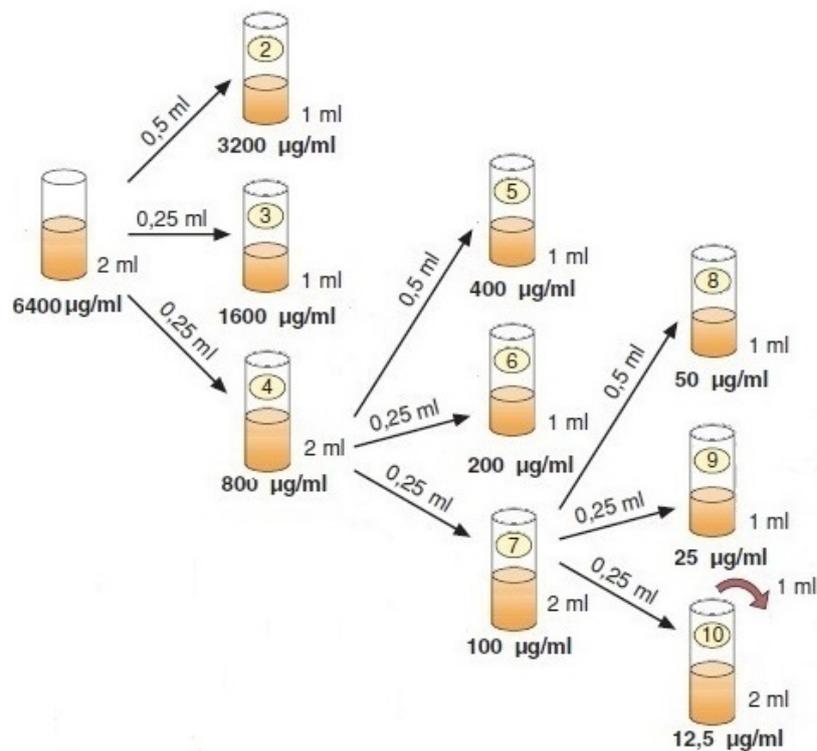
### 3.3.1.1. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

Las CMI de la amiodarona, la ciclosporina A, el fluconazol, el ibuprofeno y la lactoferrina se obtuvieron para todas las cepas por los métodos estandarizados de microdilución en caldo RPMI descritos en los documentos M27-A3 del CLSI y EDef 7.3.1. del EUCAST. La CMI se definió como la menor concentración de compuesto antifúngico que causó el 50% de la inhibición del crecimiento del hongo después de 24 y 48 h de incubación en el método descrito en el CLSI y 24 h de incubación en el método descrito en el EUCAST.

### 3.3.1.1.1. Determinación de la CMI utilizando el método recomendado por el CLSI

Se utilizó RPMI 1640 con L-glutamina y sin bicarbonato de sodio como medio de cultivo durante el ensayo (Sigma-Aldrich). El medio se tamponó con ácido morfolinopropanosulfónico 0,165 M (MOPS, Sigma-Aldrich). Se ajustó el pH hasta  $7,0 \pm 0,1$  a 22 °C. Se esterilizó por filtración y se almacenó a 4 °C. Se preparó una solución madre de fluconazol, para ello se pesó una cantidad suficiente de antifúngico con el fin de obtener una concentración 100 veces superior a la concentración más alta de antifúngico a ensayar y se disolvió en dimetil sulfóxido (DMSO) o en agua destilada estéril en función de la sustancia. A partir de la solución madre se preparó una sucesión de diluciones dobles seriadas (**Figura 3.1**).

Posteriormente, se diluyó el contenido de cada tubo en el medio RPMI en una proporción de 1:50 (**Figura 3.2**). Se añadieron en cada uno de los pocillos de una columna de la microplaca de fondo cóncavo (fondo en "U") 100 µl, empezando por la columna 10 en orden de menor a mayor concentración. Se añadieron 100 µl de RPMI con 2% de DMSO a las dos últimas columnas y se utilizaron como control de crecimiento del hongo y como control de esterilidad del medio (columnas 11 y 12 respectivamente). Una vez preparadas las microplacas se rotularon y se almacenaron a -70 °C un máximo de seis meses.

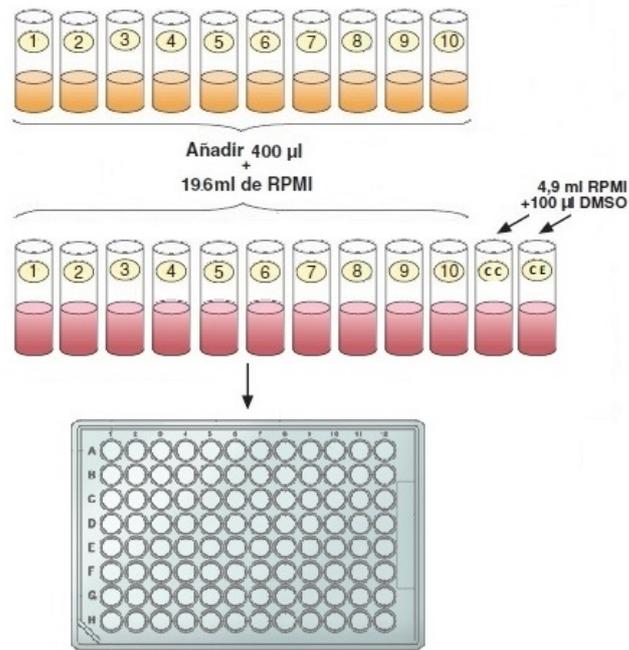


**Figura 3.1:** Realización de las diluciones seriadas en el método de CLSI (Modificado de Cantón et al., 2007).

Las concentraciones finales ensayadas de estos fármacos fueron: de 0,125 a 64 µg/ml para el fluconazol, de 0,25 a 128 µg/ml para la amiodarona y la ciclosporina A, de 0,5 a 256 µg/ml para el ibuprofeno y de 0,0625 a 32 µg/ml para la lactoferrina.

El día del ensayo, las microplacas se descongelaron a temperatura ambiente y se prepararon los inóculos en tubos de solución salina al 0,85% (**Figura 3.3**). En estos tubos se suspendieron unas colonias provenientes de un cultivo de 24 h de incubación, hasta obtener una turbidez de 0,5 McFarland que corresponde con una concentración aproximada de  $1-5 \times 10^6$  UFC/ml.

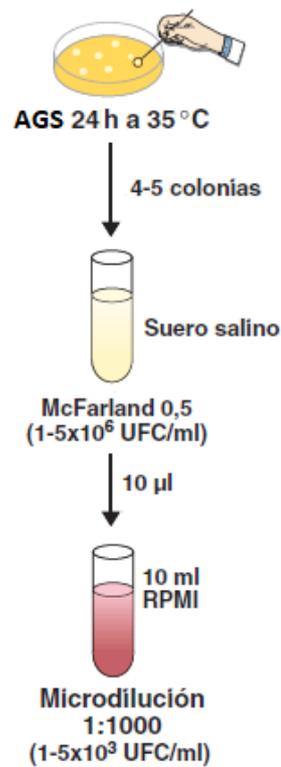
## Materiales y métodos



**Figura 3.2:** Preparación de las placas para el método de CLSI (Modificado de Cantón et al., 2007).

Se dispensaron 100 µl de una dilución 1/1000 del inóculo en RPMI en cada pocillo de las columnas que contenían los fármacos y de la columna del control de crecimiento, para obtener la concentración final de fármaco a estudiar y la densidad de inóculo final ( $0,5-2,5 \times 10^3$  UFC/ml). Al control de esterilidad se le añadieron otros 100 µl del RPMI utilizado el mismo día, diluyendo así el RPMI para obtener una concentración de DMSO al 1%. Las microplacas se incubaron a  $35 \pm 2$  °C durante 24-48 h. La lectura se realizó visualmente a los dos tiempos, comparando el crecimiento en los distintos pocillos con la columna del control de crecimiento.

Siguiendo las recomendaciones del documento M27-A3 del CLSI, en cada ensayo se incluyó una de las dos cepas de referencia como control, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 o *Candida krusei* ATCC 6258. Se comprobó que los valores para estas dos cepas empleadas como control de calidad mostraron una CMI para el fluconazol que estaba dentro del rango publicado, 32 µg/ml y 1-2 µg/ml, respectivamente en todas las combinaciones analizadas, antes de dar por válido el ensayo.



**Figura 3.3:** Preparación del inóculo de levaduras según el método de CLSI (Modificado de Cantón et al., 2007).

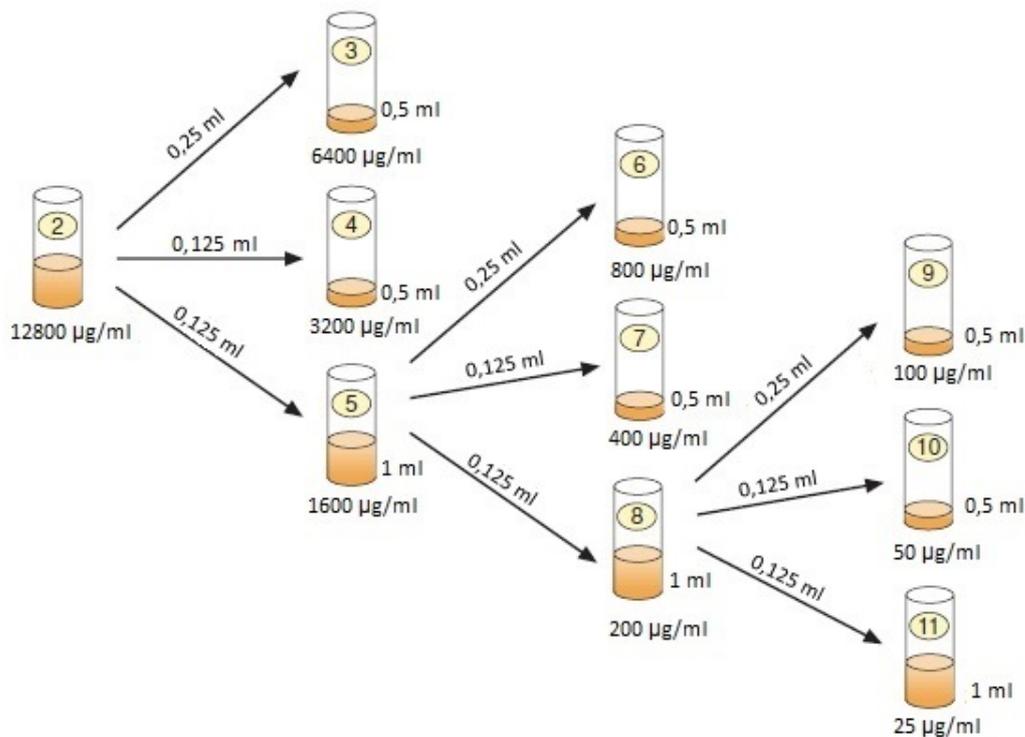
### 3.3.1.1.2. Determinación de CMI utilizando el método recomendado por el EUCAST

Se utilizó RPMI 1640 con L-glutamina y sin bicarbonato de sodio que se tamponó con MOPS 0,165 M y se le añadió una cantidad de glucosa suficiente para obtener una concentración final del 2%. El medio RPMI se preparó concentrado al doble para permitir su dilución a la mitad después de añadir el inóculo preparado en agua. Por último, se filtró y se almacenó a 4 °C. La solución madre de los fármacos se obtuvo pesando cantidad suficiente de fármaco antifúngico con el fin de lograr una concentración 200 veces superior a la concentración más alta de antifúngico a ensayar y se disolvió en DMSO o en agua destilada estéril en función de la sustancia.

Las concentraciones finales de los fármacos ensayadas fueron las mismas que en el método anterior: de 0,125 a 64 µg/ml para el fluconazol; de 0,25 a 128 µg/ml para la amiodarona y la ciclosporina A; de 0,5 a 256 µg/ml para el ibuprofeno y de 0,0625 a 32 µg/ml para la lactoferrina.

## Materiales y métodos

Se preparó una serie de diluciones dobles siguiendo el esquema de la **Figura 3.4**, en el que variaron las concentraciones dependiendo del fármaco a estudiar. A continuación, se diluyó el contenido de cada tubo en el medio RPMI en una proporción 1:100. Se añadieron en la microplaca de fondo plano 100  $\mu$ l de cada una de las distintas concentraciones de fármaco a cada columna de menor a mayor concentración (empezando desde la columna 10 hasta la 1). Las columnas 11 (control de crecimiento del hongo) y 12 (control de esterilidad del medio) se llenaron con 100  $\mu$ l de RPMI doble concentrado suplementado con glucosa al 2% y con DMSO al 2%. Una vez preparadas las microplacas se rotularon y se almacenaron a  $-70$  °C un máximo de seis meses (el llenado de placas fue similar a lo mostrado en la **Figura 3.2**, modificando la proporción de la dilución en RPMI).



**Figura 3.4:** Preparación de las diluciones seriadas de fluconazol en el método de EUCAST (Modificado de Cantón et al., 2007).

Los inóculos se prepararon en tubos de agua destilada estéril, en los cuales se resuspendieron varias colonias obtenidas de un cultivo de 18-24 h de AGS incubado a  $35 \pm 2$  °C. Se ajustó la suspensión a un valor de 0,5 McFarland y se diluyó dicha suspensión en una proporción 1:10. Se inoculó en cada pocillo 100  $\mu$ l de la suspensión de levadura a una concentración de  $1-5 \times 10^5$

UFC/ml de la columna 1 hasta la 11, de este modo se obtuvo la concentración requerida de fármaco, así como la concentración final de inóculo ( $0,5-2,5 \times 10^5$  UFC/ml). Al control de esterilidad se le añadieron otros 100  $\mu$ l de agua destilada estéril del lote utilizado en la preparación del inóculo. Se incubaron las placas sin agitación a  $35 \pm 2$  °C durante 24 h. La lectura se realizó en un lector de placas (Bio-Rad, EEUU) a una absorbancia de 450 nm. Se volvieron a incubar 24 h más aquellas placas en las que se mostraba una absorbancia inferior a 0,2 y se tomaron como pruebas fallidas aquellas que tras 48 h de incubación no alcanzaron una absorbancia mayor que 0,2.

Además, en cada ensayo se incluyó una de las dos cepas de referencia, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 o *Candida krusei* ATCC 6258 como control de calidad. Al igual que en el método anterior se comprobó que los valores para estas dos cepas estaban dentro del rango publicado antes de dar por válido el ensayo.

### 3.3.1.1.3. Interpretación

Para la clasificación de los aislamientos según su sensibilidad al fluconazol se utilizaron los puntos de corte clínicos y epidemiológicos propuestos por el CLSI y el EUCAST para las especies de *Candida* más prevalentes (**Tabla 3.4**) (Clinical and Laboratory Standards Institute M60, 2017; EUCAST Antifungal Clinical Breakpoint v 9.0; Espinel-Ingroff y Turnidge, 2016).

**Tabla 3.4:** Puntos de corte clínicos y epidemiológicos de fluconazol para las especies más prevalentes.

Especie	CLSI				EUCAST			
	ECV ( $\mu$ g/ml)	CBP ( $\mu$ g/ml)			ECV ( $\mu$ g/ml)	CBP ( $\mu$ g/ml)		
	No WT	S	SDD	R	No WT	S	I	R
<i>Candida albicans</i>	>0,5	$\leq 2$	4	$\geq 8$	>1	$\leq 2$	4	>4
<i>Candida glabrata</i>	>8	-	$\leq 32$	$\geq 64$	>32	$\leq 0,02$	$\leq 0,02 - 32$	>32
<i>Candida guilliermondii</i>	>8	-	-	-	>16	-	-	-
<i>Candida krusei</i>	>32	-	-	-	>128	-	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	>1	$\leq 2$	4	$\geq 8$	>2	$\leq 2$	4	>4
<i>Candida tropicalis</i>	>1	$\leq 2$	4	$\geq 8$	>2	$\leq 2$	4	>4

ECV: puntos de corte epidemiológicos; I: intermedia; R: resistente; S: sensible; SDD: sensible dosis dependiente.

### 3.3.1.1.4. Comparación de los resultados entre los métodos del CLSI y el EUCAST

Para comparar los resultados entre ambos métodos se han determinado los porcentajes de acuerdo esencial y el coeficiente de correlación intraclase (CCI) en un intervalo de confianza del 95% (Cuenca-Estrella et al. 2010). El acuerdo esencial se define como las discrepancias existentes en los resultados de la CMI no mayores de dos diluciones dobles seriadas. Para el cálculo del CCI se aproximan los valores de CMI a una distribución normal transformándolos en valores logarítmicos de base 2. Por otra parte, el CCI indica el grado de variabilidad entre los valores estudiados, teniendo un valor de CCI inferior a 0,4, se hablará de un pobre acuerdo; si está por encima de 0,75, será muy bueno o excelente. Si está entre ambos, se considerará bueno (moderado) (Fleiss, 2011). Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa IBM Statistical Package for the Social Sciences (versión 23.0, IBM SPSS, Madrid, España).

### 3.3.2. TABLERO DE AJEDREZ

El método de tablero de ajedrez se realizó siguiendo algunas de las recomendaciones de los dos documentos anteriormente citados descritos por el CLSI y el EUCAST.

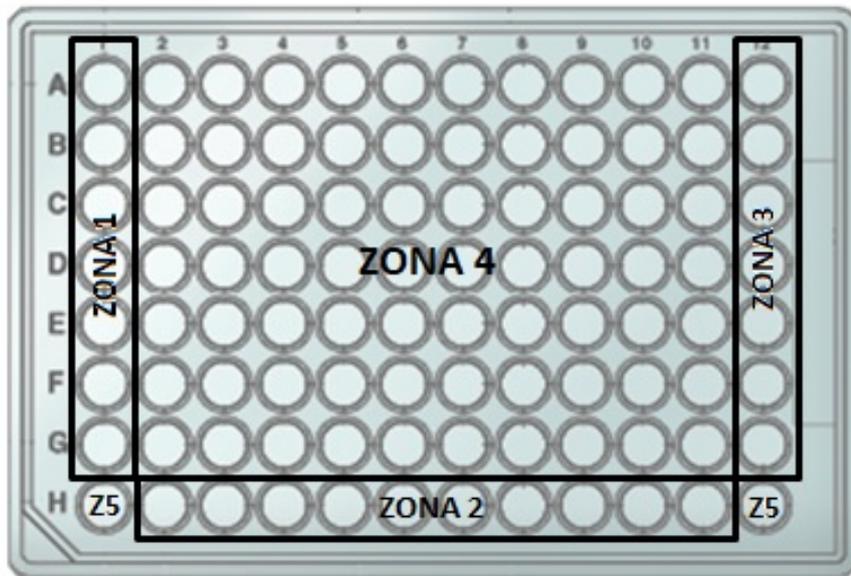
En cada caso, el RPMI se preparó según lo descrito anteriormente. Se realizó un gradiente de concentraciones para cada uno de los compuestos utilizados (**Figura 3.5**). Se utilizaron microplacas de 96 pocillos de fondo cóncavo siguiendo la recomendación del documento M27-A3 y pocillos de fondo plano según el documento EDef 7.3.1. El volumen final de las placas fue de 100  $\mu$ l en todos los pocillos. Se prepararon los inóculos con la concentración final previamente descrita para cada método.

Se estudiaron un total de cuatro combinaciones de fármacos, siendo el fluconazol el compuesto que se utilizó en todos los casos. Se dispusieron las diferentes concentraciones en filas o en columnas en las microplacas para obtener un gradiente doble de concentraciones (**Figura 3.5**). Para el fluconazol se utilizó un rango u otro dependiendo de los resultados de CMI obtenidos, de 1-64  $\mu$ g/ml o de 0,125 a 8  $\mu$ g/ml dispensándose 50  $\mu$ l desde la fila G hasta la fila A (de menor a mayor concentración) de la columna 11 hasta la columna 1. Para la amiodarona se utilizó un gradiente de concentraciones de 0,25 a 128  $\mu$ g/ml dispensándose 50  $\mu$ l desde la columna 11

hasta la 2 (de menor a mayor concentración), del pocillo H hasta el pocillo A. Para la ciclosporina A se utilizó un gradiente de concentraciones de 0,25 a 128 µg/ml dispensándose de idéntica manera 50 µl desde la columna 11 hasta la 2, del pocillo H hasta el pocillo A. Para el ibuprofeno se utilizó un gradiente de concentraciones de 1 a 512 µg/ml dispensándose de menor a mayor concentración 50 µl desde la columna 11 hasta la 2, del pocillo H hasta el pocillo A. Y para la lactoferrina se utilizó un gradiente de concentraciones de 0,0625 a 32 µg/ml dispensándose 50 µl de cada concentración de forma creciente desde la columna 11 hasta la 2, del pocillo H hasta el pocillo A.

Los pocillos de la última columna (A12-G12) se destinaron al control crecimiento del hongo, en los que se añadió 100 µl de RPMI con DMSO al 2% cuando se siguieron las recomendaciones del CLSI y 100 µl de RPMI doble concentrado suplementado con glucosa al 2% y con DMSO al 2% cuando se siguieron las directrices del EUCAST. En la columna 1 (filas de A-G) y en la fila H (columnas de la 2-21) se dispuso 50 µl de RPMI. Los pocillos H1 y H12 se destinaron al control de esterilidad del medio de cultivo, uno el día de la preparación de la microplaca y otro el día de preparación del inóculo.

Se analizaron un total de 32 aislamientos de distintas especies de *Candida* que se seleccionaron después de analizar los resultados obtenidos en las pruebas de sensibilidad a los compuestos estudiados. En esta selección se incluyeron aquellas cepas que mostraban resistencia al fluconazol. Además, se tomó en cuenta los datos de frecuencia para cada especie de *Candida* mostrados en los estudios epidemiológicos, seleccionando así en mayor cantidad aquellas especies que se aíslan con mayor frecuencia en clínica. Al igual que en la determinación de la CMI, los aislamientos de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 o de *Candida krusei* ATCC 625///8 empleados como control de calidad mostraron una CMI para el fluconazol dentro de los rangos publicados, validando así los distintos análisis (Clinical and Laboratory Standards Institute M60, 2017).



**Figura 3.5:** Distribución de las diferentes concentraciones de fármaco en una placa de combinación. Se diferencian 5 zonas; Zona 1, donde se encuentra solo el compuesto dispensado en filas, en nuestro caso fue el fármaco antifúngico fluconazol. Zona 2, donde se encuentra solo el compuesto que se va a combinar con fluconazol dispensado en columnas. Zona 3, control de crecimiento. Zona 4, combinaciones entre el fluconazol y el otro compuesto en forma de tablero de ajedrez. Zona 5, control de esterilidad.

Para la interpretación de las interacciones entre los fármacos, se utilizaron los modelos no paramétricos de las dos teorías de la no interacción, la teoría de la aditividad de Loewe y la teoría de la independencia de Bliss.

### 3.3.2.1. TEORÍA ADITIVA DE LOEWE

Se compararon las concentraciones de los fármacos, solos o en combinación, que producen el mismo efecto. Su modelo no paramétrico se basa en el índice de concentración inhibitoria fraccionada (FICI). El FICI es igual a la suma de las FIC de cada compuesto, que se definen como la CMI de cada fármaco cuando actúa en combinación dividido por la CMI de fármaco cuando actúa solo. El FICI permite clasificar las interacciones como sinérgicas, antagonistas o sin interacción.

$$FICI = \frac{\text{CMI de A en combinación}}{\text{CMI de A solo}} + \frac{\text{CMI de B en combinación}}{\text{CMI de B solo}}$$

Se definió la interacción como sinérgica si el FICI era  $\leq 0,5$ , sin interacción entre 0,5 y 4, y antagonista si el FICI era  $> 4$  (Odds, 2003).

### 3.3.2.2. TEORÍA DE LA INDEPENDENCIA DE BLISS

Se compararon los efectos obtenidos en el experimento con las estimaciones del efecto combinado basados en los efectos del fármaco individual. La teoría de la independencia de Bliss se describió mediante la siguiente ecuación:

$$I_i = (I_A + I_B) - (I_A \times I_B)$$

Donde  $I_i$  es el porcentaje previsto de inhibición de la combinación teórica de fármacos A y B, e  $I_A$  e  $I_B$  son los porcentajes experimentales de inhibición de cada fármaco que actúa solo, respectivamente. Puesto que  $I = 1 - E$  (E es un porcentaje de crecimiento) si se reemplaza en la primera ecuación se obtiene:  $E_i = E_A \times E_B$ , donde  $E_i$  es el porcentaje esperado de crecimiento de la combinación teórica no interactiva de fármacos A y B. La  $E_A$  y  $E_B$  son los porcentajes experimentales de crecimiento de cada fármaco que actúa por sí solo. La interacción se define como la diferencia ( $\Delta E$ ) entre los porcentajes esperados y obtenidos de crecimiento a diversas concentraciones. Se obtiene un resultado de  $\Delta E$  para cada combinación de fármacos según la naturaleza de la interacción. Los parámetros del modelo fueron obtenidos utilizando el software Combenefit (Universidad de Cambridge, Reino Unido). El modelo no paramétrico de  $\Delta E$  se basa en el modelo de Prichard y colaboradores, que permite la construcción de un gráfico tridimensional permitiendo observar la naturaleza y la intensidad de las combinaciones (Prichard et al., 1991; Prichard et al., 1993).

Se calcularon las sumas de los porcentajes de todas las interacciones sinérgicas estadísticamente significativas ( $\Sigma SIN$ ) y antagonistas ( $\Sigma ANT$ ). Cuando la diferencia media fue positiva, así como su intervalo de confianza (IC) del 95% entre las 3 repeticiones, se interpretó como sinergia estadísticamente significativa; cuando la diferencia, así como su IC del 95%, fue

negativa, se interpretó como antagonismo significativo. En cualquier otro caso, se concluyó que no presentaban interacción. Las interacciones con <100% de interacciones estadísticamente significativas se consideraron débiles, aquellas con 100% a 200% de interacciones estadísticamente significativas se consideraron moderadas y aquellas con > 200% de interacciones estadísticamente significativas se consideraron fuertes (Afeltra et al., 2004).

### 3.3.3. CURVAS DE LETALIDAD

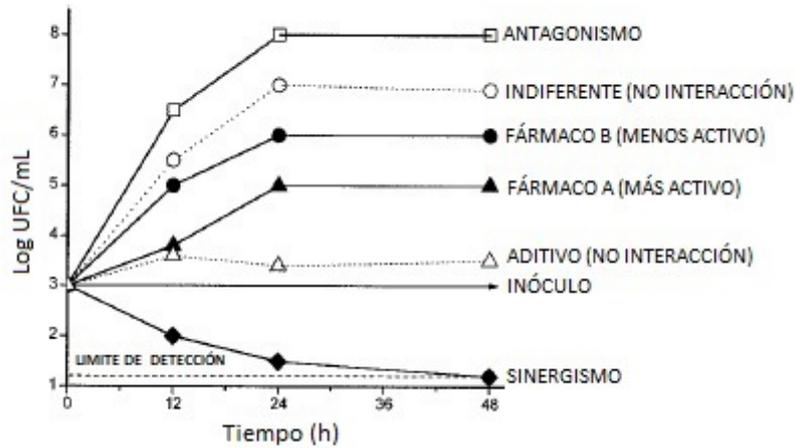
Las curvas de letalidad se realizaron mediante el sistema estático, en el que las cepas se expusieron a una concentración constante de fármaco elegida en función de las CMI y los datos obtenidos en el modelo de tablero de ajedrez. Este análisis se realizó según el estudio descrito por Cantón y colaboradores (Cantón et al., 2004). El estudio se llevó a cabo en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano con RPMI 1640, que se elaboró según el documento M27-A3 para levaduras. El montaje de la placa se realizó añadiendo 100 µl en cada pocillo, por triplicado, bajo el siguiente patrón: un control de crecimiento que únicamente presentaba RPMI con DMSO al 2%, el fluconazol solo en una concentración de 8 µg/ml, el compuesto seleccionado solo y la combinación del antifúngico con ese compuesto. Las diferentes concentraciones de fármaco y de cepas seleccionadas se detallan en la **Tabla 3.5**.

Se estudió el efecto de las combinaciones contra un total de seis aislamientos de *Candida*, seleccionados tras analizar los resultados obtenidos por el método anterior. La preparación del inóculo se realizó como según las recomendaciones del protocolo descrito por el EUCAST. Se suspendieron varias colonias en agua destilada estéril, se ajustó a una turbidez de 0,5 McFarland y se diluyó hasta obtener un inóculo final de  $1-5 \times 10^5$  UFC/ml. La placa se incubó durante un tiempo máximo de 48 h a una temperatura de  $35 \pm 2$  °C.

**Tabla 3.5:** Concentraciones de los fármacos ensayados para obtener las curvas de letalidad.

Cepas estudiadas	Agentes				
	Fluconazol	Amiodarona	Ciclosporina A	Ibuprofeno	Lactoferrina
<i>Candida albicans</i> ATCC 64124					
<i>Candida albicans</i> NCPF 3153			2 µg/ml	64 µg/ml	8 µg/ml
<i>Candida albicans</i> UPV 15-147		2 µg/ml			
<i>Candida albicans</i> UPV 15-154	8 µg/ml		-	-	-
<i>Candida albicans</i> UPV 15-157		-			
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019			2 µg/ml	64 µg/ml	8 µg/ml
<i>Candida parapsilosis</i> NCPF 3104		2 µg/ml			

En los tiempos 0, 2, 4, 6, 24 y 48 h se recogió una muestra (de 6, 10 o 15 µl, en función de la dilución) de los pocillos de la placa tanto del control como de los que contenían el fármaco. Las diluciones se realizaron en PBS en distintas proporciones; 1:100, 1:200, 1:300 y 1:500. De ellas se recogieron 5, 10, 25, 50, 100 µl (dependiendo de la dilución) y se sembraron en placas de AGS por triplicado. Estas placas se incubaron a  $35 \pm 2$  °C durante 24-48 h y se contaron el número de UFC. A partir de esas UFC/ml para cada tiempo y fármaco, se obtuvieron representaciones para cada cepa (**Figura 3.6**). A partir de las curvas de letalidad, se definió una interacción como sinérgica cuando se observó un descenso de  $\geq 2 \log_{10}$  con respecto al fármaco más activo, indiferencia el descenso de  $< 2 \log_{10}$  respecto al fármaco más activo y antagonismo al incremento  $> 2 \log_{10}$  (Sahuquillo et al., 2006). Se consideró efecto fungistático el descenso de  $< 3 \log_{10}$  UFC/ml con respecto al inóculo inicial, mientras que el efecto se consideró fungicida cuando el descenso fue  $> 3 \log_{10}$  UFC/ml con respecto al inóculo inicial de *Candida*.



**Figura 3.6:** Interpretación de las curvas de letalidad en el estudio de las combinaciones de fármacos (Modificada de Mukherjee et al., 2005).

### 3.4. ESTUDIOS IN VIVO

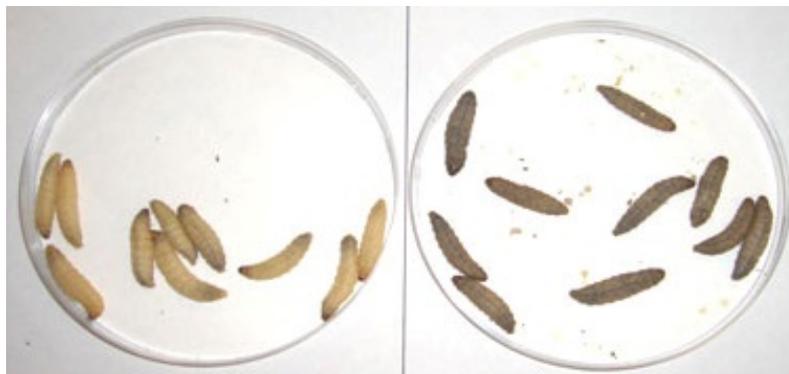
El estudio de la actividad de los fármacos en combinación in vivo se llevó a cabo mediante el modelo animal alternativo en larvas del insecto *Galleria mellonella* (Fuchs et al., 2010; Li et al., 2013). Las larvas se solicitaron a la empresa Bichosa (Galicia) y se utilizaron la semana siguiente de su recepción. Las larvas se mantuvieron a 25 °C de temperatura, con comida y en oscuridad hasta su inoculación.

#### 3.4.1. INFECCIÓN DE *Galleria mellonella* con *Candida*

Los aislamientos de *Candida* seleccionados para el estudio, se sembraron en caldo YPD (2% glucosa, 2% bacto-peptona, 1% extracto de levadura) y se incubaron a 30 °C en un agitador orbital durante 24 h, hasta que alcanzar la fase estacionaria. Posteriormente, las células se recogieron mediante centrifugación a 2500 rpm durante 10 minutos y se lavaron varias veces con PBS. Por último, se resuspendieron en PBS con ampicilina (20 µg/ml), para evitar la contaminación bacteriana. El ajuste de la concentración se realizó mediante el conteo de células al microscopio utilizando la cámara Burker (una concentración inicial de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/ml). Los inóculos se comprobaron mediante la siembra en AGS.

La inoculación de las larvas de *Galleria mellonella* con *Candida* se llevó a cabo en grupos de 10-20 larvas de un peso aproximado de 300-500 mg cada una. El inóculo se inyectó en las larvas mediante una jeringa de precisión de 0,75 mm de diámetro de la aguja. En la última propata izquierda, que previamente se limpió con una torunda humedecida en alcohol a 70%, se inyectaron 10  $\mu$ l del inóculo en tampón PBS suplementado con ampicilina. Las jeringas, previamente y tras ser utilizadas, se lavaron con acetona y alcohol. Además, cada vez que se inoculó una cepa se procedió a un lavado con alcohol.

En todos los ensayos se incluyeron varios controles, un grupo de larvas no infectadas mantenidas en las mismas condiciones de temperatura que las inoculadas y otro grupo de larvas inoculadas con PBS-ampicilina (Mesa-Arango et al., 2013). Las larvas se colocaron en placas de Petri y se incubaron en la oscuridad a 37 °C. Las tasas de mortalidad se determinaron mediante el recuento de las larvas, diferenciando vivas y muertas, cada 24 h. La muerte de las larvas se determinó por la ausencia de respuesta a una estimulación física (ligera presión con pinzas).



**Figura 3.7:** Dos grupos de larvas de *Galleria mellonella*, a la izquierda 10 ejemplares vivos y a la derecha otro grupo de larvas muertas por infección con *Candida* (Kavanagh y Fallon, 2010).

### 3.4.2. EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LOS COMPUESTOS

Tras la infección de las larvas de *Galleria mellonella* con los aislamientos seleccionados, se analizó la eficacia del fluconazol y los compuestos no antifúngicos en solitario, así como la de las combinaciones. Esta eficacia se evaluó estudiando la supervivencia de las larvas infectadas y tratadas con los diferentes compuestos (Scorzoni et al., 2013).

Los fármacos solos y sus combinaciones se inocularon en las larvas inyectando en la última propata derecha 10 µl de cada una de las concentraciones mediante las jeringas de precisión. Este proceso se realizó a continuación de la infección por las distintas especies de *Candida*, realizándose de la misma manera que lo citado con anterioridad. Las concentraciones utilizadas para dicho estudio fueron las siguientes:

**Tabla 3.6:** Fármacos ensayados en los diferentes estudios.

<b>Agente</b>	<b>Farmacología</b>	<b>Concentraciones</b>
Fluconazol	Fármaco antifúngico	32 µg/mL
Amiodarona	Fármaco regulador de la homeostasis	2 µg/mL
Ciclosporina A	Fármaco inhibidor de la calcineurina	2 µg/mL
Ibuprofeno	Fármaco antiinflamatorio no esteroideo	8 µg/mL
Lactoferrina	Glicopeptido antimicrobiano	16 µg/ml

En las combinaciones de los fármacos, sólo se estudió una concentración por grupo de larvas, el fluconazol se analizó a 32 µg/ml, a 2 µg/ml se estudiaron la amiodarona y la ciclosporina A, mientras que el ibuprofeno y la lactoferrina a 16 µg/ml. La supervivencia se controló cada 24 h, observando el número de larvas vivas y muertas, siguiendo las directrices anteriores.

En esta evaluación se utilizaron también distintos controles, un grupo de larvas no infectadas, pero si tratadas con las mismas concentraciones de fármacos y otro grupo de larvas inoculadas con el diluyente que se utilizó para diluir las distintas concentraciones. Estos controles sirvieron para evaluar la posible toxicidad de los fármacos u otros efectos que puedan contribuir en los resultados observados.

### **3.4.3. ANÁLISIS DE LOS DATOS**

El modelo experimental en *Galleria mellonella* se tabuló y representó mediante curvas de supervivencia. La estimación de las diferencias (log rank y pruebas de Wilcoxon) se realizó por el método de Kaplan-Meier (Ortega-Riveros et al., 2017).

## **RESULTADOS**



## 4. RESULTADOS

Resumen del trabajo realizado:

- Se determinó la sensibilidad al fluconazol de las células planctónicas de los distintos aislamientos de *Candida* mediante los métodos de microdilución en caldo M27-A3 y E.def 7.3.1.
- Se estudió la actividad antifúngica de los fármacos no antifúngicos contra distintas especies del género *Candida*.
- Se evaluó la eficacia de las combinaciones entre fluconazol y el resto de los fármacos elegidos mediante los métodos de tablero de ajedrez y las curvas de letalidad.
- Se interpretó la interacción entre los fármacos mediante el índice de concentración inhibitoria fraccionada y el modelo de variación del porcentaje de crecimiento ( $\Delta E$ ).
- Se empleó el modelo alternativo en *Galleria mellonella* para evaluar la eficacia de las combinaciones in vivo.

### 4.1. ANÁLISIS IN VITRO

#### 4.1.1. ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD DE LOS AISLAMIENTOS *Candida* AL FLUCONAZOL Y A LOS FÁRMACOS NO ANTIFÚNGICOS

En un primer experimento se estudió la sensibilidad in vitro de un total de 41 aislamientos de distintas especies del género *Candida* a una serie de fármacos según los criterios propuestos por el CLSI, con el objetivo de seleccionar aquellos agentes que mostrasen actividad antifúngica (**Tabla 4.1**).

En este estudio se analizaron distintos rangos de concentraciones: de 0,0312 a 16  $\mu\text{g/ml}$  para el ciprofloxacino; de 0,0625 a 32  $\mu\text{g/ml}$  para la lactoferrina; de 0,125 a 64  $\mu\text{g/ml}$  para el fluconazol, el levofloxacino, la minociclina y el moxifloxacino; de 0,25 a 128  $\mu\text{g/ml}$  para la

## Materiales y métodos

amiodarona, la doxiciclina y la ciclosporina A; de 0,5 a 256  $\mu\text{g/ml}$  para el ofloxacino y de 1 a 512  $\mu\text{g/ml}$  para el ibuprofeno. La mayoría de las especies de *Candida* fueron sensibles al fluconazol, exceptuando *Candida krusei* que posee una resistencia intrínseca. El resto de los agentes estudiados contra las distintas especies no mostraron una buena actividad antifúngica, ya que en su mayoría las CMI fueron mayores que la concentración más alta estudiada o próximas a esa concentración. La lactoferrina, en cambio, mostró actividad contra algunas especies de *Candida*.

**Tabla 4.1:** Actividad anticandidiásica in vitro de diferentes fármacos (no utilizados habitualmente en el tratamiento de las candidiasis).

	<i>Candida africana</i> (2)	<i>Candida albicans</i> (4)	<i>Candida bracarensis</i> (2)	<i>Candida dubliniensis</i> (3)	<i>Candida glabrata</i> (3)	<i>Candida guilliermondi</i> (4)	<i>Candida krusei</i> (4)
Fluconazol	Rango CMI	0,125 - 0,125	0,125 - 1	2 - 4	0,125 - 1	1 - 8	16 - 32
	MG de la CMI	0,125	0,25	2,83	0,25	4	3,36
	Mediana de la CMI	0,125	0,1875	3	0,125	8	4
Doxiciclina	Rango CMI	> 128 - > 128	128 - > 128	128 - 128	128 - > 128	> 128 - > 128	128 - > 128
	MG de la CMI	> 128	> 128	128	> 128	> 128	> 128
	Mediana de la CMI	> 128	> 128	128	128	> 128	> 128
Minociclina	Rango CMI	64 - 64	> 64 - > 64	> 64 - > 64	64 - > 64	> 64 - > 64	64 - > 64
	MG de la CMI	64	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64
	Mediana de la CMI	64	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64
Moxifloxacino	Rango CMI	> 64 - > 64	64 - > 64	> 64 - > 64	64 - 64	64 - 64	64 - 64
	MG de la CMI	> 64	> 64	> 64	64	64	64
	Mediana de la CMI	> 64	64	> 64	64	64	64
Ciprofloxacino	Rango CMI	> 16 - > 16	16 - > 16	> 16 - > 16	> 16 - > 16	> 16 - > 16	> 16 - > 16
	MG de la CMI	> 16	> 16	> 16	> 16	> 16	> 16
	Mediana de la CMI	> 16	> 16	> 16	> 16	> 16	> 16
Ofloxacino	Rango CMI	> 256 - > 256	128 - > 256	128 - > 256	128 - > 256	256 - > 256	> 256 - > 256
	MG de la CMI	> 256	> 256	256	256	> 256	> 256
	Mediana de la CMI	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256
Levofloxacino	Rango CMI	64 - > 64	> 64 - > 64	> 64 - > 64	64-> 64	64-> 64	64 - > 64
	MG de la CMI	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64
	Mediana de la CMI	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64
Ciclosporina A	Rango CMI	> 128 - > 128	> 128 - > 128	> 128 - > 128	> 128 - > 128	> 128 - > 128	> 128 - > 128
	MG de la CMI	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128
	Mediana de la CMI	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128
Amiodarona	Rango CMI	> 128 - > 128	> 128 - > 128	> 128 - > 128	128 - > 128	128 - 128	128 - > 128
	MG de la CMI	> 128	> 128	> 128	> 128	128	> 128
	Mediana de la CMI	> 128	> 128	> 128	128	128	> 128
Ibuprofeno	Rango CMI	> 512 - > 512	512 - > 512	512 - 512	256 - > 512	512 - 512	512 - > 512
	MG de la CMI	> 512	> 512	512	> 512	512	> 512
	Mediana de la CMI	> 512	> 512	512	> 512	512	> 512
Lactoferrina	Rango CMI	32 - >32	16 - 32	16 - 16	16 - 32	8-16	16 - > 32
	MG de la CMI	> 32	22,63	16	25,40	12,70	26,91
	Mediana de la CMI	> 32	24	16	32	16	24

CMI, concentración mínima inhibitoria en µg/ml; MG, media geométrica; (n), número de aislamientos.

**Tabla 4.1:** (continuación) Actividad anticandidiásica in vitro de diferentes fármacos (no utilizados habitualmente en el tratamiento de las candidiasis).

	<i>Candida lusitanae</i> (3)	<i>Candida metapsilosis</i> (3)	<i>Candida nivariensis</i> (3)	<i>Candida orthopsilosis</i> (3)	<i>Candida parapsilosis</i> (4)	<i>Candida tropicalis</i> (3)	Total	
Fluconazol	Rango CMI	0,25 - 1	0,5 - 2	0,25-16	0,125-1	0,125-64	0,125 - > 64	<b>0,125 - &gt; 64</b>
	MG de la CMI	0,4	0,79	4	0,63	1,41	3,17	<b>1,29</b>
	Mediana de la CMI	0,25	1	16	1	0,625	1	<b>1</b>
Doxiciclina	Rango CMI	> 128 - > 128	128-128	128-128	128 - > 128	128 - > 128	> 128 - > 128	<b>128 - &gt; 128</b>
	MG de la CMI	> 128	128	128	> 128	> 128	> 128	<b>&gt; 128</b>
	Mediana de la CMI	> 128	128	128	> 128	128	> 128	<b>&gt; 128</b>
Minociclina	Rango CMI	64 - > 64	64 - > 64	> 64 - > 64	64 - > 64	32 - 64	> 64 - > 64	<b>32 - &gt; 64</b>
	MG de la CMI	> 64	> 64	> 64	> 64	45,25	> 64	<b>&gt; 64</b>
	Mediana de la CMI	64	64	> 64	> 64	48	> 64	<b>&gt; 64</b>
Ciprofloxacino	Rango CMI	> 16 - > 16	16 - > 16	> 16 - > 16	16 - > 16	16 - > 16	> 16 - > 16	<b>16 - &gt; 16</b>
	MG de la CMI	> 16	> 16	> 16	> 16	> 16	> 16	<b>&gt; 16</b>
	Mediana de la CMI	> 16	16	> 16	> 16	> 16	> 16	<b>&gt; 16</b>
Levofloxacino	Rango CMI	> 64 - > 64	> 64 - > 64	> 64 - > 64	> 64 - > 64	> 64 - > 64	> 64 - > 64	<b>64 - &gt; 64</b>
	MG de la CMI	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	<b>&gt; 64</b>
	Mediana de la CMI	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	<b>&gt; 64</b>
Moxifloxacino	Rango CMI	> 64 - > 64	64 - > 64	64 - > 64	> 64 - > 64	64 - > 64	> 64 - > 64	<b>64 - &gt; 64</b>
	MG de la CMI	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	<b>&gt; 64</b>
	Mediana de la CMI	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	<b>&gt; 64</b>
Ofloxacino	Rango CMI	> 256 - > 256	128 - > 256	128 - > 256	> 256 - > 256	> 256 - > 256	> 256 - > 256	<b>128 - &gt; 256</b>
	MG de la CMI	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	<b>&gt; 256</b>
	Mediana de la CMI	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	<b>&gt; 256</b>
Ciclosporina A	Rango CMI	> 128 - > 128	> 128 - > 128	> 128 - > 128	> 128 - > 128	> 128 - > 128	> 128 - > 128	<b>&gt; 128 - &gt; 128</b>
	MG de la CMI	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	<b>&gt; 128</b>
	Mediana de la CMI	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	<b>&gt; 128</b>
Amiodarona	Rango CMI	> 128 - > 128	> 128 - > 128	128 - > 128	> 128 - > 128	128 - > 128	> 128 - > 128	<b>128 - &gt; 128</b>
	MG de la CMI	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	<b>&gt; 128</b>
	Mediana de la CMI	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	<b>&gt; 128</b>
Ibuprofeno	Rango CMI	512 - 512	512 - > 512	512 - > 512	512 - 512	512 - > 512	> 512 - > 512	<b>256 - &gt; 512</b>
	MG de la CMI	512	> 512	> 512	512	> 512	> 512	<b>&gt; 512</b>
	Mediana de la CMI	512	> 512	> 512	512	512	> 512	<b>&gt; 512</b>
Lactoferrina	Rango CMI	32 - >32	16 - 16	16 - 16	16 - 32	16 - 32	32 - > 32	<b>8 - &gt; 32</b>
	MG de la CMI	> 32	16	16	25,40	26,91	> 32	<b>27,27</b>
	Mediana de la CMI	32	16	16	32	32	32	<b>32</b>

CMI, concentración mínima inhibitoria en µg/ml; MG, media geométrica; (n), número de aislamientos.

Se seleccionaron los fármacos por diferentes criterios:

- Aquel que mostró una CMI menor que la concentración más alta lactoferrina.
- Los fármacos que presentan mejores resultados en otros estudios, como son los inhibidores de la calcineurina (ciclosporina A) o los reguladores del calcio (amiodarona).
- El ibuprofeno, fármaco de uso cotidiano, que a concentraciones altas muestra actividad antifúngica.

Se estudió la sensibilidad de 74 aislamientos de *Candida* al fluconazol y a los cuatro fármacos no antifúngicos seleccionados, mediante el método M27-A3 propuesto por el CLSI y el método Edef 7.3.1 propuesto por el EUCAST.

Las medias geométricas de las CMI del fluconazol a las 24 h contra estas especies mediante el método M27-A3 fueron de 13,5 µg/ml para *Candida albicans*, de 26,9 µg/ml para *Candida glabrata*, de 38,1 µg/ml para *Candida krusei*, de 5,3 µg/ml para *Candida parapsilosis* y de 3,5 µg/ml para *Candida tropicalis*. Ocho de los 12 aislamientos de *Candida glabrata* presentaron una sensibilidad dependiente de la dosis (**Tabla 4.2**). Por otro lado, mediante el método Edef 7.3.1 las medias geométricas de la CMI del fluconazol contra los 74 aislamientos de *Candida* variaron ligeramente (**Tabla 4.2**). Para *Candida albicans* el valor de la media geométrica de la CMI fue de 2,21 µg/ml, para *Candida glabrata* fue de 9,51 µg/ml, para *Candida krusei* fue de 22,63 µg/ml, para *Candida parapsilosis* fue de 1,12 µg/ml y para *Candida tropicalis* fue de 0,84 µg/ml. Cabe destacar que en algunos de los aislamientos estudiados la CMI del fluconazol fue una dilución más alta mediante el método propuesto por el CLSI que mediante el método propuesto por el EUCAST.

La amiodarona, la ciclosporina A y el ibuprofeno, en el rango de concentraciones estudiado, no presentaron actividad contra las distintas especies por cualquiera de los métodos utilizados. En todos los casos la CMI fue superior a la mayor concentración ensayada (**Tabla 4.3 - 4.5**).

## Resultados

**Tabla 4.2:** Actividad anticandidiásica in vitro del fluconazol.

Especies	Aislamientos (n)	CLSI			EUCAST		
		Rango de CMI	MG	Med	Rango de CMI	MG	Med
<i>Candida africana</i>	2	0,125 - 0,25	0,18	0,19	0,125 - 0,25	0,18	0,19
<i>Candida albicans</i>	16	0,125 - >64	13,45	>64	0,125 - >128	8,72	>64
<i>Candida bracarensis</i>	2	2 - 4	2,83	3	2 - 4	2,83	3
<i>Candida dubliniensis</i>	4	0,125 - 1	0,25	0,19	0,125 - 0,25	0,15	0,13
<i>Candida glabrata</i>	12	1 - >64	26,91	32	1 - >64	9,51	8
<i>Candida guilliermondii</i>	4	1 - 8	3,36	4	1 - 8	3,36	4
<i>Candida krusei</i>	4	16 - 64	38,05	48	16 - 64	22,63	24
<i>Candida lusitaniae</i>	3	0,25 - 1	0,40	0,25	0,25 - 0,5	0,31	0,25
<i>Candida metapsilosis</i>	3	0,5 - 2	1	1	0,5 - 1	1	0,5
<i>Candida nivariensis</i>	3	0,25 - 16	4	16	0,25 - 16	4	16
<i>Candida orthopsilosis</i>	6	0,25 - 4	1	1	0,25 - 2	1	1
<i>Candida parapsilosis</i>	10	0,125 - >64	5,28	4	0,25 - >64	1,12	1,5
<i>Candida tropicalis</i>	5	1 - >64	3,48	1	0,25 - >64	0,84	0,75

CMI, concentración mínima inhibitoria en µg/ml; MG, media geométrica; Med, Mediana; n: número de aislamientos.

**Tabla 4.3:** Actividad anticandidiásica in vitro de la amiodarona.

Especies	Aislamientos (n)	CLSI			EUCAST		
		Rango de CMI	MG	Med	Rango de CMI	MG	Med
<i>Candida africana</i>	2	>128 - >128	>128	>128	>128 - >128	>128	>128
<i>Candida albicans</i>	16	>128 - >128	>128	>128	>128 - >128	>128	>128
<i>Candida bracarensis</i>	2	>128 - >128	>128	>128	>128 - >128	>128	>128
<i>Candida dubliniensis</i>	4	>128 - >128	>128	>128	>128 - >128	>128	>128
<i>Candida glabrata</i>	12	>128 - >128	>128	>128	>128 - >128	>128	>128
<i>Candida guilliermondii</i>	4	>128 - >128	>128	>128	>128 - >128	>128	>128
<i>Candida krusei</i>	4	>128 - >128	>128	>128	>128 - >128	>128	>128
<i>Candida lusitaniae</i>	3	>128 - >128	>128	>128	>128 - >128	>128	>128
<i>Candida metapsilosis</i>	3	>128 - >128	>128	>128	>128 - >128	>128	>128
<i>Candida nivariensis</i>	3	>128 - >128	>128	>128	>128 - >128	>128	>128
<i>Candida orthopsilosis</i>	6	>128 - >128	>128	>128	>128 - >128	>128	>128
<i>Candida parapsilosis</i>	10	>128 - >128	>128	>128	>128 - >128	>128	>128
<i>Candida tropicalis</i>	5	>128 - >128	>128	>128	>128 - >128	>128	>128

CMI, concentración mínima inhibitoria en µg/ml; MG, media geométrica; Med, Mediana; n: número de aislamientos.

**Tabla 4.4:** Actividad anticandidiásica in vitro de la ciclosporina.

Especies	Aislamientos (n)	CLSI			EUCAST		
		Rango de CMI	MG	Med	Rango de CMI	MG	Med
<i>Candida africana</i>	2	>128 - >128	>128	>128	>128 - >128	>128	>128
<i>Candida albicans</i>	16	>128 - >128	>128	>128	>128 - >128	>128	>128
<i>Candida bracarensis</i>	2	>128 - >128	>128	>128	>128 - >128	>128	>128
<i>Candida dubliniensis</i>	4	>128 - >128	>128	>128	>128 - >128	>128	>128
<i>Candida glabrata</i>	12	>128 - >128	>128	>128	>128 - >128	>128	>128
<i>Candida guilliermondii</i>	4	>128 - >128	>128	>128	>128 - >128	>128	>128
<i>Candida krusei</i>	4	>128 - >128	>128	>128	>128 - >128	>128	>128
<i>Candida lusitaniae</i>	3	>128 - >128	>128	>128	>128 - >128	>128	>128
<i>Candida metapsilosis</i>	3	>128 - >128	>128	>128	>128 - >128	>128	>128
<i>Candida nivariensis</i>	3	>128 - >128	>128	>128	>128 - >128	>128	>128
<i>Candida orthopsilosis</i>	6	>128 - >128	>128	>128	>128 - >128	>128	>128
<i>Candida parapsilosis</i>	10	>128 - >128	>128	>128	>128 - >128	>128	>128
<i>Candida tropicalis</i>	5	>128 - >128	>128	>128	>128 - >128	>128	>128

CMI, concentración mínima inhibitoria en µg/ml; MG, media geométrica; Med, Mediana; n: número de aislamientos.

**Tabla 4.5:** Actividad anticandidiásica in vitro del ibuprofeno.

Especies	Aislamientos (n)	CLSI			EUCAST		
		Rango de CMI	MG	Med	Rango de CMI	MG	Med
<i>Candida africana</i>	2	>256 - >256	>256	>256	>256 - >256	>256	>256
<i>Candida albicans</i>	16	>256 - >256	>256	>256	>256 - >256	>256	>256
<i>Candida bracarensis</i>	2	>256 - >256	>256	>256	>256 - >256	>256	>256
<i>Candida dubliniensis</i>	4	>256 - >256	>256	>256	>256 - >256	>256	>256
<i>Candida glabrata</i>	12	>256 - >256	>256	>256	>256 - >256	>256	>256
<i>Candida guilliermondii</i>	4	>256 - >256	>256	>256	>256 - >256	>256	>256
<i>Candida krusei</i>	4	>256 - >256	>256	>256	>256 - >256	>256	>256
<i>Candida lusitaniae</i>	3	>256 - >256	>256	>256	>256 - >256	>256	>256
<i>Candida metapsilosis</i>	3	>256 - >256	>256	>256	>256 - >256	>256	>256
<i>Candida nivariensis</i>	3	>256 - >256	>256	>256	>256 - >256	>256	>256
<i>Candida orthopsilosis</i>	6	>256 - >256	>256	>256	>256 - >256	>256	>256
<i>Candida parapsilosis</i>	10	>256 - >256	>256	>256	>256 - >256	>256	>256
<i>Candida tropicalis</i>	5	>256 - >256	>256	>256	>256 - >256	>256	>256

CMI, concentración mínima inhibitoria en µg/ml; MG, media geométrica; Med, Mediana; n: número de aislamientos.

La lactoferrina mostró cierta actividad antifúngica contra algunos aislamientos. Las medias geométricas de las CMI de la lactoferrina obtenidas siguiendo el protocolo M27-A3 fueron de 22,63 µg/ml para *Candida dubliniensis*, 26,91 µg/ml para *Candida glabrata*, 26,91 µg/ml para

## Resultados

*Candida guilliermondii*, 20,16 µg/ml para *Candida metapsilosis* y 20,16 µg/ml para *Candida nivariensis* (Tabla 4.6). Por otro lado, siguiendo el protocolo Edef. 7.3.1 las medias geométricas de las CMI de la lactoferrina fueron de 16 µg/ml para *Candida bracariensis*, de 19,03 µg/ml para *Candida dubliniensis*, de 25,40 µg/ml para *Candida glabrata*, de 16 µg/ml para *Candida metapsilosis* y de 16 µg/ml para *Candida nivariensis* (Tabla 4.6).

**Tabla 4.6:** Actividad anticandidiásica in vitro de la lactoferrina.

Especies	Aislamientos (n)	CLSI			EUCAST		
		Rango de CMI	MG	Med	Rango de CMI	MG	Med
<i>Candida africana</i>	2	32 - >32	>32	>32	>32 - >32	>32	>32
<i>Candida albicans</i>	16	32 - >32	>32	>32	16 - >32	>32	>32
<i>Candida bracarensis</i>	2	16 - 16	16	16	16 - 16	16	16
<i>Candida dubliniensis</i>	4	8 - 32	22,63	32	8 - 32	19,03	24
<i>Candida glabrata</i>	12	16 - >32	26,91	32	16 - 32	25,40	32
<i>Candida guilliermondii</i>	4	16 - >32	26,91	24	16 - >32	>32	32
<i>Candida krusei</i>	4	16 - >32	>32	>32	16 - >32	32	>32
<i>Candida lusitaniae</i>	3	32 - >32	>32	32	32 - >32	>32	32
<i>Candida metapsilosis</i>	3	16 - 32	20,16	16	16 - 16	16	16
<i>Candida nivariensis</i>	3	16 - 32	20,16	16	16 - 16	16	16
<i>Candida orthopsilosis</i>	6	16 - >32	>32	32	16 - >32	32	32
<i>Candida parapsilosis</i>	10	16 - >32	>32	32	32 - >32	>32	32
<i>Candida tropicalis</i>	5	32 - >32	>32	>32	32 - >32	>32	>32

CMI, concentración mínima inhibitoria en µg/ml; MG, media geométrica; Med, Mediana; n: número de aislamientos.

Los valores de CMI nos permitieron clasificar las cepas de *Candida* estudiadas según su sensibilidad al fluconazol utilizando los puntos de corte previamente citados en el apartado de métodos (3.3.1.1.3.). Utilizando los puntos de corte establecidos por el CLSI observamos que de los 16 aislamientos de *Candida albicans* estudiados diez fueron resistentes al fluconazol (62,5%) y 13 no pertenecían a la población salvaje (81,2%), es decir poseen algún mecanismo de resistencia. Los diez aislamientos resistentes no pertenecieron a la población salvaje.

Por otra parte, de los aislamientos de *Candida glabrata* analizados cuatro fueron resistentes al fluconazol (33,3%), mientras que nueve de los 12 aislamientos poseían algún mecanismo de resistencia (75%). Los cuatro aislamientos resistentes no pertenecieron a la población salvaje. De los diez aislamientos de *Candida parapsilosis*, ocho pertenecían a la población no salvaje (80%), mientras que al clasificarlos utilizando los puntos de corte clínicos el número de

aislamientos resistentes al fluconazol fue de 3 (30%), que coincidían también en el grupo de los no pertenecientes a la población salvaje (**Tabla 4.7**).

**Tabla 4.7:** Clasificación de las especies de *Candida* según su sensibilidad al fluconazol por el método CLSI.

Especies	Aislamientos (n)	ECV		CBP		
		WT (%)	No WT (%)	S (%)	SDD (%)	R (%)
<i>Candida albicans</i>	16	3 (18,8)	13 (81,2)	8 (37,5)		10 (62,5)
<i>Candida glabrata</i>	12	3 (25)	9 (75)		8 (66,7)	4 (33,3)
<i>Candida guilliermondii</i>	4	4(100)	-	-	-	-
<i>Candida krusei</i>	4	2 (50)	2 (50)	-	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	10	2 (20)	8 (80)	4 (40)	3 (30)	3 (30)
<i>Candida tropicalis</i>	5	3 (60)	2 (40)	3 (60)	1 (20)	1 (20)

CBP, puntos de corete clínicos; ECV, puntos de corte epidemiológicos; n: número de aislamientos; R, resistente; S, sensible; SDD, sensible dosis dependiente; WT, población salvaje.

Utilizando los puntos de corte establecidos por el EUCAST (**Tabla 4.8**), los 16 aislamientos de *Candida albicans* mostraron los mismos porcentajes tanto mediante los puntos de corte clínico como los epidemiológicos, diez de los 16 aislamientos se clasificaron como resistentes al fluconazol y no pertenecientes a la población salvaje (62,5%). De igual manera se observaron el mismo número de aislamientos de *Candida glabrata* resistentes a este fármaco y con algún mecanismo de resistencia (33,3%). Cabe destacar que el 66,7% de los aislamientos de esta especie mostraron sensibilidad intermedia al fluconazol.

**Tabla 4.8:** Clasificación de las especies de *Candida* según su sensibilidad al fluconazol por el método EUCAST.

Especies	Aislamientos (n)	ECV		CBP		
		WT (%)	No WT (%)	S (%)	I (%)	R (%)
<i>Candida albicans</i>	16	6 (37,5)	10 (62,5)	6 (37,5)		10 (62,5)
<i>Candida glabrata</i>	12	8 (66,7)	4 (33,3)		8 (66,7)	4 (33,3)
<i>Candida guilliermondii</i>	4	4 (100)	-	-	-	-
<i>Candida krusei</i>	4	4 (100)	-	-	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	10	5 (50)	5 (50)	5 (50)	2 (20)	3 (30)
<i>Candida tropicalis</i>	5	3 (60)	2 (40)	3 (60)	1 (20)	1 (20)

CBP, puntos de corete clínicos; ECV, puntos de corte epidemiológicos; n: número de aislamientos; R, resistente; S, sensible; SDD, sensible dosis dependiente; WT, población salvaje.

## Resultados

Los porcentajes de aislamientos resistentes al fluconazol obtenidos mediante los dos métodos, CLSI y EUCAST, fueron iguales. Sin embargo, estos aislamientos no fueron los mismos en ambos casos.

Las **Tablas 4.9** y **4.10** muestran los porcentajes de acuerdo esencial y los índices de CCI que se dan entre los valores de CMI obtenidos para el fluconazol y la lactoferrina con los métodos del EUCAST y CLSI. El acuerdo esencial entre los resultados obtenidos al analizar la sensibilidad al fluconazol por estos dos métodos es excelente (>95%). Los porcentajes de acuerdo esencial varían entre las diferentes especies de *Candida*. Los valores de acuerdo esencial más bajos se observan contra *Candida dubliniensis* (75%). El índice de CCI muestra muy buena correlación entre los resultados obtenidos por ambos métodos ya que es superior al valor de 0,75. Si observamos estos datos centrándonos en las especies la correlación entre los resultados de ambos métodos no fue tan buena, ya que contra *Candida dubliniensis*, *Candida krusei* y *Candida metapsilosis* el CCI fue entre 0,4 y 0,75, por lo que en estos casos los resultados muestran una buena concordancia (**Tabla 4.9**).

**Tabla 4.9:** Concordancia de la sensibilidad al fluconazol entre los métodos EUCAST y CLSI.

Especies	Aislamientos (n)	Acuerdo esencial	CCI
<i>Candida africana</i>	2	100%	1
<i>Candida albicans</i>	16	93,75%	0,851
<i>Candida bracarensis</i>	2	100%	1
<i>Candida dubliniensis</i>	4	75%	0,419
<i>Candida glabrata</i>	12	100%	0,978
<i>Candida guilliermondii</i>	4	100%	1
<i>Candida krusei</i>	4	100%	0,647
<i>Candida lusitaniae</i>	3	100%	0,75
<i>Candida metapsilosis</i>	3	100%	0,667
<i>Candida nivariensis</i>	3	100%	1
<i>Candida orthopsilosis</i>	6	100%	0,779
<i>Candida parapsilosis</i>	10	100%	1
<i>Candida tropicalis</i>	5	80%	1

CCI, coeficiente de correlación intraclase; n: número de aislamientos.

El acuerdo esencial entre los resultados obtenidos al analizar la sensibilidad a la lactoferrina por los métodos CLSI y EUCAST también fue excelente (>98%). El porcentaje más bajo que se observa al diferenciar entre especies es para *Candida albicans* que muestra un acuerdo del

93,75% (Tabla 4.10). Al igual que en el caso anterior, los resultados obtenidos mediante el estudio de la sensibilidad a la lactoferrina por ambos métodos mostraron una muy buena correlación. Solo contra *Candida albicans* se observó un valor de CCI bajo, presentando así unos resultados con una buena concordancia.

**Tabla 4.10:** Concordancia de la sensibilidad a la lactoferrina entre los métodos EUCAST y CLSI.

Especies	Aislamientos (n)	Acuerdo esencial	CCI
<i>Candida africana</i>	2	100%	-
<i>Candida albicans</i>	16	93,75%	0,414
<i>Candida bracarensis</i>	2	100%	-
<i>Candida dubliniensis</i>	4	100%	0,875
<i>Candida glabrata</i>	12	100%	0,784
<i>Candida guilliermondii</i>	4	100%	0,914
<i>Candida krusei</i>	4	100%	0,976
<i>Candida lusitaniae</i>	3	100%	1
<i>Candida metapsilosis</i>	3	100%	-
<i>Candida nivariensis</i>	3	100%	-
<i>Candida orthopsilosis</i>	6	100%	0,975
<i>Candida parapsilosis</i>	10	100%	0,842
<i>Candida tropicalis</i>	5	100%	1

CCI, coeficiente de correlación intraclass; n: número de aislamientos.

#### 4.1.2. ESTUDIO DE LA EFICACIA DE LAS COMBINACIONES ENTRE EL FLUCONAZOL Y LOS AGENTES NO ANTIFÚNGICOS

##### 4.1.2.1. MÉTODO DEL TABLERO DE AJEDREZ

Se estudió la eficacia de las combinaciones entre el fluconazol y los agentes no antifúngicos contra 32 aislamientos de *Candida* mediante el método del tablero de ajedrez. Se evaluó el efecto de los fármacos solos y en combinación a distintas concentraciones de 1-64 µg/ml o de 0,125 a 8 µg/ml para el fluconazol, de 0,25-128 µg/ml para la amiodarona, de 0,25-128 µg/ml para la ciclosporina A, de 1-512 µg/ml para el ibuprofeno y de 0,0625-32 µg/ml para la lactoferrina.

#### 4.1.2.1.1. Combinación de fluconazol y amiodarona

La combinación del fluconazol con la amiodarona redujo notablemente las CMI del fluconazol, además de mostrar sinergismo contra algunos de los aislamientos estudiados.

Los resultados obtenidos por el método del CLSI modificado, mostraron que la combinación de estos dos fármacos contra seis de los diez aislamientos de *Candida albicans* disminuía la CMI del fluconazol (**Tabla 4.11**). Por otro lado, contra seis de los siete aislamientos estudiados de *Candida glabrata* la CMI del fluconazol también se redujo. Esta combinación mostró una buena actividad contra algunos aislamientos de *Candida parapsilosis* y *Candida krusei*. La combinación del fluconazol y de la amiodarona, siguiendo el método del CLSI modificado, mostró un efecto sinérgico contra nueve de los 32 aislamientos analizados (**Tabla 4.12**). La interpretación de los resultados según los modelos de FICI y  $\Delta E$  mostraron buena concordancia a la hora de interpretar el efecto de la combinación contra los diferentes aislamientos de *Candida*. Esta combinación presentó la mejor actividad sinérgica contra los aislamientos de la especie *Candida glabrata*. El modelo FICI, mostró unos rangos de 0,02 hasta 0,27 en aquellos aislamientos en los que la combinación presentó un efecto sinérgico. Para el modelo  $\Delta E$ , los porcentajes de interacciones sinérgicas y antagónicas variaron de 614% a 738% y de -211% hasta -517% para los mismos aislamientos, presentando un fuerte efecto sinérgico en todos los casos. La combinación del fluconazol con la amiodarona presentó también sinergismo contra dos aislamientos de *Candida albicans*, mostrando un rango de FICI de 0,02 hasta 0,07 y unos porcentajes de interacciones sinérgicas y antagónicas de 1418% a 1692% y de -201% a -405%.

La actividad antifúngica de la combinación que se estudió siguiendo el método del EUCAST modificado mostró resultados equivalentes a los observados con el método anterior (**Tabla 4.13**). En seis de los diez aislamientos de *Candida albicans* se observó una fuerte disminución de la CMI del fluconazol, reduciéndose de concentraciones  $>64 \mu\text{g/ml}$  hasta concentraciones  $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ . En el mismo número de aislamientos de *Candida glabrata*, la combinación también disminuyó notablemente la CMI del fluconazol. Al igual que en el método anterior, se observó una buena actividad contra algunos aislamientos de *Candida parapsilosis* y *Candida krusei*. Según el método del EUCAST modificado, el efecto sinérgico de esta combinación fue también similar al mostrado con el método anterior (**Tabla 4.14**). Aunque en este caso se observa

variación al comparar los dos modelos utilizados para la interpretación, ya que utilizando el modelo FICI se observa que la combinación de los fármacos tiene efecto sinérgico contra nueve aislamientos, por el contrario, al utilizar el modelo de  $\Delta E$ , se muestra un efecto sinérgico sobre diez aislamientos. Los nueve aislamientos contra los que la combinación mostró efecto sinérgico mediante el modelo FICI fueron los mismos contra los que se observó sinergismo al interpretar los resultados por el modelo  $\Delta E$ . El efecto de la combinación contra *Candida glabrata* varió según el modelo utilizado, presentando un rango de FICI de 0,02 a 0,27 para cuatro aislamientos y unos porcentajes de interacciones sinérgicas y antagónicas de 674% a 1296% y de -361% a -1201% para cinco aislamientos. Contra *Candida albicans* UPV 10-170 y UPV 15-154 el efecto de la interacción de los dos fármacos fue semejante a lo observado por el método anterior, se obtuvo en este caso un rango de FICI, de 0,02 a 0,26, y de los porcentajes de interacciones sinérgicas y antagónicas de 914% a 1714% y de -134% a -334%.

## Resultados

**Tabla 4.11:** Actividad antifúngica in vitro del fluconazol y de la amiodarona contra *Candida* por el método del CLSI.

Aislamientos	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	Solo		En combinación	
	Fluconazol	Amiodarona	Fluconazol	Amiodarona
<i>Candida albicans</i> ATCC 64124	>64	>128	64	>128
<i>Candida albicans</i> NCPF 3153	1	>128	1	16
<i>Candida albicans</i> UPV 06-100	1	>128	1	128
<i>Candida albicans</i> UPV 06-114	1	>128	0,5	128
<i>Candida albicans</i> UPV 10-166	32	>128	32	>128
<i>Candida albicans</i> UPV 10-170	>64	>128	1	2
<i>Candida albicans</i> UPV 15-147	>64	>128	1	>128
<i>Candida albicans</i> UPV 15-154	>64	>128	8	1
<i>Candida albicans</i> UPV 15-157	>64	>128	1	>128
<i>Candida albicans</i> UPV 15-176	>64	>128	1	>128
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	16	>128	2	8
<i>Candida glabrata</i> UPV 07-185	32	>128	4	0,25
<i>Candida glabrata</i> UPV 07-200	16	>128	2	8
<i>Candida glabrata</i> UPV 11-452	32	>128	16	32
<i>Candida glabrata</i> UPV 15-202	64	>128	32	>128
<i>Candida glabrata</i> UPV 16-006	8	>128	8	0,5
<i>Candida glabrata</i> UPV 16-032	>64	>128	4	0,25
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	32	>128	16	>128
<i>Candida krusei</i> NCPF 3321	32	>128	32	0,25
<i>Candida krusei</i> UPV 03-263	64	>128	32	64
<i>Candida nivariensis</i> CBS 9983	8	>128	4	128
<i>Candida nivariensis</i> CBS 9984	8	>128	4	4
<i>Candida orthopsilosis</i> ATCC 96141	2	>128	2	64
<i>Candida orthopsilosis</i> UPV 09-242	2	>128	0,5	1
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	2	>128	1	>128
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	0,5	>128	0,5	>128
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC MYA 4646	4	>128	4	>128
<i>Candida parapsilosis</i> NCPF 3104	>64	>128	1	32
<i>Candida parapsilosis</i> UPV 12-241	2	>128	2	>128
<i>Candida parapsilosis</i> UPV 15-177	4	>128	4	8
<i>Candida tropicalis</i> UPV 05-014	1	>128	1	2
<i>Candida tropicalis</i> UPV 09-273	>64	>128	4	1

**Tabla 4.12:** Interacción in vitro entre el fluconazol y la amiodarona, según los modelos no paramétricos FICI y  $\Delta E$ , contra cepas de *Candida* por el método del CLSI.

Aislamientos	Modelo FICI			Modelo $\Delta E$		
	FICI	INT	$\Sigma$ SIN (n)	$\Sigma$ ANT (n)	IC 95%	INT
<i>Candida albicans</i> ATCC 64124	1,50	NI	830 (33)	- 809 (37)	- 0,004/0,123	NI
<i>Candida albicans</i> NCPF 3153	1,06	NI	237 (32)	- 253 (30)	0,119/0,412	NI
<i>Candida albicans</i> UPV 06-100	1,50	NI	198 (35)	- 200 (23)	- 0,003/0,230	NI
<i>Candida albicans</i> UPV 06-114	1,00	NI	174 (40)	- 185 (30)	0,018/0,144	NI
<i>Candida albicans</i> UPV 10-166	2,00	NI	466 (32)	- 449 (36)	- 0,002/0,345	NI
<i>Candida albicans</i> UPV 10-170	0,02	SIN	1692 (53)	- 405 (16)	0,173/0,325	SIN
<i>Candida albicans</i> UPV 15-147	1,03	NI	173 (34)	- 156 (36)	- 0,001/0,157	NI
<i>Candida albicans</i> UPV 15-154	0,07	SIN	1418 (56)	- 201 (10)	0,081/0,362	SIN
<i>Candida albicans</i> UPV 15-157	1,14	NI	881 (42)	- 873 (25)	- 0,011/0,440	NI
<i>Candida albicans</i> UPV 15-176	1,06	NI	1779 (40)	- 1838 (30)	0,174/ 0,383	NI
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	0,16	SIN	614 (36)	- 389 (14)	0,082/0,313	SIN
<i>Candida glabrata</i> UPV 07-185	0,13	SIN	696 (51)	- 435 (15)	0,110/0,537	SIN
<i>Candida glabrata</i> UPV 07-200	0,16	SIN	738 (51)	- 517 (18)	0,068/0,321	SIN
<i>Candida glabrata</i> UPV 11-452	0,63	NI	973 (35)	- 946 (33)	- 0,020/0,223	NI
<i>Candida glabrata</i> UPV 15-202	1,50	NI	1025 (30)	- 993 (33)	- 0,011/0,178	NI
<i>Candida glabrata</i> UPV 16-006	1,00	NI	1109 (26)	- 1208 (23)	0,150/0,370	NI
<i>Candida glabrata</i> UPV 16-032	0,06	SIN	687 (60)	- 211 (9)	0,155/0,313	SIN
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	1,50	NI	255 (53)	- 244 (15)	- 0,014/0,174	NI
<i>Candida krusei</i> NCPF 3321	1,00	NI	413 (33)	- 402 (31)	- 0,018/0,351	NI
<i>Candida krusei</i> UPV 03-263	0,75	NI	564 (37)	- 523 (31)	- 0,012/0,348	NI
<i>Candida nivariensis</i> CBS 9983	1,00	NI	1041 (50)	- 1026 (16)	- 0,031/0,184	NI
<i>Candida nivariensis</i> CBS 9984	0,63	NI	1151 (47)	- 1135 (20)	- 0,027/0,175	NI
<i>Candida orthopsilosis</i> ATCC 96141	1,25	NI	1072 (40)	- 1102 (31)	0,105/0,322	NI
<i>Candida orthopsilosis</i> UPV 09-242	0,25	SIN	995 (50)	- 737 (20)	0,159/0,229	SIN
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	1,50	NI	218 (33)	- 152 (35)	- 0,003/0,190	NI
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	2,00	NI	355 (35)	- 304 (32)	- 0,002/0,238	NI
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC MYA 4646	2,00	NI	571 (33)	- 520 (16)	- 0,018/0,325	NI
<i>Candida parapsilosis</i> NCPF 3104	0,13	SIN	1419 (58)	- 211 (8)	0,178/0,420	SIN
<i>Candida parapsilosis</i> UPV 12-241	2,00	NI	536 (33)	- 513 (35)	- 0,015/0,237	NI
<i>Candida parapsilosis</i> UPV 15-177	1,03	NI	783 (43)	- 797 (23)	0,122/0,218	NI
<i>Candida tropicalis</i> UPV 05-014	1,01	NI	706 (28)	- 733 (19)	0,085/0,152	NI
<i>Candida tropicalis</i> UPV 09-273	0,04	SIN	827 (47)	- 330 (20)	0,170/0,355	SIN

IC 95%: Intervalo de confianza del 95%; INT: Interpretación; ANT: Antagonismo; NI: No interacción; SIN: Sinergismo; n: número de interacciones.

## Resultados

**Tabla 4.13:** Actividad antifúngica in vitro del fluconazol y de la amiodarona contra *Candida* por el método del EUCAST.

Aislamientos	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	Solo		En combinación	
	Fluconazol	Amiodarona	Fluconazol	Amiodarona
<i>Candida albicans</i> ATCC 64124	>128	>256	64	>256
<i>Candida albicans</i> NCPF 3153	1	>128	1	64
<i>Candida albicans</i> UPV 06-100	0,25	>128	0,25	32
<i>Candida albicans</i> UPV 06-114	1	>128	0,5	>128
<i>Candida albicans</i> UPV 10-166	32	>128	0,125	>128
<i>Candida albicans</i> UPV 10-170	>64	>128	0,125	64
<i>Candida albicans</i> UPV 15-147	>128	>256	2	>256
<i>Candida albicans</i> UPV 15-154	>64	>128	2	0,25
<i>Candida albicans</i> UPV 15-157	>128	>256	2	>256
<i>Candida albicans</i> UPV 15-176	>128	>256	2	>256
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	8	>128	1	4
<i>Candida glabrata</i> UPV 07-185	16	>128	4	4
<i>Candida glabrata</i> UPV 07-200	16	>128	4	1
<i>Candida glabrata</i> UPV 11-452	64	>128	32	8
<i>Candida glabrata</i> UPV 15-202	32	>128	1	>128
<i>Candida glabrata</i> UPV 16-006	4	>128	4	1
<i>Candida glabrata</i> UPV 16-032	>64	>128	2	0,25
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	16	>128	16	0,5
<i>Candida krusei</i> NCPF 3321	32	>128	32	1
<i>Candida krusei</i> UPV 03-263	32	>128	16	32
<i>Candida nivariensis</i> CBS 9983	8	>128	8	0,25
<i>Candida nivariensis</i> CBS 9984	8	>128	8	0,5
<i>Candida orthopsilosis</i> ATCC 96141	1	>128	0,5	128
<i>Candida orthopsilosis</i> UPV 09-242	2	>128	1	1
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	1	>128	1	>128
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	0,5	>128	0,5	>128
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC MYA 4646	4	>128	2	>128
<i>Candida parapsilosis</i> NCPF 3104	>128	>128	4	1
<i>Candida parapsilosis</i> UPV 12-241	2	>128	1	>128
<i>Candida parapsilosis</i> UPV 15-177	4	>128	4	4
<i>Candida tropicalis</i> UPV 05-014	1	>128	1	2
<i>Candida tropicalis</i> UPV 09-273	>128	>256	4	1

**Tabla 4.14:** Interacción in vitro entre el fluconazol y la amiodarona, según los modelos no paramétricos FICI y  $\Delta E$ , contra cepas de *Candida* por el método del EUCAST.

Aislamientos	Modelo FICI			Modelo $\Delta E$		
	FICI	INT	$\Sigma$ SIN (n)	$\Sigma$ ANT (n)	IC 95%	INT
<i>Candida albicans</i> ATCC 64124	1,25	NI	1012 (30)	- 939 (35)	- 0,005/0,118	NI
<i>Candida albicans</i> NCPF 3153	1,13	NI	317 (32)	- 345 (30)	0,150/0,360	NI
<i>Candida albicans</i> UPV 06-100	1,13	NI	281 (40)	- 245 (23)	- 0,003/0,210	NI
<i>Candida albicans</i> UPV 06-114	1,50	NI	240 (38)	- 253 (30)	0,160/0,360	NI
<i>Candida albicans</i> UPV 10-166	1,00	NI	611 (33)	- 594 (37)	- 0,002/0,304	NI
<i>Candida albicans</i> UPV 10-170	0,26	SIN	914 (40)	- 334 (26)	0,060/0,220	SIN
<i>Candida albicans</i> UPV 15-147	1,01	NI	198 (32)	- 146 (35)	- 0,005/0,149	NI
<i>Candida albicans</i> UPV 15-154	0,02	SIN	1714 (64)	- 134 (6)	0,040/0,360	SIN
<i>Candida albicans</i> UPV 15-157	1,01	NI	911 (43)	- 894 (27)	- 0,007/0,252	NI
<i>Candida albicans</i> UPV 15-176	1,01	NI	1936 (37)	- 2067 (33)	0,123/0,430	NI
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	0,14	SIN	674 (44)	- 425 (20)	0,111/0,364	SIN
<i>Candida glabrata</i> UPV 07-185	0,27	SIN	869 (45)	- 796 (13)	0,102/0,641	SIN
<i>Candida glabrata</i> UPV 07-200	0,25	SIN	1128 (56)	- 866 (14)	0,083/0,337	SIN
<i>Candida glabrata</i> UPV 11-452	0,53	NI	1296 (45)	- 1201 (23)	0,064/0,351	SIN
<i>Candida glabrata</i> UPV 15-202	1,03	NI	897 (33)	- 806 (33)	- 0,008/0,273	NI
<i>Candida glabrata</i> UPV 16-006	1,00	NI	1478 (25)	- 1488 (20)	0,121/0,434	NI
<i>Candida glabrata</i> UPV 16-032	0,02	SIN	851 (51)	- 61 (15)	0,240/0,410	SIN
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	1,13	NI	309 (50)	- 294 (10)	- 0,010/0,235	NI
<i>Candida krusei</i> NCPF 3321	1,00	NI	493 (40)	- 485 (25)	- 0,016/0,245	NI
<i>Candida krusei</i> UPV 03-263	0,63	NI	471 (45)	- 443 (23)	- 0,010/0,338	NI
<i>Candida nivariensis</i> CBS 9983	1,00	NI	763 (59)	- 747 (11)	- 0,025/0,287	NI
<i>Candida nivariensis</i> CBS 9984	1,00	NI	982 (56)	- 955 (13)	- 0,015/0,192	NI
<i>Candida orthopsilosis</i> ATCC 96141	1,00	NI	948 (41)	- 988 (23)	0,143/0,220	NI
<i>Candida orthopsilosis</i> UPV 09-242	0,25	SIN	1185 (49)	- 924 (20)	0,107/0,285	SIN
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	2,00	NI	234 (30)	- 178 (31)	- 0,003/0,134	NI
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	1,50	NI	277 (40)	- 291 (29)	0,044/0,189	NI
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC MYA 4646	1,50	NI	550 (48)	- 443 (20)	- 0,014/0,281	NI
<i>Candida parapsilosis</i> NCPF 3104	0,02	SIN	1602 (50)	0 (0)	0,259/0,418	SIN
<i>Candida parapsilosis</i> UPV 12-241	1,50	NI	409 (30)	- 382 (35)	- 0,010/0,175	NI
<i>Candida parapsilosis</i> UPV 15-177	1,02	NI	765 (55)	- 780 (15)	0,100/0,210	NI
<i>Candida tropicalis</i> UPV 05-014	1,01	NI	853 (33)	- 860 (21)	0,068/0,171	NI
<i>Candida tropicalis</i> UPV 09-273	0,02	SIN	625 (54)	- 101 (14)	0,152/0,358	SIN

IC 95%: Intervalo de confianza del 95%; INT: Interpretación; ANT: Antagonismo; NI: No interacción; SIN: Sinergismo; n: número de interacciones.

#### 4.1.2.1.2. Combinación de fluconazol y ciclosporina A

El estudio de la actividad antifúngica, siguiendo el método del CLSI modificado de la combinación del fluconazol con la ciclosporina A, mostró una elevada disminución de la CMI del fluconazol, reduciéndose de una concentración  $>64$  o  $32 \mu\text{g/ml}$  a  $1$  o  $2 \mu\text{g/ml}$  contra seis aislamientos de *Candida albicans* (**Tabla 4.15**). Por otra parte, también se observó una reducción de la CMI del fluconazol contra los aislamientos de *Candida glabrata*, siendo significativa esta reducción contra *Candida glabrata* UPV 15-202 y *Candida glabrata* UPV 16-032, con un descenso de  $\geq 64$  a  $4 \mu\text{g/ml}$ . La interacción de estos fármacos presentó un efecto sinérgico contra 16 de las 32 cepas estudiadas, de las cuales diez son cepas de *Candida* resistentes al fluconazol (**Tabla 4.16**). La interpretación de los resultados por ambos modelos, FICI y  $\Delta E$ , mostraron muy buena concordancia. Contra seis de los diez los aislamientos de *Candida albicans*, la interacción del fluconazol y la ciclosporina A presentó buena actividad sinérgica, con FICI que varían de  $0,01$  a  $0,31$  y con porcentajes de interacción que van desde  $272\%$  hasta  $2351\%$  y desde  $-114\%$  hasta  $-771\%$ . Por otro lado, contra cinco de las siete cepas de *Candida glabrata* analizadas la combinación mostró un efecto sinérgico. En este caso los rangos de FICI fueron de  $0,07$  a  $0,50$  para las cepas sensibles dosis dependientes y de  $0,06$  para la cepa resistente al fluconazol. Los resultados de la interpretación mediante el modelo  $\Delta E$  mostraron altos porcentajes de interacción sinérgica que oscilaron entre  $904\%$  y  $1589\%$ , mientras que los porcentajes de interacción antagónica variaron de  $-583\%$  a  $-1019\%$ .

La actividad antifúngica analizada mediante la técnica de tablero de ajedrez siguiendo el método del EUCAST modificado mostró que la combinación reduce notablemente la CMI del fluconazol contra varios de los aislamientos de *Candida* estudiados (**Tabla 4.17**). Esta combinación fue sinérgica frente a diferentes aislamientos de *Candida*, siendo muy efectiva contra las cepas de *Candida glabrata* estudiadas (**Tabla 4.18**). La interpretación de la interacción de los fármacos por los dos modelos presento ligeras discrepancias, mostrando la combinación un efecto sinérgico contra *Candida glabrata* UPV 16-006 según el modelo  $\Delta E$ , mientras que, según el modelo FICI el fluconazol y la ciclosporina no interaccionaron por lo que su efecto era indiferente (FICI =  $0,51$ ). En el resto de los casos, los resultados obtenidos por ambos métodos coincidieron. Sin embargo, los valores de FICI obtenidos fueron más bajos, mientras que los

porcentajes de interacción sinérgica y antagónica fueron más altos. Contra las cinco cepas de *Candida albicans* resistentes, la combinación del fluconazol y la ciclosporina A mostró un efecto sinérgico con valores de FICI más bajos (de 0,01 a 0,13) y porcentajes de interacciones sinérgicas y antagónicas más altas que las observadas con el método anterior.

## Resultados

**Tabla 4.15:** Actividad antifúngica in vitro del fluconazol y de la ciclosporina A contra *Candida* por el método del CLSI.

Aislamientos	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	Solo		En combinación	
	Fluconazol	Ciclosporina A	Fluconazol	Ciclosporina A
<i>Candida albicans</i> ATCC 64124	>64	>128	64	2
<i>Candida albicans</i> NCPF 3153	1	>128	0,25	16
<i>Candida albicans</i> UPV 06-100	1	>128	1	0,25
<i>Candida albicans</i> UPV 06-114	1	>128	1	0,5
<i>Candida albicans</i> UPV 10-166	32	>128	2	4
<i>Candida albicans</i> UPV 10-170	>64	>128	1	2
<i>Candida albicans</i> UPV 15-147	>64	>128	1	1
<i>Candida albicans</i> UPV 15-154	>64	>128	1	2
<i>Candida albicans</i> UPV 15-157	>64	>128	1	2
<i>Candida albicans</i> UPV 15-176	>64	>128	1	>128
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	16	>128	2	64
<i>Candida glabrata</i> UPV 07-185	32	>128	4	4
<i>Candida glabrata</i> UPV 07-200	32	>128	2	2
<i>Candida glabrata</i> UPV 11-452	32	>128	8	64
<i>Candida glabrata</i> UPV 15-202	64	>128	4	0,25
<i>Candida glabrata</i> UPV 16-006	8	>128	4	64
<i>Candida glabrata</i> UPV 16-032	>64	>128	4	>128
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	32	>128	32	0,25
<i>Candida krusei</i> NCPF 3321	32	>128	32	0,25
<i>Candida krusei</i> UPV 03-263	64	>128	64	128
<i>Candida nivariensis</i> CBS 9983	8	>128	2	4
<i>Candida nivariensis</i> CBS 9984	8	>128	2	8
<i>Candida orthopsilosis</i> ATCC 96141	2	>128	2	0,25
<i>Candida orthopsilosis</i> UPV 09-242	2	>128	2	0,25
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	1	>128	1	>128
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	0,5	>128	0,25	>128
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC MYA 4646	4	>128	1	32
<i>Candida parapsilosis</i> NCPF 3104	>64	>128	1	4
<i>Candida parapsilosis</i> UPV 12-241	2	>128	2	0,25
<i>Candida parapsilosis</i> UPV 15-177	4	>128	4	0,25
<i>Candida tropicalis</i> UPV 05-014	1	>128	1	2
<i>Candida tropicalis</i> UPV 09-273	>64	>128	1	2

**Tabla 4.16:** Interacción in vitro entre el fluconazol y la ciclosporina A, según los modelos no paramétricos FICI y  $\Delta E$ , contra cepas de *Candida* por el método del CLSI.

Aislamientos	Modelo FICI			Modelo $\Delta E$		
	FICI	INT	$\Sigma$ SIN (n)	$\Sigma$ ANT (n)	IC 95%	INT
<i>Candida albicans</i> ATCC 64124	0,52	NI	1291 (40)	- 1310 (28)	0,345/0,492	NI
<i>Candida albicans</i> NCPF 3153	0,50	SIN	272 (34)	- 154 (32)	0,125/0,393	SIN
<i>Candida albicans</i> UPV 06-100	1,00	NI	182 (22)	- 167 (35)	- 0,010/0,656	NI
<i>Candida albicans</i> UPV 06-114	1,00	NI	244 (34)	- 241 (30)	- 0,011/0,402	NI
<i>Candida albicans</i> UPV 10-166	0,05	SIN	954 (41)	- 771 (20)	0,013/0,352	SIN
<i>Candida albicans</i> UPV 10-170	0,01	SIN	1191 (56)	- 114 (13)	0,129/0,179	SIN
<i>Candida albicans</i> UPV 15-147	0,01	SIN	2351 (54)	- 173 (16)	0,139/0,169	SIN
<i>Candida albicans</i> UPV 15-154	0,02	SIN	2205 (49)	- 487 (19)	0,130/0,162	SIN
<i>Candida albicans</i> UPV 15-157	0,13	SIN	2336 (49)	- 666 (11)	0,144/0,168	SIN
<i>Candida albicans</i> UPV 15-176	1,01	NI	690 (40)	- 699 (21)	0,548/0,785	NI
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	0,27	SIN	996 (38)	- 728 (32)	0,185/0,301	SIN
<i>Candida glabrata</i> UPV 07-185	0,13	SIN	1240 (42)	- 1019 (24)	0,068/0,322	SIN
<i>Candida glabrata</i> UPV 07-200	0,07	SIN	1589 (48)	- 890 (22)	0,031/0,226	SIN
<i>Candida glabrata</i> UPV 11-452	0,13	SIN	904 (37)	- 615 (25)	0,111/0,491	SIN
<i>Candida glabrata</i> UPV 15-202	0,04	SIN	1140 (43)	- 583 (25)	0,112/0,361	SIN
<i>Candida glabrata</i> UPV 16-006	0,51	NI	468 (34)	- 440 (34)	- 0,006/0,402	NI
<i>Candida glabrata</i> UPV 16-032	1,00	NI	441 (35)	- 496 (33)	0,594/0,808	NI
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	0,51	NI	241 (34)	- 292 (33)	0,043/0,221	NI
<i>Candida krusei</i> NCPF 3321	1,03	NI	247 (31)	- 231 (36)	- 0,007/0,297	NI
<i>Candida krusei</i> UPV 03-263	1,03	NI	324 (40)	- 264 (30)	- 0,007/0,353	NI
<i>Candida nivariensis</i> CBS 9983	0,26	SIN	1894 (54)	- 1663 (16)	0,036/0,383	SIN
<i>Candida nivariensis</i> CBS 9984	0,27	SIN	1052 (30)	- 747 (16)	0,022/0,422	SIN
<i>Candida orthopsilosis</i> ATCC 96141	1,00	NI	211 (21)	- 191 (36)	- 0,010/0,393	NI
<i>Candida orthopsilosis</i> UPV 09-242	1,50	NI	319 (26)	- 291 (37)	- 0,012/0,234	NI
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	1,50	NI	172 (44)	- 189 (21)	0,058/0,127	NI
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	1,50	NI	201 (32)	- 243 (30)	0,024/0,151	NI
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC MYA 4646	0,31	SIN	328 (36)	- 125 (27)	0,014/0,185	SIN
<i>Candida parapsilosis</i> NCPF 3104	0,02	SIN	709 (42)	- 480 (28)	0,240/0,302	SIN
<i>Candida parapsilosis</i> UPV 12-241	0,75	NI	166 (26)	- 93 (27)	- 0,011/0,262	NI
<i>Candida parapsilosis</i> UPV 15-177	1,25	NI	247 (17)	- 236 (47)	- 0,005/0,281	NI
<i>Candida tropicalis</i> UPV 05-014	1,01	NI	977 (47)	- 951 (21)	- 0,014/0,394	NI
<i>Candida tropicalis</i> UPV 09-273	0,02	SIN	2129 (50)	- 580 (20)	0,198/0,252	SIN

IC 95%: Intervalo de confianza del 95%; INT: Interpretación; ANT: Antagonismo; NI: No interacción; SIN: Sinergismo; n: número de interacciones.

## Resultados

**Tabla 4.17:** Actividad antifúngica in vitro del fluconazol y de la ciclosporina A contra *Candida* por el método del EUCAST.

Aislamientos	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	Solo		En combinación	
	Fluconazol	Ciclosporina A	Fluconazol	Ciclosporina A
<i>Candida albicans</i> ATCC 64124	>128	>128	128	4
<i>Candida albicans</i> NCPF 3153	1	>128	0,25	64
<i>Candida albicans</i> UPV 06-100	1	>128	1	0,25
<i>Candida albicans</i> UPV 06-114	1	>129	1	0,25
<i>Candida albicans</i> UPV 10-166	32	>128	1	4
<i>Candida albicans</i> UPV 10-170	>64	>128	1	0,25
<i>Candida albicans</i> UPV 15-147	>128	>128	4	1
<i>Candida albicans</i> UPV 15-154	>128	>128	2	2
<i>Candida albicans</i> UPV 15-157	>128	>128	2	1
<i>Candida albicans</i> UPV 15-176	>128	>128	2	>128
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	8	>128	2	4
<i>Candida glabrata</i> UPV 07-185	32	>128	2	2
<i>Candida glabrata</i> UPV 07-200	16	>128	1	2
<i>Candida glabrata</i> UPV 11-452	64	>128	16	16
<i>Candida glabrata</i> UPV 15-202	32	>128	1	2
<i>Candida glabrata</i> UPV 16-006	4	>128	2	2
<i>Candida glabrata</i> UPV 16-032	>64	>128	1	>128
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	32	>128	16	4
<i>Candida krusei</i> NCPF 3321	64	>128	2	>128
<i>Candida krusei</i> UPV 03-263	64	>128	2	>128
<i>Candida nivariensis</i> CBS 9983	8	>128	1	2
<i>Candida nivariensis</i> CBS 9984	8	>128	1	4
<i>Candida orthopsilosis</i> ATCC 96141	1	>128	1	0,25
<i>Candida orthopsilosis</i> UPV 09-242	2	>128	1	>128
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	1	>128	1	>128
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	0,5	>128	0,25	>128
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC MYA 4646	4	>128	1	16
<i>Candida parapsilosis</i> NCPF 3104	>128	>128	2	4
<i>Candida parapsilosis</i> UPV 12-241	2	>128	1	64
<i>Candida parapsilosis</i> UPV 15-177	8	>128	2	>128
<i>Candida tropicalis</i> UPV 05-014	1	>128	1	2
<i>Candida tropicalis</i> UPV 09-273	>128	>128	2	2

**Tabla 4.18:** Interacción in vitro entre el fluconazol y la ciclosporina, según los modelos no paramétricos FICI y ΔE, contra cepas de *Candida* por el método del EUCAST.

Aislamientos	Modelo FICI			Modelo ΔE			IC 95%	INT
	FICI	INT	ΣSIN (n)	ΣANT (n)				
<i>Candida albicans</i> ATCC 64124	0,52	NI	475 (28)	- 485 (22)	0,261/0,352	NI		
<i>Candida albicans</i> NCPF 3153	0,50	SIN	203 (36)	- 90 (29)	0,101/0,355	SIN		
<i>Candida albicans</i> UPV 06-100	1,00	NI	221 (42)	- 145 (24)	- 0,012/0,5096	NI		
<i>Candida albicans</i> UPV 06-114	1,00	NI	403 (37)	- 415 (30)	0,010/0,383	NI		
<i>Candida albicans</i> UPV 10-166	0,05	SIN	1274 (33)	- 957 (22)	0,015/0,291	SIN		
<i>Candida albicans</i> UPV 10-170	0,01	SIN	2841 (42)	- 949 (28)	0,211/0,273	SIN		
<i>Candida albicans</i> UPV 15-147	0,01	SIN	2160 (47)	- 415 (9)	0,084/0,115	SIN		
<i>Candida albicans</i> UPV 15-154	0,02	SIN	2326 (42)	- 620 (15)	0,097/0,160	SIN		
<i>Candida albicans</i> UPV 15-157	0,13	SIN	2409 (48)	- 733 (14)	0,150/0,183	SIN		
<i>Candida albicans</i> UPV 15-176	1,01	NI	769 (15)	- 770 (12)	0,464/0,783	NI		
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	0,27	SIN	1096 (38)	- 828 (32)	0,234/0,349	SIN		
<i>Candida glabrata</i> UPV 07-185	0,13	SIN	2010 (45)	- 1230 (24)	0,083/0,342	SIN		
<i>Candida glabrata</i> UPV 07-200	0,07	SIN	1589 (56)	- 995 (14)	0,048/0,222	SIN		
<i>Candida glabrata</i> UPV 11-452	0,13	SIN	1474 (48)	- 714 (20)	0,113/0,574	SIN		
<i>Candida glabrata</i> UPV 15-202	0,04	SIN	2111 (33)	- 1277 (28)	0,104/0,492	SIN		
<i>Candida glabrata</i> UPV 16-006	0,51	NI	608 (37)	- 535 (23)	0,608/0,816	SIN		
<i>Candida glabrata</i> UPV 16-032	1,00	NI	2232 (17)	- 2202 (11)	- 0,008/0,488	NI		
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	0,51	NI	281 (35)	- 359 (32)	0,034/0,260	NI		
<i>Candida krusei</i> NCPF 3321	1,03	NI	219 (29)	- 195 (34)	- 0,010/0,311	NI		
<i>Candida krusei</i> UPV 03-263	1,03	NI	357 (36)	- 299 (31)	- 0,010/0,350	NI		
<i>Candida nivariensis</i> CBS 9983	0,13	SIN	2369 (50)	- 2123 (20)	0,034/0,387	SIN		
<i>Candida nivariensis</i> CBS 9984	0,14	SIN	1230 (30)	- 1024 (16)	0,023/0,451	SIN		
<i>Candida orthopsilosis</i> ATCC 96141	1,00	NI	507 (43)	- 586 (20)	- 0,008/0,462	NI		
<i>Candida orthopsilosis</i> UPV 09-242	1,50	NI	875 (48)	- 798 (22)	- 0,017/0,211	NI		
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	1,50	NI	353 (43)	- 365 (25)	0,060/0,160	NI		
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	1,50	NI	190 (30)	- 273 (32)	0,020/0,165	NI		
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC MYA 4646	0,31	SIN	1173 (36)	- 538 (23)	0,017/0,230	SIN		
<i>Candida parapsilosis</i> NCPF 3104	0,02	SIN	921 (40)	- 420 (28)	0,233/0,300	SIN		
<i>Candida parapsilosis</i> UPV 12-241	0,75	NI	766 (26)	- 693 (27)	- 0,017/0,299	NI		
<i>Candida parapsilosis</i> UPV 15-177	1,25	NI	853 (37)	- 753 (29)	- 0,010/0,275	NI		
<i>Candida tropicalis</i> UPV 05-014	1,01	NI	876 (44)	- 833 (24)	- 0,011/0,386	NI		
<i>Candida tropicalis</i> UPV 09-273	0,02	SIN	3349 (47)	- 570 (21)	0,193/0,247	SIN		

IC 95%: Intervalo de confianza del 95%; INT: Interpretación; ANT: Antagonismo; NI: No interacción; SIN: Sinergismo; n: número de interacciones.

#### 4.1.2.1.3. Combinación de fluconazol e ibuprofeno

Los resultados obtenidos según el método del CLSI modificado, mostraron que la combinación de fluconazol e ibuprofeno contra siete cepas de *Candida albicans* redujo la CMI del fluconazol (**Tabla 4.19**). En algunos casos, como contra *Candida albicans* UPV 10-170, UPV 15-147 y UPV 15-154, esta reducción fue importante de  $\geq 64$  a 2  $\mu\text{g/ml}$ . Sin embargo, la reducción de la CMI del fluconazol no fue menor contra los aislamientos estudiados de *Candida glabrata*. La interacción entre el ibuprofeno y el fluconazol presentó cierta actividad sinérgica, mostrando sinergismo contra nueve de los 32 aislamientos estudiados (**Tabla 4.20**). Esta combinación también presentó actividad sinérgica contra los seis aislamientos de *Candida albicans* resistentes al fluconazol, tanto al analizar los resultados por el modelo de FICI como por el modelo  $\Delta E$ . Para dichas cepas, el rango de FICI varió de 0,05 a 0,038, mientras que los porcentajes de interacción sinérgica contra *Candida albicans* UPV 10-166, *Candida albicans* UPV 10-170 y *Candida albicans* UPV 15-176 fueron más bajos, 632%, 551% y 450%, respectivamente. El resto mostraron valores altos que oscilaban entre 1017% y 1425%. Los porcentajes de interacción antagónica variaron desde -247% hasta -808%. Al contrario que en el resto de las combinaciones, la adición de ibuprofeno al fluconazol no mostró interacción contra las cepas de *Candida glabrata*, siendo así su efecto indiferente.

La actividad antifúngica de la combinación estudiada según el método del EUCAST modificado, presentó resultados similares a los del método anterior (**Tabla 4.21**). Contra algunos aislamientos de *Candida albicans* se observó una fuerte disminución de la CMI del fluconazol, reduciéndose de concentraciones  $>128$  y  $>64$   $\mu\text{g/ml}$  a concentraciones de 8 y 2  $\mu\text{g/ml}$ . Con este método, todos los aislamientos de *Candida glabrata* mostraron una reducción de la CMI del fluconazol al combinarse con ibuprofeno, aunque esta reducción no fuese notable en todos los casos. Se observó una buena actividad contra dos aislamientos de *Candida krusei*, en los que se observó una reducción de la CMI de 32  $\mu\text{g/ml}$  a 2  $\mu\text{g/ml}$ . Los dos modelos empleados para la interpretación mostraron buena concordancia, el efecto de la combinación fue sinérgico contra nueve aislamientos de *Candida* por ambos modelos (**Tabla 4.22**). El modelo FICI mostró valores que oscilaron entre 0,02 y 0,38 contra las cepas de *Candida albicans* resistentes al fluconazol. Los porcentajes de interacción sinérgica de cuatro de estos aislamientos resistentes a dicho

fármaco fueron altos, variaron de 1196% a 1862% y de -513% a -1310%. Mientras que para el resto de los aislamientos resistentes al fluconazol, *Candida albicans* UPV 10-166 y *Candida albicans* UPV 15-176, fueron porcentajes más bajos, de 415% a 419% y de -168% a -342%.

## Resultados

**Tabla 4.19:** Actividad antifúngica in vitro del fluconazol y del ibuprofeno contra *Candida* por el método del CLSI.

Aislamientos	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	Solo		En combinación	
	Fluconazol	Ibuprofeno	Fluconazol	Ibuprofeno
<i>Candida albicans</i> ATCC 64124	>64	>256	32	>256
<i>Candida albicans</i> NCPF 3153	1	>256	1	>256
<i>Candida albicans</i> UPV 06-100	1	>256	1	0,5
<i>Candida albicans</i> UPV 06-114	1	>256	0,5	128
<i>Candida albicans</i> UPV 10-166	32	>256	2	32
<i>Candida albicans</i> UPV 10-170	>64	>256	2	128
<i>Candida albicans</i> UPV 15-147	>64	>256	2	32
<i>Candida albicans</i> UPV 15-154	>64	>256	2	16
<i>Candida albicans</i> UPV 15-157	>64	>256	8	128
<i>Candida albicans</i> UPV 15-176	>64	>256	32	64
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	16	>256	8	0,5
<i>Candida glabrata</i> UPV 07-185	32	>256	16	1
<i>Candida glabrata</i> UPV 07-200	16	>256	16	0,5
<i>Candida glabrata</i> UPV 11-452	32	>256	16	256
<i>Candida glabrata</i> UPV 15-202	64	>256	32	8
<i>Candida glabrata</i> UPV 16-006	8	>256	8	>256
<i>Candida glabrata</i> UPV 16-032	>64	>256	32	128
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	32	>256	16	16
<i>Candida krusei</i> NCPF 3321	32	>256	16	64
<i>Candida krusei</i> UPV 03-263	64	>256	8	256
<i>Candida nivariensis</i> CBS 9983	8	>256	4	32
<i>Candida nivariensis</i> CBS 9984	8	>256	4	64
<i>Candida orthopsilosis</i> ATCC 96141	2	>256	2	128
<i>Candida orthopsilosis</i> UPV 09-242	4	>256	1	64
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	2	>256	1	256
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	0,5	>256	0,5	256
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC MYA 4646	4	>256	4	>256
<i>Candida parapsilosis</i> NCPF 3104	>64	>256	1	64
<i>Candida parapsilosis</i> UPV 12-241	2	>256	2	64
<i>Candida parapsilosis</i> UPV 15-177	4	>256	4	>256
<i>Candida tropicalis</i> UPV 05-014	1	>256	1	128
<i>Candida tropicalis</i> UPV 09-273	>64	>256	8	64

**Tabla 4.20:** Interacción in vitro entre el fluconazol y el ibuprofeno, según los modelos no paramétricos FICI y  $\Delta E$ , contra cepas de *Candida* por el método del CLSI.

Aislamientos	Modelo FICI			Modelo $\Delta E$			INT
	FICI	INT	$\Sigma$ SIN (n)	$\Sigma$ ANT (n)	IC 95%		
<i>Candida albicans</i> ATCC 64124	1,25	NI	437 (40)	- 494 (22)	0,315/0,468	NI	
<i>Candida albicans</i> NCPF 3153	2,00	NI	521 (32)	- 496 (25)	- 0,009/0,256	NI	
<i>Candida albicans</i> UPV 06-100	1,00	NI	181 (30)	- 139 (40)	- 0,017/0,339	NI	
<i>Candida albicans</i> UPV 06-114	0,75	NI	234 (30)	- 177 (33)	- 0,017/0,282	NI	
<i>Candida albicans</i> UPV 10-166	0,13	SIN	632 (44)	- 247 (25)	0,049/0,263	SIN	
<i>Candida albicans</i> UPV 10-170	0,27	SIN	551 (35)	- 383 (20)	0,143/0,178	SIN	
<i>Candida albicans</i> UPV 15-147	0,08	SIN	1278 (40)	- 479 (30)	0,161/0,205	SIN	
<i>Candida albicans</i> UPV 15-154	0,05	SIN	1425 (35)	- 808 (20)	0,165/0,227	SIN	
<i>Candida albicans</i> UPV 15-157	0,31	SIN	1017 (35)	- 794 (32)	0,314/0,368	SIN	
<i>Candida albicans</i> UPV 15-176	0,38	SIN	450 (27)	- 365 (15)	0,325/0,623	SIN	
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	0,50	NI	397 (30)	- 413 (25)	- 0,001/0,347	NI	
<i>Candida glabrata</i> UPV 07-185	1,00	NI	371 (33)	- 352 (28)	- 0,014/0,407	NI	
<i>Candida glabrata</i> UPV 07-200	1,00	NI	325 (27)	- 291 (18)	- 0,010/0,444	NI	
<i>Candida glabrata</i> UPV 11-452	1,00	NI	802 (40)	- 836 (28)	0,155/0,527	NI	
<i>Candida glabrata</i> UPV 15-202	0,52	NI	443 (30)	- 407 (33)	- 0,014/0,383	NI	
<i>Candida glabrata</i> UPV 16-006	2,00	NI	316 (36)	- 320 (30)	0,059/0,403	NI	
<i>Candida glabrata</i> UPV 16-032	0,75	NI	230 (41)	- 275 (25)	0,022/0,557	NI	
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	0,53	NI	278 (34)	- 310 (30)	0,115/0,236	NI	
<i>Candida krusei</i> NCPF 3321	0,63	NI	232 (50)	- 245 (20)	0,089/0,269	NI	
<i>Candida krusei</i> UPV 03-263	0,63	NI	284 (35)	- 240 (26)	- 0,013/0,331	NI	
<i>Candida nivariensis</i> CBS 9983	0,56	NI	721 (50)	- 743 (20)	0,039/0,608	NI	
<i>Candida nivariensis</i> CBS 9984	0,63	NI	618 (44)	- 656 (25)	0,078/0,596	NI	
<i>Candida orthopsilosis</i> ATCC 96141	1,25	NI	522 (48)	- 554 (21)	0,065/0,327	NI	
<i>Candida orthopsilosis</i> UPV 09-242	0,38	SIN	688 (43)	- 532 (27)	0,016/0,279	SIN	
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	1,00	NI	137 (28)	- 128 (22)	- 0,013/0,231	NI	
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	1,50	NI	309 (33)	- 298 (35)	- 0,015/0,189	NI	
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC MYA 4646	2,00	NI	299 (36)	- 291 (33)	- 0,005/0,130	NI	
<i>Candida parapsilosis</i> NCPF 3104	0,13	SIN	365 (55)	- 140 (15)	0,088/0,129	SIN	
<i>Candida parapsilosis</i> UPV 12-241	1,13	NI	343 (30)	- 318 (34)	- 0,001/0,229	NI	
<i>Candida parapsilosis</i> UPV 15-177	2,00	NI	1530 (49)	- 1562 (20)	0,014/0,232	NI	
<i>Candida tropicalis</i> UPV 05-014	1,25	NI	375 (38)	- 382 (31)	0,102/0,426	NI	
<i>Candida tropicalis</i> UPV 09-273	0,19	SIN	391 (52)	- 175 (12)	0,267/0,352	SIN	

IC 95%: Intervalo de confianza del 95%; INT: Interpretación; ANT: Antagonismo; NI: No interacción; SIN: Sinergismo; n: número de interacciones.

## Resultados

**Tabla 4.21:** Actividad antifúngica in vitro del fluconazol y del ibuprofeno, contra *Candida* por el método del EUCAST.

Aislamientos	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	Solo		En combinación	
	Fluconazol	Ibuprofeno	Fluconazol	Ibuprofeno
<i>Candida albicans</i> ATCC 64124	>128	>512	2	>512
<i>Candida albicans</i> NCPF 3153	1	>256	1	128
<i>Candida albicans</i> UPV 06-100	1	>256	1	1
<i>Candida albicans</i> UPV 06-114	1	>256	0,5	256
<i>Candida albicans</i> UPV 10-166	32	>256	4	32
<i>Candida albicans</i> UPV 10-170	>64	>256	8	128
<i>Candida albicans</i> UPV 15-147	>128	>512	2	32
<i>Candida albicans</i> UPV 15-154	>128	>512	2	16
<i>Candida albicans</i> UPV 15-157	>128	>512	8	128
<i>Candida albicans</i> UPV 15-176	>128	>512	64	128
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	8	>256	4	16
<i>Candida glabrata</i> UPV 07-185	32	>256	16	0,5
<i>Candida glabrata</i> UPV 07-200	16	>256	8	1
<i>Candida glabrata</i> UPV 11-452	64	>512	4	>512
<i>Candida glabrata</i> UPV 15-202	32	>512	16	0,5
<i>Candida glabrata</i> UPV 16-006	4	>512	2	>512
<i>Candida glabrata</i> UPV 16-032	>64	>512	1	>512
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	16	>512	16	>512
<i>Candida krusei</i> NCPF 3321	32	>512	2	>512
<i>Candida krusei</i> UPV 03-263	32	>512	2	512
<i>Candida nivariensis</i> CBS 9983	8	>512	8	1
<i>Candida nivariensis</i> CBS 9984	8	>512	8	2
<i>Candida orthopsilosis</i> ATCC 96141	2	>256	1	64
<i>Candida orthopsilosis</i> UPV 09-242	2	>512	0,5	1
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	1	>512	0,5	256
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	0,5	>256	0,5	128
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC MYA 4646	4	>512	1	>512
<i>Candida parapsilosis</i> NCPF 3104	>128	>512	2	1
<i>Candida parapsilosis</i> UPV 12-241	2	>256	1	256
<i>Candida parapsilosis</i> UPV 15-177	4	>512	2	>512
<i>Candida tropicalis</i> UPV 05-014	1	>256	1	2
<i>Candida tropicalis</i> UPV 09-273	>128	>512	4	64

**Tabla 4.22:** Interacción in vitro entre el fluconazol y el ibuprofeno, según los modelos no paramétricos FICI y  $\Delta E$ , contra cepas de *Candida* por el método del EUCAST.

Aislamientos	Modelo FICI			Modelo $\Delta E$		
	FICI	INT	$\Sigma$ SIN (n)	$\Sigma$ ANT (n)	IC 95%	INT
<i>Candida albicans</i> ATCC 64124	1,01	NI	590 (35)	- 602 (22)	0,340/0,537	NI
<i>Candida albicans</i> NCPF 3153	1,25	NI	421 (35)	- 437 (30)	0,004/0,238	NI
<i>Candida albicans</i> UPV 06-100	1,00	NI	193 (30)	- 168 (37)	- 0,014/0,263	NI
<i>Candida albicans</i> UPV 06-114	1,00	NI	175 (33)	- 143 (35)	- 0,012/0,273	NI
<i>Candida albicans</i> UPV 10-166	0,16	SIN	419 (40)	- 168 (30)	0,074/0,240	SIN
<i>Candida albicans</i> UPV 10-170	0,19	SIN	1527 (43)	- 1310 (24)	0,151/0,241	SIN
<i>Candida albicans</i> UPV 15-147	0,04	SIN	1417 (41)	- 513 (28)	0,098/0,125	SIN
<i>Candida albicans</i> UPV 15-154	0,02	SIN	1862 (35)	- 808 (35)	0,144/0,186	SIN
<i>Candida albicans</i> UPV 15-157	0,16	SIN	1196 (37)	- 932 (32)	0,170/0,297	SIN
<i>Candida albicans</i> UPV 15-176	0,38	SIN	415 (30)	- 342 (23)	0,318/0,586	SIN
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	0,53	NI	413 (34)	- 394 (32)	- 0,002/0,395	NI
<i>Candida glabrata</i> UPV 07-185	0,50	NI	265 (37)	- 159 (22)	- 0,011/0,374	NI
<i>Candida glabrata</i> UPV 07-200	0,50	NI	278 (45)	- 170 (21)	- 0,013/0,553	NI
<i>Candida glabrata</i> UPV 11-452	1,06	NI	1310 (45)	- 1353 (24)	0,187/0,617	NI
<i>Candida glabrata</i> UPV 15-202	0,50	NI	388 (28)	- 381 (39)	- 0,010/0,400	NI
<i>Candida glabrata</i> UPV 16-006	1,50	NI	246 (48)	- 319 (21)	0,052/0,357	NI
<i>Candida glabrata</i> UPV 16-032	1,01	NI	230 (41)	- 195 (25)	- 0,004/0,557	NI
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	2,00	NI	421 (34)	- 453 (32)	0,131/0,324	NI
<i>Candida krusei</i> NCPF 3321	1,06	NI	315 (48)	- 366 (20)	0,118/0,428	NI
<i>Candida krusei</i> UPV 03-263	0,56	NI	256 (35)	- 201 (26)	- 0,011/0,344	NI
<i>Candida nivariensis</i> CBS 9983	1,00	NI	548 (55)	- 565 (10)	0,023/0,393	NI
<i>Candida nivariensis</i> CBS 9984	1,00	NI	627 (50)	- 641 (20)	0,094/0,516	NI
<i>Candida orthopsilosis</i> ATCC 96141	0,63	NI	746 (40)	- 786 (20)	0,077/0,380	NI
<i>Candida orthopsilosis</i> UPV 09-242	0,25	SIN	873 (48)	- 698 (22)	0,025/0,376	SIN
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	0,75	NI	131 (30)	- 119 (29)	- 0,018/0,140	NI
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	1,25	NI	481 (38)	- 458 (22)	- 0,022/0,172	NI
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC MYA 4646	1,25	NI	328 (47)	- 287 (19)	- 0,008/0,162	NI
<i>Candida parapsilosis</i> NCPF 3104	0,01	SIN	493 (51)	- 110 (17)	0,073/0,103	SIN
<i>Candida parapsilosis</i> UPV 12-241	1,00	NI	376 (33)	- 358 (37)	- 0,003/0,267	NI
<i>Candida parapsilosis</i> UPV 15-177	1,50	NI	2044 (57)	- 2096 (10)	0,007/0,268	NI
<i>Candida tropicalis</i> UPV 05-014	1,00	NI	451 (33)	- 469 (30)	0,090/0,407	NI
<i>Candida tropicalis</i> UPV 09-273	0,08	SIN	515 (56)	- 390 (12)	0,250/0,427	SIN

IC 95%: Intervalo de confianza del 95%; INT: Interpretación; ANT: Antagonismo; NI: No interacción; SIN: Sinergismo; n: número de interacciones.

#### 4.1.2.1.4. Combinación de fluconazol y lactoferrina

Los resultados obtenidos por el método de tablero de ajedrez siguiendo el método del CLSI modificado fueron similares a lo observado en el resto de combinaciones, con una disminución de la CMI del fluconazol en el 50% de los aislamientos analizados (**Tabla 4.23**). La CMI se redujo de concentraciones de >64 y 32 µg/ml a 1 - 16 µg/ml Contra los seis aislamientos de *Candida albicans* resistentes al fluconazol. Por otra parte, también se observó una disminución de la CMI del fluconazol contra la mayoría de las cepas de *Candida glabrata* estudiadas. Cabe destacar que contra dos de estas cepas que eran resistentes a dicho fármaco (*Candida glabrata* UPV 15-202 y *Candida glabrata* UPV 16-032) la CMI del fluconazol se redujo de 64 µg/ml a 8 µg/ml y de >64 µg/ml a 1 µg/ml, respectivamente. La interacción de estos fármacos mostró un efecto sinérgico contra varias de las cepas estudiadas (**Tabla 4.24**). Los resultados analizados mediante el modelo FICI y el modelo  $\Delta E$  presentaron ligeras discrepancias, mostrando esta combinación efecto sinérgico contra 13 de los aislamientos de *Candida* estudiados cuando se interpretó mediante el modelo de FICI, mientras que cuando la interacción se analizó utilizando el modelo  $\Delta E$  la combinación mostró actividad sinérgica contra 12 de las cepas de *Candida* estudiadas. La combinación mostró sinergismo contra estos 12 últimos aislamientos mediante los dos modelos de interpretación. Mediante el modelo FICI se definió como sinérgica la combinación de fluconazol y lactoferrina contra *Candida orthopsilosis* UPV 09-242 con un valor de 0,5, mientras que dicha cepa utilizando el modelo  $\Delta E$  no mostró interacción. Contra los aislamientos de *Candida albicans* y *Candida glabrata* la interacción presenta buena actividad sinérgica, con valores de FICI que variaron de 0,09 a 0,38 y con porcentajes de interacción que oscilaron entre 233% y 971% y entre -72% hasta -821%.

La actividad antifúngica analizada mediante el método del EUCAST modificado, mostró similitud con el método descrito en el párrafo anterior. La combinación reduce notablemente la CMI del fluconazol contra varios de los aislamientos de *Candida albicans* estudiados disminuyendo de concentraciones altas como >128, >64 y 32 µg/ml hasta concentraciones entre 1-2 µg/ml (**Tabla 4.25**). Contra las cepas de *Candida glabrata* también se observaron reducciones significativas de la CMI del fluconazol al combinarse con la lactoferrina. Esta combinación mostró un efecto sinérgico contra 15 de las 32 cepas de *Candida* por el modelo FICI (**Tabla 4.26**). Mientras que,

utilizando el modelo  $\Delta E$  se definió la interacción como sinérgica contra 14 de las 32 cepas estudiadas, siendo *Candida krusei* UPV 03-263 la cepa en la que la interacción mostró un valor de FICI de 0,5, que la define como sinérgica, mientras que el modelo  $\Delta E$  mostró una diferencia negativa y un intervalo de confianza positivo que lo define en este caso como indiferente. El resto de aislamientos contra los que la combinación mostró sinergismo fueron los mismos por ambos modelos de interpretación. Los valores de FICI obtenidos contra *Candida albicans* fueron menores que los observados en el método anterior, con rangos que variaron de 0,01 a 0,26.

## Resultados

**Tabla 4.23:** Actividad antifúngica in vitro del fluconazol y de la lactoferrina contra *Candida* por el método del CLSI.

Aislamientos	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	Solo		En combinación	
	Fluconazol	Lactoferrina	Fluconazol	Lactoferrina
<i>Candida albicans</i> ATCC 64124	>64	>32	64	>32
<i>Candida albicans</i> NCPF 3153	1	32	0,5	16
<i>Candida albicans</i> UPV 06-100	1	>32	1	0,0625
<i>Candida albicans</i> UPV 06-114	1	>32	1	8
<i>Candida albicans</i> UPV 10-166	32	>32	1	4
<i>Candida albicans</i> UPV 10-170	>64	>32	2	16
<i>Candida albicans</i> UPV 15-147	>64	>32	16	4
<i>Candida albicans</i> UPV 15-154	>64	>32	16	8
<i>Candida albicans</i> UPV 15-157	>64	>32	8	16
<i>Candida albicans</i> UPV 15-176	>64	>32	8	>32
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	16	16	2	2
<i>Candida glabrata</i> UPV 07-185	32	>32	4	4
<i>Candida glabrata</i> UPV 07-200	32	>32	8	4
<i>Candida glabrata</i> UPV 11-452	32	>32	4	16
<i>Candida glabrata</i> UPV 15-202	64	>32	8	16
<i>Candida glabrata</i> UPV 16-006	8	>32	8	16
<i>Candida glabrata</i> UPV 16-032	>64	>32	1	>32
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	32	16	16	8
<i>Candida krusei</i> NCPF 3321	32	16	32	0,0625
<i>Candida krusei</i> UPV 03-263	64	16	32	0,125
<i>Candida nivariensis</i> CBS 9983	8	32	1	32
<i>Candida nivariensis</i> CBS 9984	8	16	1	16
<i>Candida orthopsilosis</i> ATCC 96141	2	32	1	16
<i>Candida orthopsilosis</i> UPV 09-242	2	>32	0,5	16
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	1	32	1	2
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	0,5	32	0,5	32
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC MYA 4646	4	32	2	8
<i>Candida parapsilosis</i> NCPF 3104	>64	32	16	8
<i>Candida parapsilosis</i> UPV 12-241	2	>32	2	8
<i>Candida parapsilosis</i> UPV 15-177	4	>32	2	>32
<i>Candida tropicalis</i> UPV 05-014	1	32	1	8
<i>Candida tropicalis</i> UPV 09-273	>64	>32	1	8

**Tabla 4.24:** Interacción in vitro entre el fluconazol y la lactoferrina, según los modelos no paramétricos FICI y ΔE, contra cepas de *Candida* por el método del CLSI.

Aislamientos	Modelo FICI		Modelo ΔE					
	FICI	INT	ΣSIN (n)		ΣANT (n)		IC 95%	INT
<i>Candida albicans</i> ATCC 64124	1,50	NI	180	(44)	- 171	(22)	0,221/0,260	NI
<i>Candida albicans</i> NCPF 3153	1,00	NI	207	(37)	- 190	(30)	- 0,017/0,146	NI
<i>Candida albicans</i> UPV 06-100	1,00	NI	153	(50)	- 180	(20)	0,005/0,128	NI
<i>Candida albicans</i> UPV 06-114	1,25	NI	487	(44)	- 511	(22)	0,085/0,371	NI
<i>Candida albicans</i> UPV 10-166	0,09	SIN	732	(46)	- 340	(24)	0,163/0,205	SIN
<i>Candida albicans</i> UPV 10-170	0,27	SIN	484	(40)	- 136	(30)	0,091/0,301	SIN
<i>Candida albicans</i> UPV 15-147	0,19	SIN	523	(56)	- 72	(11)	0,192/0,217	SIN
<i>Candida albicans</i> UPV 15-154	0,25	SIN	587	(55)	- 278	(12)	0,200/0,238	SIN
<i>Candida albicans</i> UPV 15-157	0,31	SIN	233	(48)	- 107	(18)	0,364/0,401	SIN
<i>Candida albicans</i> UPV 15-176	1,06	NI	217	(41)	- 220	(28)	0,466/0,596	NI
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	0,25	SIN	971	(50)	- 652	(20)	0,120/0,330	SIN
<i>Candida glabrata</i> UPV 07-185	0,31	SIN	453	(40)	- 340	(27)	0,280/0,470	SIN
<i>Candida glabrata</i> UPV 07-200	0,31	SIN	658	(40)	- 546	(24)	0,151/0,479	SIN
<i>Candida glabrata</i> UPV 11-452	0,38	SIN	890	(45)	- 796	(20)	0,267/0,713	SIN
<i>Candida glabrata</i> UPV 15-202	0,38	SIN	681	(38)	- 587	(17)	0,221/0,502	SIN
<i>Candida glabrata</i> UPV 16-006	1,25	NI	813	(48)	- 821	(22)	0,165/0,658	NI
<i>Candida glabrata</i> UPV 16-032	1,00	NI	801	(37)	- 810	(26)	0,696/0,836	NI
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	1,00	NI	172	(40)	- 180	(20)	0,023/0,324	NI
<i>Candida krusei</i> NCPF 3321	1,00	NI	639	(40)	- 641	(27)	0,089/0,419	NI
<i>Candida krusei</i> UPV 03-263	0,51	NI	590	(41)	- 605	(33)	0,098/0,522	NI
<i>Candida nivariensis</i> CBS 9983	1,12	NI	263	(33)	- 259	(36)	- 0,011/0,474	NI
<i>Candida nivariensis</i> CBS 9984	1,12	NI	389	(51)	- 396	(20)	0,055/0,465	NI
<i>Candida orthopsilosis</i> ATCC 96141	1,00	NI	214	(30)	- 158	(34)	- 0,043/0,257	NI
<i>Candida orthopsilosis</i> UPV 09-242	0,50	SIN	186	(32)	- 179	(34)	- 0,006/0,281	NI
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	1,06	NI	288	(35)	- 296	(28)	0,001/0,162	NI
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	2,00	NI	432	(35)	- 340	(35)	- 0,009/0,120	NI
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC MYA 4646	0,75	NI	495	(35)	- 457	(30)	- 0,010/0,209	NI
<i>Candida parapsilosis</i> NCPF 3104	0,38	SIN	977	(40)	- 871	(24)	0,308/0,385	SIN
<i>Candida parapsilosis</i> UPV 12-241	1,13	NI	323	(30)	- 300	(35)	- 0,015/0,274	NI
<i>Candida parapsilosis</i> UPV 15-177	1,50	NI	656	(42)	- 670	(27)	0,132/0,427	NI
<i>Candida tropicalis</i> UPV 05-014	1,25	NI	433	(40)	- 445	(29)	0,093/0,283	NI
<i>Candida tropicalis</i> UPV 09-273	0,13	SIN	1022	(44)	- 682	(26)	0,213/0,332	SIN

IC 95%: Intervalo de confianza del 95%; INT: Interpretación; ANT: Antagonismo; NI: No interacción; SIN: Sinergismo; n: número de interacciones.

## Resultados

**Tabla 4.25:** Actividad antifúngica in vitro del fluconazol y de la lactoferrina contra *Candida* por el método del EUCAST.

Aislamientos	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	Solo		En combinación	
	Fluconazol	Lactoferrina	Fluconazol	Lactoferrina
<i>Candida albicans</i> ATCC 64124	>128	32	128	32
<i>Candida albicans</i> NCPF 3153	1	16	0,5	16
<i>Candida albicans</i> UPV 06-100	0,25	16	0,25	0,125
<i>Candida albicans</i> UPV 06-114	1	32	1	4
<i>Candida albicans</i> UPV 10-166	32	>32	0,5	4
<i>Candida albicans</i> UPV 10-170	>64	>32	1	8
<i>Candida albicans</i> UPV 15-147	>128	32	16	0,125
<i>Candida albicans</i> UPV 15-154	>128	>32	2	0,0625
<i>Candida albicans</i> UPV 15-157	>128	>32	2	16
<i>Candida albicans</i> UPV 15-176	>128	>32	2	>32
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	8	8	1	0,5
<i>Candida glabrata</i> UPV 07-185	32	32	8	8
<i>Candida glabrata</i> UPV 07-200	16	32	2	8
<i>Candida glabrata</i> UPV 11-452	64	32	1	8
<i>Candida glabrata</i> UPV 15-202	32	32	4	8
<i>Candida glabrata</i> UPV 16-006	4	32	1	16
<i>Candida glabrata</i> UPV 16-032	>64	32	1	32
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	16	16	8	8
<i>Candida krusei</i> NCPF 3321	32	16	16	0,5
<i>Candida krusei</i> UPV 03-263	32	16	16	0,0625
<i>Candida nivariensis</i> CBS 9983	8	16	4	8
<i>Candida nivariensis</i> CBS 9984	8	16	4	8
<i>Candida orthopsilosis</i> ATCC 96141	2	16	1	4
<i>Candida orthopsilosis</i> UPV 09-242	2	>32	0,5	0,0625
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	2	32	1	2
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	0,5	32	0,25	16
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC MYA 4646	4	32	1	8
<i>Candida parapsilosis</i> NCPF 3104	>128	32	16	4
<i>Candida parapsilosis</i> UPV 12-241	2	>32	1	8
<i>Candida parapsilosis</i> UPV 15-177	8	>32	1	>32
<i>Candida tropicalis</i> UPV 05-014	1	32	0,5	16
<i>Candida tropicalis</i> UPV 09-273	>128	32	2	0,0625

**Tabla 4.26:** Interacción in vitro entre el fluconazol y la lactoferrina, según los modelos no paramétricos FICI y  $\Delta E$ , contra cepas de *Candida* por el método del EUCAST.

Aislamientos	Modelo FICI		Modelo $\Delta E$					
	FICI	INT	$\Sigma$ SIN (n)		$\Sigma$ ANT (n)		IC 95%	INT
<i>Candida albicans</i> ATCC 64124	1,50	NI	322	(44)	- 337	(26)	0,261/0,300	NI
<i>Candida albicans</i> NCPF 3153	1,50	NI	358	(33)	- 335	(35)	- 0,021/0,155	NI
<i>Candida albicans</i> UPV 06-100	1,01	NI	196	(48)	- 221	(18)	0,001/0,134	NI
<i>Candida albicans</i> UPV 06-114	1,12	NI	393	(59)	- 410	(8)	0,076/0,308	NI
<i>Candida albicans</i> UPV 10-166	0,08	SIN	651	(39)	- 221	(24)	0,161/0,197	SIN
<i>Candida albicans</i> UPV 10-170	0,13	SIN	484	(40)	- 136	(30)	0,117/0,180	SIN
<i>Candida albicans</i> UPV 15-147	0,06	SIN	523	(56)	- 102	(11)	0,173/0,203	SIN
<i>Candida albicans</i> UPV 15-154	0,01	SIN	754	(60)	- 89	(10)	0,173/0,200	SIN
<i>Candida albicans</i> UPV 15-157	0,26	SIN	325	(59)	- 13	(8)	0,332/0,373	SIN
<i>Candida albicans</i> UPV 15-176	1,01	NI	276	(47)	- 282	(20)	0,471/ 0,611	NI
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	0,19	SIN	1186	(60)	- 887	(10)	0,122/ 0,288	SIN
<i>Candida glabrata</i> UPV 07-185	0,50	SIN	520	(45)	- 402	(23)	0,285/ 0,501	SIN
<i>Candida glabrata</i> UPV 07-200	0,38	SIN	978	(40)	- 843	(20)	0,153/0,492	SIN
<i>Candida glabrata</i> UPV 11-452	0,28	SIN	913	(48)	- 668	(22)	0,256/0,732	SIN
<i>Candida glabrata</i> UPV 15-202	0,38	SIN	717	(38)	- 629	(24)	0,220/0,521	SIN
<i>Candida glabrata</i> UPV 16-006	0,75	NI	709	(45)	- 715	(22)	0,167/0,639	NI
<i>Candida glabrata</i> UPV 16-032	1,01	NI	864	(40)	- 877	(30)	0,703/0,993	NI
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	1,00	NI	212	(47)	- 214	(18)	0,026/0,396	NI
<i>Candida krusei</i> NCPF 3321	0,53	NI	636	(46)	- 664	(24)	0,080/0,440	NI
<i>Candida krusei</i> UPV 03-263	0,50	SIN	600	(40)	- 618	(30)	0,103/0,550	NI
<i>Candida nivariensis</i> CBS 9983	1,00	NI	238	(34)	- 231	(35)	- 0,010/0,457	NI
<i>Candida nivariensis</i> CBS 9984	1,00	NI	406	(55)	- 423	(15)	0,010/0,368	NI
<i>Candida orthopsilosis</i> ATCC 96141	0,75	NI	169	(26)	- 158	(32)	- 0,016/0,165	NI
<i>Candida orthopsilosis</i> UPV 09-242	0,25	SIN	205	(35)	- 89	(35)	0,064/0,130	SIN
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	0,56	NI	248	(38)	- 265	(24)	0,003/0,129	NI
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	1,00	NI	371	(31)	- 348	(35)	- 0,008/0,161	NI
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC MYA 4646	0,50	SIN	515	(37)	- 363	(30)	0,003/0,208	SIN
<i>Candida parapsilosis</i> NCPF 3104	0,19	SIN	1143	(56)	- 836	(14)	0,143/0,217	SIN
<i>Candida parapsilosis</i> UPV 12-241	0,63	NI	186	(20)	- 161	(44)	- 0,003/0,241	NI
<i>Candida parapsilosis</i> UPV 15-177	1,13	NI	598	(47)	- 604	(23)	0,130/0,419	NI
<i>Candida tropicalis</i> UPV 05-014	1,00	NI	321	(47)	335	(23)	0,085/0,224	NI
<i>Candida tropicalis</i> UPV 09-273	0,01	SIN	1434	(66)	- 8	(2)	0,158/0,218	SIN

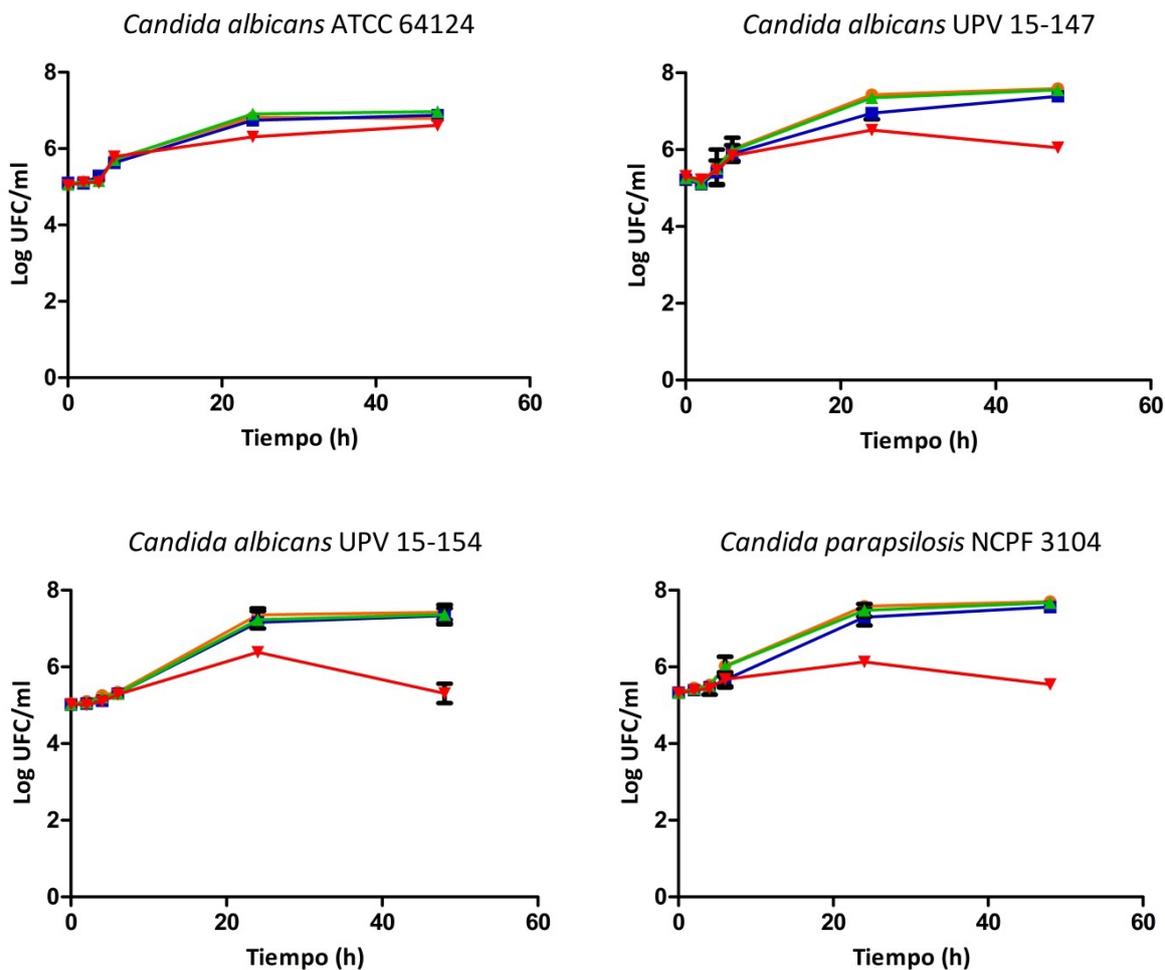
IC 95%: Intervalo de confianza del 95%; INT: Interpretación; ANT: Antagonismo; NI: No interacción; SIN: Sinergismo; n: número de interacciones.

### 4.1.3. CURVAS DE LETALIDAD

Se estudió la eficacia de las combinaciones entre el fluconazol y los agentes no antifúngicos contra cuatro aislamientos de *Candida* y dos cepas de referencia mediante las curvas de letalidad. La selección de las cepas se realizó analizando los resultados obtenidos previamente en el tablero de ajedrez, se escogieron cuatro cepas de *Candida* resistentes al fluconazol y dos cepas sensibles a este mismo fármaco. En el estudio de la combinación de la amiodarona y el fluconazol se cambió una de las cepas seleccionadas, ya que mediante el método de tablero de ajedrez no se observó un efecto sinérgico y se sustituyó *Candida albicans* UPV 15-157 por *Candida albicans* UPV 15-154. Las concentraciones utilizadas se escogieron en función de la CMI, la información obtenida del método anterior y la Cmax, seleccionando así una concentración para cada fármaco, de 8 µg/ml para el fluconazol y la lactoferrina, de 2 µg/ml para la amiodarona y la ciclosporina A y de 64 µg/ml para el ibuprofeno.

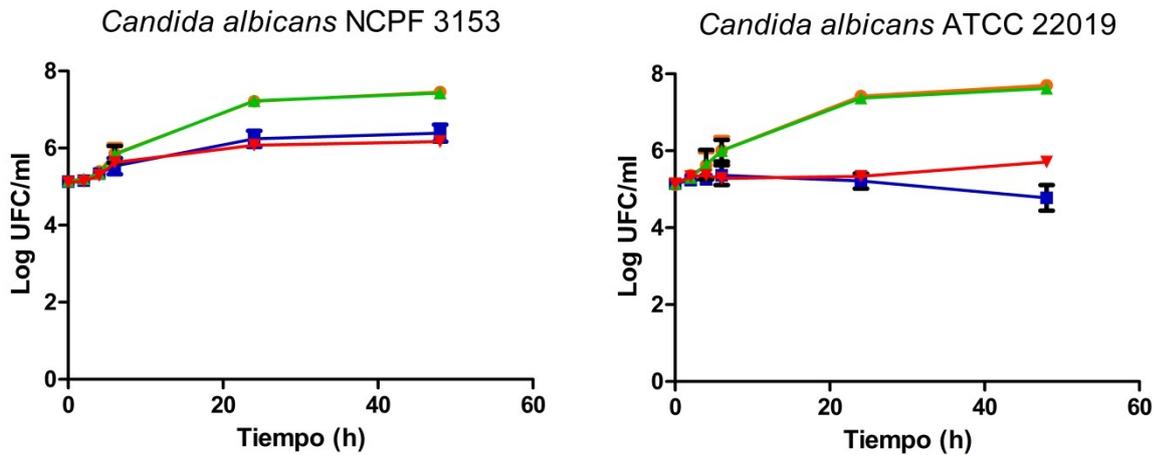
#### 4.1.3.1. COMBINACIÓN DE FLUCONAZOL Y AMIODARONA

Los resultados de la interacción de la amiodarona y el fluconazol obtenidos mediante las curvas de letalidad contra los aislamientos con resistencia al fluconazol, *Candida albicans* ATCC 64124, *Candida albicans* UPV 15-147, *Candida albicans* UPV 15-154 y *Candida parapsilosis* NCPF 3104, mostraron una buena concordancia con los resultados observados mediante el método del tablero de ajedrez. Aunque el efecto fue indiferente contra *Candida albicans* UPV 15-147, con una disminución de 1,385 log UFC/ml, se observó una mejora de la actividad fungistática de la combinación respecto a la actividad del fármaco antifúngico solo (**Figura 4.1 b**). La combinación también mostró un efecto indiferente Contra *Candida albicans* ATCC 64124. Sin embargo, en este caso no se observó una mejora significativa de la actividad (**Figura 4.1 a**). El fluconazol junto con la amiodarona presentó una actividad sinérgica contra *Candida albicans* UPV 15-154 y *Candida parapsilosis* NCPF 3104, ya que se observó una disminución de 2 log UFC/ml y de 2,02 log UFC/ml a las 48 h respecto al fármaco más activo (**Figura 4.1 c y d**).



**Figura 4.1:** Actividad in vitro de la combinación de fluconazol y amiodarona contra cuatro cepas de *Candida* resistentes al fluconazol. (a) *Candida albicans* ATCC 64124; (b) *Candida albicans* UPV 15-147; (c) *Candida albicans* UPV 15-154 y (d) *Candida parapsilosis* NCPF 3104. Circulo naranja, control; triangulo verde, amiodarona; cuadrado azul, fluconazol; triangulo rojo, fluconazol+amiodarona

La interacción entre la amiodarona y el fluconazol contra los aislamientos de *Candida* sensibles al fluconazol mediante ambos métodos, tablero de ajedrez y curvas de letalidad, fue similar. Contra *Candida albicans* NCPF 3153 la interacción de amiodarona con el fluconazol tuvo un efecto indiferente al mostrar una disminución <2 log UFC/ml respecto al fármaco más activo (Figura 4.2 a).

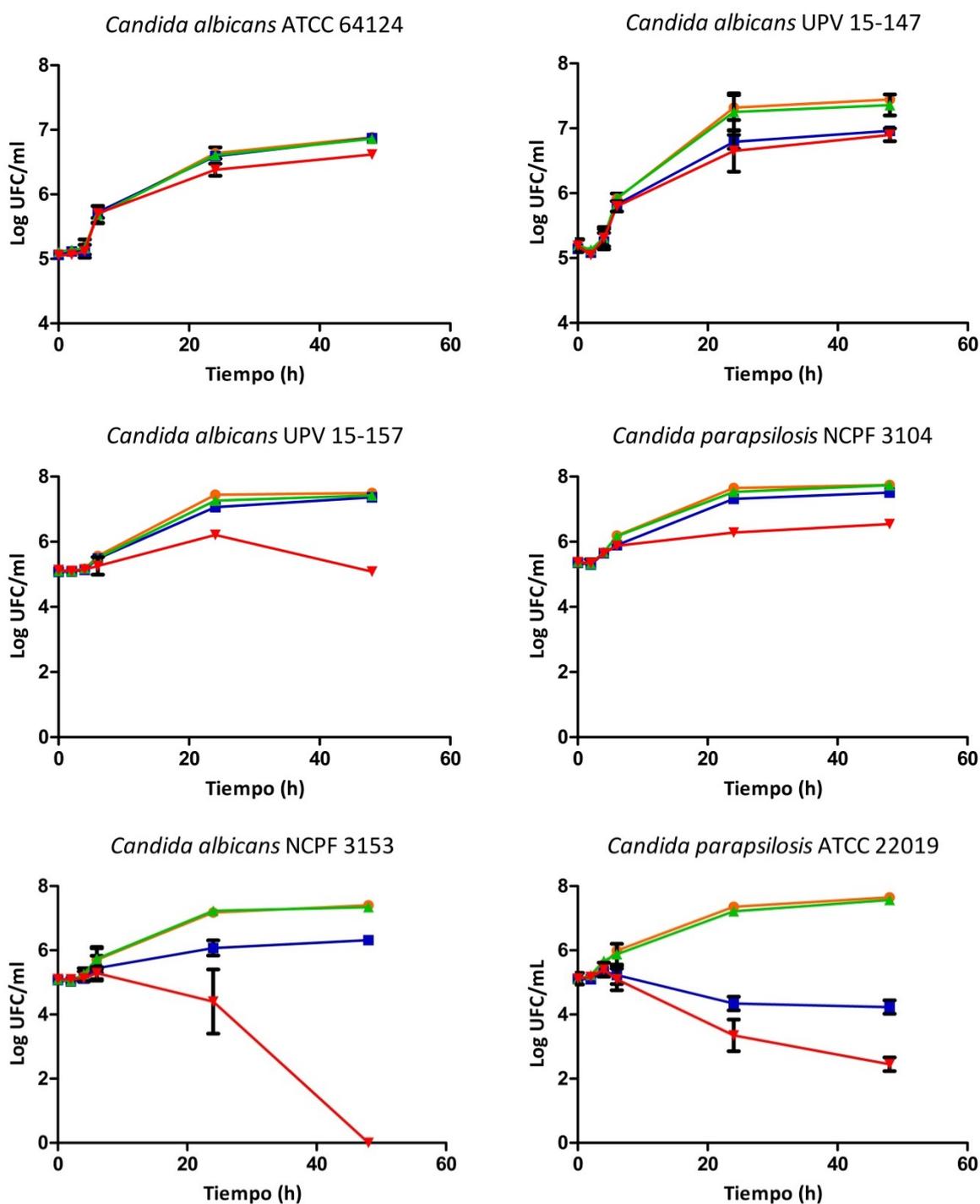


**Figura 4.2:** Actividad in vitro de la combinación de fluconazol y amiodarona contra dos cepas de *Candida* sensibles al fluconazol. (a) *Candida albicans* NCPF 3153 y (b) *Candida albicans* ATCC 22019. Circulo naranja, control; triangulo verde, amiodarona; cuadrado azul, fluconazol; triangulo rojo, fluconazol+amiodarona.

Por otra parte, aunque contra *Candida parapsilosis* ATCC 22019 el efecto de la combinación también fue indiferente, se observó como el fluconazol presentaba una mayor actividad que amiodarona y fluconazol juntos debido a que la curva del fármaco antifúngico solo se ubicó bajo la curva de la combinación (**Figura 4.2 b**).

#### 4.1.3.2. COMBINACIÓN FLUCONAZOL Y CICLOSPORINA A

La interpretación del efecto de la combinación de la ciclosporina A y el fluconazol mediante el estudio de las curvas de letalidad, al igual que en el caso de la amiodarona y el fluconazol, no presentó una equivalencia total con los resultados obtenidos mediante el tablero de ajedrez. En este caso, tanto contra *Candida albicans* UPV 15-147 como contra *Candida parapsilosis* NCPF 3104 el efecto de la combinación no mostró una disminución  $\geq 2$  log UFC/ml con respecto al efecto del fluconazol. Como se observa en la **Figura 4.3 b**, no hay diferencia entre la actividad del fármaco antifúngico solo y la combinación, de tal manera que su efecto se define como indiferente. Al contrario que contra la cepa de *Candida parapsilosis* NCPF 3104, donde se observa que la combinación tiene cierta actividad sobre el crecimiento en comparación con la obtenida por el fármaco antifúngico solo, aunque el efecto del fluconazol y ciclosporina A siga siendo indiferente (**Figura 4.3 d**).



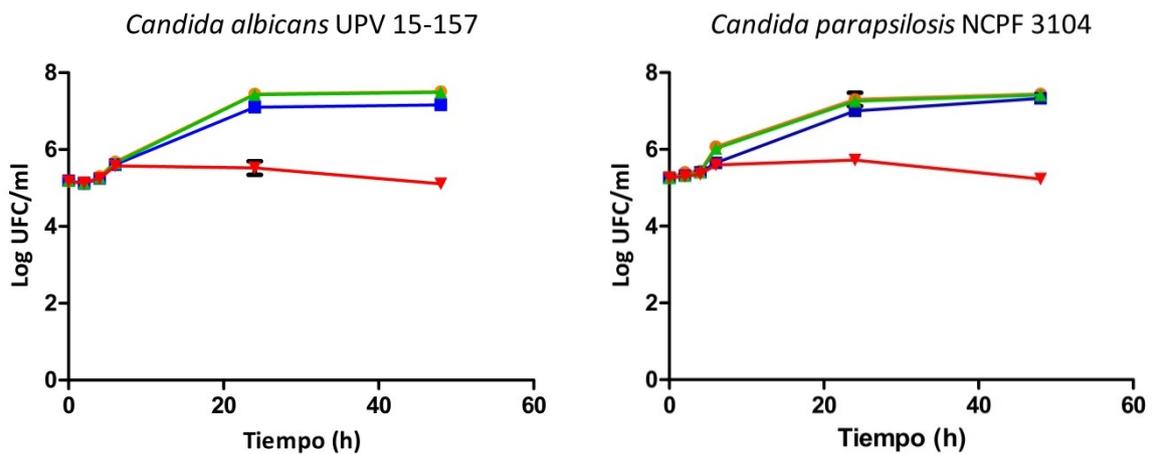
**Figura 4.3:** Actividad in vitro de la combinación de fluconazol y ciclosporina A contra (a) *Candida albicans* ATCC 64124; (b) *Candida albicans* UPV 15-147; (c) *Candida albicans* UPV 15-157; (d) *Candida parapsilosis* NCPF 3104; (e) *Candida albicans* NCPF 3153; (f) *Candida parapsilosis* ATCC 22019. Circulo naranja, control; triangulo verde, ciclosporina A; cuadrado azul, fluconazol; triangulo rojo, fluconazol+ciclosporina A.

## Resultados

Contra el resto de los aislamientos, la actividad del fluconazol combinada con la ciclosporina A mostró unos resultados concordantes con el método de tablero de ajedrez, ya que presentó sinergismo contra *Candida albicans* UPV 15-157 y *Candida albicans* NCPF 3153, mostrando contra la cepa de *Candida albicans* una disminución de 2,28 log UFC/ml a las 48 h en relación al fármaco más activo, mejorando la actividad fungistática del fluconazol (**Figura 4.3 c**). Contra *Candida albicans* NCPF 3153 la disminución a las 48 h de la combinación respecto al fluconazol solo fue >2 log UFC/ml. Además, en este caso la actividad de la combinación fue fungicida al mostrar una reducción >3 log UFC/ml respecto al inóculo inicial (**Figura 4.3 e**). Por otra parte, la ciclosporina A no interactuó con el fluconazol contra *Candida albicans* ATCC 64124, mostrando un efecto indiferente (**Figura 4.3 a**). Aunque la combinación de estos fármacos contra la cepa sensible al fluconazol *Candida parapsilosis* ATCC 22019 presentó un efecto indiferente en ambas técnicas, las curvas de letalidad nos han permitido observar que la adición de la ciclosporina A al fluconazol mejora su actividad fungistática. En la **Figura 4.3 f**, la combinación contra *Candida parapsilosis* ATCC 22019 a las 48 h presenta una disminución de 1,78 log UFC/ml respecto al fluconazol y una reducción de 2,63 log UFC/ml respecto al inóculo inicial.

### 4.1.3.3. COMBINACIÓN DE FLUCONAZOL E IBUPROFENO

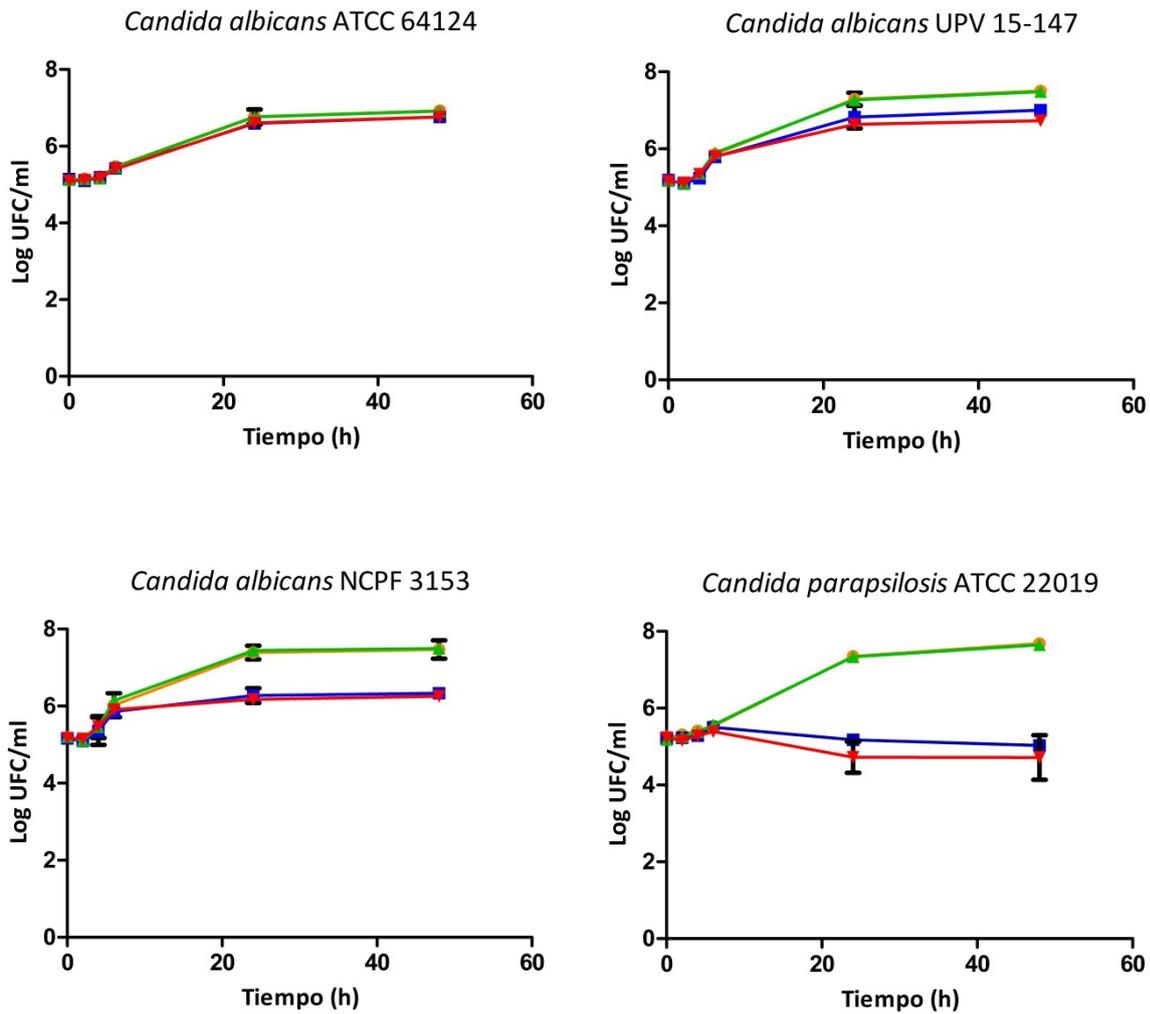
La combinación del ibuprofeno y el fluconazol mostró efecto sinérgico contra dos de los seis aislamientos estudiados mediante la técnica de las curvas de letalidad (**Figura 4.4**). Tanto contra *Candida albicans* UPV 15-157 como contra *Candida parapsilosis* NCPF 3104 el efecto de la combinación por este método y el de tablero de ajedrez mostró concordancia. La reducción respecto al fluconazol observada a las 48 h contra *Candida albicans* UPV 15-157 fue de 2,05 UFC/ml, mientras que contra *Candida parapsilosis* NCPF 3104 fue de 2,11 UFC/ml. Contra estas dos cepas la combinación mejoró la actividad del fluconazol, reduciendo el crecimiento de los aislamientos de *Candida* que en este caso eran resistentes a dicho agente antifúngico.



**Figura 4.4:** Actividad in vitro de la combinación de fluconazol e ibuprofeno contra (a) *Candida albicans* UPV 15-154 y (b) *Candida parapsilosis* NCPF 3104. Circulo naranja, control; triangulo verde, ibuprofeno; cuadrado azul, fluconazol; triangulo rojo, fluconazol+ibuprofeno.

El ibuprofeno junto con el fluconazol mostró un efecto indiferente contra el resto de cepas de *Candida* estudiadas, siendo similar al obtenido mediante el tablero de ajedrez exceptuando el resultado contra *Candida albicans* UPV 15-147 para la cual la combinación presentó un efecto sinérgico al estudiarla mediante dicha técnica (**Figura 4.5**).

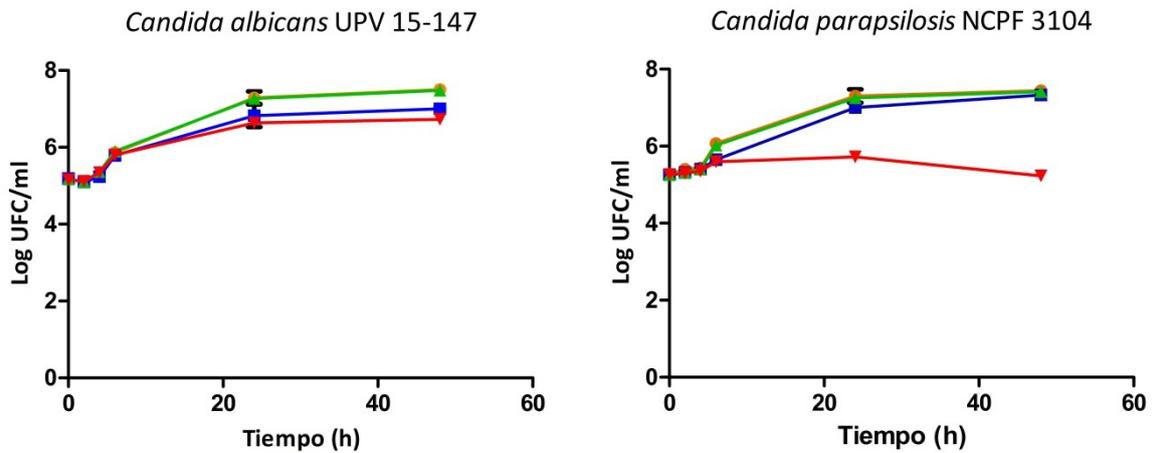
## Resultados



**Figura 4.5:** Actividad in vitro de la combinación de fluconazol e ibuprofeno contra (a) *Candida albicans* ATCC 64124; (b) *Candida albicans* UPV 15-147; (c) *Candida albicans* NCPF 3153 y (d) *Candida albicans* ATCC 22019. Circulo naranja, control; triangulo verde, ibuprofeno; cuadrado azul, fluconazol; triangulo rojo, fluconazol+ibuprofeno.

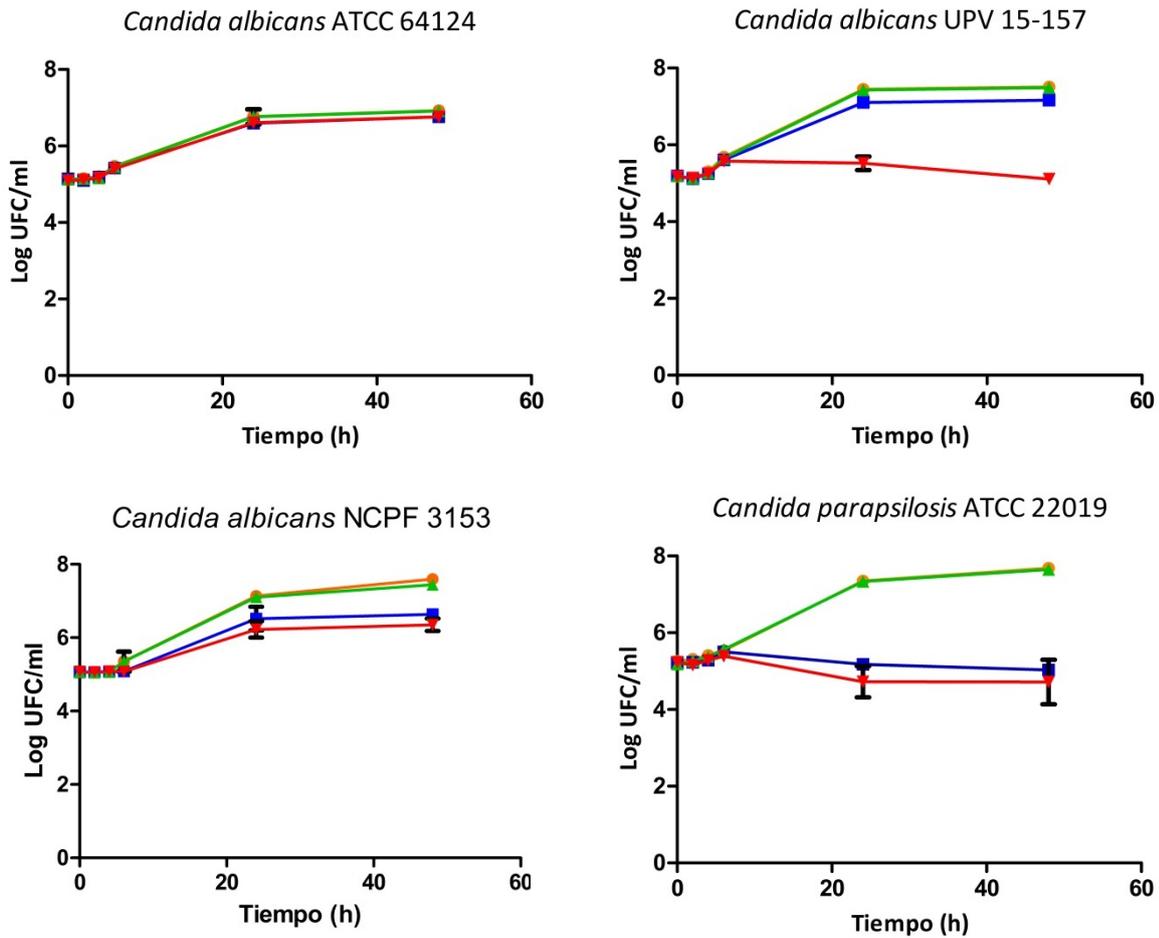
### 4.1.3.4. COMBINACIÓN DE FLUCONAZOL Y LACTOFERRINA

El efecto de la combinación de la lactoferrina y el fluconazol analizado mediante la técnica de las curvas de letalidad contra *Candida albicans* UPV 15-147 y *Candida parapsilosis* NCPF 3104 presentó discrepancias al compararlo con los resultados previamente obtenidos (**Figura 4.6 b y d**). En este caso, el efecto de la combinación fue indiferente contra ambos aislamientos, aunque contra la cepa de *Candida parapsilosis* presentó una reducción de 1,3 log UFC/ml respecto al fluconazol tras 48 h (**Figura 4.6 d**).



**Figura 4.6:** Actividad in vitro de la combinación de fluconazol y lactoferrina (a) *Candida albicans* UPV 15-147 y (b) *Candida parapsilosis* NCPF 3104. Circulo naranja, control; triangulo verde, lactoferrina; cuadrado azul, fluconazol; triangulo rojo, fluconazol+lactoferrina.

En los demás casos evaluados, la interpretación de la interacción entre ambos fármacos por los dos métodos (curvas de letalidad y tablero de ajedrez) presentó gran similitud. El fluconazol junto a la lactoferrina mostraron sinergismo contra *Candida albicans* UPV 15-157 con una disminución de 2 log UFC/ml respecto al fármaco más activo. La combinación no mostró actividad fungicida, pero si mejoró la actividad antifúngica del fluconazol (**Figura 4.7 c**). Por el contrario, la adición de lactoferrina al fluconazol contra *Candida parapsilosis* ATCC 22019 mostró una mejora en la actividad del fluconazol tanto a las 24 h como a las 48 h, aunque el efecto fuese indiferente (**Figura 4.7 f**).

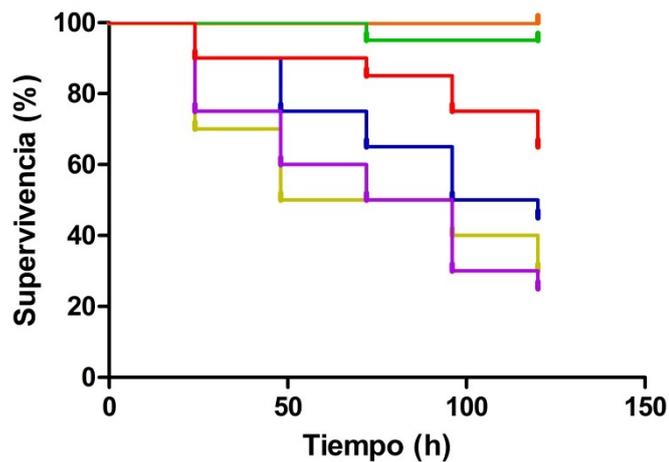


**Figura 4.7:** Actividad in vitro de la combinación de fluconazol y lactoferrina contra (a) *Candida albicans* ATCC 64124; (b) *Candida albicans* UPV 15-157; (c) *Candida albicans* NCPF 3153 y (d) *Candida albicans* ATCC 22019. Circulo naranja, control; triangulo verde, lactoferrina; cuadrado azul, fluconazol; triangulo rojo, fluconazol+lactoferrina.

#### 4.2. ANÁLISIS IN VIVO DEL TRATAMIENTO DE LA CANDIDIASIS EXPERIMENTAL EN *Galleria mellonella*

Se estudió la eficacia terapéutica de las combinaciones entre el fluconazol y los agentes no antifúngicos en un modelo de candidiasis con la cepa *Candida krusei* ATCC 6258 en *Galleria mellonella*. Las concentraciones utilizadas fueron de 32 µg/ml de fluconazol, de 2 µg/ml de amiodarona y ciclosporina A, de 8 µg/ml para el ibuprofeno y de 16 µg/ml lactoferrina. En todos los ensayos se incluyeron varios controles, un grupo de larvas no infectadas mantenidas en las mismas condiciones que las inoculadas, otro grupo de larvas inoculadas con PBS-ampicilina, un

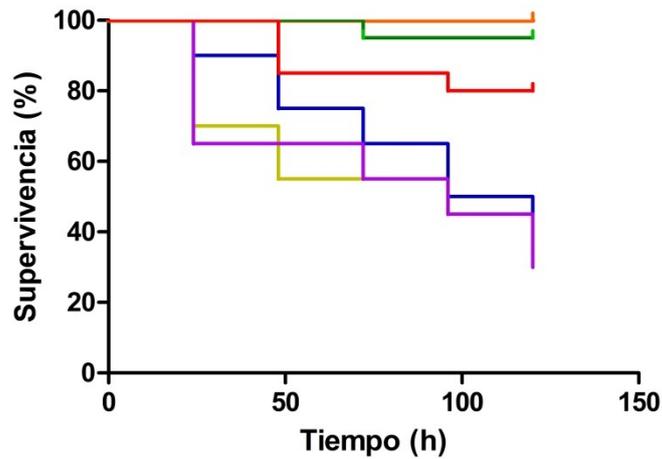
grupo de larvas no infectadas, pero si tratadas con las mismas concentraciones de fármacos y otro grupo de larvas inoculadas con los distintos diluyentes utilizados en este estudio. Se realizó un estudio para observar la influencia de los compuestos y diluyentes empleados sobre las larvas. Los resultados no mostraron ningún efecto destacable mostrando en todos los casos supervivencias elevadas.



**Figura 4.8:** Actividad terapéutica de la combinación de fluconazol y amiodarona en la candidiasis experimental con *Candida krusei* ATCC 6258. Curva naranja, control; curva verde, PBS + ampicilina; curva amarilla, sin tratamiento; curva azul, fluconazol 32 µg/ml; curva morada, amiodarona 2 µg/ml; curva roja, fluconazol + amiodarona. Inoculo inicial  $1 \times 10^6$  células/larva.

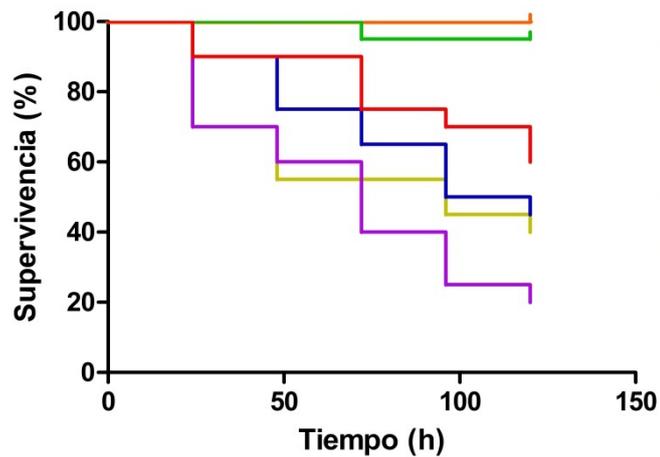
Las larvas infectadas con *Candida krusei* sin tratamiento presentaron una supervivencia similar a las infectadas y a las tratadas solo con la amiodarona (**Figura 4.8**). Por otro lado, aquellas que fueron tratadas con fluconazol a una concentración de 32 µg/ml mostraron una supervivencia a las 120 horas del 45%, mayor que lo observado en el tratamiento con amiodarona donde las larvas de *Galleria mellonella* presentaron una supervivencia del 25% tras el mismo periodo de tiempo. Los grupos de larvas infectadas y tratadas mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo de larvas control. La combinación de estos dos compuestos redujo la mortalidad de las larvas infectadas, presentando una supervivencia del 65%. Aunque en este grupo de larvas no se observaron diferencias significativas al compararlo con las que fueron tratadas con el fármaco antifúngico.

## Resultados



**Figura 4.9:** Actividad terapéutica de la combinación de fluconazol y ciclosporina A en la candidiasis experimental con *Candida krusei* ATCC 6258. Curva naranja, control; curva verde, PBS + ampicilina; curva amarilla, sin tratamiento; curva azul, fluconazol 32 µg/ml; curva morada, ciclosporina A 2 µg/ml; curva roja, fluconazol + ciclosporina A. Inoculo inicial  $1 \times 10^6$  células/larva.

La combinación de ciclosporina A y fluconazol contra *Candida krusei* ATCC 6258 mostró mayor supervivencia que el resto de combinaciones empleadas para el tratamiento de las larvas infectadas (**Figura 4.9**). De las 20 larvas de *Galleria mellonella* infectadas y tratadas con la combinación, 16 larvas sobrevivieron hasta el final del estudio. Este grupo no mostró diferencias estadísticamente significativas con el grupo de larvas control, mostrando valores similares a los obtenidos por las larvas no infectadas. Las curvas de supervivencia de larvas infectadas sin tratamiento y las tratadas con el fluconazol y la ciclosporina A de forma individual fueron similares, presentando una supervivencia del 40%, del 45% y del 30%, respectivamente.

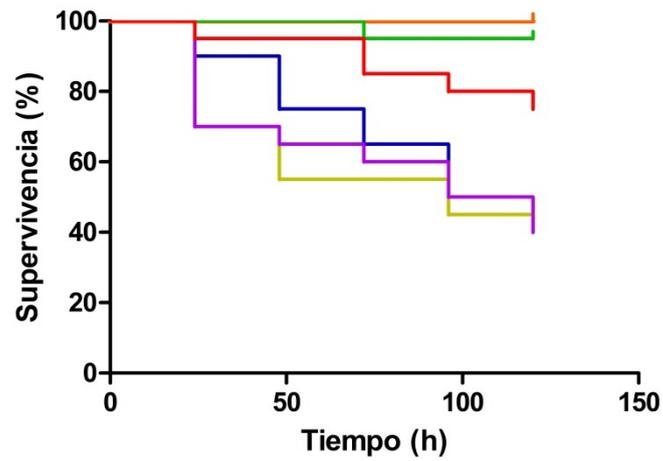


**Figura 4.10:** Actividad terapéutica de la combinación de fluconazol e ibuprofeno en la candidiasis experimental con *Candida krusei* ATCC 6258. Curva naranja, control; curva verde, PBS + ampicilina; curva amarilla, sin tratamiento; curva azul, fluconazol 32 µg/ml; curva morada, ibuprofeno 8 µg/ml; curva roja, fluconazol + ibuprofeno. Inoculo inicial  $1 \times 10^6$  células/larva.

El tratamiento con 8 µg/ml de ibuprofeno de las larvas de *Galleria mellonella* infectadas, mostró una supervivencia baja al compararla con el resto de tratamientos observados, aunque este grupo presentó diferencias significativas al compararlo con el grupo control. Sin embargo, los resultados obtenidos al combinar fluconazol e ibuprofeno fueron similares a los obtenidos en el tratamiento combinado del fluconazol y la amiodarona, sobreviviendo el 60% de las larvas infectadas trascurridas 120 horas (**Figura 4.10**). Entre estos dos grupos de larvas no se observaron diferencias.

Los porcentajes de supervivencia mostrado por las larvas de *Galleria mellonella* infectadas con *Candida krusei* ATCC 6258 sin tratamiento, con un tratamiento de 32 µg/ml de fluconazol y un tratamiento con 16 µg/ml de lactoferrina fueron muy similares entre sí, aunque se observaron diferencias significativas al comparar las larvas tratadas de las que no lo estaban (**Figura 4.11**). El tratamiento de fluconazol combinado con lactoferrina aumentó la supervivencia de las larvas que tras 120 h de estudio mantuvo con vida a 15 de ellas (75%). Al comparar este grupo de larvas con aquellas que fueron tratadas únicamente con fluconazol no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

## Resultados



**Figura 4.11:** Actividad terapéutica de la combinación de fluconazol y lactoferrina en la candidiasis experimental con *Candida krusei* ATCC 6258. Curva naranja, control; curva verde, PBS + ampicilina; curva amarilla, sin tratamiento; curva azul, fluconazol 32 µg/ml; curva morada, lactoferrina 16 µg/ml; curva roja, fluconazol + lactoferrina. Inoculo inicial  $1 \times 10^6$  células/larva.

## **DISCUSIÓN**



## 5. DISCUSIÓN

Las candidiasis invasoras se han convertido en un importante reto médico dentro de las enfermedades infecciosas debido tanto al aumento de las personas susceptibles a padecerlas, como al limitado número de fármacos antifúngicos disponibles para su tratamiento (Pemán y Salavert, 2013). Estas micosis causadas por *Candida albicans* y otras especies de *Candida* pueden presentarse como infecciones leves, como las candidiasis mucocutáneas, o infecciones graves, como las candidiasis invasoras con una importante mortalidad y morbilidad (Brown et al., 2012). La etiología de las candidiasis está sufriendo un cambio importante con un aumento de especies de *Candida* que presentan una sensibilidad reducida a varios fármacos antifúngicos de uso habitual en el tratamiento de estas enfermedades (Arendrup et al., 2013; Puig-Asensio et al., 2014; Nieto et al., 2015). Pese a que se han producido avances en el tratamiento de estas enfermedades en los últimos años, la disponibilidad de agentes antifúngicos es limitada respecto a los fármacos disponibles para el tratamiento de otras infecciones (Nathan y Cars, 2014; Quindós, 2015; Gould, 2016). Uno de los fármacos más empleados en el tratamiento antifúngico de las candidiasis es el fluconazol, un triazol fluorado que inhibe la enzima 14- $\alpha$  desmetilasa del lanosterol. Este agente se caracteriza por tener una excelente biodisponibilidad y una baja toxicidad, además se puede administrar tanto por vía oral como intravenosa (Egunsola et al., 2013). Sin embargo, los fracasos terapéuticos son frecuentes y una parte importante de estos se relaciona con la resistencia a los fármacos (Pfaller et al., 2011; Pfaller et al., 2012). Entre las soluciones disponibles para resolver los problemas relacionados con el tratamiento de estas enfermedades causadas por aislamientos resistentes, destacan la búsqueda de nuevos fármacos, el desarrollo de nuevas formulaciones de fármacos ya establecidos o la combinación de fármacos antifúngicos que permitan una reducción de la dosis necesaria y la disminución de los efectos adversos. Esta última alternativa se ha visto limitada debido a los altos costes y a los importantes efectos secundarios que pueden ir asociados a la combinación de fármacos antifúngicos, lo que ha facilitado que los estudios se centren en la combinación entre fármacos antifúngicos y otros fármacos cuyo fin no es esencialmente el tratamiento antifúngico (Afeltra y Verweij, 2003; Tragiannidis et al., 2013; Liu et al., 2014).

## Conclusiones

*Candida albicans* es el agente etiológico más frecuente en las candidiasis invasoras, aunque, con cada vez más frecuencia, se producen infecciones a causa de otras especies como *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* o *Candida dubliniensis* (Arendrup et al., 2013). Es necesario un diagnóstico correcto, mediante la identificación de la especie responsable de la infección, para poder administrar un tratamiento adecuado al paciente. Algunas especies como *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* son sensibles a la gran mayoría de fármacos antifúngicos, mientras que otras especies como *Candida parapsilosis* y *Candida krusei* tienen una sensibilidad reducida a las equinocandinas y resistencia al fluconazol, respectivamente. Sin embargo, las especies habitualmente sensibles a los fármacos antifúngicos, también incluyen aislamientos con una menor sensibilidad e incluso resistentes a los fármacos antifúngicos. Algunos aislamientos pueden adquirir resistencia a ciertos fármacos, siendo más probable la aparición de esta resistencia inducida en pacientes con tratamiento antifúngico de larga duración y profilaxis. A este problema se une que el número de fármacos antifúngicos es limitado y que presentan interacciones farmacológicas que complican el tratamiento en pacientes que reciben tratamientos farmacológicos múltiples (Quindós, 2015; Gould, 2016).

En la actualidad existen dos métodos de microdilución en caldo estandarizados para el estudio de la sensibilidad de *Candida* a los fármacos antifúngicos propuestos por el CLSI y el EUCAST. Estas pruebas permiten identificar aquellas especies y aislamientos que son potencialmente resistentes a un agente antifúngico específico. Para diferenciar los aislamientos según su sensibilidad a los fármacos ambos comités han desarrollado puntos de corte clínicos y epidemiológicos. Se denominan puntos de corte clínicos (CBP) a aquellas concentraciones que distinguen entre aislamientos que probablemente responderán al tratamiento y los que no lo harán, mientras que los puntos de corte epidemiológicos (ECV) son las concentraciones empleadas para diferenciar entre poblaciones que no presentan mecanismos de resistencia y aquellas que sí. Los valores epidemiológicos se utilizan en los casos en los que no se dispone de puntos de corte clínicos, ya que podrían ayudar en la identificación temprana de cepas con mecanismos de resistencia adquiridos (Espinell-Ingroff y Turnidge, 2016). Actualmente, la predicción del resultado de la terapia antifúngica se realiza utilizando los puntos de corte clínicos establecidos por el CLSI y el EUCAST; sin embargo, estos valores solo están disponibles

para ciertas especies del género *Candida* (Clinical and Laboratory Standards Institute M60, 2017; EUCAST Antifungal Clinical Breakpoint v. 9.0, 2018).

En este trabajo de Tesis se ha estudiado la actividad del fluconazol contra aislamientos de diferentes especies de *Candida* por ambos métodos estandarizados y se han obtenido resultados similares, al igual que lo observado en diferentes estudios donde se ha mostrado una alta concordancia entre ellos (Espinel-Ingroff et al., 2005; Pfaller et al. 2011; Jang et al., 2013; Espinel-Ingroff y Turnidge, 2016). En nuestro trabajo en un gran número de casos se observó que la CMI del fluconazol era una dilución mayor utilizando la metodología propuesta por el CLSI. En general, se asume que las CMI obtenidas por el método EUCAST son más bajas que las obtenidas por el CLSI, ya que existen diferencias metodológicas entre ambos métodos consistentes en la adición de glucosa al 2% en la metodología del EUCAST, respecto al 0,2% de la metodología del CLSI, para facilitar el crecimiento de especies de *Candida*, así como el tamaño del inóculo utilizado (100 veces mayor en el caso del EUCAST). Esta diferencia en los resultados coincide con lo obtenido por Cuesta y colaboradores, aunque en el estudio de estos autores ocurría solo en los casos en los que la concentración era mayor de 2 µg/ml, a diferencia de lo observado en nuestro estudio donde ocurre también a concentraciones menores (Cuesta et al., 2010). En el presente trabajo, los porcentajes de sensibilidad y resistencia al fluconazol contra los aislamientos de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis* obtenidos al utilizar los puntos de corte clínicos presentaron concordancia por ambos métodos. Este hecho concuerda con lo observado en el estudio de Jang y colaboradores donde mostraron una elevada similitud al comparar la actividad del fluconazol contra un gran número de aislamientos por ambos métodos utilizando los puntos de corte clínicos (Jang et al., 2013). Aunque Pfaller y colaboradores y Jang y colaboradores muestran también una alta concordancia entre los resultados obtenidos al emplear los puntos de corte epidemiológicos por ambos métodos, nuestros datos no mostraron una concordancia tan alta (Pfaller et al., 2011; Jang et al., 2013).

Al comparar los métodos se obtuvo un porcentaje de acuerdo esencial alto para el fluconazol. Esto concuerda con lo observado en el estudio de Pfaller y colaboradores donde se alcanza un acuerdo esencial superior al 90% para este fármaco antifúngico (Pfaller et al., 2014). El

## Conclusiones

fluconazol logró un 100% de acuerdo esencial cuando se evaluaba contra la mayoría de las especies de *Candida*, a excepción de *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* y *Candida tropicalis* donde las tasas de acuerdo esencial fueron inferiores, siendo en estos dos últimos casos  $\leq 80\%$ . Este hecho no concuerda con lo obtenido por otros autores, donde se observan valores  $>90\%$  (Espinel-Ingroff et al., 2005; Pfaller et al., 2011; Pfaller et al., 2014). Estas diferencias pueden deberse al número de aislamientos analizados en este trabajo de Tesis, ya que la mayoría de estudios emplean un mayor número. La concordancia entre los resultados obtenidos por ambos métodos se ha evaluado también mediante el coeficiente de correlación intraclase, CCI, y se ha obtenido un acuerdo excelente. Este resultado concuerda con los valores obtenidos por Cuenca-Estrella y colaboradores (Cuenca-Estrella et al., 2010). Al analizar los valores de concordancia de los resultados obtenidos por ambos métodos en relación con la especie se observa que el valor más bajo corresponde a los resultados de *Candida dubliniensis*. Esto se puede deber a que el número de aislamientos estudiados para dicha especie fue bajo. A diferencia de lo mostrado por Rodríguez-Tudela y colaboradores, donde los resultados de ambos métodos al estudiar la sensibilidad de *Candida krusei* presentan una excelente correlación, nuestros datos mostraron un valor menor y la concordancia fue buena (Rodríguez-Tudela et al., 2014).

Por otra parte, los resultados de concordancia obtenidos al analizar el acuerdo esencial para la lactoferrina fueron más altos que los observados para el fluconazol, siendo en este caso el estudio de la sensibilidad de *Candida albicans* el que presentó un valor ligeramente menor. Para este compuesto los índices de CCI mostraron muy buena concordancia entre los métodos, a excepción de la comparación de la sensibilidad de *Candida albicans* que presentó un valor de 0,414 muy inferior al resto de valores obtenidos en este estudio. Estas diferencias se deben a que los resultados obtenidos al estudiar actividad de la lactoferrina presentan una variabilidad mayor que el resto de los datos.

Algunos fármacos indicados para el tratamiento de otras enfermedades no causadas por hongos pueden tener actividad antifúngica, ya que los hongos y las células humanas tienen vías metabólicas comunes (Liu et al., 2014). Nueve de los 11 agentes no antifúngicos empleados (doxiciclina, minociclina, ciprofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino, ofloxacino, ciclosporina

A, amiodarona e ibuprofeno) no mostraron actividad contra *Candida* cuando se emplearon de forma individual. Este hecho no concuerda con algunos de los estudios observados, donde varios fármacos presentan actividad antifúngica (Pina-Vaz et al., 2000; Stergiopoulou et al., 2008 a; Gao et al., 2013). Estas diferencias pueden estar causadas por las variaciones en las concentraciones empleadas entre este trabajo de Tesis y los estudios publicados. Gao y colaboradores observaron actividad antifúngica al emplear la doxiciclina contra biopelículas generadas por *Candida albicans* (Gao et al., 2013). Estos investigadores obtuvieron una CMI de 512 µg/ml, mientras que en el presente trabajo la concentración más alta empleada fue de 128 µg/ml. Por otro lado, Pina-Vaz y colaboradores observaron actividad al emplear ibuprofeno, pero en una concentración mayor a los 256 µg/ml que se han utilizado en la presente investigación (Pina-Vaz et al., 2000). Los resultados obtenidos en el estudio de la sensibilidad de diferentes aislamientos de *Candida* a la ciclosporina A, mostraron concordancia con lo observado por Li y colaboradores, ya que estos autores no vieron actividad contra *Candida albicans* al estudiar el efecto de este fármaco solo (Li et al., 2008). Rocha da Silva y colaboradores también encontraron resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo al estudiar la actividad de la amiodarona contra *Candida tropicalis* (Rocha da Silva et al., 2013). Estos autores no observaron actividad de la amiodarona y la CMI fue superior a la mayor concentración analizada en su estudio.

La combinación entre el fluconazol y otros fármacos indicados para otras afecciones es una alternativa para el tratamiento de infecciones causadas por especies *Candida* resistentes o con sensibilidad reducida a este agente antifúngico, ya que algunos de esos fármacos han mostrado actividad antifúngica (Afeltra y Verweij, 2003; Liu et al., 2014; Spitzer et al., 2017). Además, esta terapia combinada se puede utilizar para aumentar la eficacia del fármaco antifúngico y reducir así la dosis necesaria y los efectos adversos. Una estrategia terapéutica atractiva ha sido aumentar la sensibilidad de *Candida* al fluconazol mediante su combinación con diferentes fármacos cuya finalidad no es esencialmente el tratamiento antifúngico, como algunos fármacos antibacterianos, los inhibidores de la calcineurina, los inhibidores de la proteína de choque térmico 90 (Hsp90) o los reguladores de la homeostasis del calcio (Lui et al., 2014; Cui et al., 2015; Jia et al., 2016). La eficacia terapéutica de una combinación se puede valorar tanto in vitro como in vivo (Mukherjee et al., 2005). Existen distintos métodos para estudiar la eficacia

## Conclusiones

in vitro, como el del tablero de ajedrez, las curvas de letalidad o los ensayos con tiras de E-test (Guo et al., 2010; Ben-Ami et al., 2011; Li et al., 2015 b). El estudio de la eficacia de las combinaciones por el método del tablero de ajedrez puede interpretarse por varios modelos y evaluar, de esta forma, la interacción entre el fluconazol y otros fármacos. En el presente trabajo de Tesis se han utilizado dos enfoques no paramétricos, los modelos mediante el cálculo del índice de concentración inhibitoria fraccionada FICI y la variación del porcentaje de crecimiento  $\Delta E$  basados en las teorías de la no interacción, la teoría de la aditividad de Loewe y la teoría de la independencia de Bliss, respectivamente (Greco et al., 1995; Odds, 2003; Afeltra et al 2004).

Las curvas de letalidad o *time-kill* permiten evaluar el crecimiento y la muerte de los microorganismos en función tanto del tiempo como de la concentración del fármaco antimicrobiano. Este método permite la comparación directa de los efectos correspondientes a diversos perfiles de concentraciones en función del tiempo y proporcionan una información más completa que la determinación de las CMI (Gil-Alonso et al., 2015). De igual forma, las curvas letalidad son un método útil para determinar la eficacia de las combinaciones de compuestos permitiendo detectar la combinación más activa contra una especie y a qué tiempo se alcanza la actividad fungicida o fungistática. Este método se emplea con frecuencia en los estudios de la actividad de los fármacos contra infecciones bacterianas y fúngicas, ya que proporciona una valiosa información farmacodinámica, es decir, nos informa sobre la relación entre la concentración del fármaco y su efecto contra un organismo (Gil-Alonso et al., 2016; Bozo et al., 2016; Lin et al., 2018; Locke et al., 2018). En este trabajo de Tesis se analizó mediante el estudio de las curvas de letalidad el comportamiento del fluconazol, de la amiodarona, de la ciclosporina A, del ibuprofeno y de la lactoferrina contra dos de las especies más frecuentemente aisladas, *Candida albicans* y *Candida parapsilosis*. Para el análisis de las curvas de letalidad se seleccionaron las concentraciones (una para cada compuesto) en relación a los resultados obtenidos por el método del tablero de ajedrez, con el fin de poder confirmar mediante este método el efecto observado anteriormente.

Cabe destacar que no existen métodos estandarizados para el estudio de las combinaciones de fármacos. Por ello, en el presente trabajo la elección de las técnicas para los análisis de la

interacción entre compuestos se realizó en base a la metodología utilizada en otros estudios. Se seleccionó el método del tablero de ajedrez debido a su facilidad tanto de realización como de interpretación de resultados. Sin embargo, debido a algunas limitaciones que presenta este método, se añadió una segunda técnica, el estudio de las curvas de letalidad ya que aporta una información más detallada.

La supervivencia de las levaduras durante el tratamiento antifúngico está vinculado a un buen funcionamiento de la homeostasis del calcio, ya que un exceso de este catión intracelular se ha relacionado con el daño celular (Cruz et al., 2002). En la homeostasis del calcio están implicadas rutas metabólicas muy reguladas que son utilizadas por las células para mantener en equilibrio la concentración de calcio dentro de su rango óptimo, tanto en el citosol como en otros orgánulos. La amiodarona es un agente antiarrítmico de clase III usado en el tratamiento de varios tipos de taquiarritmias. Este fármaco muestra efectos similares a los beta bloqueantes y a los bloqueadores de los canales de calcio (Brunton, 2012). La combinación entre el fluconazol y la amiodarona en este estudio ha mostrado in vitro efectos sinérgicos contra aislamientos de *Candida*. Este hecho concuerda con los resultados obtenidos en otros estudios (Guo et al., 2008; Gamarra et al., 2010; Rocha da Silva et al., 2013). Nuestros resultados muestran reducciones de la CMI del fluconazol contra aislamientos de *Candida*, tanto sensibles como resistentes, al combinar este fármaco antifúngico con la amiodarona. Sin embargo, la amiodarona no muestra actividad antifúngica cuando se utiliza sola, al igual que sucede en el trabajo de Rocha da Silva y colaboradores (Rocha da Silva et al., 2013). El efecto de la combinación no mostró antagonismo contra ninguno de los aislamientos estudiados, a diferencia de lo observado por Guo y colaboradores (Guo et al., 2008). En el trabajo de estos autores la combinación de la amiodarona con el fluconazol mostró efecto antagónico contra tres de las diez cepas de *Candida albicans* estudiadas. En nuestro trabajo los resultados que mostraron efecto sinérgico presentaron valores de FICI por ambos métodos de 0,02 a 0,26, siendo ligeramente superiores a los de Guo y colaboradores, de 0,008 a 0,016 (Guo et al., 2008). Los porcentajes de interacción sinérgica que obtuvieron en dicho estudio mostraron una mayor similitud con nuestros datos, de 805% a 1494%. A diferencia de los resultados obtenidos en el último estudio, que no observaron ningún efecto sinérgico contra las cepas sensibles, nuestros resultados mostraron sinergismo contra aislamientos sensibles dosis dependientes. El estudio de la combinación de

## Conclusiones

la amiodarona con el fluconazol mostró leves diferencias a la hora de interpretar los datos obtenidos mediante el método del EUCAST modificado utilizando el modelo de FICI respecto al modelo  $\Delta E$ , el número de cepas contra las que la combinación presentó un efecto sinérgico fue diferente. Este hecho puede deberse a las limitaciones que presenta la interpretación de los resultados mediante el modelo de FICI, donde es más fácil cometer errores que en la interpretación por el modelo  $\Delta E$ , ya que los valores empleados en este último modelo se obtienen directamente de los datos del experimento (Mukherjee et al., 2005; Zhou et al., 2012). Además, el modelo  $\Delta E$  presenta un criterio estadístico más objetivo debido a que el efecto no se limita a una dilución concreta, a diferencia de lo que ocurre al utilizar el modelo FICI (Te Dorsthorst et al. 2002). Estas mismas variaciones entre los modelos de interpretación se observaron en otros estudios (Guo et al., 2008; Li et al., 2015 c). En el trabajo de Guo y colaboradores se observó efecto indiferente contra dos cepas de *Candida albicans* al utilizar el modelo FICI, mientras que la interpretación de los resultados por el modelo  $\Delta E$  contra esos aislamientos mostró un efecto antagónico (Guo et al., 2008). Li y colaboradores también observaron discrepancias al comparar ambos modelos de interpretación en su estudio de interacción entre el voriconazol y un bloqueador de los canales de calcio contra *Aspergillus fumigatus* (Li et al., 2015 d). La combinación empleada por estos autores mostró efecto indiferente contra un aislamiento sensible al voriconazol al utilizar el modelo FICI, mientras que al interpretar su efecto mediante el modelo  $\Delta E$  fue sinérgico. Además, observaron que contra dos cepas de *Aspergillus fumigatus* el efecto de la combinación fue sinérgico al interpretar los resultados mediante el modelo FICI e indiferente cuando se utilizó el modelo  $\Delta E$ .

En presente estudio, la combinación entre el fluconazol y la amiodarona mostró efecto sinérgico contra dos de los seis aislamientos estudiados mediante las curvas de letalidad, resultados concordantes con los observados mediante el tablero de ajedrez contra esos aislamientos. Guo y colaboradores, al igual que en este trabajo de Tesis, observaron mejores resultados de la combinación contra los aislamientos resistentes, además mostraron también una buena concordancia entre los dos métodos empleados, tablero de ajedrez y curvas de letalidad (Guo et al., 2008). Aunque estos autores emplearon el ensayo de reducción del XTT para medir el efecto de la combinación en el crecimiento fúngico, los valores de inhibición fueron similares a los obtenidos en este estudio. Por otra parte, Kuhn y colaboradores han observado que no

existen grandes diferencias al cuantificar el crecimiento de *Candida* mediante el conteo de colonias y el ensayo de XTT, aunque no pudieron demostrar que estos resultados sean extrapolables cuando se evalúan otras especies (Kuhn et al., 2003). El estudio de las curvas de letalidad nos permitió confirmar que la combinación de fluconazol y amiodarona presentan una mayor actividad que el fluconazol solo contra tres de los cuatro aislamientos de *Candida* resistentes. Aunque esta interacción no mostró un efecto sinérgico contra *Candida albicans* UPV 15-147, se observó una mejora respecto a la actividad del fluconazol solo a las 48 h. Los resultados observados contra todos los aislamientos analizados por las curvas de letalidad fueron concordantes con lo obtenido mediante el método tablero de ajedrez. Otros autores también han observado buena concordancia al comparar los resultados obtenidos por los dos métodos empleados en este trabajo de Tesis (Guo et al., 2010; Kovacs et al., 2016; Gu et al., 2016). Guo y colaboradores analizaron la combinación de fluconazol y alicina contra tres aislamientos de *Candida albicans* mediante curvas de letalidad, observando los mismos resultados que los obtenidos mediante tablero de ajedrez (Guo et al., 2010). La alicina es un compuesto azufrado presente en el ajo que ha mostrado actividad contra *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Scedosporium prolificans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton*. Gu y colaboradores mostraron gran concordancia al estudiar la actividad del tres agentes azólicos y la fluoxetina contra un aislamiento de *Candida albicans* resistente al fluconazol, mostrando efecto sinérgico al analizarlo mediante los dos métodos (Gu et al., 2016). La fluoxetina es un antidepresivo de la clase inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina, que ha mostrado tener actividad antifúngica en combinación con azoles.

Gamarra y colaboradores mostraron en su trabajo que el efecto sinérgico del tratamiento de amiodarona y fluconazol en combinación contra cepas resistentes al fluconazol podría explicarse por una alteración en la fluidez de la membrana (Gamarra et al., 2010). Estos autores afirmaron que esta variación se produce por la combinación de las actividades de ambos compuestos. La amiodarona genera una hiperpolarización transitoria de la membrana seguida de una despolarización resultado de la afluencia de  $Ca^{2+}$  y de  $H^+$ , mientras que el fluconazol reduce el ergosterol presente en la membrana plasmática. Este hecho sugiere una posible conexión entre la síntesis de ergosterol y las rutas de la homeostasis del calcio, ya que cuando ambos fármacos se combinan se produce una inhibición total o parcial de las respuestas al

## Conclusiones

estrés inducidas por los tratamientos de los fármacos de forma individual. Por otro lado, el efecto de la combinación también puede deberse al bloqueo de las bombas de expulsión y eyección, que son empleadas por las levaduras como mecanismo de resistencia al fluconazol, haciendo que la actividad del fluconazol se vea mejorada (Rocha da Silva et al., 2013). Además, estos autores concluyeron que el efecto de la combinación entre la amiodarona y el fluconazol podía deberse a cambios en la integridad de la membrana celular y a la generación de estrés oxidativo.

La ruta de la calcineurina tiene gran importancia en el crecimiento, la morfogénesis y la resistencia de los hongos patógenos. Existen diversos estudios que muestran que la inhibición farmacológica de la calcineurina fúngica es una estrategia comúnmente utilizada para mejorar la actividad del fluconazol contra aislamientos de *Candida* resistentes (Marchetti et al., 2003; Sun et al., 2007; Uppuluri et al., 2008; Shinde et al., 2012; Jia et al., 2016). La ciclosporina A, un inhibidor de la calcineurina, es un péptido cíclico compuesto por 11 aminoácidos, lipófilo y altamente hidrófobo que se emplea para prevenir el rechazo a los trasplantes (Brunton, 2012). Varios estudios han mostrado que la combinación de ciclosporina A con fluconazol puede mejorar la actividad antifúngica contra aislamientos de *Candida* (Marchetti et al., 2000, Cruz et al., 2002; Onyewu et al., 2006). En nuestro estudio de Tesis doctoral se observó mediante los dos métodos que la ciclosporina A mostraba una potente actividad al combinarla con el fluconazol, ya que disminuía notablemente las CMI del mismo, aunque no se observó actividad antifúngica cuando se empleó sola. Además, no se han observado diferencias entre los resultados obtenidos mediante los métodos CLSI y EUCAST. El trabajo presentado por Li y colaboradores mostró que la combinación de ciclosporina A y fluconazol reducía la CMI de dicho fármaco contra distintos aislamientos de *Candida albicans* tanto sensibles como resistentes al fármaco antifúngico (Li et al., 2008). Además, estos mismos investigadores observaron buena actividad al combinar este inhibidor de la calcineurina con itraconazol y voriconazol. Nuestros resultados muestran que la adición de la ciclosporina A al fluconazol mejora la actividad del fármaco antifúngico contra *Candida parapsilosis*, tal como comunicaron Cordeiro y colaboradores en su estudio, donde se observa un efecto sinérgico de la combinación sobre el complejo *Candida parapsilosis* (Cordeiro et al., 2014). Cabe resaltar este hecho debido a que los estudios epidemiológicos muestran un aumento en la frecuencia de esta especie en las últimas

décadas, como se observa en los estudios de Fungemyca y Candipop (Cantón et al., 2011; Pemán et al. 2011; Puig-Asensio et al., 2014).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo respecto al efecto sinérgico de la combinación de la ciclosporina A y el fluconazol contra cepas de *Candida* tanto sensibles como resistentes al fluconazol concuerdan con otros estudios publicados (Shinde et al., 2012; Cordeiro et al., 2014). Cabe destacar que la combinación mostró sinergismo con valores de FICI bajos y altos porcentajes de interacción sinérgica contra cinco de las seis cepas de *Candida albicans* resistentes al fluconazol estudiadas. Esta combinación se presenta, por tanto, como una potente alternativa que mejora la actividad del fluconazol contra los aislamientos resistentes de *Candida albicans*. Estos datos concuerdan con lo observado por Li y colaboradores cuyos resultados muestran un fuerte efecto sinérgico, incluso a concentraciones inferiores a las utilizadas en nuestro estudio (Li et al., 2008). Además, estos autores observan una buena concordancia entre los dos modelos empleados para la interpretación de los resultados, como sucede en el presente trabajo contra los aislamientos de *Candida albicans*. Por otro lado, podemos observar que la combinación ejerce un efecto sinérgico contra los aislamientos de *Candida glabrata* resistentes y sensibles dosis dependientes estudiados mediante el método del CLSI modificado. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Li y colaboradores que mostraron un efecto sinérgico contra aislamientos de *Candida glabrata* utilizando la combinación con tacrolimus, otro inhibidor de la calcineurina (Li et al., 2015 a). Nuestra combinación de fármacos redujo notablemente la CMI del fluconazol contra todos los aislamientos de *Candida glabrata* estudiados, siendo esta disminución de gran relevancia ya que, en la población de pacientes con inmunodeficiencias, la infección por *Candida glabrata* causaba una elevada mortalidad y además era responsable del 30% de todas las candidemias en UCI (Ruan et al., 2008; West et al., 2013; Rodrigues et al., 2014). Pfaller y colaboradores mostraron que una proporción elevada de más de 20.000 aislamientos clínicos de *Candida glabrata* tienen sensibilidad reducida al fluconazol, por lo que esta combinación aumentaría la actividad de este fármaco facilitando el tratamiento (Pfaller et al., 2010). La interacción in vitro contra los aislamientos de *Candida glabrata* mediante el protocolo de EUCAST modificado ha mostrado pequeñas discrepancias a la hora de interpretar su efecto, ya que mediante el modelo  $\Delta E$  el efecto de la combinación fue sinérgico contra un aislamiento más que mediante el modelo

## Conclusiones

de FICI. Esta diferencia puede deberse a una infraestimación del efecto cuando se utiliza la interpretación por el modelo de FICI, debido a que la determinación de la CMI puede mostrar pequeñas variaciones de un experimento a otro. Además, este modelo genera aproximaciones imprecisas cuando se obtienen CMI mayores que la escala. Al contrario, el modelo  $\Delta E$  reduce los errores ya que los valores derivan directamente del experimento. Li y colaboradores respaldan el uso de este último modelo de interpretación como un instrumento útil para el análisis de las interacciones entre diferentes fármacos mediante el método del tablero de ajedrez (Li et al., 2008).

Los resultados obtenidos mediante el estudio de las curvas de letalidad de la combinación de ciclosporina A y fluconazol mostraron discrepancias con los observados por el método del tablero de ajedrez. De igual modo, la investigación de Li y colaboradores mostró discordancia al comparar los datos obtenidos mediante las curvas de letalidad y el tablero de ajedrez contra aislamientos de *Candida* sensibles al fluconazol (Li et al., 2008). Al contrario que lo presentado por estos investigadores, nuestra falta de concordancia se observó en el estudio de la actividad contra los aislamientos de *Candida* resistentes al fluconazol. La combinación de ciclosporina A y fluconazol no mostró efecto sinérgico ni contra *Candida albicans* UPV 15-147 ni contra *Candida parapsilosis* NCPF 3104 al estudiarlas mediante curvas de letalidad, a diferencia de lo obtenido mediante el método del tablero de ajedrez. Este hecho puede deberse bien a un error al realizar la medición en el tablero de ajedrez o bien debido a la dependencia del cálculo de las unidades formadoras de colonias del método de las curvas de letalidad, que dificulta su análisis cuando el crecimiento de las células se produce de forma agrupada (Mukherjee et al., 2005). En el caso de *Candida parapsilosis* NCPF 3104, la combinación no mostró un efecto sinérgico debido, posiblemente, a que la concentración de ciclosporina A a la que se obtuvo ese efecto mediante el tablero de ajedrez fue mayor que la concentración estudiada para las curvas de letalidad. Sin embargo, contra esta cepa, el fluconazol combinado con la ciclosporina A mostró mejor actividad que el fármaco más activo. Por otro lado, los resultados obtenidos contra el resto de aislamientos estudiados mediante los dos métodos mostraron concordancia. La interacción entre la ciclosporina A y el fluconazol fue sinérgica contra dos aislamientos de *Candida*, uno sensible y otro resistente, a diferencia de lo mostrado por otros autores donde el fluconazol y la ciclosporina A presentan sinergismo solo contra cepas resistentes o sensibles al

fármaco antifúngico (Marchetti et al., 2003; Li et al., 2008). Este hecho puede deberse a que ninguno de los estudios ha utilizado las mismas concentraciones para el fluconazol o la ciclosporina A que en el presente trabajo. Las curvas de letalidad proporcionaron una información detallada en relación a la actividad, ya que mostraron que la combinación ejercía un efecto fungicida contra *Candida albicans* NCPF 3153, una cepa sensible al fluconazol, al igual que lo observado por Marchetti y colaboradores, donde contra dos cepas sensibles al fluconazol con unas CMI de 0,25 µg/ml y 0,03 µg/ml, menores que la CMI de nuestro aislamiento, obtuvieron unos resultados similares (Marchetti et al., 2003). Por otro lado, en el estudio de Li y colaboradores se muestra que la actividad de la combinación contra los aislamientos resistentes a los azoles es fungistática, como se observa en el análisis contra *Candida albicans* UPV 15-157 realizado en este trabajo de Tesis (Li et al., 2008). Estos investigadores presentaron resultados similares entre la cepa sensible al fluconazol que analizaron en su estudio y la cepa sensible a dicho fármaco empleada en el presente trabajo, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, contra la cual la combinación mostró un efecto indiferente; sin embargo, a las 48 h se observó una actividad fungistática mayor que la del fluconazol.

El mecanismo por el que la combinación de fluconazol y ciclosporina A muestra un efecto sinérgico y/o un aumento de la sensibilidad al fluconazol se produce al unirse la ciclosporina A a la ciclofilina A para formar un complejo de proteína-fármaco. Este complejo inhibe la respuesta al estrés mediada por la calcineurina, causando daño a las membranas celulares y aumentando la permeabilidad de la membrana de las células fúngicas (Liu et al., 2014). Este aumento de la permeabilidad incrementa a su vez la concentración intracelular de fluconazol hasta lograr un efecto fungicida. La perturbación de la membrana causada por la inhibición de la biosíntesis del ergosterol por parte del fluconazol también aumenta las concentraciones del inhibidor de la calcineurina intracelular. Además, esta perturbación conduce a un aumento de la captación de calcio, pudiendo desencadenar la muerte celular debido a esas altas concentraciones citoplasmáticas (Courchesne, 2002; Kaur et al., 2004; Juvvadi et al., 2016). También se ha mostrado en otros estudios que la combinación de fluconazol con ciclosporina A contra *Candida albicans* productora de biopelícula ejerció un efecto sinérgico e inhibió su formación (Uppuluri et al., 2008; Shinde et al., 2012; Jia et al., 2016). Esta inhibición se produce por la supresión de la expresión de genes relacionados con el desarrollo de la biopelícula y la

## Conclusiones

resistencia a los fármacos, a la reducción de la hidrofobicidad de la superficie celular y a la concentración intracelular de calcio.

La inhibición de la ruta de la calcineurina podría potenciar las actividades antifúngicas de los fármacos que actúan en la biosíntesis del ergosterol. Onyewu y colaboradores han mostrado que el fenpropimorf y la terbinafina presentan actividad sinérgica con inhibidores de la calcineurina contra *Candida albicans*, *Candida glabrata* y *Candida krusei* (Onyewu et al., 2003). Estos dos compuestos pertenecen al grupo de los morfolinos y las alilaminas, respectivamente, e inhiben enzimas específicas en la biosíntesis del ergosterol. Los resultados de esos autores ponen de manifiesto que la ruta de la biosíntesis del ergosterol podría estar relacionada con la ruta de la calcineurina, ya que el efecto de los agentes antifúngicos no azólicos que inhiben la ruta de biosíntesis del ergosterol se puede potenciar mediante la inhibición de la ruta de señalización de la calcineurina.

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos se emplean para reducir la inflamación, el dolor y la fiebre, ya que inhiben la actividad de la ciclooxigenasa y por lo tanto la síntesis de las prostaglandinas. Algunos estudios han analizado el efecto de estos fármacos sobre la inhibición del crecimiento del hongo, la activación enzimática y la disminución de la producción de prostaglandina E2 fúngica, mostrando que los fármacos antiinflamatorios no esteroideos tienen actividad antifúngica potencial contra hongos patógenos (Erb-Downward y Noverr, 2007; Trofa et al., 2009). Por otro lado, Els y colaboradores han observado que las biopelículas de *Candida albicans* son capaces de producir prostaglandinas y mejorar así la formación de sus tubos germinales. Este hecho confirma el importante papel de las prostaglandinas como factor de virulencia en las infecciones por *Candida* (Ells et al., 2011). Además, se ha sugerido que la actividad de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos podría estar relacionada con cambios en la producción de prostaglandinas, en los potenciales de membrana, en la formación de biopelículas y en la reducción de la cantidad de polisacáridos extracelulares (Alem y Douglas, 2004). El ibuprofeno es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, lipófilo, derivado del ácido propiónico (Brunton, 2012). Este agente ha mostrado poseer cierta actividad fungicida, causando lesiones en la membrana y una actividad fungistática a bajas concentraciones,  $\leq 3$  mg/ml (Pina-Vaz et al., 2000). Estos datos concuerdan con los recientemente obtenidos por Król

y colaboradores que muestran cierta actividad antifúngica contra aislamientos de *Candida* (Król et al., 2018). Sin embargo, los resultados obtenidos por estos autores no concuerdan con lo observado en nuestro estudio, donde el ibuprofeno no presentó actividad antifúngica de forma individual contra los aislamientos de *Candida* analizados. Este hecho puede deberse a que la concentración más alta estudiada en este trabajo de Tesis fue 512 µg/ml, menor a las concentraciones estudiadas en los trabajos de Pina-Vaz y colaboradores y Król y colaboradores (Pina-Vaz et al., 2000; Król et al., 2018). Sin embargo, nuestros resultados concuerdan con lo observado por Arai y colaboradores, en cuyo trabajo el ibuprofeno no presentó actividad ni a altas concentraciones (Arai et al., 2005). Por otro lado, en el presente trabajo hemos detectado una reducción de la CMI del fluconazol contra varios aislamientos de *Candida* cuando el ibuprofeno se combinó con el fluconazol, como en los estudios de Pina-Vaz y colaboradores y Costa-de-Oliveira y colaboradores (Pina-Vaz et al., 2005; Costa-de-Oliveira et al., 2015). En ambos estudios la disminución ocurre contra aislamientos resistentes al fluconazol, mientras que en esta Tesis también se observa una disminución de la CMI contra los aislamientos de *Candida* sensibles al fluconazol. Los resultados presentados en el estudio de Sharma y colaboradores donde analizan la actividad contra 69 aislamientos clínicos de *Candida* resistentes al fluconazol, mostraron que contra dos de las nueve cepas de *Candida krusei* estudiadas la sensibilidad al fluconazol aumentaba cuando se combinaba con ibuprofeno (Sharma et al., 2015). Este hallazgo confirma lo observado en el presente estudio donde la combinación disminuye la CMI de fluconazol contra los tres aislamientos de *Candida krusei* analizados. Nuestros resultados muestran, además, una reducción de la CMI del fluconazol contra *Candida glabrata*, en contraposición a lo que se observa en el trabajo de Sharma y colaboradores, donde no observaron una reducción de la CMI del fluconazol contra esta especie (Sharma et al., 2015). Sin embargo, en el presente estudio la combinación no tuvo un efecto sinérgico contra los aislamientos de *Candida glabrata* analizados, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Król y colaboradores donde se muestran efectos indiferentes o antagónicos contra todas las cepas de *Candida glabrata* estudiadas (Król et al., 2018). Cabe destacar que, en este último estudio, la combinación muestra antagonismo contra la cepa *Candida glabrata* ATCC 90030 y en nuestro estudio la combinación no mostró interacción con el fluconazol, este hecho puede deberse a que el rango de concentraciones estudiado para el

## Conclusiones

ibuprofeno fue menor que el empleado en ese trabajo. La combinación de ibuprofeno y fluconazol ha mostrado, en el presente estudio, muy buenos resultados contra los aislamientos de *Candida albicans* resistentes al fluconazol, donde se ha observado efecto sinérgico contra los seis aislamientos de *Candida albicans* resistentes. Otros autores han obtenido resultados similares al analizar esta combinación contra cepas de esa especie resistentes al fluconazol (Arai et al., 2005; Pina-Vaz et al., 2005; Ricardo et al., 2009). A diferencia de la mayoría de los estudios que solo interpretan las interacciones mediante el índice FICI, en el presente trabajo se interpretaron los datos también mediante el modelo  $\Delta E$ , ya que presenta un criterio estadístico más objetivo (Afeltra et al., 2004). Los resultados mostrados para esta combinación al emplear los dos modelos de interpretación fueron similares por ambos métodos como se observó en el estudio de Yang y colaboradores (Yang et al., 2016). Estos investigadores detectaron buena concordancia entre los dos modelos al analizar un gran número de fármacos antiinflamatorios no esteroideos combinados con distintos agentes antifúngicos de uso habitual.

Los análisis realizados utilizando las curvas de letalidad para la evaluación del efecto de la combinación de ibuprofeno y fluconazol mostraron ligeras discrepancias con los resultados obtenidos al estudiar dicha interacción por el método del tablero de ajedrez. En el caso de las curvas de letalidad, el efecto mostrado por el fluconazol junto al ibuprofeno contra el aislamiento resistente *Candida albicans* UPV 15-147 fue indiferente. Sin embargo, esta combinación mostró un efecto sinérgico al analizarla por el método del tablero de ajedrez. Al igual que lo comentado en el estudio de la combinación de fluconazol y ciclosporina A, este hecho puede deberse a que esta técnica depende directamente del conteo de las UFC, siendo necesario para ello un crecimiento aislado de cada colonia. Los resultados observados contra el resto de aislamientos de *Candida* analizados entre ambos métodos fueron similares, mostrando concordancia con lo presentado en la literatura (Li et al., 2015 c; Shrestha et al., 2015 a; Shrestha et al., 2015 b). El presente estudio es el primero que analiza esta combinación de fármacos mediante esta metodología, por ello únicamente se han podido comparar los resultados obtenidos con los publicados por Zhou y colaboradores. Estos autores emplearon otro fármaco antiinflamatorio no esteroideo y otro agente antifúngico, pero obtuvieron resultados similares (Zhou et al., 2012). Estos autores observaron buena concordancia entre el método del tablero de ajedrez y las curvas de letalidad al estudiar la interacción entre la aspirina

y la anfotericina B contra aislamientos de *Candida albicans* y *Candida parapsilosis*. Rosato y colaboradores han estudiado el efecto del ibuprofeno en combinación con anidulafungina contra nueve aislamientos de *Candida*, mostrando una disminución de la CMI del fármaco antifúngico, un efecto sinérgico y una reducción significativa de la formación de la biopelícula (Rosato et al., 2016).

En cuanto al mecanismo de acción, Pina-Vaz y colaboradores han demostrado que el ibuprofeno inhibe la actividad de las bombas de expulsión de tipo ABC, por lo que el efecto es notable contra los aislamientos de *Candida albicans* resistentes a los azoles (Pina-Vaz et al., 2005). En otro estudio del mismo grupo se observó una reversión de algunos aislamientos de *Candida albicans* resistentes a los azoles al tratarlos con ibuprofeno (Ricardo et al., 2009). El hallazgo de estos autores mostró que el fármaco inducía un bloqueo físico al actuar directamente sobre los transportadores de tipo ABC. Este hecho lo confirmaron al observar que los aislamientos revertidos mostraban una sobreexpresión de los genes que codifican las bombas de expulsión (*CDR1* y *CDR2*), mientras que los aislamientos en los que no se produjo una reversión presentaban un aumento en la expresión del gen diana para los azoles (*ERG11*) y de los genes *CDR*. Sharma y colaboradores también mostraron un cambio en la resistencia al fluconazol, ya que 42 de los 69 aislamientos de *Candida* (60,9%) analizados en su trabajo aumentaban su sensibilidad al fluconazol, aunque en este caso observaron un efecto variable del ibuprofeno contra las distintas cepas estudiadas (Sharma et al., 2015). Król y colaboradores, han mostrado recientemente resultados similares con una reversión de la resistencia a los triazoles en algunos aislamientos de *Candida*, aunque su investigación también mostró que el ibuprofeno puede reducir la respuesta antifúngica natural del hospedador (Król et al., 2018).

Los glicopéptidos antimicrobianos representan un gran grupo de moléculas producidas por prácticamente todos los organismos vivos que actúan como una barrera natural contra la infección. Estos compuestos constituyen un mecanismo de defensa innato y exhiben una amplia gama de actividades contra bacterias, hongos, virus y parásitos (Duncan y O'Neil, 2013; Bruni et al., 2016). La lactoferrina es una glicoproteína fijadora de hierro perteneciente a la familia de las transferrinas que se encuentra dentro de este grupo de péptidos. Este compuesto está presente principalmente en la leche de mamíferos. Además, puede encontrarse en otras

## Conclusiones

secreciones exocrinas humanas como las lágrimas, la saliva, los fluidos seminales y gastrointestinales, las secreciones de las mucosas nasales y bronquiales y el plasma (de Oliveira et al., 2018). La lactoferrina desempeña un papel importante en la respuesta inmunitaria innata y se ha identificado una amplia gama de actividades: antivirales, antimicrobianas, antifúngicas, antiparasitarias, inmunomoduladoras y antioxidantes (Bruni et al., 2016; de Oliveira et al., 2018). Por otra parte, la lactoferrina ha mostrado efectos antifúngicos contra diferentes especies de *Candida*, mediante mecanismos relacionados con la liberación de calcio de las reservas intracelulares (Wakabayashi et al., 1998; Lupetti et al., 2003). Este hecho refuerza los resultados mostrados en este trabajo de Tesis, donde se muestra un efecto inhibitorio del crecimiento de algún aislamiento de *Candida* estudiado, con una CMI menor que la concentración más alta utilizada. Wakabayashi y colaboradores muestran una CMI de lactoferrina menor contra las cepas de *Candida* resistentes a los azoles, al igual que en este trabajo donde presentamos una CMI de lactoferrina de 16 µg/ml contra los aislamientos de *Candida krusei* mediante los dos métodos empleados (Wakabayashi et al., 1998). A diferencia de lo presentado en el estudio de Wakabayashi y colaboradores, en el presente trabajo la lactoferrina mostró actividad antifúngica contra aislamientos de *Candida albicans* sensibles al fluconazol mediante el método propuesto por el EUCAST. Los resultados obtenidos en esta Tesis muestran que la combinación de fluconazol con lactoferrina redujo la CMI del fluconazol al igual que se observa en otros estudios (Wakabayashi et al., 1998; Kobayashi et al., 2011). Aunque en estas investigaciones la disminución se observa contra cepas de *Candida* resistentes a los azoles, nuestros datos también muestran reducción contra aislamientos sensibles. Esta combinación muestra buenos resultados contra los aislamientos de *Candida albicans* y *Candida glabrata*, donde se observa mayor sinergia que contra el resto de aislamientos de *Candida*. Estos resultados son similares a los obtenidos por Kuipers y colaboradores, cuyo estudio muestra un potente efecto sinérgico de esta combinación contra un aislamiento de *Candida albicans* y un aislamiento de *Candida glabrata*, ambos resistentes al fluconazol (Kuipers et al., 1998). Kobayashi y colaboradores observaron un efecto sinérgico al combinar el fluconazol y la lactoferrina contra cuatro aislamientos de *Candida albicans* resistentes al fluconazol (Kobayashi et al., 2011). Sin embargo, la combinación de itraconazol y lactoferrina obtenía mejores resultados ya que era sinérgica contra los cinco aislamientos de *Candida albicans* estudiados

por Kobayashi y colaboradores. El efecto sinérgico observado contra los aislamientos de *Candida* utilizando el modelo de FICI es mayor que utilizando el modelo  $\Delta E$ . Según algunos autores este hecho puede deberse a un error a la hora de determinar la CMI debido a que cuando se obtienen CMI mayores que el rango de estudio el cálculo del FICI puede mostrar resultados imprecisos (Meletiadis et al., 2003; Mukherjee et al., 2005). Venkatesh y Rong han observado que la combinación entre el fluconazol y la lactoferrina recombinante humana muestra un potente efecto sinérgico contra tres aislamientos de *Candida albicans* sensibles al fluconazol (Venkatesh y Rong, 2008). Estos autores emplearon cepas aisladas de sangre periférica de neonatos con sepsis y de adultos. Otros autores han observado como los péptidos sintéticos derivados de la lactoferrina presentan una actividad antifúngica mayor que la lactoferrina (Lupetti et al., 2000). Lupetti y colaboradores analizaron los péptidos derivados de lactoferrina contra un aislamiento de *Candida albicans* resistente al fluconazol. La investigación de Morici y colaboradores muestra que un péptido derivado de la lactoferrina puede inhibir significativamente las etapas iniciales de la formación de biopelículas de *Candida albicans* (Morici et al., 2016). Estos investigadores estudiaron la combinación de los derivados de la lactoferrina y el fluconazol contra diez aislamientos clínicos de *Candida albicans*, de los cuales nueve eran sensibles al fluconazol y uno resistente.

Los resultados obtenidos del estudio de la combinación entre el fluconazol y la lactoferrina mediante las curvas de letalidad no presentaron concordancia con los datos obtenidos mediante el método del tablero de ajedrez, ya que esta combinación mostró un efecto indiferente tanto contra *Candida albicans* UPV 15-147, como contra *Candida parapsilosis* NCPF 3104, mientras que mediante el método del tablero de ajedrez el efecto fue sinérgico. Estas discrepancias entre los métodos pueden deberse a la diferencia en las concentraciones analizadas. En el estudio de la interacción entre la lactoferrina y el fluconazol mediante las curvas de letalidad la concentración de fluconazol empleada fue de 8  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que la concentración de este fármaco en la que se observó un efecto sinérgico mediante el tablero de ajedrez contra estos mismos aislamientos fue de 16  $\mu\text{g/ml}$ . Se seleccionó la concentración de 8  $\mu\text{g/ml}$  para el análisis de las curvas de letalidad para mantener la misma concentración de fluconazol en todas las combinaciones analizadas por este método contra los distintos aislamientos estudiados. Al contrario que lo que se ha observado en los distintos estudios

## Conclusiones

previos realizados en el presente trabajo, donde observamos que la lactoferrina posee actividad antifúngica, en los resultados obtenidos mediante el análisis de las curvas de letalidad no se observa dicha actividad contra ninguno de los aislamientos de *Candida* estudiados. Este hecho puede deberse a que la concentración de lactoferrina estudiada mediante este método fue menor que la analizada en el resto de métodos debido a que en el estudio de sensibilidad se emplea un rango de concentraciones que permite el análisis de un mayor número de concentraciones. Además, en los casos en los que se ha observado que posee actividad la CMI de lactoferrina era mayor que la concentración empleada para este estudio de las curvas de letalidad. La combinación mostró efecto sinérgico contra un aislamiento de *Candida albicans* resistente al fluconazol al analizarlo mediante este método, confirmando el resultado obtenido para dicho aislamiento mediante el tablero de ajedrez. No se han encontrado otros estudios en los que se combinen estos compuestos utilizando este método, por lo que nuestra investigación es la primera que muestra resultados del efecto de la combinación de fluconazol y lactoferrina sobre el crecimiento de diversos aislamientos de *Candida*.

La actividad de la lactoferrina contra *Candida* se ha relacionado con cambios en la permeabilidad de la membrana, efectos indirectos sobre la activación enzimática, privación del hierro mediante la capacidad para unirse y secuestrarlo o la combinación de varios de estos mecanismos (Nikawa et al., 1993). Este estudio mostró también que la variación de la actividad entre distintas especies de *Candida* podía deberse a las diferencias en la composición de la pared celular, en la sensibilidad a la activación enzimática o en la necesidad del hierro de las diferentes especies. El trabajo de Venkatesh y Rong ha propuesto que el mecanismo del efecto sinérgico de la lactoferrina con el fluconazol probablemente se deba a un efecto directo de la lactoferrina sobre las membranas celulares que complementaría la acción del fluconazol, ya que en otro estudio se observó que la actividad no depende del efecto secuestrador de hierro de la lactoferrina (Kuipers et al., 1999; Venkatesh y Rong, 2008). Kobayashi y colaboradores observaron que la actividad sinérgica mostrada por la combinación del fluconazol y la lactoferrina contra aislamientos de *Candida albicans* resistentes a ese fármaco antifúngico, depende de la sensibilidad a dicho fármaco y de los mecanismos de resistencia de los aislamientos (Kobayashi et al., 2011).

El estudio de la infección en modelos animales es muy útil tanto para analizar las interacciones entre el hospedador y el patógeno como para evaluar la eficacia de los tratamientos. El modelo en ratones es el más utilizado; sin embargo, el uso de mamíferos es complejo, costoso y éticamente cuestionable. Los modelos en animales invertebrados son una atractiva alternativa para la realización de muchos de estos estudios. Durante la evolución, los animales no vertebrados han desarrollado inmunidad contra patógenos microbianos, y por esta razón, existen similitudes funcionales y estructurales entre el sistema inmunológico innato de mamíferos e insectos (Fuchs y Mylonakis 2006; Mylonakis et al. 2007). Entre estos modelos, *Galleria mellonella* proporciona importantes ventajas como modelo experimental porque las larvas de este lepidóptero se pueden incubar en un rango de temperaturas que simulan las condiciones de la infección humana. Además, es posible inyectar concentraciones exactas del microorganismo patógeno. La viabilidad de las larvas de *Galleria* se valora con facilidad por la falta de movimiento y la melanización inducida en respuesta a la candidiasis. En este trabajo de Tesis hemos utilizado las larvas de *Galleria mellonella* para evaluar in vivo la eficacia de la terapia combinada en la infección diseminada por *Candida krusei*. Esta levadura muestra una virulencia reducida en los sistemas de mamíferos y la carga fúngica es significativamente menor en animales infectados con *Candida krusei* que en animales infectados con otros patógenos fúngicos (Arendrup, et al. 2002; Scorzoni et al. 2013). Además, *Candida krusei* es intrínsecamente resistente al fluconazol, por lo que ofrece un excelente modelo para correlacionar la eficacia antifúngica in vitro e in vivo. En estudios previos de nuestro grupo habíamos evaluado diferentes inóculos de esta especie por lo que se utilizó el más adecuado para desarrollar una infección susceptible de ser tratada farmacológicamente (Mateo et al. 2015).

Uno de los principales hallazgos de nuestro trabajo es la correlación entre la eficacia in vivo de los antifúngicos durante la infección por *Candida krusei* y sus perfiles de sensibilidad in vitro. El fluconazol no tuvo ningún efecto protector durante la infección por *Candida krusei* en el modelo de *Galleria mellonella*. Este resultado es comparable con el obtenido por Scorzoni y colaboradores. Estos autores mostraron que los modelos en animales invertebrados como *Caenorhabditis elegans* y *Galleria mellonella* son sencillos de utilizar y son sistemas adecuados para evaluar la eficacia antifúngica in vivo (Scorzoni et al. 2013). Analizaron la actividad cuatro

## Conclusiones

fármacos antifúngicos (fluconazol, voriconazol, anfotericina B y caspofungina) para el tratamiento de las infecciones producidas por *Candida krusei* y *Candida albicans*. El tratamiento con fluconazol, incluso en dosis muy altas (32 o 64 mg/kg), no aumentó la supervivencia de las larvas infectadas con *Candida krusei*, sin embargo, el tratamiento con todas las concentraciones de fluconazol ensayadas aumentó significativamente la supervivencia de las larvas infectadas con *Candida albicans*.

Además, se ha correlacionado el efecto sinérgico de la combinación de fluconazol con amiodarona, ciclosporina A, ibuprofeno y lactoferrina observado in vitro mediante la técnica del tablero de ajedrez con los resultados de supervivencia en *Galleria mellonella*. En todos los casos estudiados, se ha observado un aumento de la supervivencia de las larvas infectadas por *Candida krusei* tras el tratamiento combinado respecto al grupo control y a los grupos tratados con un único fármaco. Los trabajos publicados sobre la eficacia del tratamiento experimental de la candidiasis de combinación de fármacos antifúngicos con otros compuestos son muy escasos. Cowen y colaboradores evaluaron la actividad del fluconazol combinado con la geldanamicina, un inhibidor de la Hsp90 en el tratamiento de la infección por *Candida albicans* en *Galleria mellonella*. La terapia de combinación con estos fármacos, bien tolerados por el ser humano, aumentó significativamente la supervivencia de las larvas infectadas respecto del control sin tratar (Cowen et al., 2009). Estos autores señalan la importancia de la combinación de fluconazol con la geldanamicina en la mejora de la eficacia de los fármacos antifúngicos existentes, ya que limita la aparición de resistencias y ejerce una actividad de amplio espectro contra diversos patógenos fúngicos. Además, mostraron que las sinergias detectadas en el modelo en *Galleria mellonella* pueden reproducirse en mamíferos. Sin embargo De Melo y colaboradores han observado diferencias entre los efectos sinérgicos o antagonistas de combinaciones de fármacos en las pruebas in vitro e in vivo (de Melo et al., 2013). Su trabajo se centró en la evaluación del efecto de la miriocina, un inhibidor de la síntesis de esfingosina, un precursor de los esfingolípidos importante en la membrana celular y molécula de señalización celular. Este compuesto tiene también propiedades inmunosupresoras y antifúngicas. Sus efectos se estudiaron in vivo e in vitro, y se compararon solos y combinados con dos fármacos antifúngicos, el fluconazol y la anfotericina B. Los resultados de las pruebas in vitro mostraron un efecto antifúngico sinérgico. Sin embargo, el tratamiento de las larvas de

*Galleria mellonella* infectadas con *Candida albicans* no aumentó la supervivencia, al contrario, la mortalidad aumentó significativamente. El tratamiento con miriocina influyó en la expresión de genes implicados en la inmunidad y en el estrés durante la infección por *Candida albicans* produciendo un efecto inmunosupresor en el hospedador.

*Galleria mellonella* es un modelo de hospedador alternativo sencillo que facilita la evaluación de la patogenia de los hongos, así como la correlación de la sensibilidad in vitro con la eficacia in vivo de fármacos antifúngicos. Además, puede ser útil para seleccionar, a través de un cribado previo, fármacos o combinaciones para posterior evaluación en vertebrados con el objetivo de reducir el impacto ético de la investigación. Aunque el modelo en *Galleria mellonella* presenta varias ventajas y puede proporcionar información útil sobre la virulencia de los microorganismos y sobre la efectividad de los tratamientos farmacológicos, existen limitaciones en su uso ya que este invertebrado no presenta respuesta inmune adaptativa y por lo tanto el modelo no sería adecuado para estudios más complejos relacionados con este tipo de respuesta. De la misma manera, tampoco sería un modelo idóneo, dado su simplicidad anatómica y fisiológica, para analizar la toxicidad de fármacos sobre órganos complejos, como por ejemplo los efectos nefrotóxicos o hepatotóxicos que pueden causar. Por lo que sería necesario confirmar los resultados observados en *Galleria mellonella* con los obtenidos en un modelo más complejo antes de ser extrapolados al ser humano y comenzar con ensayos clínicos.

Los resultados obtenidos en esta Tesis mediante los métodos del tablero de ajedrez, con los modelos de interpretación FICI y  $\Delta E$ , las curvas de letalidad y los modelos experimentales in vivo nos han permitido evaluar nuevos enfoques en el tratamiento de las candidiasis invasoras producidas por aislamientos de *Candida* resistentes o con sensibilidad reducida al fluconazol. En este trabajo se ha mostrado que un tratamiento mediante la combinación del fluconazol con otros fármacos sin indicación terapéutica como agentes antifúngicos, como la ciclosporina A, ibuprofeno o lactoferrina pueden tener un efecto sinérgico. Este efecto sinérgico de la combinación farmacológica permitiría reducir el número de fracasos terapéuticos, los efectos adversos indeseables y disponer de tratamiento más asequibles para estas enfermedades.



**CONCLUSIONES**



## 6. CONCLUSIONES

1. Los métodos propuestos por el CLSI y el EUCAST para el estudio de la actividad antifúngica del fluconazol mediante el cálculo de la CMI han mostrado una excelente correlación contra distintos aislamientos de *Candida*.
2. La lactoferrina mostró actividad antifúngica contra *Candida*. Sin embargo, la amiodarona, la ciclosporina A y el ibuprofeno no la presentaron.
3. El método del tablero de ajedrez y el estudio de las curvas de letalidad mostraron resultados concordantes en la evaluación de la eficacia de las combinaciones de fármacos.
4. Los modelos mediante el cálculo del índice de concentración inhibitoria fraccionada FICI y la variación del porcentaje de crecimiento  $\Delta E$  interpretaron de manera similar los resultados obtenidos mediante la metodología del tablero de ajedrez.
5. La interacción entre fluconazol y amiodarona, ciclosporina A, ibuprofeno y lactoferrina contra aislamientos de *Candida* resistentes al fluconazol redujo notablemente la CMI de este fármaco antifúngico.
6. La combinación de fluconazol y ciclosporina A mostró un efecto antifúngico sinérgico contra la mitad de aislamientos de *Candida*.
7. La combinación de fluconazol y ciclosporina A fue fungicida contra *Candida albicans* NCPF 3153.
8. La combinación de fluconazol e ibuprofeno fue sinérgica contra todos los aislamientos de *Candida albicans* resistentes al fluconazol.
9. La combinación de fluconazol y lactoferrina fue sinérgica contra *Candida albicans* y *Candida glabrata*.

## Conclusiones

10. La combinación de fluconazol y ciclosporina A mejoró la supervivencia de las larvas infectadas con *Candida krusei* ATCC 6258 en el modelo de candidiasis en *Galleria mellonella*.

## **BIBLIOGRAFÍA**



## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Afeltra J, Dannaoui E, Meis JF, Rodriguez-Tudela JL, Verweij PE. (2002). In vitro synergistic interaction between amphotericin B and pentamidine against *Scedosporium prolificans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(10), 3323-3326.
2. Afeltra J, Verweij PE. (2003). Antifungal activity of nonantifungal drugs. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 22(7), 397-407.
3. Afeltra J, Vitale RG, Mouton JW, Verweij PE. (2004). Potent synergistic in vitro interaction between nonantimicrobial membrane-active compounds and itraconazole against clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* Resistant to itraconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(4), 1335-1343.
4. Agabian N, Köhler G, Morschhäuser J. (2006). Role of calcineurin in stress resistance, morphogenesis, and virulence of a *Candida albicans* wild-type strain. *Infection and Immunity*, 74(7), 4366-4369.
5. Akhouayri I, Turc C, Royet J, Charroux B. (2011). Toll-8/tollo negatively regulates antimicrobial response in the *Drosophila* respiratory epithelium. *PLoS Pathogens*, 7(10), e1002319.
6. Alarco A, Marcil A, Chen J, Suter B, Thomas D, Whiteway M. (2004). Immune-deficient *Drosophila melanogaster*: A model for the innate immune response to human fungal pathogens. *The Journal of Immunology*, 172(9), 5622.
7. Alastruey-Izquierdo A, Melhem MS, Bonfietti L, Rodriguez-Tudela JL. (2015). Susceptibility test for fungi: Clinical and laboratorial correlations in medical mycology. *Revista do Instituto De Medicina Tropical De São Paulo*, 57(Supl 19), 57-64.
8. Alem MA, Douglas LJ. (2003). Effects of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs on biofilms and planktonic cells of *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(1), 41-47.
9. Alexander BD, Byrne TC, Smith KL, Hanson KE, Anstrom KJ, Perfect JR, Reller LB. (2006). Comparative evaluation of etest and sensititre YeastOne panels against the clinical and laboratory standards institute M27-A2 reference broth microdilution method for testing *Candida* susceptibility to seven antifungal agents. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(3), 698-706.
10. Allen D, Wilson D, Drew R, Perfect J. (2015). Azole antifungals: 35 years of invasive fungal infection management. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 13(6), 787-798.

## Bibliografía

11. Almirante B, Rodríguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, the Barcelona Candidemia Project Study Group. (2004). Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: Results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(4), 1829-1835.
12. Ansari S, Hedayati M, Zomorodian K, Pakshir K, Badali H, Rafiei A, Seyedmousavi S. (2016). Molecular characterization and in vitro antifungal susceptibility of 316 clinical isolates of dermatophytes in Iran. *Mycopathologia*, 181(1), 89-95.
13. Apidianakis Y, Rahme LG, Heitman J, Ausubel FM, Calderwood SB, Mylonakis E. (2004). Challenge of *Drosophila melanogaster* with *Cryptococcus neoformans* and role of the innate immune response. *Eukaryotic Cell*, 3(2), 413-419.
14. Arai, R., Sugita, T., & Nishikawa, A. (2005). Reassessment of the in vitro synergistic effect of fluconazole with the non-steroidal anti-inflammatory agent ibuprofen against *Candida albicans*. *Mycoses*, 48(1), 38-41.
15. Arendrup MC, Bruun B, Christensen JJ, Fuursted K, Johansen HK, Kjældgaard P, Truberg K. (2011). National surveillance of fungemia in Denmark (2004 to 2009). *Journal of Clinical Microbiology*, 49(1), 325-334.
16. Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope W, the Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). (2017). Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. EUCAST definitive document *EDef 7.3.1*
17. Arendrup MC, Dzajic E, Jensen RH, Johansen HK, Kjaldgaard P, Knudsen JD, Schønheyder HC. (2013). Epidemiological changes with potential implication for antifungal prescription recommendations for fungaemia: Data from a nationwide fungaemia surveillance programme. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(8), e353.
18. Arendrup MC, Horn T, Frimodt-Moller N. (2002). In vivo pathogenicity of eight medically relevant *Candida* species in an animal model. *Infection*, 30(5), 286-291.
19. Arendrup MC, Perlin DS. (2014). Echinocandin resistance: An emerging clinical problem? *Current Opinion in Infectious Diseases*, 27(6), 484-492.
20. Arendrup MC. (2014). Update on antifungal resistance in *Aspergillus* and *Candida*. *Clinical Microbiology and Infection*, 20, Supplement 6, 42-48.
21. Arvanitis M, Glavis-Bloom J, Mylonakis E. (2013). Invertebrate models of fungal infection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease; Animal Models of Disease*, 1832(9), 1378-1383.

22. Asmundsdottir LR, Erlendsdottir H, Gottfredsson M. (2013). Nationwide study of candidemia, antifungal use, and antifungal drug resistance in Iceland, 2000 to 2011. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(3), 841-848.
23. Athanasios, T., Christos, T., & Groll, A. H. (2015). Invasive candidiasis and candidaemia in neonates and children: Update on current guidelines. *Mycoses*, 58(1), 10-21.
24. Baillie GS, Douglas LJ. (2000). Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46(3), 397-403.
25. Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda, SK. (2015). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79.
26. Banville N, Browne N, Kavanagh K. (2012). Effect of nutrient deprivation on the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection. *Virulence*, 3(6), 497-503.
27. Bassetti M, Merelli M, Righi E, Diaz-Martin A, Rosello EM, Luzzati R, Tumbarello M. (2013). Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility, and outcome of candidemia across five sites in Italy and Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(12), 4167-4172.
28. Bassetti M, Peghin M, Timsit J. (2016). The current treatment landscape: Candidiasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(suppl 2), ii22.
29. Bassetti M, Taramasso L, Nicco E, Molinari MP, Mussap M, Viscoli C. (2011). Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility and outcome of nosocomial candidemia in a tertiary care hospital in Italy. *PLoS ONE*, 6(9), e24198.
30. Beggs WH. (1982). Combined activity of ketoconazole and sulphamethoxazole against *Candida albicans*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 10(6), 539-541.
31. Ben-Ami R, Lewis RE, Kontoyiannis DP. (2011). In vitro interactions among echinocandins against *Aspergillus fumigatus*: Lack of concordance among methods. *Medical Mycology*, 49(3), 285-288.
32. Berkow EL, Lockhart SR. (2017). Fluconazole resistance in *Candida* species: A current perspective. *Infection and Drug Resistance*, 10, 237-245.
33. Berkow EL, Manigaba K, Parker JE, Barker KS, Kelly SL, Rogers PD. (2015). Multidrug transporters and alterations in sterol biosynthesis contribute to azole antifungal resistance in *Candida parapsilosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(10), 5942-5950.
34. Blankenship JR, Wormley FL, Boyce MK, Schell WA, Filler SG, Perfect JR, Heitman J. (2003). Calcineurin is essential for *Candida albicans* survival in serum and virulence. *Eukaryotic Cell*, 2(3), 422-430.

## Bibliografía

35. Bowman TV, Zon LI. (2010). Swimming into the future of drug discovery: In vivo chemical screens in zebrafish. *ACS Chemical Biology*, 5(2), 159-161.
36. Bozó A, Domán M, Majoros L, Kardos G, Varga I, Kovács R. (2016). The in vitro and in vivo efficacy of fluconazole in combination with farnesol against *Candida albicans* isolates using a murine vulvovaginitis model. *Journal of Microbiology*, 54(11), 753-760.
37. Breger J, Fuchs BB, Aperis G, Moy TI, Ausubel FM, Mylonakis E. (2006). Antifungal chemical compounds identified using a *C. elegans* pathogenicity assay. *PLoS Pathogens*, 3(2), e18.
38. Brennan M, Thomas DY, Whiteway M, Kavanagh K. (2002). Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 34(2), 153-157.
39. Brenner S. (1973). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77(1), 71-94.
40. Brothers KM, Newman ZR, Wheeler RT. (2011). Live imaging of disseminated candidiasis in zebrafish reveals role of phagocyte oxidase in limiting filamentous growth. *Eukaryotic Cell*, 10(7), 932-944.
41. Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC. (2012). Hidden killers: Human fungal infections. *Science Translational Medicine*, 4(165), 165rv13.
42. Bruni N, Capucchio TM, Biasibetti E, Pessione E, Cirrincione S, Giraudo L, Dosio, F. (2016). Antimicrobial activity of lactoferrin-related peptides and applications in human and veterinary medicine. *Molecules* 21(6), 752.
43. Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC. (2012). *Goodman & Gilman: las bases farmacológicas de la terapéutica (12a. ed.)*. México, D.F: McGraw-Hill Interamericana.
44. Cafini F, Sevillano D, Alou L, Gómez-Aguado F, Corcuera MT, González N, Prieto, J. (2012). Effect of protein binding on the activity of voriconazole alone or combined with anidulafungin against *Aspergillus* spp. using a time-kill methodology. *Revista Española de Quimioterapia* 25(1), 47.
45. Cantón E, Martín-Mazuleos E, Espinel-Ingroff A. (2007). Cap. 15a - Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos. En: Pemán J, Martín-Mazuleos E, Rubio MC (eds). *Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica*.
46. Cantón E, Pemán J, Gobernado M, Viudes A, Espinel-Ingroff A. (2004). Patterns of amphotericin B killing kinetics against seven *Candida* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(7), 2477-2482.
47. Cantón E, Pemán J, Gobernado M, Viudes A, Espinel-Ingroff A. (2005). Synergistic activities of fluconazole and voriconazole with terbinafine against four *Candida* Species

- determined by checkerboard, time-kill, and etest methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(4), 1593-1596.
48. Cantón E, Pemán J, Quindós G, Eraso E, Miranda-Zapico I, Álvarez M, the FUNGEMYCA Study Group. (2011). Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(12), 5590-5596.
  49. Cantón E, Pemán J. (1999). Curvas de letalidad en antifúngicos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 16, 82-85.
  50. Capilla J, Clemons KV, Stevens DA. (2007). Animal models: An important tool in mycology. *Medical Mycology*, 45(8), 657-684.
  51. Chamilos G, Lionakis MS, Lewis RE, Lopez-Ribot J, Saville SP, Albert ND, Kontoyiannis DP. (2006). *Drosophila melanogaster* as a facile model for large-scale studies of virulence mechanisms and antifungal drug efficacy in *Candida* species. *The Journal of Infectious Diseases*, 193(7), 1014-1022.
  52. Chao C, Hsu P, Jen C, Chen I, Wang C, Chan H, Chuang Y. (2010). Zebrafish as a model host for *Candida albicans* infection. *Infection and Immunity*, 78(6), 2512-2521.
  53. Charroux B, Royet J. (2010). *Drosophila* immune response: From systemic antimicrobial peptide production in fat body cells to local defense in the intestinal tract. *Fly*, 4(1), 40-47.
  54. Chaturvedi V, Ramani R, Andes D, Diekema DJ, Pfaller MA, Ghannoum MA, Sein T. (2011). Multilaboratory testing of two-drug combinations of antifungals against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida parapsilosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(4), 1543-1548.
  55. Chen S, Slavin M, Nguyen Q, Marriott D, Playford EG, Ellis D, Sorrell T. (2006). Active surveillance for candidemia, Australia. *Emerging Infectious Diseases*, 12(10), 1508.
  56. Chen S, Slavin M, Sorrell T (2011). Echinocandin antifungal drugs in fungal infections. *Drugs*, 71(1), 11-41.
  57. Chen Y, Lehman VN, Averette AF, Perfect JR, Heitman J. (2013). Posaconazole exhibits in vitro and in vivo synergistic antifungal activity with caspofungin or FK506 against *Candida albicans*. *PLoS ONE*, 8(3), e57672.
  58. Chen YL, Brand A, Morrison EL, Silao FG, Bigol UG, Malbas FF, Heitman J. (2011). Calcineurin controls drug tolerance, hyphal growth, and virulence in *Candida dubliniensis*. *Eukaryotic Cell*, 10(6), 803-819.

## Bibliografía

59. Chrisman CJ, Alvarez M, Casadevall A. (2010). Phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* by, and nonlytic exocytosis from, *Acanthamoeba castellanii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(18), 6056-6062.
60. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2008). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. clinical and laboratory standards institute, Wayne, PA. *CLSI document M27-A3*.
61. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2009). Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved guideline-second edition, Wayne, PA. *CLSI document M44-A2*.
62. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Fourth International Supplement, Wayne, PA. *CLSI document M27-A3 S4*.
63. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2017). Performance standards for antifungal susceptibility testing of yeasts, Wayne, PA. *CLSI supplement M60*.
64. Cordeiro RA, Macedo RB, Teixeira CEC, de Farias FJ, Bandeira, Pinheiro TJ, Moreira JLB, Sidrim JJC. (2014). The calcineurin inhibitor cyclosporin A exhibits synergism with antifungals against *Candida parapsilosis* species complex. *Journal of Medical Microbiology*, 63(7), 936-944.
65. Costa-de-Oliveira S, Miranda IM, Silva-Dias A, Silva AP, Rodrigues AG, Pina-Vaz C. (2015). Ibuprofen potentiates the in vivo antifungal activity of fluconazole against *Candida albicans* murine infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(7), 4289-4292.
66. Courchesne WE, Sedide O. (2003). Amiodarone induces a caffeine-inhibited, MID1-dependent rise in free cytoplasmic calcium in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 47(1), 223-234.
67. Courchesne WE. (2002). Characterization of a novel, broad-based fungicidal activity for the antiarrhythmic drug amiodarone. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 300(1), 195.
68. Cowen LE, Sanglard D, Howard SJ, Rogers PD, Perlin DS. (2015). Mechanisms of antifungal drug resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(7), a019752.
69. Cowen LE, Singh SD, Köhler JR, Collins C, Zaas AK, Schell WA, Aziz H, Mylonakis E, Perfect JR, Whitesell L, Lindquist S. (2009). Harnessing Hsp90 function as a powerful, broadly effective therapeutic strategy for fungal infectious disease. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 106(8), 2818-2823.
70. Cruz MC, Del Poeta M, Wang P, Wenger R, Zenke G, Quesniaux VFJ, Heitman J. (1999). Immunosuppressive and nonimmunosuppressive cyclosporine analogs are toxic to the

- opportunistic fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* via cyclophilin-dependent inhibition of calcineurin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(1), 143-149.
71. Cruz MC, Goldstein AL, Blankenship JR, Del Poeta M, Davis D, Cardenas ME, Heitman J. (2002). Calcineurin is essential for survival during membrane stress in *Candida albicans*. *The EMBO Journal*, 21(4), 546-559.
  72. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Bernal-Martinez L, Cuesta I, Buitrago MJ, Rodriguez-Tudela JL. (2010). Comparison of the vitek 2 antifungal susceptibility system with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) broth microdilution reference methods and with the sensititre YeastOne and etest techniques for in vitro detection of antifungal resistance in yeast isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(5), 1782-1786.
  73. Cuesta I, Bielza C, Cuenca-Estrella M, Larrañaga P, Rodríguez-Tudela JL. (2010). Evaluation by data mining techniques of fluconazole breakpoints established by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and comparison with those of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(4), 1541-1546.
  74. Cui J, Kaandorp JA, Sloot PMA, Lloyd CM, Filatov MV. (2009). Calcium homeostasis and signaling in yeast cells and cardiac myocytes. *FEMS Yeast Research*, 9(8), 1137-1147.
  75. Cui J, Ren B, Tong Y, Dai H, Zhang L. (2015). Synergistic combinations of antifungals and anti-virulence agents to fight against *Candida albicans*. *Virulence*, 6(4), 362-371.
  76. d'Enfert C. (2009). Hidden killers: Persistence of opportunistic fungal pathogens in the human host. *Current Opinion in Microbiology*, 12(4), 358-364.
  77. da Silva CR, de Andrade Neto JB, Sidrim JJ, Ângelo MR, Magalhães HI, Cavalcanti BC, Nobre Júnior HV. (2013). Synergistic effects of amiodarone and fluconazole on *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(4), 1691-1700.
  78. Dananjaya SH, Udayangani RM, Shin SY, Edussuriya M, Nikapitiya C, Lee J, De Zoysa M. (2017). In vitro and in vivo antifungal efficacy of plant based lawsone against *Fusarium oxysporum* species complex. *Microbiological Research*, 201, 21-29.
  79. Danilova N, Hohman VS, Sacher F, Ota T, Willett CE, Steiner LA. (2004). T cells and the thymus in developing zebrafish. *Developmental & Comparative Immunology*, 28(7), 755-767.
  80. Dannaoui E, Schwarz P, Lortholary O. (2009). In vitro interactions between antifungals and immunosuppressive drugs against zygomycetes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(8), 3549-3551.

## Bibliografía

81. de Melo NR, Abdrahman A, Greig C, Mukherjee K, Thornton C, Ratcliffe NA, Vilcinskas A, Butt TM. (2013). Myriocin significantly increases the mortality of a non-mammalian model host during *Candida* pathogenesis. *PLoS One*, 8(11), e78905.
82. de Oliveira LF, Jorge AO, Dos Santos SS. (2006). In vitro minocycline activity on superinfecting microorganisms isolated from chronic periodontitis patients. *Brazilian Oral Research*, 20(3), 202-206.
83. de Quadros AU, Bini D, Pereira PA, Moroni EG, Monteiro MC. (2011). Antifungal activity of some cyclooxygenase inhibitors on *Candida albicans*: PGE2-dependent mechanism. *Folia Microbiologica*, 56(4), 349-352.
84. de Repentigny L. (2004). Animal models in the analysis of *Candida* host–pathogen interactions. *Current Opinion in Microbiology*, 7(4), 324-329.
85. Desalermos A, Fuchs BB, Mylonakis E. (2012). Selecting an invertebrate model host for the study of fungal pathogenesis. *PLOS Pathogens*, 8(2), e1002451.
86. Deslauriers N, Côté L, Montplaisir S, de Repentigny L. (1997). Oral carriage of *Candida albicans* in murine AIDS. *Infection and Immunity*, 65(2), 661-667.
87. Di Veroli GY, Fornari C, Wang D, Mollard S, Bramhall JL, Richards FM, Jodrell DI. (2016). Combenefit: An interactive platform for the analysis and visualization of drug combinations. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 32(18), 2866-2868.
88. Diekema D, Arbefeville S, Boyken L, Kroeger J, Pfaller M. (2012). The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease*, 73(1), 45-48.
89. Dotis J, Prasad P, Zaoutis T, Roilides E. (2012). Epidemiology, risk factors and outcome of *Candida parapsilosis* bloodstream infection in children. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 31(6), 557-560.
90. Dudiuk C, Gamarra S, Leonardeli F, Jimenez-Ortigosa C, Vitale RG, Afeltra J, Garcia-Effron G. (2014). Set of classical PCRs for detection of mutations in *Candida glabrata* FKS genes linked with echinocandin resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(7), 2609-2614.
91. Duncan VM, O'Neil DA. (2013). Commercialization of antifungal peptides. *Fungal Biology Reviews; Revealing Diverse Modes of Action and Biological Roles of Antifungal Peptides*, 26(4), 156-165.
92. Egunsola O, Adefurin A, Fakis A, Jacqz-Aigrain E, Choonara I, Sammons H. (2012). Safety of fluconazole in paediatrics: A systematic review. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 69(6), 1211-1221.

93. Ells R, Kock J, Albertyn J, Kemp G, Pohl C. (2011). Effect of inhibitors of arachidonic acid metabolism on prostaglandin E2 production by *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* biofilms. *Medical Microbiology and Immunology*, 200(1), 23-28.
94. Erb-Downward J, Noverr MC. (2007). Characterization of prostaglandin E(2) production by *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, 75(7), 3498-3505.
95. Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Cuenca-Estrella M, Pfaller MA, Rinaldi M, Rodriguez-Tudela JL, Verweij PE. (2005). International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(8), 3884-3889.
96. Espinel-Ingroff A, Turnidge J. (2016). The role of epidemiological cutoff values (ECVs/ECOFFs) in antifungal susceptibility testing and interpretation for uncommon yeasts and moulds. *Revista Iberoamericana De Micología*, 33(2), 63-75.
97. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. Antifungal agents breakpoint tables for interpretation of MICs. Version 9.0, ([http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/))
98. Ewbank JJ, Zugasti O. (2011). *C. elegans*: Model host and tool for antimicrobial drug discovery. *Disease Models & Mechanisms*, 4(3), 300-304.
99. Falagas ME, Roussos N, Vardakas KZ. (2010). Relative frequency of albicans and the various non-albicans *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: A systematic review. *International Journal of Infectious Diseases*, 14(11), e966.
100. Fallon JP, Troy N, Kavanagh K. (2011). Pre-exposure of galleria mellonella larvae to different doses of *Aspergillus fumigatus* conidia causes differential activation of cellular and humoral immune responses. *Virulence*, 2(5), 413-421.
101. Felipe LO, Júnior WFDS, Araújo KC, Fabrino DL. (2017). Lactoferrin, chitosan and melaleuca alternifolia-natural products that show promise in candidiasis treatment. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(2), 212-219.
102. Ferrandon D, Imler J, Hetru C, Hoffmann JA. (2007). The *Drosophila* systemic immune response: Sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nature Reviews Immunology*, 7, 862.
103. Fleiss JL. (2011) The design and analysis of clinical experiments. Nueva York: John Wiley & Sons, Inc.
104. Flowers SA, Barker KS, Berkow EL, Toner G, Chadwick SG, Gyax SE, Rogers PD. (2012). Gain-of-function mutations in UPC2 are a frequent cause of ERG11 upregulation in azole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, 11(10), 1289-1299.

## Bibliografía

105. Fuchs BB, Eby J, Nobile CJ, El Khoury JB, Mitchell AP, Mylonakis E. (2010). Role of filamentation in *Galleria mellonella* killing by *Candida albicans*. *Microbes and Infection/Institut Pasteur*, 12(6), 488-496.
106. Fuchs BB, Mylonakis E. (2006). Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. *Current Opinion in Microbiology*, 9(4) 346-351.
107. Gamarra S, Rocha EMF, Zhang Y, Park S, Rao R, Perlin DS. (2010). Mechanism of the synergistic effect of amiodarone and fluconazole in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(5), 1753-1761.
108. Gao Y, Zhang C, Lu C, Liu P, Li Y, Li H, Sun S. (2013). Synergistic effect of doxycycline and fluconazole against *Candida albicans* biofilms and the impact of calcium channel blockers. *FEMS Yeast Research*, 13(5), 453-462.
109. Gary C, Sean D, Kevin K. (2000). Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 27(2), 163-169.
110. Gessner PK. (1995). Isobolographic analysis of interactions: An update on applications and utility. *Toxicology; Chemical Mixtures and Quantitative Risk Assessment*, 105(2), 161-179.
111. Giacomotto J, Ségalat L. (2010). High-throughput screening and small animal models, where are we? *British Journal of Pharmacology*, 160(2), 204-216.
112. Gil-Alonso S, Jauregizar N, Cantón E, Eraso E, Quindós G. (2015). In vitro fungicidal activities of anidulafungin, caspofungin, and micafungin against *Candida glabrata*, *Candida bracarensis* and *Candida nivariensis* evaluated by time-kill studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(6), 3615-3618.
113. Gil-Alonso S, Jauregizar N, Ortega I, Eraso E, Suárez E, Quindós G. (2016). In vitro pharmacodynamic modelling of anidulafungin against *Candida* spp. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 47(3), 178-183.
114. Glavis-Bloom J, Muhammed M, Mylonakis E. (2012). Of Model Hosts and Man: Using *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* and *Galleria mellonella* as Model Hosts for Infectious Disease Research. En: Mylonakis E., Ausubel F., Gilmore M., Casadevall A. (eds) Recent Advances on Model Hosts. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 710. Springer, New York, NY.
115. Gobernado Santos M, Cantón E. (2008). Anidulafungina. *Revista Española de Quimioterapia*, 21(2), 99-114.
116. Goldoni M, Johansson C. (2007). A mathematical approach to study combined effects of toxicants in vitro: Evaluation of the Bliss independence criterion and the Loewe additivity model. *Toxicology in Vitro*, 21(5), 759-769.

117. Gould K. (2016). Antibiotics: From prehistory to the present day. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(3), 572-575.
118. Gratacap RL, Wheeler RT. (2014). Utilization of zebrafish for intravital study of eukaryotic pathogen–host interactions. *Developmental and Comparative Immunology*, 46(1), 108-115.
119. Graybill JR, Bocanegra R, Najvar LK, Hernandez S, Larsen RA. (2003). Addition of caspofungin to fluconazole does not improve outcome in murine candidiasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(7), 2373-2375.
120. Greco WR, Bravo G, Parsons JC. (1995). The search for synergy: A critical review from a response surface perspective. *Pharmacol Rev*, 47(2), 331.
121. Gu W, Guo D, Zhang L, Xu D, Sun S. (2016). The synergistic effect of azoles and fluoxetine against resistant *Candida albicans* strains is attributed to attenuating fungal virulence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(10), 6179-6188.
122. Gu W, Yu Q, Yu C, Sun S. (2018). In vivo activity of fluconazole/tetracycline combinations in *Galleria mellonella* with resistant *Candida albicans* infection. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 13, 74-80.
123. Guentzel MN, Herrera C. (1982). Effects of compromising agents on candidosis in mice with persistent infections initiated in infancy. *Infection and Immunity*, 35(1), 222-228.
124. Guo N, Wu X, Yu L, Liu J, Meng R, Jin J, Deng X. (2010). In vitro and in vivo interactions between fluconazole and allicin against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida albicans* determined by alternative methods. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 58(2), 193-201.
125. Guo Q, Sun S, Yu J, Li Y, Cao L. (2008). Synergistic activity of azoles with amiodarone against clinically resistant *Candida albicans* tested by checkerboard and time–kill methods. *Journal of Medical Microbiology*, 57(4), 457-462.
126. Gupta SS, Ton VK, Beaudry V, Rulli S, Cunningham K, Rao R. (2003). Antifungal activity of amiodarone is mediated by disruption of calcium homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*, 278(31), 28831-28839.
127. Hampe IAI, Friedman J, Edgerton M, Morschhäuser J. (2017). An acquired mechanism of antifungal drug resistance simultaneously enables *Candida albicans* to escape from intrinsic host defenses. *PLOS Pathogens*, 13(9), e1006655.
128. Harris TW, Chen N, Cunningham F, Tello-Ruiz M, Antoshechkin I, Bastiani C, Stein LD. (2003). WormBase: A multi-species resource for nematode biology and genomics. *Nucleic Acids Research*, 32, D417.
129. Heeres J, Meerpoel L, Lewi P. (2010). *Conazoles*, 15(6), 4129-4188.

## Bibliografía

130. Helmerhorst EJ, Hodgson R, van't Hof W, Veerman ECI, Allison C, Nieuw Amerongen Av. (1999). The effects of histatin-derived basic antimicrobial peptides on oral biofilms. *Journal of Dental Research*, 78(6), 1245-1250.
131. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Tarrance J, Berthelot C, Muffato M, Stemple DL. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498-503.
132. Huang S, Cao YY, Dai BD, Sun XR, Zhu ZY, Cao YB, Jiang YY. (2008). *In vitro* synergism of fluconazole and baicalin against clinical isolates of *Candida albicans* resistant to fluconazole. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31(12), 2234-2236.
133. Irazoqui JE, Urbach JM, Ausubel FM. (2010). Evolution of host innate defence: Insights from *C. elegans* and primitive invertebrates. *Nature Reviews.Immunology*, 10(1), 47-58.
134. Jang MJ, Shin JH, Lee WG, Kim MN, Lee K, Lee HS, Ryang DW. (2013). *In vitro* Fluconazole and voriconazole susceptibilities of *Candida* Bloodstream isolates in Korea: Use of the CLSI and EUCAST epidemiological cutoff values. *Annals of Laboratory Medicine*, 33(3), 167-173.
135. Jia W, Zhang H, Li C, Li G, Liu X, Wei J. (2016). The calcineurin inhibitor cyclosporine synergistically enhances the susceptibility of *Candida albicans* biofilms to fluconazole by multiple mechanisms. *BMC Microbiology*, 16(113).
136. Jia Y, Tang R, Wang L, Zhang X, Wang Y, Jia X, Jiang Y. (2012). Calcium-activated-calceinurin reduces the *in vitro* and *in vivo* sensitivity of fluconazole to *Candida albicans* via Rta2p. *PLoS ONE*, 7(10), e48369.
137. Juvvadi PR, Lee SC, Heitman J, Steinbach WJ (2016). Calcineurin in fungal virulence and drug resistance: Prospects for harnessing targeted inhibition of calcineurin for an antifungal therapeutic approach. *Virulence*, 8(2), 186-197.
138. Kanther M, Rawls JF. (2010). Host-microbe interactions in the developing zebrafish. *Current Opinion in Immunology*, 22(1), 10-19.
139. Kanungo J, Cuevas E, Ali SF. (2014). Zebrafish model in drug safety assessment. *Current Pharmaceutical Design*, 20(34), 5416-5429.
140. Katiyar SK, Alastruey-Izquierdo A, Healey KR, Johnson ME, Perlin DS, Edlind TD. (2012). Fks1 and Fks2 are functionally redundant but differentially regulated in *Candida glabrata*: Implications for echinocandin resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(12), 6304-6309.
141. Kaur R, Castaño I, Cormack BP. (2004). Functional genomic analysis of fluconazole susceptibility in the pathogenic yeast *Candida glabrata*: Roles of calcium signaling and mitochondria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(5), 1600-1613.

142. Kavanagh K, Dowd S. (2004). Histatins: Antimicrobial peptides with therapeutic potential. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56(3), 285-289.
143. Kavanagh K, Fallon JP. (2010). *Galleria mellonella* larvae as models for studying fungal virulence. *Fungal Biology Reviews*, 24(1), 79-83.
144. Kelly J, Kavanagh K. (2011). Caspofungin primes the immune response of the larvae of *Galleria mellonella* and induces a non-specific antimicrobial response. *Journal of Medical Microbiology*, 60(2), 189-196.
145. Kiraz N, Dağ I, Yamac M, Kiremitci A, Kaşifoğlu N, Akgun Y. (2008). Antifungal activity of caspofungin in combination with amphotericin B against *Candida glabrata*: Comparison of disk diffusion, etest, and time-kill methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(2), 788-790.
146. Kiraz N, Dağ I, Yamac M, Kiremitci A, Kaşifoğlu N, Oz Y. (2010). Synergistic activities of three triazoles with caspofungin against *Candida glabrata* isolates determined by time-kill, etest, and disk diffusion methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(5), 2244-2247.
147. Kobayashi T, Kakeya H, Miyazaki T, Izumikawa K, Yanagihara K, Ohno H, Kohno S. (2011). Synergistic antifungal effect of lactoferrin with azole antifungals against *Candida albicans* and a proposal for a new treatment method for invasive candidiasis. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 64(4), 292.
148. Konopka K, Dorocka-Bobkowska B, Gebremedhin S, Düzgüneş N. (2010). Susceptibility of *Candida* biofilms to histatin 5 and fluconazole. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 97(4), 413-417.
149. Kovács R, Bozó A, Gesztelyi R, Domán M, Kardos G, Nagy F, Majoros L. (2016). Effect of caspofungin and micafungin in combination with farnesol against *Candida parapsilosis* biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 47(4), 304-310.
150. Król J, Nawrot U, Bartoszewicz M. (2018). Anti-candidal activity of selected analgesic drugs used alone and in combination with fluconazole, itraconazole, voriconazole, posaconazole and isavuconazole. *Journal De Mycologie Médicale*, In Press (<https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2018.03.002>).
151. Kuhn DM, Balkis M, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. (2003). Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), 506-508.
152. Kuipers ME, de Vries HG, Eikelboom MC, Meijer DKF, Swart PJ. (1999). Synergistic fungistatic effects of lactoferrin in combination with antifungal drugs against clinical *Candida* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(11), 2635-2641.
153. LaFayette SL, Collins C, Zaas AK, Schell WA, Betancourt-Quiroz M, Gunatilaka AAL, Cowen LE. (2010). PKC signaling regulates drug resistance of the fungal pathogen *Candida*

## Bibliografía

- albicans* via circuitry comprised of Mkc1, calcineurin, and Hsp90. *PLoS Pathogens*, 6(8), e1001069.
154. Lam SH, Chua HL, Gong Z, Wen Z, Lam TJ, Sin YM. (2002). Morphologic transformation of the thymus in developing zebrafish. *Developmental Dynamics*, 225(1), 87-94.
  155. Lamarin GA, Chamilos G, Lewis RE, Kontoyiannis DP. (2007). Virulence studies of *Scedosporium* and *Fusarium* species in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Infectious Diseases*, 196(12), 1860-1864.
  156. Laupland KB, Gregson DB, Church DL, Ross T, Elsayed S. (2005). Invasive *Candida* species infections: A 5 year population-based assessment. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(3), 532-537.
  157. Lemaitre B, Hoffmann J. (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology*, 25(1), 697-743.
  158. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart J, Hoffmann J. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86(6), 973-983.
  159. Lepak AJ, Marchillo K, VanHecker J, Diekema D, Andes DR. (2013). Isavuconazole pharmacodynamic target determination for *Candida* species in an in vivo murine disseminated candidiasis model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(11), 5642-5648.
  160. Lewis RE, Diekema DJ, Messer SA, Pfaller MA, Klepser ME. (2002). Comparison of etest, chequerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49, 345-351.
  161. Li D, Deng L, Hu G, Zhao L, Hu D, Jiang Y, Wang Y. (2013). Using *Galleria mellonella*-*Candida albicans* infection model to evaluate antifungal agents. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 36(9), 1482-1487.
  162. Li H, Chen Z, Zhang C, Gao Y, Zhang X, Sun S. (2015a). Resistance reversal induced by a combination of fluconazole and tacrolimus (FK506) in *Candida glabrata*. *Journal of Medical Microbiology*, 64(1), 44-52.
  163. Li LP, Liu W, Liu H, Zhu F, Zhang DZ, Shen H, Jiang YY. (2015b). Synergistic antifungal activity of berberine derivative B-7b and fluconazole. *PLoS ONE*, 10(5), e0126393.
  164. Li P, White RM, Zon LI. (2011). Chapter 17 - transplantation in zebrafish. En: Detrich HW, Westerfield M, Zon LI (Eds.), *Methods in cell biology* (pp. 403-417)
  165. Li S, Song Y, Zhang L, Shi J, Ma Z, Guo H, Zhang, H. (2015d). An in vitro and in vivo study on the synergistic effect and mechanism of itraconazole or voriconazole alone and in

- combination with tetrandrine against *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Medical Microbiology*, 64(9), 1008-1020.
166. Li Y, Chang W, Zhang M, Li X, Jiao Y, Lou H. (2015c). Synergistic and drug-resistant reversing effects of diorcinol D combined with fluconazole against *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research*, 15(2), fov001.
167. Li Y, Sun S, Guo Q, Ma L, Shi C, Su L, Li H. (2008). In vitro interaction between azoles and cyclosporin A against clinical isolates of *Candida albicans* determined by the checkerboard method and time-kill curves. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61, 577-585.
168. Lilly EA, Ikeh M, Nash EE, Fidel PL, Noverr MC. (2017). Immune protection against lethal fungal-bacterial intra-abdominal infections. *mBio*, 9(1), 1472.
169. Lin Y, Yu HH, Zhao J, Han M, Zhu Y, Akter J, Li J. (2018). Polymyxin B in combination with enrofloxacin exerts synergistic killing against extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(6), e00028-18.
170. Lionakis MS, Kontoyiannis DP. (2005). Fruit flies as a minihost model for studying drug activity and virulence in aspergillus. *Medical Mycology*, 43(S1), 111-114.
171. Liu S, Hou Y, Chen X, Gao Y, Li H, Sun S. (2014). Combination of fluconazole with non-antifungal agents: A promising approach to cope with resistant *Candida albicans* infections and insight into new antifungal agent discovery. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 43(5), 395-402.
172. Lu M, Yu C, Cui X, Shi J, Yuan L, Sun S. (2018). Gentamicin synergises with azoles against drug-resistant *Candida albicans*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 51(1), 107-114.
173. Lupetti A, Paulusma-Annema A, Welling MM, Dogterom-Ballering H, Brouwer CP, Senesi S, Nibbering PH. (2002). Synergistic activity of the N-terminal peptide of human lactoferrin and fluconazole against *Candida* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(1), 262-267.
174. Lupetti A, Paulusma-Annema A, Welling MM, Senesi S, Van Dissel JT, Nibbering PH. (2000). Candidacidal activities of human lactoferrin peptides derived from the N terminus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(12), 3257-3263.
175. MacPherson S, Akache B, Weber S, De Deken X, Raymond M, Turcotte B. (2005). *Candida albicans* zinc cluster protein Upc2p confers resistance to antifungal drugs and is an activator of ergosterol biosynthetic genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(5), 1745-1752.

## Bibliografía

176. Maesaki S, Marichal P, Hossain M, Sanglard D, Vanden Bossche H, Kohno S. (1998). Synergic effects of tactolimus and azole antifungal agents against azole-resistant *Candida albicans* strains. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42(6), 747-753.
177. Mahir K, Emilio V, Giacomo P, Coste AT, Jacques B, Dominique S. (2006). CRZ1, a target of the calcineurin pathway in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology*, 59(5), 1429-1451.
178. Mak P, Zdybicka-Barabas A, Cytryńska M. (2010). A different repertoire of *Galleria mellonella* antimicrobial peptides in larvae challenged with bacteria and fungi. *Developmental & Comparative Immunology*, 34(10), 1129-1136.
179. Marchetti O, Moreillon P, Entenza JM, Vouillamoz J, Glauser MP, Bille J, Sanglard D. (2003). Fungicidal synergism of fluconazole and cyclosporine in *Candida albicans* is not dependent on multidrug efflux transporters encoded by the *CDR1*, *CDR2*, *CaMDR1*, and *FLU1* Genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(5), 1565-1570.
180. Marchetti O, Moreillon P, Glauser MP, Bille J, Sanglard D. (2000). Potent synergism of the combination of fluconazole and cyclosporine in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(9), 2373-2381.
181. Marichal P, Koymans L, Willemsens S, Bellens D, Verhasselt P, Luyten W, Vanden Bossche H. (1999). Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 $\alpha$ -demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology*, 145(10), 2701-2713.
182. Martel CM, Parker JE, Bader O, Weig M, Gross U, Warrilow AGS, Kelly SL. (2010). Identification and characterization of four azole-resistant *erg3* mutants of *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(11), 4527-4533.
183. Matar MJ, Ostrosky-Zeichner L, Paetznick VL, Rodriguez JR, Chen E, Rex JH. (2003). Correlation between E-test, disk diffusion, and microdilution methods for antifungal susceptibility testing of fluconazole and voriconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(5), 1647-1651.
184. Mateo E, Ortega-Riveros M, De la Pinta I, Ezpeleta G, Carton JD, Marcos-Arias C, Eraso E, Quindós G. (2014). Patogenicidad de *Candida* en modelos experimentales in vivo en *Caenorhabditis elegans* y *Galleria mellonella*. Bilbao, XII Congreso Nacional de Micología, Póster B9.
185. Mavor A, Thewes S, Hube B. (2005). Systemic fungal infections caused by *Candida* species: Epidemiology, infection process and virulence attributes. *Current Drug Targets*, 6(8), 863-874.
186. Mayer FL, Wilson D, Hube B. (2012). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119-128.
187. Meeker ND, Trede NS. (2008). Immunology and zebrafish: Spawning new models of human disease. *Developmental & Comparative Immunology*, 32(7), 745-757.

188. Meijer AH, Spaink HP. (2010). Host-pathogen interactions made transparent with the zebrafish model. *Current Drug Targets*, 12(7), 1000-1017.
189. Meletiadis J, Mouton JW, Meis JFGM, Verweij PE. (2003). In vitro drug interaction modeling of combinations of azoles with terbinafine against clinical *Scedosporium prolificans* Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(1), 106-117.
190. Meletiadis J, Pournaras S, Roilides E, Walsh TJ. (2010). Defining Fractional Inhibitory Concentration Index cutoffs for additive interactions based on self-drug additive combinations, Monte Carlo simulation analysis, and in vitro-in vivo correlation data for antifungal drug combinations against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(2), 602-609.
191. Meletiadis J, Te Dorsthorst DT, Verweij PE. (2006). The concentration-dependent nature of in vitro amphotericin b–itraconazole interaction against *Aspergillus fumigatus*: Isobolographic and response surface analysis of complex pharmacodynamics interactions. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 28(5), 439-449.
192. Meletiadis J, Verweij PE, Te Dorsthorst DT, Meis JFGM, Mouton JW. (2005). Assessing in vitro combinations of antifungal drugs against yeasts and filamentous fungi: Comparison of different drug interaction models. *Medical Mycology*, 43(2), 133-152.
193. Mensa J, Gatell J, García-Sánchez J, Letang E, López-Suñé E, Marco F. (2017). Guía de terapéutica antimicrobiana. Barcelona, Editorial Antares.
194. Mesa-Arango, A., Forastiero, A., Bernal-Martínez, L., Cuenca-Estrella, M., Mellado, E., & Zaragoza, O. (2013). The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the virulence of the fungal pathogen *Candida tropicalis* and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast. *Medical Mycology*, 51(5), 461-472.
195. Miyazaki T, Miyazaki Y, Izumikawa K, Kakeya H, Miyakoshi S, Bennett JE, Kohno S. (2005). Fluconazole treatment is effective against a *Candida albicans* erg3/erg3 mutant in vivo despite in vitro resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(2), 580-586.
196. Morici P, Fais R, Rizzato C, Tavanti A, Lupetti A. (2016). Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by the synthetic lactoferricin derived peptide hLF1-11. *PLoS ONE*, 11(11), e0167470.
197. Morio F, Loge C, Besse B, Hennequin C, Le Pape P. (2010). Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: New substitutions and a review of the literature. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 66(4), 373-384.
198. Morris MI. (2009). Posaconazole: A new oral antifungal agent with an expanded spectrum of activity. *American Journal of Health System Pharmacy*, 66(3), 225.

## Bibliografía

199. Mowlds P, Kavanagh K. (2008). Effect of pre-incubation temperature on susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection by candida albicans. *Mycopathologia*, 165(1), 5-12.
200. Moy TI, Ball AR, Anklesaria Z, Casadei G, Lewis K, Ausubel FM. (2006). Identification of novel antimicrobials using a live-animal infection model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(27), 10414-10419.
201. Muend S, Rao R. (2008). Fungicidal activity of amiodarone is tightly coupled to calcium influx. *FEMS Yeast Research*, 8(3), 425-431.
202. Mukherjee PK, Sheehan DJ, Hitchcock CA, Ghannoum MA. (2005). Combination treatment of invasive fungal infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(1), 163-194.
203. Mylonakis E, Casadevall A, Ausubel FM. (2007). Exploiting amoeboid and non-vertebrate animal model systems to study the virulence of human pathogenic fungi. *PLoS Pathog*, 3(7), e101.
204. Mylonakis E, Moreno R, El Khoury JB, Idnurm A, Heitman J, Calderwood SB, Diener A. (2005). *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infection and Immunity*, 73(7), 3842-3850.
205. Naglik JR, Fidel PL, Odds FC. (2008). Animal models of mucosal *Candida* infection. *FEMS Microbiology Letters*, 283(2), 129-139.
206. Nakajima R, Kitamura A, Someya K, Tanaka M, Sato K. (1995). In vitro and in vivo antifungal activities of DU-6859a, a fluoroquinolone, in combination with amphotericin B and fluconazole against pathogenic fungi. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(7), 1517-1521.
207. Nash EE, Peters BM, Lilly EA, Noverr MC, Fidel PL. (2016). A murine model of *Candida glabrata* vaginitis shows no evidence of an inflammatory immunopathogenic response. *PLoS ONE*, 11(1), e0147969.
208. Nathan C, Cars O. (2014). Antibiotic resistance — problems, progress, and prospects. *The New England Journal of Medicine*, 371(19), 1761-1763.
209. Nguyen MH, Wissel MC, Shields RK, Salomoni MA, Hao B, Press EG, Clancy CJ. (2012). Performance of *Candida* real-time polymerase chain reaction,  $\beta$ -D-glucan assay, and blood cultures in the diagnosis of invasive candidiasis. *Clinical Infectious Diseases*, 54(9), 1240.
210. Nieto MC, Tellería O, Cisterna R. (2015). Sentinel surveillance of invasive candidiasis in Spain: Epidemiology and antifungal susceptibility. *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease*, 81(1), 34-40.

211. Nikawa H, Jin C, Fukushima H, Makihira S, Hamada T. (2001). Antifungal activity of histatin-5 against non-albicans *Candida* species. *Oral Microbiology and Immunology*, 16(4), 250-252.
212. Nikawa H, Samaranayake LP, Tenovuo J, Pang KM, Hamada T. (1993). The fungicidal effect of human lactoferrin on *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Archives of Oral Biology*, 38(12), 1057-1063.
213. O'Callaghan D, Vergunst A. (2010). Non-mammalian animal models to study infectious disease: Worms or fly fishing? *Current Opinion in Microbiology; Host-Microbe Interactions: Bacteria*, 13(1), 79-85.
214. Odds FC, Hanson MF, Davidson AD, Jacobsen MD, Wright P, Whyte JA., Jones BL. (2007). One year prospective survey of *Candida* bloodstream infections in Scotland. *Journal of Medical Microbiology*, 56(8), 1066-1075.
215. Odds FC. (2003). Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(1), 1.
216. Odom A, Del Poeta M, Perfect J, Heitman J. (1997). The immunosuppressant FK506 and its nonimmunosuppressive analog L-685,818 are toxic to *Cryptococcus neoformans* by inhibition of a common target protein. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(1), 156-161.
217. Okawa Y, Miyauchi M, Kobayashi H. (2008). Comparison of pathogenicity of various *Candida tropicalis* strains. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31(8), 1507-1510. 10.1248/bpb.31.1507
218. Onyewu C, Afshari NA, Heitman J. (2006). Calcineurin promotes infection of the cornea by *Candida albicans* and can be targeted to enhance fluconazole therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(11), 3963-3965.
219. Onyewu C, Blankenship JR, Del Poeta M, Heitman J. (2003). Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(3), 956-964.
220. Orozco AS, Higginbotham LM, Hitchcock CA, Parkinson T, Falconer D, Ibrahim AS, Filler SG. (1998). Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(10), 2645-2649.
221. Ortega-Riveros M, De la Pinta I, Ezpeleta G, Marcos-Arias C, Quindós G, Eraso E. (2017). Usefulness of the Non-conventional *Caenorhabditis elegans* Model to Assess *Candida* Virulence. *Mycopathologia*, 182(9-10), 785-795
222. Oxman DA, Chow JK, Frenzl G, Hadley S, Hershkovitz S, Ireland P, Golan Y. (2010). *Candidaemia* associated with decreased in vitro fluconazole susceptibility: Is *Candida*

## Bibliografía

- speciation predictive of the susceptibility pattern? *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(7), 1460-1465.
223. Pankey G, Ashcraft D, Kahn H, Ismail A. (2014). Time-kill assay and etest evaluation for synergy with polymyxin B and fluconazole against *Candida glabrata*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(10), 5795-5800.
224. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, Sobel JD. (2016). Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the infectious diseases society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 62(4), e1-e50.
225. Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ. (2018). Invasive candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers*, 4, 18026.
226. Patterson TF, Arendrup MC. (2017). Multidrug-resistant *Candida*: Epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. *Journal of Infectious Diseases*, 216(4), S445.
227. Pemán J, Cantón E, Espinel-Ingroff A. (2009). Antifungal drug resistance mechanisms. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 7(4), 453-460.
228. Pemán J, Cantón E, Quindós G, Eraso, E, Alcoba J, Guinea J, on behalf of the FUNGEMYCA Study Group. (2012). Epidemiology, species distribution and *in vitro* antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(5), 1181-1187.
229. Pemán J, Salavert M. (2012). Epidemiología general de la enfermedad fúngica invasora. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 30(2), 90-98.
230. Pemán J, Salavert M. (2013). Epidemiology and prevention of nosocomial invasive infections by filamentous fungi and yeasts. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 31(5), 328.
231. Perlin DS, Rautemaa-Richardson R, Alastruey-Izquierdo A. (2017). The global problem of antifungal resistance: Prevalence, mechanisms, and management. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(12), e392.
232. Perlin DS. (2011). Current perspectives on echinocandin class drugs. *Future Microbiology*, 6(4), 441-457.
233. Perlin DS. (2014). Echinocandin resistance, susceptibility testing and prophylaxis: Implications for patient management. *Drugs*, 74(14), 1573-1585.
234. Perlin DS. (2015a). Echinocandin resistance in *Candida*. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 61, S617.
235. Perlin, D. S. (2015b). Mechanisms of echinocandin antifungal drug resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1354(1), 1-11.

236. Petrou MA, Rogers TR. (1991). Interactions in vitro between polyenes and imidazoles against yeasts. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 27(4), 491-506.
237. Pfaller MA, Andes D, Diekema DJ, Espinel-Ingroff A, Sheehan D. (2010). Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: Time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Drug Resistance Updates*, 13(6), 180-195.
238. Pfaller MA, Castanheira M, Messer SA, Rhomberg PR, Jones RN. (2014). Comparison of EUCAST and CLSI broth microdilution methods for the susceptibility testing of 10 systemically active antifungal agents when tested against *Candida* spp. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 79(2), 198-204.
239. Pfaller MA, Chaturvedi V, Diekema DJ, Ghannoum MA, Holliday NM, Killian SB, Ramani R. (2008). Clinical evaluation of the sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel for antifungal susceptibility testing of the echinocandins anidulafungin, caspofungin, and micafungin. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(7), 2155-2159.
240. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ellis D, Tullio V, and the Global Antifungal Surveillance Group. (2010). Results from the ARTEMIS DISK global antifungal surveillance study, 1997 to 2007: A 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), 1366-1377.
241. Pfaller MA, Diekema DJ, Procop GW, Rinaldi MG. (2007). Multicenter comparison of the VITEK 2 yeast susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing fluconazole against *Candida* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(3), 796-802.
242. Pfaller MA, Diekema DJ, Sheehan DJ. (2006). Interpretive breakpoints for fluconazole and *Candida* Revisited: A blueprint for the future of antifungal susceptibility testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(2), 435-447.
243. Pfaller MA, Diekema DJ. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(1), 133-163.
244. Pfaller MA, Diekema DJ. (2012). Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(9), 2846-2856.
245. Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Diekema DJ. (2011). Comparison of the broth microdilution (BMD) method of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing with the 24-hour CLSI BMD method for testing susceptibility of *Candida* species to fluconazole, posaconazole, and voriconazole by use of epidemiological cutoff values. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(3), 845-850.

## Bibliografía

246. Pfaller MA. (2012). Antifungal drug resistance: Mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *The American Journal of Medicine*, 125(1, Supplement), S13.
247. Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Costa-de-Oliveira S, Ricardo E, Mårdh P. (2005). Potent synergic effect between ibuprofen and azoles on *Candida* resulting from blockade of efflux pumps as determined by FUN-1 staining and flow cytometry. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(4), 678-685.
248. Pina-Vaz C, Sansonetty F, Rodrigues AG, Martinez-de-Oliveira J, Fonseca AF, Mårdh P. (2000). Antifungal activity of ibuprofen alone and in combination with fluconazole against *Candida* species. *Journal of Medical Microbiology*, 49(9), 831-840.
249. Planche V, Ducroz S, Alanio A, Bougnoux M, Lortholary O, Dannaoui E. (2012). In vitro combination of anidulafungin and voriconazole against intrinsically azole-susceptible and -resistant *Aspergillus* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(8), 4500-4503.
250. Polak A. (1999). The past, present and future of antimycotic combination therapy. *Mycoses*, 42(5-6), 355-370.
251. Prichard MN, Prichard LE, Baguley WA, Nassiri MR, Shipman C. (1991). Three-dimensional analysis of the synergistic cytotoxicity of ganciclovir and zidovudine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(6), 1060-1065.
252. Prichard MN, Prichard LE, Shipman C. (1993). Strategic design and three-dimensional analysis of antiviral drug combinations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(3), 540-545.
253. Puig-Asensio M, Padilla B, Garnacho-Montero J, Zaragoza O, Aguado JM, Zaragoza R, Paul M. (2014). Epidemiology and predictive factors for early and late mortality in candida bloodstream infections: A population-based surveillance in Spain. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(4), O254.
254. Puig-Asensio M, Ruiz-Camps I, Fernández-Ruiz M, Aguado JM, Muñoz P, Valerio M, Almirante B. (2015). Epidemiology and outcome of candidaemia in patients with oncological and haematological malignancies: Results from a population-based surveillance in Spain. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(5), 491.e10.
255. Pukkila-Worley R, Ausubel FM, Mylonakis E. (2011). *Candida albicans* infection of *Caenorhabditis elegans* induces antifungal immune defenses. *PLoS Pathogens*, 7(6), e1002074.
256. Pukkila-Worley R, Peleg AY, Tampakakis E, Mylonakis E. (2009). *Candida albicans* hyphal formation and virulence assessed using a *Caenorhabditis elegans* infection model. *Eukaryotic Cell*, 8(11), 1750-1758.
257. Puri S, Edgerton M. (2014). How does it kill? Understanding the candidacidal mechanism of salivary histatin 5. *Eukaryotic Cell*, 13(8), 958-964.

258. Quindós G. (2013). Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Revista Iberoamericana De Micología*, 31(1), 42-48.
259. Quindós G. (2015). *Micología Clínica*. Philadelphia, PA: Elsevier.
260. Raffetin A, Courbin V, Jullien V, Dannaoui E. (2018). In vitro combination of isavuconazole with echinocandins against azole-susceptible and -resistant *Aspergillus* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(1)10.
261. Reese LC, Taglialatela G. (2010). A role for calcineurin in Alzheimer's disease. *Current Neuropharmacology*, 9(4), 685-692.
262. Ricardo E, Costa-de-Oliveira S, Silva Dias A, Guerra J, Rodrigues AG, Pina-Vaz C. (2009). Ibuprofen reverts antifungal resistance on *Candida albicans* showing overexpression of CDR genes. *FEMS Yeast Research*, 9(4), 618-625.
263. Robbins N, Caplan T, Cowen LE. (2017). Molecular evolution of antifungal drug resistance. *Annual Review of Microbiology*, 71, 753-775.
264. Robbins N, Uppuluri P, Nett J, Rajendran R, Ramage G, Lopez-Ribot J, Cowen LE. (2011). Hsp90 governs dispersion and drug resistance of fungal biofilms. *PLoS Pathogens*, 7(9), e1002257.
265. Rodrigues CF, Silva S, Henriques M. (2014). *Candida glabrata*: A review of its features and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 33(5), 673-688.
266. Rodriguez-Tudela JL, Donnelly JP, Pfaller MA, Chryssantou E, Warn P, Denning DW, Cuenca-Estrella M. (2007). Statistical analyses of correlation between fluconazole MICs for *Candida* spp. assessed by standard methods set forth by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (E.dis. 7.1) and CLSI (M27-A2). *Journal of Clinical Microbiology*, 45(1), 109-111.
267. Rosato A, Catalano A, Carocci A, Carrieri A, Carone A, Caggiano G, Montagna MT. (2016). In vitro interactions between anidulafungin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on biofilms of *Candida* spp. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24(5), 1002-1005.
268. Rowan R, Moran C, McCann M, Kavanagh K. (2008). Use of *Galleria mellonella* larvae to evaluate the in vivo anti-fungal activity of Ag2(mal)(phen)3]. *BioMetals*, 22(3), 461.
269. Ruan SY, Lee LN, Jerng JS, Yu CJ, Hsueh PR. (2008). *Candida glabrata* fungaemia in intensive care units. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(2), 136-140.
270. Sahuquillo Arce J, Colombo Gainza E, Gil Brusola A, Ortiz Estévez R, Cantón E, Gobernado M. (2006). In vitro activity of linezolid in combination with doxycycline, fosfomicin, levofloxacin, rifampicin and vancomycin against methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Revista Española Quimioterapia*, 19(3), 252-257.

## Bibliografía

271. Salehi F, Esmaeili M, Mohammadi R. (2016). Isolation of *Candida* species from gastroesophageal lesions among pediatrics in Isfahan, Iran: Identification and antifungal susceptibility testing of clinical isolates by E-test. *Advanced Biomedical Research*, 6, 103.
272. Sanchis M, Martin-Vicente A, Capilla J, Guarro J. (2016). Antifungal therapies in murine infections by *Candida kefyr*. *Mycoses*, 59(4), 253-258.
273. Sanglard D, Coste AT. (2016). Activity of isavuconazole and other azoles against *Candida* clinical isolates and yeast model systems with known azole resistance mechanisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(1), 229-238.
274. Sasaki E, Maesaki S, Miyazaki Y, Yanagihara K, Tomono K, Tashiro T, Kohno S. (2000). Synergistic effect of ofloxacin and fluconazole against azole-resistant *Candida albicans*. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 6(3), 151-154.
275. Scorzoni L, de Lucas MP, Mesa-Arango A, Fusco-Almeida A, Lozano E, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O. (2013). Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile. *PLoS ONE*, 8(3), e60047.
276. Selmecki A, Forche A, Berman J. (2006). Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5785), 367-370.
277. Sharma M, Biswas D, Kotwal A, Thakuria B, Kakati B, Chauhan BS, Patras A. (2014). Ibuprofen-mediated reversal of fluconazole resistance in clinical isolates of *Candida*. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 9(1), DC22.
278. Shen LL, Baranowski J, Fostel J, Montgomery DA, Lartey PA. (1992). DNA topoisomerases from pathogenic fungi: Targets for the discovery of antifungal drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36(12), 2778-2784.
279. Sherertz RJ, Boger MS, Collins CA, Mason L, Raad II. (2006). Comparative in vitro efficacies of various catheters lock solutions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(5), 1865-1868.
280. Shi W, Chen Z, Chen X, Cao L, Liu P, Sun S. (2010). The combination of minocycline and fluconazole causes synergistic growth inhibition against *Candida albicans*: An in vitro interaction of antifungal and antibacterial agents. *FEMS Yeast Research*, 10(7), 885-893.
281. Shinde RB, Chauhan NM, Raut JS, Karuppayil SM. (2012). Sensitization of *Candida albicans* biofilms to various antifungal drugs by cyclosporine A. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 11(27).
282. Shrestha SK, Fosso MY, Garneau-Tsodikova S. (2015). A combination approach to treating fungal infections. *Scientific Reports*, 5, 17070.

283. Shrestha SK, Grilley M, Anderson T, Dhiman C, Oblad J, Chang CT, Takemoto JY. (2015a). In vitro antifungal synergy between amphiphilic aminoglycoside K20 and azoles against *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. *Medical Mycology*, 53(8), 837-844.
284. Singh SD, Robbins N, Zaas AK, Schell WA, Perfect JR, Cowen LE. (2009). Hsp90 governs echinocandin resistance in the pathogenic yeast *Candida albicans* via calcineurin. *PLoS Pathogens*, 5(7), e1000532.
285. Singulani JL, Scorzoni L, Gomes PC, Nazaré AC, Polaquini CR, Regasini LO, Mendes-Giannini M. (2017). Activity of gallic acid and its ester derivatives in *Caenorhabditis elegans* and zebrafish (*Danio rerio*) models. *Future Medicinal Chemistry*, 9(16), 1863-1872.
286. Situ H, Bobek LA. (2000). In vitro assessment of antifungal therapeutic potential of salivary histatin-5, two variants of histatin-5, and salivary mucin (MUC7) domain 1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(6), 1485-1493.
287. Souza ACR, Fuchs BB, Pinhati HMS, Siqueira RA, Hagen F, Meis JF, Colombo AL. (2015). *Candida parapsilosis* resistance to fluconazole: Molecular mechanisms and in vivo impact in infected *Galleria mellonella* larvae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(10), 6581-6587.
288. Stachura DL, Traver D. (2011). Cap 4 - cellular dissection of zebrafish hematopoiesis. In Detrich HW, Westerfield M, Zon LI. (Eds.), *Methods in cell biology* (pp. 75-110)
289. Steenbergen JN, Shuman HA, Casadevall A. (2001). *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(26), 15245-15250.
290. Stepanović S, Vuković D, Ješić M, Ranin L. (2004). Influence of acetylsalicylic acid (aspirin) on biofilm production by *Candida* species. *Journal of Chemotherapy*, 16(2), 134-138.
291. Stergiopoulou T, Meletiadiis J, Sein T, Papaioannidou P, Tsiouris I, Roilides E, Walsh TJ. (2008a). Comparative pharmacodynamic interaction analysis between ciprofloxacin, moxifloxacin and levofloxacin and antifungal agents against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(2), 343-348.
292. Stergiopoulou, T, Meletiadiis J, Sein T, Papaioannidou P, Tsiouris I, Roilides E, Walsh TJ. (2008b). Isobolographic analysis of pharmacodynamic interactions between antifungal agents and ciprofloxacin against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(6), 2196-2204.
293. Stie J, Fox D. (2007). Calcineurin regulation in fungi and beyond. *Eukaryotic Cell*, 7(2), 177-186.
294. Sudbery P, Gow N, Berman J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*, 12(7), 317-324.

## Bibliografía

295. Sugar AM, Liu XP, Chen RJ. (1997). Effectiveness of quinolone antibiotics in modulating the effects of antifungal drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(11), 2518-2521.
296. Sullivan C, Kim CH. (2008). Zebrafish as a model for infectious disease and immune function. *Fish & Shellfish Immunology; NOFFI: Advances in Fish Immunology*, 25(4), 341-350.
297. Sun L, Sun S, Cheng A, Wu X, Zhang Y, Lou H. (2009). In vitro activities of retigeric acid B alone and in combination with azole antifungal agents against *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(4), 1586-1591.
298. Sun S, Li Y, Guo Q, Shi C, Yu J, Ma L. (2007). In vitro interactions between tacrolimus and azoles against *Candida albicans* determined by different methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(2), 409-417.
299. Swanson MS, Hammer BK. (2000). *Legionella pneumophila* pathogenesis: A fateful journey from amoebae to macrophages. *Annual Review of Microbiology*, 54(1), 567-613.
300. Tallarida RJ. (2006). An overview of drug combination analysis with isobolograms. *The Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics*, 319(1), 1-7.
301. Te Dorsthorst DT, Verweij PE, Meis JFGM, Punt NC, Mouton JW. (2001). Comparison of Fractional Inhibitory Concentration Index with response surface modeling for characterization of in vitro interaction of antifungals against itraconazole-susceptible and -resistant *Aspergillus fumigatus* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(3), 702-707.
302. Te Dorsthorst DT, Verweij PE, Meletiadis J, Bergervoet M, Punt NC, Meis JFGM, Mouton JW. (2002). In vitro interaction of flucytosine combined with amphotericin B or fluconazole against thirty-five yeast isolates determined by both the Fractional Inhibitory Concentration Index and the Response Surface Approach. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(9), 2982-2989.
303. Tragiannidis A, Tsoulas C, Kerl K, Groll AH. (2013). Invasive candidiasis: Update on current pharmacotherapy options and future perspectives. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 14(11), 1515-1528.
304. Traver D, Herbomel P, Patton EE, Murphey RD, Yoder JA, Litman GW, Trede NS. (2003). The zebrafish as a model organism to study development of the immune system. *Advances in Immunology*, 81, 253.
305. Trofa D, Agovino M, Stehr F, Schäfer W, Rykunov D, Fiser A, Gácsér A. (2009). Acetylsalicylic acid (aspirin) reduces damage to reconstituted human tissues infected with *Candida* species by inhibiting extracellular fungal lipases. *Microbes and Infection/Institut Pasteur*, 11(14-15), 1131-1139.

306. Tsai H, Bobek LA. (1997). Studies of the mechanism of human salivary histatin-5 candidacidal activity with histatin-5 variants and azole-sensitive and -resistant *Candida* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(10), 2224-2228.
307. Uppuluri P, Nett J, Heitman J, Andes D. (2008). Synergistic effect of calcineurin inhibitors and fluconazole against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(3), 1127-1132.
308. Valentín A, Cantón E, Pemán J, Fernandez-Rivero M, Tormo-Mas M, Martínez, J. P. (2016). In vitro activity of anidulafungin in combination with amphotericin B or voriconazole against biofilms of five *Candida* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(12), 3449-3452.
309. Van Bambeke F, Michot J, Van Eldere J, Tulkens PM. (2005). Quinolones in 2005: An update. *Clinical Microbiology and Infection*, 11(4), 256-280.
310. Venkatesh MP, Rong L. (2008). Human recombinant lactoferrin acts synergistically with antimicrobials commonly used in neonatal practice against coagulase-negative staphylococci and *Candida albicans* causing neonatal sepsis. *Journal of Medical Microbiology*, 57(9), 1113-1121.
311. Wakabayashi H, Abe S, Teraguchi S, Hayasawa H, Yamaguchi H. (1998). Inhibition of hyphal growth of azole-resistant strains of *Candida albicans* by triazole antifungal agents in the presence of lactoferrin-related compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(7), 1587-1591.
312. Wanjare S, Gupta R, Mehta P. (2016). Caspofungin MIC distribution amongst commonly isolated *Candida* species in a tertiary care centre - an Indian experience. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 10(11), DC13.
313. Wasmann RE, Muilwijk EW, Burger DM, Verweij PE, Knibbe CA, Brüggemann RJ. (2017). Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of micafungin. *Clinical Pharmacokinetics*, 57(3), 267-286.
314. West L, Lowman DW, Mora-Montes HM, Grubb S, Murdoch C, Thornhill MH, Haynes, K. (2013). Differential virulence of *Candida glabrata* Glycosylation mutants. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(30), 22006-22018.
315. Williams DW, Kuriyama T, Silva S, Malic S, Lewis MAO. (2011). *Candida* biofilms and oral candidosis: Treatment and prevention. *Periodontology 2000*, 55(1), 250-265.
316. Wojda I, Kowalski P, Jakubowicz T. (2009). Humoral immune response of *Galleria mellonella* larvae after infection by *beauveria bassiana* under optimal and heat-shock conditions. *Journal of Insect Physiology*, 55(6), 525-531.

## Bibliografía

317. Yang S, Liao Y, Cong L, Lu X, Yang R. (2016). In vitro interactions between non-steroidal anti-inflammatory drugs and antifungal agents against planktonic and biofilm forms of *Trichosporon asahii*. *PLoS ONE*, 11(6), e0157047.
318. Zeng B, Li J, Wang Y, Chen P, Wang X, Cui J, Zhou Y. (2017). In vitro and in vivo effects of suloctidil on growth and biofilm formation of the opportunistic fungus *Candida albicans*. *Oncotarget*, 8(41), 69972-69982.
319. Zhang J, Silao FGS, Bigol UG, Bungay AAC, Nicolas MG, Heitman J, Chen Y. (2012). Calcineurin is required for pseudohyphal growth, virulence, and drug resistance in *Candida lusitanae*. *Plos One*, 7(8), e44192.
320. Zhang YQ, Rao R. (2007). Global disruption of cell cycle progression and nutrient response by the antifungal agent amiodarone. *Journal of Biological Chemistry*, 282(52), 37844-37853.
321. Zhou Y, Wang G, Li Y, Liu Y, Song Y, Zheng W, Jia, J. (2012). In vitro interactions between aspirin and amphotericin B against planktonic cells and biofilm cells of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(6), 3250-3260.