



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

NAZIOARTEKO
BIKAINASUN
CAMPUSA
CAMPUS DE
EXCELENCIA
INTERNACIONAL

Departamento de Inmunología,
Microbiología y Parasitología
Facultad de Medicina y Odontología

Immunologia, Mikrobiologia eta
Parasitologia Saila
Medikuntza eta Odontologia Fakultatea

Estudio de la patogenicidad de *Candida* y de la actividad de los fármacos antifúngicos en un modelo animal en *Caenorhabditis elegans*

Tesis Doctoral

Marcelo Ortega Riveros

Leioa, 2015

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo de Tesis de doctorado ha sido posible gracias los proyectos de investigación «Modelos in vivo para el estudio de la patogenicidad de *Candida* y su sensibilidad a fármacos antifúngicos: modelo experimental en *Caenorhabditis elegans*» (PI11/00203) (Acción Estratégica de Salud 2011, Instituto de Salud Carlos III (FIS). Ministerio de Ciencia e Innovación), Grupo de Investigación Consolidado del Sistema Universitario Vasco (GIC12 210-IT-696-13) «Candidiasis y otras infecciones humanas asociadas a biopelículas microbianas» (Consejería de Educación, Universidades e Investigación, Gobierno Vasco-Eusko Jaurlaritza), «Desarrollo y evaluación de un modelo experimental en *Caenorhabditis elegans* para el estudio de la patogenicidad de *Candida* y su sensibilidad a fármacos antifúngicos» (S-PR11UN003) (Proyectos de Investigación Estratégica SAIOTEK 2011. Departamento de Industria, Comercio y Turismo del 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).

En estas líneas quiero agradecer a la Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea y en especial al Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología por la oportunidad que me ha brindado de hacer esta Tesis en un grupo de investigación con excelentes profesionales y personas, en un estudio con un modelo que me ha parecido maravilloso y por el privilegio de tener los tutores que tengo.

Agradezco sinceramente a los Doctores Guillermo Quindós y Elena Eraso por confiarme un proyecto con un modelo que nos era desconocido, por vuestro optimismo, cercanía, paciencia y por guiarme en el trabajo que conlleva esta Tesis, todo lo cual hace que la formación que me habéis entregado vaya más allá de la Microbiología. También quiero agradecer al Doctor Guillermo Ezpeleta “mi tercer tutor”, quien ha sido fundamental en este trabajo; muchas gracias por tu amistad, tus consejos, paciencia y por ayudarme con las correcciones y la siempre compleja estadística. Una de tantas conversaciones con la Doctora Estibaliz Mateo fue muy importante cuando ya tenía hecha casi toda la parte experimental, gracias por orientarme y animarme a escribir.

Iker De la Pinta trabajó codo a codo conmigo desde que se integró al grupo, además le debo muchas imágenes de esta tesis. Numerosas veces hizo de superhéroe y siempre con un chiste a flor de labio. Querido Iker, muchísimas gracias también por los partidos vistos y jugados, por las quedadas, en general por tu amistad. Espero que la distancia no sea una limitante para que esta perdure (y no olvides la promesa de agradecer al power ranger rosa en tu Tesis).

Muy a tiempo estuvieron conmigo Sandra Gil Alonso y Aketza Varona Barquin, con quien compartimos muchas risas en el laboratorio, canciones y algún baile de diversos estilos dudosamente musicales, además de largas conversaciones en los momentos difíciles. Gracias chicos por escucharme y apoyarme, gracias por la compañía, vuestra amistad y por hacer mucho más llevadero todo.

La Doctora Cristina Marcos Arias e Ilargi Miranda fueron quienes me recibieron y me orientaron en el laboratorio, gracias por vuestra paciencia y buena disposición.

El grupo del laboratorio fue creciendo, y pude ir coincidiendo en horario con algunas personas como Saioa y Oihane (¡vaya dos!), Esther y su aversión al café, la metódica Naia, Raquel mi compañera de copas, la pequeña Catalina, Verónica y sus locuras lindas y la simpática Sheilinha. Al siguiente curso Juan Daniel con quien compartí actividades nematódicas y nos deleitó con sus bailes, Camino que solo dejaba de sonreír cuando le tocaban al equipo de sus amores, Marta siempre maja y formal, Katherine my dear shopping partner, Desiree que con su simpatía partió a conquistar “Heelsinki” y Janire siempre buscando en qué ayudar, gracias por el compañerismo, habéis creado un ambiente extraordinario en el laboratorio.

Querida Ainara Hernando, la “esbirra” ideal, la *Condesa elegans*, heredera de la “gusanística aplicada”. Kiskis, me siento orgulloso de haber sido un pequeño aporte en tu decisión de seguir

hacia el Doctorado y te doy las gracias por alguna lectura de los gusanillos y cosas técnicas, pero principalmente por tu simpatía, tu sentido del humor y porque la seriedad y el respeto por el trabajo que has demostrado, me han motivado a ser mejor.

A “los del labo de arriba”, los de antes y los de ahora, Marilú, Olatz, Jonathan, Arantza, Giulia e Inés... les agradezco por recibirme siempre con una sonrisa, aunque supieran que muchas veces sólo iba por “robar” alguna cosa (sobre todo galletas).

No quiero dejar de mencionar a la secretaría del Departamento, personificada en Mariangel y luego Olatz, quienes me orientaron en los temas administrativos y con una paciencia infinita me recuperaron las claves que año tras año olvidaba. También a Rocío y Carmen, que me recibieron siempre con una sonrisa.

Antes de agradecer a los de afuera de la Universidad, quiero también hacer un cariñoso recuerdo a los chicos del grupo de Ciencias por los buenos momentos que compartí con quienes pude conocer.

Gracias también al Doctor Eduardo Álvarez... que extraño llamarle así a quien compartió conmigo más cervezas que experiencias de laboratorio. Fue un mes intenso de trabajo y fiesta y con quien espero seguir compartiendo ambas cosas.

Hay muchas personas que no están directamente relacionadas con la tesis, pero que también han sido muy importantes para llegar hasta aquí. Patricia Ibarra quien me acompañó en las buenas, en las malas y en las peores. Xabi, que me dio un trabajo de alta confianza en cuanto llegué a Algorta. Jaime, quien además de ser un pilar que siempre me brindó la tranquilidad de que no me iba a faltar trabajo, fue un oído que soportó mis dilemas espirituales. Pepe, por su amistad, esas enriquecedoras conversaciones sobre historia y por nunca dudar en ayudarme. Cristian Vidal, muchas gracias amigo por tu apoyo y tu saber estar ¡y por los conciertozcos!

Marco Blandi, gracias por tu amistad, por las ricas cenas viendo algún partido interesante y por captar y sacarme (a veces casi a la fuerza) cuando necesitaba descansar de la tesis. Y cuando se me quería pasar la mano con el descanso, estaba Elisa. Gracias Eli por tu cariño, por tu alegría y por tu apoyo.

También quiero agradecer a mis amigos de mi bello y querido Algorta, en especial a “el lobo”, “los Goonies” y Sandra Mannai, quienes me levantaron y me ayudaron a seguir adelante y a Carlos Martín y Elidia Munne por su ánimo, siempre positivos.

Finalmente doy las infinitas gracias a mi familia, especialmente a mi hermana Mari y a mi tía Gladys, por sus consejos, por su comprensión y su apoyo incondicional.

Estoy listo para una nueva etapa que sin ustedes no hubiese podido alcanzar, muchas gracias.

A mi madre, *in memoriam*

A mi hermana, por su fortaleza

A mis amigos del Hospital Lucio Córdova de Santiago de Chile

Índice de abreviaturas

AGS	Agar glucosado de Sabouraud
ALS	<i>Agglutinin-Like Sequence</i> (secuencias parecidas a aglutininas)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BHI	Infusión cerebro corazón
C3b	Factor 3 de la cascada del sistema del complemento
CandiPop	Estudio poblacional prospectivo sobre candidemia en España (2010-2011)
CCAC	<i>Canadian Council of Animal Care</i>
CEEA	Comité ético de experimentación animal
CEID	Comisión de ética en investigación y desarrollo
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CNC	Caenacinas
DMSO	Dimetil sulfóxido
EPINE	Estudio de prevalencia de las infecciones nosocomiales en España
FELASA	<i>Federation of European Laboratory Animal Science</i>
Hwp1	<i>Hyphal-wall protein 1</i> (proteína 1 de la pared de las hifas)
Hyr1p	<i>Hyphally regulated 1 protein</i> (proteína 1 regulada por hifas)
ICLAS	<i>International Council for Laboratory Animal Science</i>
IFN- γ	Interferón gamma
IL-12	Interleucina 12
IL-1 β	Interleucina-1-beta
ILR	Receptor de insulina
LB	Luria Bertani
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight</i> (espectrometría de masas)
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> (proteína quinasa activada por mitógeno)
MAPKK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase</i> (proteína quinasa, quinasa activada por mitógeno)
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (ácido morfolino propano sulfónico)
NCPF	<i>National Collection of Pathogenic Fungi</i>
NGM	<i>Nematode growth medium</i> (medio para crecimiento de los nematodos)
NLP	<i>Neuropeptide-like peptides</i> (péptidos similares a neuropéptidos)

PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
RPMI	Medio del Roswell Park Memorial Institute
Sap	Aspartil proteasas
SPP	Proteínas tipo saposinas
Th17	Linfocitos T cooperadores 17
TLR	Receptor de tipo Toll
UCI	Unidades de cuidados intensivos
UPV/EHU	Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1.	Los desafíos en la investigación de las candidiasis.....	3
2.	<i>Candida</i> en el reino <i>Fungi</i>	4
3.	Candidiasis y formas de estudio de las candidiasis invasoras.....	6
3.1	Candidiasis invasora.....	6
3.2	Factores de virulencia y mecanismos de patogenicidad	7
3.3	Epidemiología	9
3.4	Diagnóstico	10
4.	Tratamiento antifúngico.....	12
4.1	Anfotericina B	12
4.2	Azoles.....	13
4.3	Equinocandinas.....	15
4.4	Otros fármacos antifúngicos de uso sistémico	16
4.5	Perspectivas futuras.....	17
5.	Modelos en animales invertebrados para el estudio de las candidiasis	17
5.1	Modelos en amebas.....	19
5.2	Modelos en insectos	19
6.	Modelo en <i>Caenorhabditis elegans</i>	21
6.1	Inmunidad en <i>Caenorhabditis elegans</i>	24

HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN

	Objetivos.....	31
1.	Objetivos generales.....	31
2.	Objetivos específicos.....	31

MATERIAL Y MÉTODOS

1.	Cepas y condiciones previas a los ensayos.....	35
1.1	<i>Caenorhabditis elegans</i>	35

1.1.1	Crecimiento de la población de <i>Caenorhabditis elegans</i> en agar NGM	35
1.1.2	Lisis alcalina para coordinar y descontaminar poblaciones de <i>Caenorhabditis elegans</i>	36
1.2	Cepas de <i>Candida</i>	36
1.3	Fármacos antifúngicos	37
1.4	Tampones y medios de cultivo	37
2.	Diseño del estudio	39
3.	Sensibilidad in vitro de las cepas de <i>Candida</i> a los fármacos antifúngicos	39
4.	Estudios de supervivencia de <i>Caenorhabditis elegans</i>	39
4.1	Preparación de las cepas	40
4.1.1	<i>Caenorhabditis elegans</i>	40
4.1.2	<i>Candida</i>	41
4.2	Estudios de supervivencia de <i>Caenorhabditis elegans</i>	41
4.2.1	Infección de los nematodos	41
4.2.2	Estudio de la infección por <i>Candida</i> en un medio acuoso	41
4.2.3	Estudio de la infección por <i>Candida</i> en DMSO	42
4.2.4	Efecto de los fármacos antifúngicos en el desarrollo de la candidiasis invasiva experimental	42
4.3	Estudio estadístico de las variables y modelos empleados	44
4.4	Implicaciones éticas	45

RESULTADOS

1.	Efecto del solvente en la supervivencia de <i>Caenorhabditis elegans</i>	49
2.	Virulencia de las distintas especies de <i>Candida</i> y estimación del efecto del medio de incubación	50
2.1	Infección por <i>Candida albicans</i>	50
2.2	Infección por <i>Candida dubliniensis</i>	52
2.3	Infección por <i>Candida glabrata</i>	53
2.4	Infección por <i>Candida krusei</i>	54
2.5	Infección por <i>Candida metapsilosis</i>	55

2.6	Infección por <i>Candida orthopsilosis</i>	56
2.7	Infección con <i>Candida parapsilosis sensu stricto</i>	57
3.	Comparación de la virulencia de las especies de <i>Candida</i>	58
4.	Observación de microscopía de la infección por <i>Candida</i>	62
5.	Efecto de <i>Candida</i> inactivada sobre la supervivencia de <i>Caenorhabditis elegans</i>	65
6.	Sensibilidad in vitro de <i>Candida</i> a los fármacos antifúngicos	65
7.	Eficacia del tratamiento antifúngico de la candidiasis experimental en <i>Caenorhabditis elegans</i>	67
7.1	Tratamiento antifúngico de la candidiasis experimental por <i>Candida albicans</i>	67
7.1.1	Anfotericina B	67
7.1.2	Azoles.....	68
7.1.3	Equinocandinas.....	71
7.2	Tratamiento antifúngico de la candidiasis experimental por <i>Candida dubliniensis</i> ...	75
7.2.1	Anfotericina B	75
7.2.2	Azoles.....	76
7.2.3	Equinocandinas.....	79
7.3	Tratamiento antifúngico de la candidiasis experimental por <i>Candida glabrata</i>	83
7.3.1	Anfotericina B	83
7.3.2	Azoles.....	84
7.3.3	Equinocandinas.....	87
7.4	Tratamiento antifúngico de la candidiasis experimental por <i>Candida krusei</i>	91
7.4.1	Anfotericina B	91
7.4.2	Azoles.....	92
7.4.3	Equinocandinas.....	95
7.5	Tratamiento antifúngico de la candidiasis experimental por <i>Candida metapsilosis</i> ..	99
7.5.1	Anfotericina B	99
7.5.2	Azoles.....	100
7.5.3	Equinocandinas.....	103
7.6	Tratamiento antifúngico de la candidiasis experimental por <i>Candida orthopsilosis</i>	107

7.6.1	Anfotericina B	107
7.6.2	Azoles.....	108
7.6.3	Equinocandinas.....	111
7.7	Tratamiento antifúngico de la candidiasis experimental por <i>Candida parapsilosis</i> .	115
7.7.1	Anfotericina B	115
7.7.2	Azoles.....	116
7.7.3	Equinocandinas.....	119
7.8	Toxicidad de los fármacos antifúngicos sobre <i>Caenorhabditis elegans</i>	123

DISCUSIÓN

1.	Candidiasis y modelos experimentales para su estudio	127
1.1	Modelos experimentales de candidiasis invasora.....	128
1.2	Progreso de la infección por <i>Candida</i>	129
1.3	Efecto del DMSO sobre <i>Caenorhabditis elegans</i>	131
1.4	Infectividad de las especies de <i>Candida</i>	132
1.5	Tratamiento de la candidiasis en <i>Caenorhabditis elegans</i>	134
1.5.1	Tratamiento de la infección por <i>Candida albicans</i>	135
1.5.2	Tratamiento de la infección por <i>Candida dubliniensis</i>	136
1.5.3	Tratamiento de la infección por <i>Candida glabrata</i>	137
1.5.4	Tratamiento de la infección por <i>Candida krusei</i>	138
1.5.5	Tratamiento de la infección por <i>Candida metapsilosis</i>	139
1.5.6	Tratamiento de la infección por <i>Candida orthopsilosis</i>	140
1.5.7	Tratamiento de la infección por <i>Candida parapsilosis</i>	141
1.6	Limitaciones del modelo con <i>Caenorhabditis elegans</i>	143
CONCLUSIONES.....		145
BIBLIOGRAFÍA.....		149

INTRODUCCIÓN

1. Los desafíos en la investigación de las candidiasis

Las infecciones fúngicas invasoras han aumentado tanto en frecuencia como en gravedad. Este aumento es debido principalmente al incremento del número de personas que sufren alteraciones inmunitarias bien por condiciones fisiológicas, como las edades extremas de la vida, o patológicas como determinadas enfermedades hematológicas, metabólicas (diabetes), inmunodeficiencias, neoplasias, sida, grandes quemados o con intervenciones quirúrgicas mayores. También se produce una alteración de los sistemas defensivos por tratamientos prolongados o intensos con antibióticos, corticoides, quimioterapia, radioterapia o trasplante de órganos, o con el uso de sondas, catéteres para nutrición o tratamiento parenteral, prótesis, etc. Además se ha producido una variación en el tipo de hongos patógenos que se aíslan en estos pacientes. En el caso de las candidiasis invasoras, esto se ha traducido en la creciente aparición de especies de *Candida* distintas de *Candida albicans*, de las que es necesario conocer su patogenicidad y su perfil de resistencia in vivo a los fármacos antifúngicos porque su aparición se ha visto favorecida por una selección de especies resistentes debido en gran parte a la utilización de tratamientos profilácticos.

En las últimas décadas han aparecido nuevos tratamientos para las infecciones fúngicas invasoras que han mejorado la supervivencia de los pacientes. Aunque se realizan evaluaciones in vitro de forma habitual, es fundamental la valoración de estos tratamientos también en modelos in vivo. La investigación utilizando mamíferos acarrea dilemas éticos y costes económicos importantes. Una solución potencial, sencilla y económica a estos problemas son los modelos en animales invertebrados, pero antes de plantear su utilización para estudiar los diversos aspectos de la candidiasis, es necesario conocer las especies de *Candida* que tienen la capacidad de causar una infección y el grado de invasión en los distintos modelos. Por otra parte, las distintas formulaciones de fármacos también pueden afectar la fisiología del modelo, por lo que es necesario conocer si los tratamientos antifúngicos se ajustan adecuadamente a cada modelo animal.

Los avances en la utilización de algunos modelos en animales invertebrados de fácil cultivo y alto rendimiento (es decir, que permiten la realización de varias tareas de manera automatizada, reduciendo la carga de trabajo y mejorando la fiabilidad), han hecho posible la búsqueda masiva de sustancias con actividad antifúngica. El nematodo *Caenorhabditis elegans* es uno de los modelos más utilizados en el que se han realizado estudios con diversos microorganismos, entre ellos *Candida*. Sin embargo, la variedad de especies de *Candida* que se han estudiado es escasa. La valoración de la utilidad del modelo continúa con la evaluación de la capacidad de distintos tratamientos antifúngicos para aumentar la supervivencia en los nematodos infectados, basándose en estudios estadísticos. Esto permite la comparación tanto de cada tratamiento respecto a los individuos no tratados, como de los distintos tratamientos entre sí. En estos modelos además se evalúan los posibles efectos tóxicos de los fármacos antifúngicos en los

animales que no han sido infectados. En las investigaciones publicadas sobre el modelo en *Caenorhabditis elegans* no se ha comentado la influencia directa del solvente del fármaco antifúngico sobre el animal. El dimetil sulfóxido (DMSO) es el solvente más utilizado para la mayoría de los fármacos y tiene la capacidad de atravesar rápidamente las membranas celulares por lo que es fundamental conocer su influencia sobre la fisiología de *Caenorhabditis elegans*.

2. *Candida* en el reino *Fungi*

Los hongos son organismos eucariotas que forman parte del Reino *Fungi* o *Mycetae*. Su metabolismo es quimioheterótrofo, se basa en la digestión de materia orgánica insoluble por medio de la secreción de enzimas y la posterior absorción de los nutrientes solubilizados. De acuerdo a su morfología, los integrantes del Reino *Fungi* pueden clasificarse en hongos filamentosos, levaduras y hongos dimorfos o polimorfos. Los hongos filamentosos son organismos multicelulares que al microscopio presentan estructuras tubulares llamadas hifas y en los medios de cultivo crecen como colonias algodonosas. Las levaduras son unicelulares con una morfología ovoide o esférica que se reproducen por gemación y miden entre 3 y 5 μm . En el medio de cultivo crecen formando colonias de aspecto cremoso, húmedo y opaco. Este grupo de hongos comprende géneros de gran importancia clínica como son *Candida* y *Cryptococcus*, además de otros con interés en la industria alimentaria, como *Saccharomyces cerevisiae*. Los hongos dimorfos o polimorfos son aquellos que expresan fenotípicamente dos o más morfologías distintas en función de las características del medio o del ambiente en el que crecen, como la temperatura, la concentración de CO_2 y el pH. Algunos hongos patógenos muestran un dimorfismo térmico: a 25 °C son hongos filamentosos y a 37 °C, cuando infectan a una persona, adquieren la forma de levadura [Rippon 1988; Sil y Andrianopoulos 2014].

Candida es una levadura con una gran capacidad de adaptación al medio, lo que le ha permitido colonizar con gran éxito la piel y las superficies mucosas y formar parte de las microbiotas de la cavidad oral, tracto gastrointestinal y vagina de los seres humanos y de otros animales. Estas levaduras poseen una pared celular de gran plasticidad que contribuye a dar forma a la célula, además de controlar su permeabilidad, protegerla de los cambios osmóticos en el medio circundante y regular la interacción entre el huésped y la célula fúngica. Al ser el primer lugar de interacción, la pared celular desempeña un importante papel tanto en el inicio como en el desarrollo de la acción patógena (Figura 1). Está compuesta por proteínas y polisacáridos como glucano (50-60% del peso seco de la pared), quitina (1-2%) y manano (30-40%). De todos los polisacáridos mencionados, el glucano, sintetizado por la 1,3- β -D-glucano sintetasa, es el más importante para mantener la estructura celular [Pontón 2008].

La membrana citoplasmática consta de una doble capa lipídica relativamente impermeable para las moléculas hidrófilas, compuesta principalmente por ergosterol y otros esteroides, grandes cantidades de proteínas con una escasa proporción de carbohidratos. Es una estructura que reviste gran importancia porque las proteínas que la forman están especializadas en diversas

funciones vitales para la célula fúngica tales como el transporte, la recepción y el envío de señales, la comunicación con el ambiente exterior, la captación selectiva y/o la secreción de solutos, los procesos de endocitosis/exocitosis, la generación de potencial de membrana y la síntesis y mantenimiento de la pared celular [Cabezón et al. 2009; Ghosh et al. 2010; te Welscher et al. 2012].

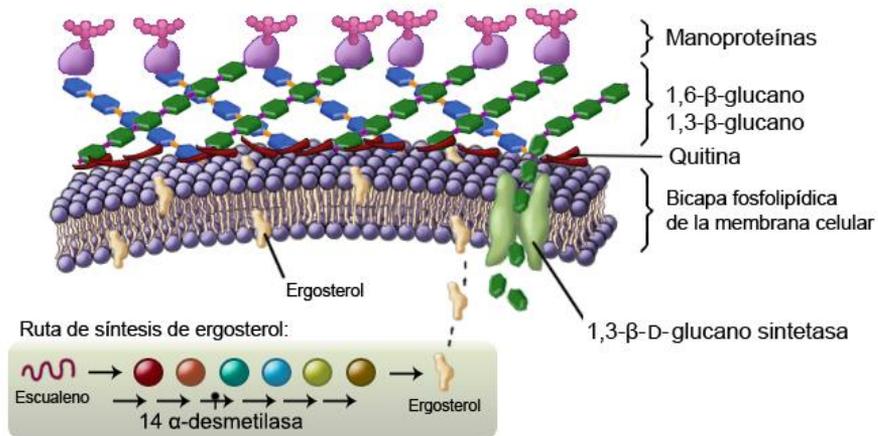


Figura 1. Membrana y pared celular de los hongos.

De las aproximadamente 150 especies de *Candida*, la más frecuentemente aislada es *Candida albicans*. La candidiasis vaginal materna es un factor de riesgo para la colonización primaria neonatal durante el parto [Mahieu et al. 2010; Pammi et al. 2013]. A pesar de su ubicuidad y de ser un género con una gran cantidad de especies descritas, solamente 15 de ellas causan infección con relativa frecuencia: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida orthopsilosis*, *Candida krusei*, *Candida lusitaniae*, *Candida guilliermondii*, *Candida famata*, *Candida dubliniensis*, *Candida metapsilosis*, *Candida kefyr*, *Candida inconspicua*, *Candida norvegensis* y *Candida rugosa* [Papon et al. 2013]. Aunque las frecuencias de aislamiento pueden variar, en el 95% de las infecciones los patógenos involucrados son *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis* [Bassetti et al. 2013; Pemán et al. 2011; Puig-Asensio et al. 2014].

3. Candidiasis y formas de estudio de las candidiasis invasoras

Candida puede formar parte de la microbiota de la piel y las mucosas del ser humano y su aislamiento no implica la existencia de una infección. Sin embargo, un desequilibrio en la microbiota del huésped puede ser el inicio o contribuir al desarrollo de una candidiasis con una amplia variedad de cuadros clínicos, desde lesiones superficiales leves, principalmente en las mucosas oral y vaginal, hasta infecciones diseminadas en pacientes con factores de riesgo [Sánchez Vargas et al. 2010].

Las infecciones diseminadas causadas por *Candida* se caracterizan por ser invasoras y propagarse a distintos órganos y tejidos a través de los sistemas linfático y circulatorio. La utilización de catéteres y sondas en pacientes con neutropenia es un factor importante en la incidencia de candidiasis. Además del agente patógeno causante de la infección y su capacidad de resistencia a los fármacos antifúngicos, los defectos inmunológicos subyacentes son importantes en la gravedad y la duración de la infección. En muchos casos, las infecciones fúngicas son la causa directa de la muerte de los pacientes que sufren un alto grado de inmunodeficiencia. Los pacientes con leucemia aguda, los receptores de trasplante de precursores hematopoyéticos y los receptores de órganos sólidos, representan los tres tipos más comunes de pacientes en riesgo. También hay factores extrínsecos importantes como la intensidad de un tratamiento de radioterapia, las brechas en la piel y mucosas causadas por la cirugía, la intensidad de la inmunosupresión debido al tipo, dosis de fármacos y duración del tratamiento y la exposición ambiental comunitaria o intrahospitalaria [Lass-Flörl et al. 2008; Low y Rotstein 2011].

La comprensión de diversos aspectos de las candidiasis se ha visto facilitada tanto por el desarrollo de técnicas genéticas, como por varios tipos de estudios: la proteómica de su interacción con el anfitrión, estudios acerca de la formación de biopelículas, de la resistencia a los medicamentos, de los estados morfogenéticos, del cambio fenotípico, etc. Las técnicas que se utilizan actualmente en estudios de genética molecular, incluyen la transformación de ADN, la interrupción secuencial rápida de genes, el aislamiento y la secuenciación de ARN, el marcado de epitopos, el uso de genes indicadores reguladores y promotores, la inmunoprecipitación de la cromatina y las micromatrices o *microarrays* de ADN [Kabir et al. 2012].

3.1 Candidiasis invasora

La candidiasis invasora aguda se presenta de manera habitual en forma de candidemia. En casi la mitad de los casos y principalmente en neonatos, los hemocultivos son negativos, por lo que la incidencia de las candidiasis invasoras puede ser mayor que la descrita en los estudios epidemiológicos. La profilaxis con fluconazol ha disminuido las candidiasis invasoras por *Candida albicans* y *Candida tropicalis*, con la consiguiente emergencia etiológica de

Candida glabrata, *Candida parapsilosis* y *Candida krusei*, aunque alrededor de la mitad de las candidemias siguen siendo causadas por *Candida albicans* [Quindós 2010; Quindós 2014]. La epidemiología de las candidemias varía entre regiones y países, observándose tasas de incidencia más altas en América del Norte que en Europa y muy variable entre los distintos países de América del Sur [Nucci et al. 2013].

3.2 Factores de virulencia y mecanismos de patogenicidad

Candida presenta diversos factores de virulencia que contribuyen a explicar sus mecanismos patógenos, tales como la formación de biopelículas, la expresión de adhesinas, la transición levaduras-hifas y la liberación de enzimas hidrolíticas.

La adhesión a las superficies constituye un prerequisite para la colonización del huésped y contribuye a la persistencia de los microorganismos en objetos inanimados tales como catéteres intravasculares, prótesis, válvulas cardíacas artificiales, etc. *Candida* es capaz de formar biopelículas sobre dichas superficies en un modo de crecimiento que conlleva ventajas ecológicas, como la protección y cooperación metabólica entre los microorganismos que la forman. Este complejo entramado se relaciona con más del 65% de las infecciones asociadas a la asistencia sanitaria, con elevadas tasas de morbilidad y mortalidad [Ramage et al. 2006; Sánchez Vargas et al. 2010]. Entre las proteínas asociadas a la formación de biopelículas destacan diversas adhesinas de la familia ALS (*Agglutinin-Like Sequence*). Las adhesinas participan en interacciones con glicoproteínas específicas de superficies celulares, ayudando a la formación de biopelículas monomicrobianas o mixtas por coagregación de varias especies fúngicas o de *Candida* con bacterias. Hay diferentes moléculas en la superficie celular de *Candida albicans* y *Streptococcus* orales que intervienen en la adhesión y coagregación de bacterias y hongos para formar biopelículas de especies mixtas [Morales y Hogan 2010]. Als3p es una adhesina que juega un papel clave en la interacción de *Candida albicans* con bacterias en la formación de biopelículas mixtas [Peters et al. 2012], además de tener otras importantes funciones tales como la capacidad de unirse a receptores celulares epiteliales y receptores endoteliales como las cadherinas, induciendo la endocitosis de *Candida albicans*, o a la ferritina para utilizarla como fuente de hierro (Fe³⁺). Por otra parte, Als1p participa en la unión a las células endoteliales de los vasos sanguíneos. Otra adhesina que se expresa en la pared celular de las hifas de *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida tropicalis* y *Candida parapsilosis* es la proteína Hwp1 (*hyphal-wall protein 1*). Esta adhesina favorece el mantenimiento de *Candida* como parte de la microbiota oral mediante la formación de enlaces covalentes con las células epiteliales bucales [Staab et al. 2013].

La transición de levaduras a hifas es otro factor de virulencia que se asocia a un mayor grado de infección en las candidiasis invasoras, principalmente en *Candida albicans*. Cuando *Candida* crece en forma de levadura y es fagocitada, puede producirse una transformación en hifas que crecen de manera multidireccional y tras sucesivas divisiones pueden llegar a medir 100 µm, lo

que representa un tamaño más que suficiente para escapar de un fagocito, adherirse a células o penetrar en el endotelio e invadir los órganos sólidos [Brand 2012]. La proteína Hyr1p (*hyphally regulated 1 protein*) que se expresa durante el desarrollo de las hifas está implicada en la resistencia a la destrucción intrafagocítica y se asocia a una mayor concentración fúngica en los tejidos [Luo et al. 2010].

Durante el crecimiento de las hifas, pueden expresarse enzimas como las aspartil proteasas, fosfolipasas, lipasas, fosfomonoesterasas y hexosaminidasas que favorecen la invasión y destrucción de los tejidos. En *Candida albicans* se han descrito diez tipos diferentes de aspartil proteasas (sap1 a sap10), mientras que en otras especies de *Candida*, los genes *SAP* se encuentran en cantidades variables [Dimopoulos et al. 2013]. Solamente sap1 a sap6 parecen jugar un papel significativo en la infección. Sin embargo, sap7 a un pH óptimo de 6,5 y sap8 a pH 2,5 presentan actividad [Aoki et al. 2011]. La función de sap9 y sap10 está asociada al mantenimiento de la integridad de la pared celular y la interacción con las células epiteliales y neutrófilos [Schild et al. 2011]. Las fosfolipasas se clasifican según su modo de acción y sus dianas en fosfolipasas A, B, C y D, lisofosfolipasa y lisofosfolipasa transacilasa. Se ha demostrado actividad fosfolipasa en muchos patógenos fúngicos, junto con su implicación en la patogenia de la candidiasis, donde tienen por función hidrolizar una o más uniones éster de los glicerofosfolípidos [Parneix y Rogues 2013].

Una vez que *Candida* alcanza un entorno más favorable, la liberación de farnesol bloquea la transición de la levadura a hifa para volver a un crecimiento levaduriforme que facilite su difusión a través del torrente sanguíneo [Ghosh et al. 2010]. Además, en el proceso de morfogénesis, *Candida* expone patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) que alertan al sistema inmune. Estas moléculas son proteínas y polisacáridos de superficie (β -glucanos, quitina y mananos), las enzimas secretadas y sus productos de degradación y el ATP liberado durante la lisis de la célula del huésped [Brand 2012]. Los fagocitos captan estas señales a través de la dectina-1 y otros receptores e inducen la liberación de IL-1 β y otras citoquinas, que reclutan células T y neutrófilos [Cheng et al. 2011; Ghosh et al. 2010]. Las personas con un sistema inmune inalterado son capaces de limitar tanto la extensión de la infección, como la colonización por *Candida*, mientras que en aquellos pacientes con inmunodeficiencia a menudo la colonización conduce al desarrollo de una candidiasis mucosa o a una candidiasis invasora. *Candida* dispone de sistemas de evasión de la respuesta inmune con un conjunto de procesos que se activan coordinadamente. Uno de ellos es el ocultamiento del β -glucano, que es cubierto por las proteínas de la pared impidiendo así su reconocimiento por la dectina-1. Por otra parte, las sap actúan inhibiendo la activación del sistema del complemento mediante la degradación del factor C3b, a la vez que la formación de hifas inhibe el desarrollo del fagolisosoma haciendo ineficaz la fagocitosis. Además, la liberación de catalasa y superóxido dismutasas por *Candida* bloquea el sistema oxidativo de radicales libres del macrófago. Por otra parte, *Candida albicans* secreta una glicoproteína o factor soluble que inhibe la producción de interleucina 12 (IL-12) y de interferón gamma (IFN- γ), alterando así la respuesta inmune celular. La respuesta de los linfocitos T

cooperadores 17 (Th17) se ve alterada por la inhibición del metabolismo del triptófano y el aumento de los metabolitos de 5-hidroxitriptófano que además disminuye la producción de IL-17 [Gilbert et al. 2014; Jiménez-López y Lorenz 2013; Luo et al. 2013].

Se ha observado que *Candida* presenta glicoproteínas de la pared celular que podrían ejercer un efecto tóxico similar al que producen las micotoxinas producidas por los hongos filamentosos y que podrían estar asociadas a enfermedades de etiología incierta o desconocida como la enfermedad de Kawasaki [Ishibashi et al. 2014; Nakamura et al. 2014; Yoshikane et al. 2015].

3.3 Epidemiología

Según los últimos datos publicados en 2014, en el Estudio de Prevalencia de las Infecciones Nosocomiales en España (EPINE) [Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene 2014], más de un 7% de los pacientes hospitalizados en España desarrolla una infección intrahospitalaria y de éstas, entre el 5 y el 15% tienen como etiología a *Candida*, clasificándose como uno de los agentes más frecuentes entre las infecciones hematológicas asociadas a la asistencia sanitaria en diferentes países y siendo la causante del 80% de las fungemias [Ott et al. 2013; Simonetti et al. 2013].

El pronóstico de la candidiasis invasora es sombrío, ya que la tasa de mortalidad atribuible a estas infecciones en la atención sanitaria se sitúa en torno al 45% [MacCallum 2010]. No obstante, este pronóstico depende de múltiples factores, entre los cuales se encuentran la especie involucrada, el tiempo transcurrido desde el inicio de la infección, factores intrínsecos y extrínsecos del paciente, el tratamiento elegido y la dosis de fármaco administrada. Sin embargo, Arendrup plantea que la situación clínica inicial de los pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos (UCI) es un factor predictivo determinante de la mortalidad de estas infecciones [Arendrup 2013].

A pesar de las posibles variaciones epidemiológicas, la enfermedad fúngica invasora más frecuente en todas las latitudes geográficas es la infección sistémica por *Candida*, con o sin candidemia asociada. Sin embargo, la incidencia, la tasa de mortalidad y la distribución de las especies causantes de las candidiasis varían tanto entre las diferentes regiones de un mismo país, como entre diferentes centros hospitalarios. Cada vez más cobran importancia las especies distintas de *Candida albicans*, así como la variación en la sensibilidad de los aislamientos clínicos de *Candida* estudiados frente a los distintos fármacos antifúngicos [Carrillo-Muñoz et al. 2006; Pemán y Salavert 2012]. En España la incidencia global ha aumentado en la última década de 4,3 casos por cada 100.000 habitantes [Almirante et al. 2005] a 8,14 casos por cada 100.000, con una mayor incidencia en niños menores de 1 año (96,4 por cada 100 000 habitantes) [Puig-Asensio et al. 2014]. Estas cifras son más altas que las encontradas en varios lugares del norte de Europa (entre 2,4 y 5,7 casos por cada 100.000 habitantes), pero menor que en EEUU (10 casos por cada 100.000 habitantes) [Quindós 2014]. Las tasas de mortalidad por candidiasis invasora

se han reducido en un 50% en las últimas décadas, alcanzando 0,62 muertes por cada 100.000 habitantes. También se ha producido una disminución en las tasas de muerte por candidiasis invasora asociada a la infección por el VIH, llegando a 0,04 por cada 100.000 habitantes [Quindós 2014]. En Latinoamérica la incidencia global de candidiasis invasora es de 1,18 casos por cada 1.000 ingresos y 0,23 casos por 1.000 pacientes/día, con importantes diferencias entre los países. La mayor incidencia se observó en Argentina (1,95 casos por cada 1.000 ingresos y 0,24 casos por 1.000 pacientes/día) y la menor en Chile (0,33 por 1.000 admisiones y 0,09 por cada 1.000 pacientes/día). Cabe señalar que las tasas de incidencia fueron más bajas en los hospitales privados, hecho que manifiesta la importancia de diferentes factores, como las características de los hospitales, las diferentes poblaciones, las normas de profilaxis y el tratamiento empírico de pacientes, en la variabilidad observada de la incidencia de la candidiasis invasora tanto entre países, como entre centros hospitalarios dentro de un mismo país [Nucci et al. 2013].

Los datos epidemiológicos locales tienen gran importancia en la orientación de la terapia antifúngica empírica en pacientes con una alta probabilidad de desarrollar candidemia. En el estudio poblacional realizado en España entre 2010 y 2011 (CandiPop), se analizaron 752 aislamientos de candidemias. *Candida albicans* fue la especie predominante (45,4%), seguida por *Candida parapsilosis* (24,9%), *Candida glabrata* (13,4%), *Candida tropicalis* (7,7%) y *Candida krusei* (2%). Sin embargo, la variabilidad geográfica en la distribución de las especies causantes de candidemia es ampliamente reconocida [Pemán et al. 2012; Puig-Asensio et al. 2014]. Se ha demostrado que la resistencia o sensibilidad disminuida a los fármacos antifúngicos es más frecuente en las especies emergentes en comparación con *Candida albicans*, lo que aumenta la gravedad de las micosis invasoras y hace más necesario un diagnóstico temprano que permita la rápida instauración del tratamiento antifúngico adecuado. Aislamientos clínicos de algunas especies de *Candida* entre las que destacan *Candida guilliermondii*, *Candida krusei* y *Candida glabrata* han mostrado ser resistentes a la anfotericina B. Así mismo, a la resistencia intrínseca y la sensibilidad dependiente de dosis que respectivamente presentan *Candida krusei* y *Candida glabrata* al fluconazol, se agrega la existencia de cepas orofaríngeas de *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* provenientes de pacientes infectados por VIH, que presentan resistencia al fluconazol. También se ha demostrado la resistencia in vitro en otras especies que presentan menos incidencia, como *Candida norvegensis*, *Candida inconspicua* y *Candida cifferi*. La capacidad de *Candida glabrata* para desarrollar resistencia a los azoles, también se manifiesta como una escasa sensibilidad al itraconazol, cuya actividad también es pobre contra *Candida krusei* si se compara con la eficacia del posaconazol o del voriconazol [Golas et al. 2014].

3.4 Diagnóstico

El diagnóstico directo de las micosis invasoras se basa principalmente en la visualización del hongo al microscopio en los tejidos afectados, además de su aislamiento en el cultivo en

muestras clínicas significativas como sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR) o biopsias. Sin embargo, estas técnicas de diagnóstico pueden ser lentas, poco concluyentes o confirmarse en estadios tardíos de la infección; además, la obtención de muestras clínicas útiles muchas veces requiere procedimientos invasores o volúmenes difíciles de obtener en neonatos. Un diagnóstico presuntivo temprano de algunas micosis invasoras como aspergilosis, candidiasis, fusariosis, mucormicosis o neumocistosis se puede obtener por observación en algunos tipos de muestras clínicas como las cutáneas, respiratorias o las obtenidas por aspiración de diferentes lesiones. Estas muestras son tratadas con KOH o teñidas con coloraciones microbiológicas, como azul de metileno, azul de toluidina, Gram, metenamina de plata de Gomori-Grocott, blanco de calcoflúor o con anticuerpos marcados con fluoresceína [Ayats et al. 2011; Lass-Flörl 2009; Oz y Kiraz 2011]. Existen técnicas que mediante amplificación de ADN, permiten identificar especies crípticas como *Candida africana* y *Candida dubliniensis*, *Candida bracarensis* y *Candida nivariensis* o *Candida metapsilosis* y *Candida orthopsilosis* dentro de los complejos-especies *Candida albicans*, *Candida glabrata* o *Candida parapsilosis*, respectivamente [Alcoba-Florez et al. 2005; Alonso-Vargas et al. 2008; Bishop et al. 2008; Tavanti et al. 2005]. Otros métodos basados en hibridación *in situ* con sondas fluorescentes PNA-FISH permiten la identificación de varias especies de *Candida* a partir de los medios de cultivo o detectan su presencia en los frascos de hemocultivos o los tejidos de biopsias [Rickerts et al. 2011; Trnovsky et al. 2008; Wang 2011].

Para evitar los inconvenientes de las técnicas convencionales, se han buscado métodos que no dependan del cultivo, sino de la detección de componentes específicos del microorganismo, como antígenos, ácidos nucleicos o metabolitos [Arendrup et al. 2009; Quindós et al. 2011], además de métodos anatomopatológicos moleculares rápidos y específicos. Las técnicas moleculares se realizan directamente en muestras de sangre, suero, lavado broncoalveolar o LCR y permiten obtener un diagnóstico en menos tiempo que el cultivo y la posterior identificación del agente infeccioso. Estas técnicas están basadas en el uso de anticuerpos monoclonales, sondas de hibridación o amplificación de secuencias génicas específicas que detectan componentes fúngicos como el 1-3- β -D-glucano, manano, galactomanano o glucuroxilomanano, proteínas o ácidos nucleicos que podrían ser eficaces en la detección de la candidemia [Lamoth et al. 2010; Lucignano et al. 2011]. Sin embargo, estas dos últimas aún requieren una correcta estandarización de la metodología, al igual que ocurre con los métodos inmunohistoquímicos, hibridación *in situ* o amplificación de ácido nucleicos en muestras de tejidos, ya que estos biomarcadores no ofrecen un grado importante de seguridad diagnóstica y se debe valorar su utilidad ya sea en solitario o combinados [Cuenca-Estrella 2012; Quindós et al. 2011]. Por otra parte, la amplificación y secuenciación de ácidos nucleicos fúngicos o la identificación por espectrometría de masas *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight* (MALDI-TOF) está siendo cada vez más utilizada y tiene la capacidad de identificar agentes patógenos en hemocultivos en forma rápida y precisa. Avni y colaboradores concluyeron en un metaanálisis que la PCR a partir de muestras directas de sangre puede tener una mayor sensibilidad para el diagnóstico de candidiasis invasora que los hemocultivos convencionales, con una especificidad

del 90% [Avni et al. 2011]. En la actualidad existen pruebas comerciales como LightCycler SeptiFast Test MGRADE (Roche Molecular Diagnostics), sistema basado en PCR a tiempo real capaz de detectar secuencias de ADN de bacterias y hongos en hemocultivos [Dark et al. 2015].

4. Tratamiento antifúngico

Para un tratamiento antifúngico adecuado es necesario considerar criterios microbiológicos (etiología de la infección, la sensibilidad del patógeno y la forma de diseminación), criterios clínicos (estado inmunitario del paciente) y farmacológicos (forma de administración, metabolismo, eliminación, toxicidad e interacciones con otros fármacos). El tratamiento antifúngico está dirigido principalmente contra la pared y la membrana de la célula fúngica, inhibiendo las moléculas esenciales para estas.

4.1 Anfotericina B

La anfotericina B sigue siendo el patrón de referencia (*gold standard*) de los distintos agentes antifúngicos, a pesar de sus indeseables efectos secundarios. Es un fármaco fungicida, cuyo espectro de acción incluye a la mayoría de las especies de hongos de importancia clínica, aunque se ha observado resistencia en algunas cepas de *Candida* distintas de *Candida albicans* [Kalantar et al. 2014]. Su actividad antifúngica se basa en interacciones directas con el ergosterol de la membrana, formando canales de iones que causan un desequilibrio de los gradientes electroquímicos, pérdida del contenido citoplasmático y la consecuente muerte celular (Figura 2). Como todos los polienos, la anfotericina B interactúa con el colesterol, lo que causa efectos hepatotóxicos y nefrotóxicos [Carrillo-Muñoz et al. 2006]. Existen dos formulaciones lipídicas de anfotericina B, anfotericina B liposómica y anfotericina B en complejo lipídico, menos tóxicas que se asocian a menor nefrotoxicidad que la formulación convencional [Hamill 2013].

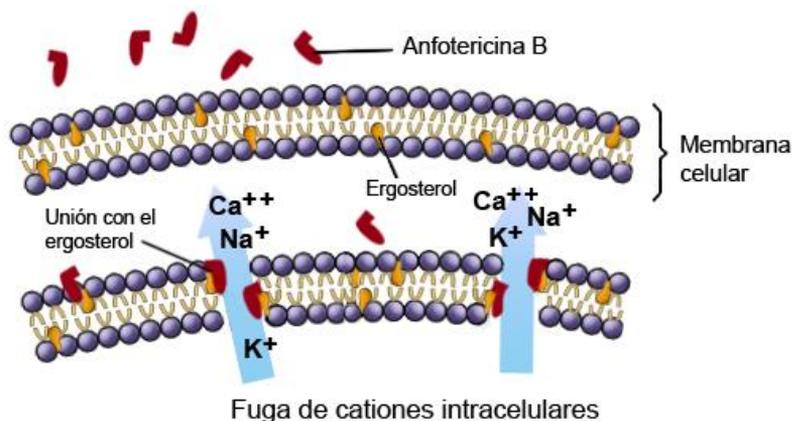


Figura 2. Mecanismo de acción de la anfotericina B.

4.2 Azoles

Los azoles forman una familia heterogénea de fármacos antifúngicos de amplio espectro y gran potencia. Químicamente tienen en común la presencia de un anillo azólico central, lo que condiciona que compartan su mecanismo de acción por inhibición de la enzima 14- α -desmetilasa, que transforma lanosterol en ergosterol y que está acoplada al citocromo P-450 (Figura 3). La inhibición de esta enzima causa diversos efectos tales como la alteración de la fluidez y permeabilidad de la membrana, la limitación del crecimiento y reproducción celular, así como la acumulación tanto de peróxido de hidrógeno como de sustancias intermedias que son sustratos de la síntesis del ergosterol y que aumentan el efecto tóxico sobre las células fúngicas, que en el caso del peróxido de hidrógeno, favorece la destrucción de los orgánulos intracitoplasmáticos. De acuerdo a las diferencias en su estructura química, los azoles se pueden clasificar en imidazoles (ketoconazol y miconazol) y triazoles (fluconazol, itraconazol, posaconazol y voriconazol). Ambos grupos presentan importantes variaciones respecto a su actividad, perfil farmacocinético y toxicidad. Los triazoles pueden sufrir interacción con otros medicamentos, ya que se metabolizan en citocromos hepáticos como el CYP3A4 y es conveniente evaluar la administración concomitante de fármacos y de otras sustancias con reconocido potencial hepatotóxico [Raschi et al. 2014].

El fluconazol es el referente con el que son comparados el resto de los azoles. Se absorbe bien por vía oral, tiene amplia biodisponibilidad y la mayor parte del fármaco se excreta sin cambios por vía renal. El fluconazol es activo contra levaduras y hongos patógenos primarios, pero inactivo frente a muchos hongos filamentosos y algunas levaduras intrínsecamente resistentes, como *Candida krusei*. Por su excelente perfil farmacocinético y su escasa toxicidad, se ha utilizado tanto en la profilaxis como en el tratamiento, lo que ha llevado a un aumento de la frecuencia de especies más resistentes, como *Candida glabrata* [Cuenca-Estrella 2010]. Los tratamientos prolongados pueden inducir resistencias secundarias en *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida metapsilosis*, *Candida parapsilosis* o *Candida tropicalis* [Miranda-Zapico et al. 2011; Pemán et al. 2012; Pinjon et al. 2005].

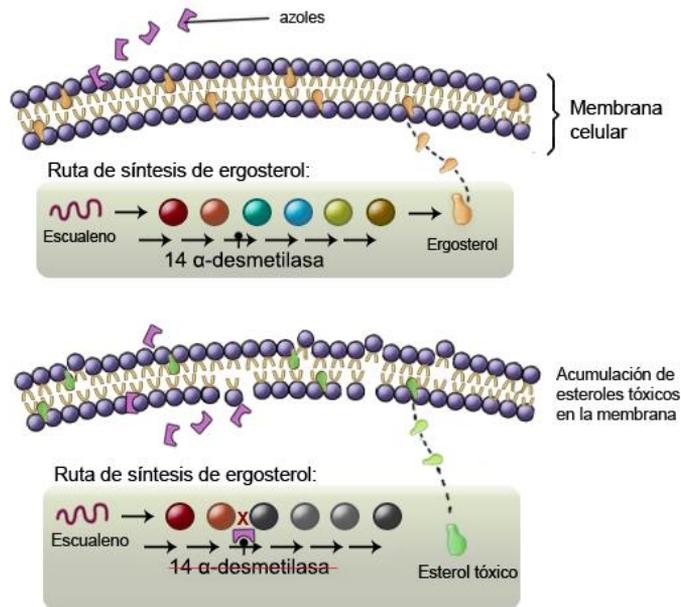


Figura 3. Mecanismo de acción de los azoles.

El posaconazol posee el espectro más amplio entre los azoles, incluyendo *Candida krusei* y los mucorales. Se utiliza en la profilaxis y el tratamiento de rescate de infecciones fúngicas invasoras y es una de las opciones terapéuticas de las mucormicosis [Heeres et al. 2010]. Es un fármaco liposoluble con baja biodisponibilidad por su escasa solubilidad en medios acuosos. Su absorción oral está limitada por la dosis y es dependiente de la ingesta de comida rica en grasas [Aperis y Mylonakis 2006]. Se metaboliza en el hígado, donde se somete a glucuronización y se convierte en metabolitos biológicamente inactivos, excretándose un 14% por vía renal y un 77% por vía digestiva [Heeres et al. 2010].

El voriconazol presenta una actividad muy potente contra *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis*, mientras que frente a *Candida krusei* y *Candida glabrata* su actividad es ligeramente menor [Heeres et al. 2010]. Su espectro de actividad es amplio e incluye levaduras y hongos filamentosos, como *Aspergillus* o *Fusarium*. Su absorción oral es buena, con una biodisponibilidad mayor al 90% que se ve disminuida con la presencia de alimentos grasos [Aperis y Mylonakis 2006]. Se metaboliza en el citocromo P-450 por lo que interacciona con otros fármacos aumentando la concentración plasmática de estos por inhibición de su metabolismo [Hoffman et al. 2000]. La administración intravenosa de voriconazol puede provocar alteración de la función renal debido a la presencia de ciclodextrina, excipiente de la presentación inyectable, que es eliminada por el riñón.

4.3 Equinocandinas

Las equinocandinas son un grupo de lipopéptidos semisintéticos cuyo mecanismo de acción se basa en el bloqueo de la subunidad catalítica de la enzima 1,3- β -D-glucano sintetasa, que causa la inhibición no competitiva de la polimerización de las unidades de glucosa difosfato de uridina en fibras de D-glucano (Figura 4). Como consecuencia, se produce la entrada masiva de agua a la célula, lo que causa edema y posteriormente lisis celular. La molécula de D-glucano no se encuentra en las células de los mamíferos, por lo que los efectos secundarios son mínimos [Chandrasekar 2011]. Las equinocandinas son fungicidas contra *Candida*, pero no son activas contra *Cryptococcus*, *Fusarium* o los mucorales [Cortés L y Russi N 2011; Quindós y Eraso 2008].

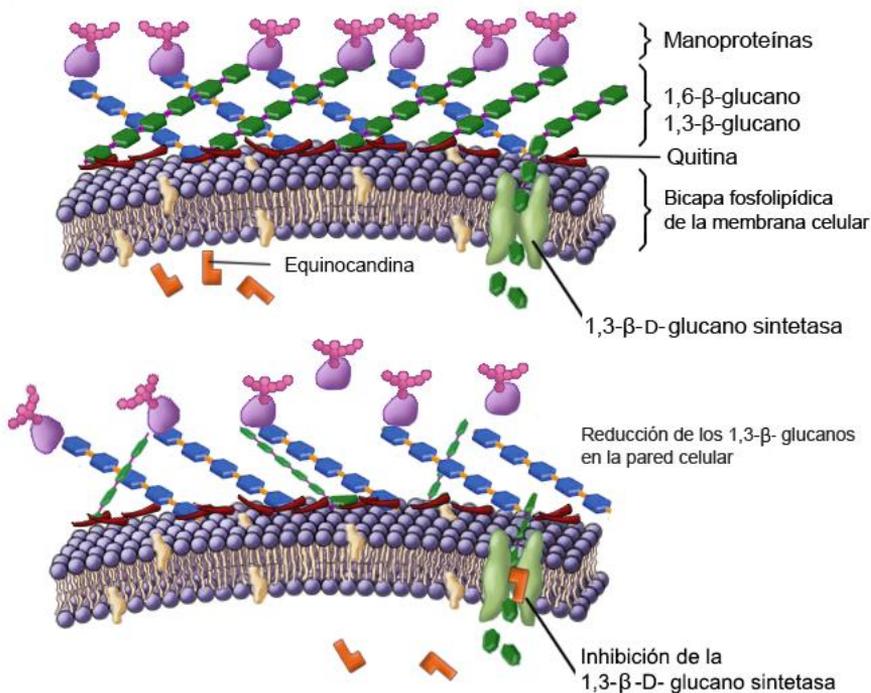


Figura 4. Mecanismo de acción de las equinocandinas.

La anidulafungina posee un amplio espectro de acción con excelente eficacia in vitro contra aislamientos clínicos de *Candida* resistentes a la anfotericina B, diferentes azoles y otras equinocandinas, lo que la convierte en una excelente herramienta terapéutica contra las candidiasis invasoras. En condiciones fisiológicas, la degradación de la anidulafungina se realiza lentamente mediante peptidasas plasmáticas en lugar de las enzimas del citocromo P-450, obteniendo productos de degradación que carecen de actividad antifúngica y que son eliminados por vía biliar [Damle et al. 2009].

La caspofungina es una neumocandina eficaz como terapia primaria de las candidiasis invasoras, como terapia de rescate para la aspergilosis invasora y como tratamiento empírico de los pacientes con neutropenia febril [Kohn et al. 2013]. La caspofungina es la que presenta más interacciones con otros fármacos debido a que se metaboliza a nivel del citocromo P-450 mediante hidrólisis peptídica lenta, N-acetilación y degradación, generando metabolitos sin actividad antifúngica [Chen et al. 2011; Cortés y Russi 2011]. Está indicada para el tratamiento de las candidiasis invasoras y de las candidiasis orofaríngeas y esofágicas refractarias a otros tratamientos. También está indicada en los casos de aspergilosis invasora en pacientes que no toleran o no responden al tratamiento con otros fármacos antifúngicos. Se puede utilizar como tratamiento combinado, con anfotericina B, itraconazol, posaconazol o voriconazol, de las mucormicosis y otras infecciones por hongos multirresistentes.

La micafungina está indicada como tratamiento de primera línea en candidemias y candidiasis invasoras en adultos y niños (incluidos los neonatos) y en la esofagitis candidiásica. También se ha aprobado su uso en la profilaxis de pacientes con trasplante de células hematopoyéticas o con neutropenia prolongada [Yamada et al. 2011].

4.4 Otros fármacos antifúngicos de uso sistémico

El uso de otros fármacos antifúngicos, como la 5-fluorocitosina, griseofulvina o terbinafina, está limitado al tratamiento de las micosis superficiales. Ocasionalmente se emplean en combinación con otros fármacos antifúngicos en el tratamiento de micosis invasoras refractarias a los tratamientos de primera elección. La 5-fluorocitosina o flucitosina es una pirimidina fluorada que se ha empleado en combinación con anfotericina B o fluconazol en el tratamiento de las candidiasis y de las criptococosis graves. Inhibe la síntesis de ADN, ARN y proteínas de la célula fúngica. Es hidrosoluble y alcanza altas concentraciones en plasma, LCR y otros líquidos corporales y se elimina sin metabolizar por la orina [Carrillo-Muñoz et al. 2006]. La griseofulvina se emplea de forma infrecuente en el tratamiento de las dermatofitosis. Se postula que puede actuar mediante la inhibición de la mitosis celular de los hongos y la síntesis de ácido nucleico, inhibiendo la función de los microtúbulos del hongo. Se administra por vía oral y se metaboliza en el hígado, con interacciones con otros fármacos [Adimi et al. 2013; Develoux 2001]. La terbinafina y la naftifina son alilaminas que inhiben la biosíntesis del ergosterol mediante el bloqueo de la enzima escualeno epoxidasa. La terbinafina es un fármaco lipófilo que se absorbe por vía oral y alcanza concentraciones altas en la piel, el pelo, las uñas y los tejidos adiposos. Presenta un amplio espectro de actividad antifúngica contra dermatofitos. Es útil en combinación con otros fármacos antifúngicos, como anfotericina B, caspofungina, fluconazol o voriconazol, para el tratamiento de las aspergilosis y las candidiasis invasoras [Adimi et al. 2013; Carrillo-Muñoz et al. 2006]. La miltefosina, utilizada para el tratamiento contra leishmaniasis, presenta un amplio espectro de actividad antifúngica in vitro y se ha observado que en combinación con posaconazol o voriconazol presenta un efecto sinérgico contra *Fusarium* y mucorales. Se han

realizado estudios para desarrollar análogos de miltefosina que muestren mayor potencia como agentes antifúngicos [Biswas et al. 2014; Ravu et al. 2013].

4.5 Perspectivas futuras

La calcineurina [Blankenship et al. 2003] o algunos fármacos anticancerígenos [Cowen et al. 2009] mejoran la actividad del fluconazol, lo que ha aumentado el interés por utilizarlos en combinación con fármacos antifúngicos [Butts y Krysan 2012]. Otros fármacos, como la enoxacina ha sido efectiva en un modelo murino de candidiasis diseminada [Breger et al. 2007]. Sin embargo, las dianas celulares sobre las que los fármacos antifúngicos pueden actuar con menores efectos secundarios, son escasas y muchos de los compuestos sintéticos son tóxicos para las células de los mamíferos. Existe un creciente interés en encontrar nuevos mecanismos de acción, por ejemplo, modulando la respuesta inmune del huésped. El Efungumab, un anticuerpo monoclonal que inhibe a la proteína hsp 90, mejoraba los resultados de los tratamientos antifúngicos, mostrando sinergismo cuando se combinaba con fluconazol, caspofungina y anfotericina B [Karwa y Wargo 2009; Krenova et al. 2010]. Sin embargo, la Agencia Europea de Medicamentos no ha autorizado su comercialización porque el rendimiento clínico no es uniforme y los efectos adversos son significativos [European Medicines Agency 2007]. La inmunoterapia con adyuvantes como el IFN- γ puede restaurar la función inmune en pacientes con micosis invasoras [Delsing et al. 2014]. Aunque muchos de los estudios presentan resultados prometedores, es pronto para incorporarlos a los esquemas de terapia antifúngica y serán necesarios nuevos estudios sobre los compuestos que muestran resultados novedosos y esperanzadores; en ellos, los modelos de micosis invasoras en animales son de gran ayuda para evaluar un gran número de fármacos, estimar su actividad antifúngica y su toxicidad. Se han encontrado algunas que actúan mediante inhibición de la formación de biopelículas, impidiendo la transición levadura-hifa, tales como tetrahidrina, magnolol, honokiol, OSIP 108 y ácido gynnémico [Delattin et al. 2014; Sun et al. 2015a; Vedyappan et al. 2013; Zhao et al. 2013]. Otras moléculas como la piridoxatina, que inactiva la síntesis del ergosterol [Chang et al. 2015], metabolitos secundarios como la glioxina [Coleman et al. 2011] o moléculas con actividad sinérgica combinada con antifúngicos como la tirocidina o el propio magnolol son prometedores avances en la terapia antifúngica [Sun et al. 2015b; Troskie et al. 2014].

5. Modelos en animales invertebrados para el estudio de las candidiasis

El modelo de candidiasis invasora en el ratón (*Mus musculus*) es el más utilizado. A pesar de que la colonización y la infección por *Candida* no ocurre de manera natural en el ratón. *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* y *Candida krusei* no forman parte de la microbiota del ratón ni son patógenos naturales del mismo pero las semejanzas anatómicas e

inmunológicas con los seres humanos han hecho que sea el modelo experimental de elección. Sin embargo, existen diferencias que podrían afectar a la interacción entre el hongo y huésped.

La utilización de mamíferos en la experimentación hoy en día es éticamente cuestionable, no considerándose aceptable si el resultado se puede obtener con métodos alternativos. La Unión Europea y entidades como *Canadian Council of Animal Care* (CCAC), *International Council for Laboratory Animal Science* (ICLAS) y *Federation of European Laboratory Animal Science* (FELASA) han publicado normas y recomendaciones generales para los experimentos con animales [Office of Laboratory Animal Welfare National Institutes of Health 2002; Olfert et al. 1993]. Estas regulaciones se basan en la regla de las “3R”: Reemplazar, Reducir, Retirar. Un modelo alternativo es todo aquel que reemplaza el uso de animales de laboratorio, reduce el número requerido en los experimentos o retira procedimientos o protocolos preexistentes para minimizar el nivel de sufrimiento o angustia que ellos puedan experimentar, según el *Office of Technologies Assessment* de EEUU [Russell y Burch 1959]. Las principales referencias normativas que regulan el uso y las buenas prácticas sobre las condiciones de vida de los animales utilizados en investigación y docencia son el Convenio Europeo sobre protección de los animales vertebrados utilizados con fines de experimentación y otros fines, la Directiva Europea 2010/63/UE y Recomendación Europea 2007/526/CE y el documento RD 1201/2005 sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos [CEID, Comisión de Ética UPV/EHU 2014]. En España, el Real Decreto 53/2013, del 1 de febrero, establece las normas básicas para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos y de animales vagabundos y asilvestrados, fauna silvestre, las especies amenazadas y los animales de compañía, con requisitos especialmente estrictos en el caso de los primates no humanos [BOE núm. 34 2013]. En el País Vasco, la Orden de 25 de junio de 1991, sobre protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos, delimita y regula los procedimientos en los que se manipulan y utilizan animales con fines experimentales [BOPV 1991136 2005]. En la Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea, el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) es un órgano colegiado encargado de evaluar los aspectos éticos, metodológicos y jurídicos que se plantean en los proyectos de investigación científica o actividades de docencia que se lleven a cabo en la institución y que impliquen la utilización de animales. Todas esas leyes y reglamentos intentan limitar la utilización de mamíferos si existe la posibilidad de obtener resultados de manera factible, fiable y razonable utilizando modelos alternativos: modelos matemáticos o computacionales, cultivos celulares, modelos vegetales o un sistema biológico in vitro, modelos en animales de sangre fría o en animales invertebrados.

Los modelos en animales invertebrados presentan varias ventajas. Su pequeño tamaño permite un mantenimiento fácil y económico, mientras que su periodo de vida relativamente corto, podría facilitar la obtención rápida de resultados. Estos modelos se han aplicado en diversos campos de la biomedicina para estudios relacionados con el cáncer, la diabetes, la obesidad, las enfermedades neurodegenerativas, etc. Su utilización en micología comenzó con el

descubrimiento de las vías de señalización Toll, indispensables para la defensa contra las micosis, utilizando *Drosophila melanogaster* [Lemaitre et al. 1996]. Desde entonces, se han ido incorporando nuevos modelos a estudios de patogenia de las micosis, eficacia de compuestos antifúngicos e inmunidad innata. Se han desarrollado modelos experimentales en amebas (*Acanthamoeba castellanii* y *Dictyostelium discoideum*), nematodos (*Caenorhabditis elegans*), artrópodos (cucaracha *Blattella germanica*, gusano de seda *Bombyx mori*, mosquito *Culex quinquefasciatus*, mosca del vinagre o de la fruta *Drosophila melanogaster* y la polilla de la cera *Galleria mellonella*) [Lionakis y Kontoyiannis 2005; Means 2010].

5.1 Modelos en amebas

La utilización de amebas como modelos alternativos para estudios de infección experimental es muy prometedora, dado el alto grado de conservación de los mecanismos de inmunidad innata y la facilidad para su manipulación bioquímica y cultivo.

Acanthamoeba castellanii es una ameba de suelo y aguas, con un metabolismo oxidativo asociado a la fagocitosis de bacterias y hongos. Su mantenimiento en el laboratorio es sencillo y económico [Axelsson-Olsson et al. 2009]. Ha sido utilizada en estudios de fagocitosis y citotoxicidad con algunas bacterias [Lee et al. 2012; Tamang et al. 2011], movimiento celular y propiedades de la regulación de genes [Clarke et al. 2013]. En este modelo se han encontrado resultados que ayudan a comprender el mecanismo que utiliza *Cryptococcus neoformans* para adaptarse al huésped mamífero [Derengowski et al. 2013] y *Aspergillus fumigatus* para escapar de las vacuolas alimentarias y germinar dentro de la célula [Van Waeyenberghe et al. 2013]. Se ha descrito un método de alto rendimiento para el cribado de fármacos antituberculosos que actúan dentro de las células infectadas, con una excelente sensibilidad y buena especificidad [Kicka et al. 2014].

Dictyostelium discoideum se ha utilizado para estudiar la virulencia de *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Mycobacterium tuberculosis* [Hagedorn et al. 2009] y en investigaciones de movilidad celular, quimiotaxis, fagocitosis y procesos tales como la citocinesis, respuestas al estrés, muerte celular no apoptótica, señalización intercelular, transducción de señales y efectos secundarios de fármacos empleados en el tratamiento del cáncer o la depresión [Williams 2010; Williams et al. 2006].

5.2 Modelos en insectos

Blattella germanica ha sido utilizada para estudiar la infección natural por *Aspergillus flavus*, con invasión de diversos órganos y respuestas de fagocitosis y encapsulación [Kulshrestha y Pathak 1997; Pathak y Kulshrestha 1998]. Sin embargo, las levaduras son digeridas o inactivadas en el

tracto digestivo de este insecto perdiendo su capacidad infectiva, lo que impide su utilización mientras no existan cepas mutantes con inmunosupresión [Zheltikova et al. 2011].

El gusano de seda *Bombyx mori* se ha utilizado con éxito como modelo de aspergilosis invasora por *Aspergillus flavus* [Kumar et al. 2004], candidiasis [Matsumoto et al. 2013], y en infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae* y *Staphylococcus aureus* [Kaito et al. 2002].

El mosquito hematófago *Culex quinquefasciatus* ha sido utilizado para estudiar los mecanismos de respuesta inmune celular contra *Candida albicans*, observándose un aumento del recuento total de hemocitos, fagocitosis y melanización de las levaduras, limitando así la infección [Da Silva et al. 2000]. Otra utilidad que se le ha dado es como «jeringa biológica» para extraer sangre de pequeños vertebrados en estudios del Virus del Nilo Occidental y con Highlands J virus [Kading et al. 2014].

Drosophila melanogaster es un modelo de estudios de biología del desarrollo y genética [Artal-Sanz et al. 2006; Giacomotto y Segalat 2010]. Entre sus ventajas están su pequeño tamaño (≈ 3 mm), un ciclo de vida corto y un genoma secuenciado con una homología del 75% con los genes humanos [Bier 2005]. Aunque *Drosophila melanogaster* no se puede conservar congelado, existen miles de cepas que están disponibles en el *Stock Center Bloomington* [Matthews et al. 2005]. Las cepas salvajes son resistentes a los hongos debido a la participación de las vías de señalización Toll, activando genes de péptidos antifúngicos como drosomicina y metchnikowina [Lionakis 2011]. Aun así, este modelo se ha utilizado con cepas mutantes para identificar nuevas dianas para el diagnóstico y tratamiento de infecciones por *Candida albicans* [Chamilos et al. 2009].

La larva de *Galleria mellonella* es un organismo que está siendo cada vez más utilizado como modelo in vivo de patogenia y tratamientos antimicrobianos, debido a la escasa dificultad de manipulación y los bajos costes de mantenimiento. Además, posee un alto grado de homología estructural y funcional con el sistema inmune innato de los vertebrados y presenta, al igual que en otros insectos, ambos tipos de respuesta, humoral (procesos de melanización, coagulación de la hemolinfa y producción de potentes péptidos antimicrobianos) y celular (fagocitosis, formación de nódulos y encapsulación a gran escala) [Krautz et al. 2014; Lionakis 2011]. Por otra parte, su capacidad para vivir a 37 °C satisface una condición importante en el estudio de los patógenos que pueden experimentar cambios significativos a temperaturas por encima o por debajo de la temperatura humana [Cook y McArthur 2013]. Las larvas de *Galleria mellonella* se pueden almacenar a temperatura ambiente y su tamaño es suficientemente grande (1,5-2,5 cm) como para que se pueda inocular la dosis precisa de agente patógeno y de fármaco [Rowan et al. 2009], además de facilitar la recogida de tejido y hemolinfa para el análisis histológico. Este modelo se ha utilizado para estudiar la infección por *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus fumigatus*, varias especies de *Candida*, y bacterias, como *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* y *Enterococcus faecalis*.

Sin embargo, aún falta mucho por avanzar en la estandarización y el conocimiento del modelo en *Galleria mellonella*, como establecer condiciones experimentales entre los distintos laboratorios o introducir cepas de referencia y cepas mutantes. Se han propuesto algunos criterios acerca de las dosis infectivas, así como precauciones en el manejo de los fármacos antifúngicos insolubles en agua para la utilización de este modelo [Li et al. 2013]. La secuenciación de transcriptomas de las diferentes etapas de desarrollo larval implicados en la respuesta inmune, ha aportado una valiosa información para dilucidar los mecanismos moleculares implicados en la defensa contra los patógenos humanos y su coevolución con los entomopatógenos [Vogel et al. 2011]. Además, se ha comprobado que las larvas en estado de inanición durante siete días antes de la infección son más susceptibles a la infección por *Candida albicans*, demostrando la reducción en la expresión de varios péptidos antimicrobianos y proteínas inmunitarias [Banville et al. 2012].

6. Modelo en *Caenorhabditis elegans*

El nematodo *Caenorhabditis elegans* se ha utilizado para el estudio de muchos mecanismos moleculares como la muerte celular, el envejecimiento, el desarrollo y la función neuronal. También se ha empleado como modelo experimental en la investigación básica sobre agentes neurotóxicos, enfermedades neurodegenerativas, cáncer, así como para el estudio de las interacciones huésped-patógeno. Presenta la ventaja de que su genoma está completamente secuenciado y comparte el 60-80% de los genes humanos. Este hecho facilita la identificación de vías reguladoras, fenómenos de interacción huésped-patógeno, identificación de genes expresados diferencialmente durante un proceso, etc. por lo que su utilización experimental facilita la extrapolación de los resultados obtenidos al ser humano [Artal-Sanz et al. 2006].

En estado adulto *Caenorhabditis elegans* mide aproximadamente 1 mm de largo y 80 µm de diámetro, con un cuerpo cilíndrico no segmentado. Se cultiva en agar o en medio líquido, con una cepa no patógena de *Escherichia coli* como fuente de alimentación. El nematodo es hermafrodita y en condiciones adecuadas se autofertiliza dando lugar a una progenie de hasta 300 larvas por cada individuo [Altun y Hall 2012]. Estas larvas pasan por cuatro estadios en un ciclo de 3 a 5 días (Figura 5), llegando a vivir unos 10-15 días.

Su cuerpo transparente permite seguir los cambios funcionales y morfológicos in vivo, característica importante en la observación del desarrollo de hifas y la colonización durante la infección por *Candida*. La falta de comida, el exceso de temperatura o la presencia de una feromona indicadora de exceso de población causan que *Caenorhabditis elegans* adopte un estadio facultativo de diapausa llamado *dauer* (duración, en alemán) que le permite prolongar cuatro a ocho veces su periodo de supervivencia. El periodo crítico en que estas señales pueden ser recibidas comienza hacia la mitad del primer estadio larvario (L1), momento en el cual puede mudar hacia un estadio L2 o hacia un estadio L2d (*dauer*). Durante el estado *dauer* el nematodo

deja de alimentarse indefinidamente y su movilidad se reduce notablemente. Este estadio termina cuando existen de nuevo condiciones favorables: una hora en un ambiente con alimentos es suficiente para que el nematodo salga del estadio *dauer*, después de dos a tres horas ya comienza a alimentarse y después de unas diez horas se produce la muda directamente al estadio L4 [Artal-Sanz et al. 2006].

Otras ventajas prácticas del modelo con *Caenorhabditis elegans* son que puede ser almacenado indefinidamente por crioconservación [Stiernagle 2006] y que existen miles de cepas genéticamente modificadas que pueden adecuarse a los diferentes tipos de ensayos, como la cepa doble mutante AU37 *glp-4(bn2) I; sek-1(km4) X*. Los mutantes *glp-4* pierden la capacidad de reproducirse debido a una morfogénesis gonadal incompleta cuando son incubados a 25 °C, con 100 veces menos células germinales que el tipo salvaje [Beanan y Strome 1992]. Esta característica permite mantener constante el número de individuos que participan en el estudio, evitando tanto las mezclas con su progenie como las muertes por eclosión matricida. La segunda mutación consta de la delección del gen *sek-1*, que impide la expresión de la proteína quinasa activada por mitógenos SEK-1, importante en la vía de la proteína quinasa quinasa activada por mitógeno (MAPKK), una de las que actúa con mayor especificidad frente a infecciones por levaduras, haciendo a esta cepa más susceptible a la infección [Scorzoni et al. 2013].

-Entre las desventajas de este modelo se encuentran la inviabilidad del nematodo a temperaturas mayores de 30 °C, que dificulta la comparación directa de la actividad in vitro e in vivo de los fármacos antifúngicos, su simplicidad anatómica y su escasa tolerancia a los solventes polares. Otro inconveniente es que los nematodos no pueden ser infectados con una concentración conocida del agente infeccioso y la infección se limita a la cantidad del microorganismo que el nematodo pueda ingerir.

Caenorhabditis elegans ha sido evaluado como un modelo de candidiasis para el estudio de la virulencia de una colección de cepas de *Candida albicans* mutantes permitiendo la identificación de los genes del factor de transcripción mutado que participan en la formación de hifas. Como se indica en la tabla 1, *Caenorhabditis elegans* es uno de los modelos animales con un mayor rendimiento en el cribado masivo de cepas y moléculas antifúngicas porque los experimentos se pueden llevar a cabo en placas de pocillos múltiples y la infección del nematodo se provoca reemplazando la comida de los nematodos por las levaduras de *Candida* que se van a estudiar [Pukkila-Worley et al. 2009a].

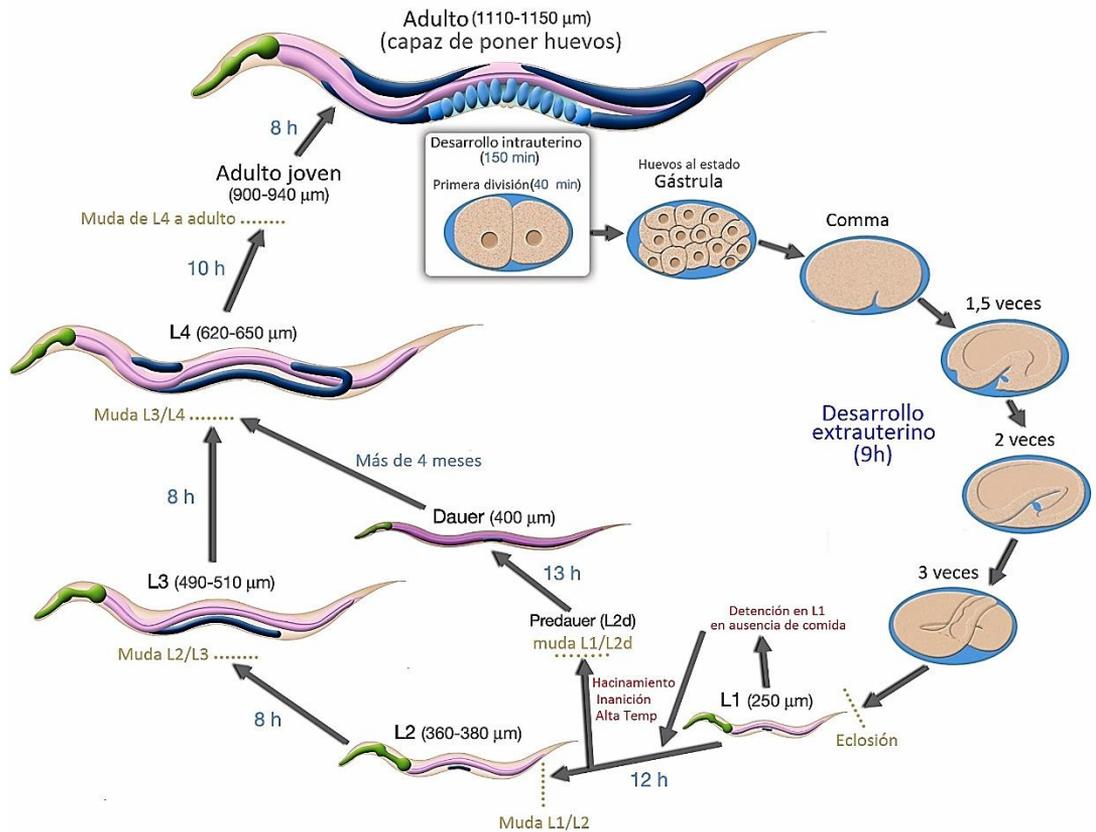


Figura 5. Ciclo de vida de *Caenorhabditis elegans*. Los tiempos indicados en letras azules se corresponden con la cepa salvaje N2 incubada a 22 °C, similares a los de la cepa doble mutante AU37 a 15 °C. Se indica el tamaño de los nematodos en los distintos estadios larvarios y las condiciones para entrar en el estado *dauer* [Altun y Hall 2012].

Tabla 1. Resumen de las características de los modelos animales más utilizados en los estudios de candidiasis [Giacomotto y Segalat 2010; Lionakis 2011]

Características	<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Galleria mellonella</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Mus musculus</i>
Ciclo (días)	3-5	3-5	10-14	21-28
Tamaño (mm)	1	15-25	3	60
Medio de crecimiento	sólido o líquido	sólido	sólido	jaula
Ensayos a 37 °C	no	si	no	si
Base de datos	WormBase	ND	Flybase	ND
Centro oficial	CGC	ND	BDSC	ND
Número de genes (aproximado)	19.000	ND	13.000	25.000
Homología con el ser humano (%)	> 60	ND	> 60	> 90
Rendimiento	medio - alto	bajo	bajo - medio	muy bajo

WormBase: <http://www.wormbase.org/>; Flybase: <http://flybase.org/>; CGC: *Caenorhabditis* Genetics Center; BDSC: Bloomington *Drosophila* Stock Center; ND: No Disponible.

6.1 Inmunidad en *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans es un nematodo de vida libre, con un sistema inmune innato protector contra las infecciones. Existen dos barreras anatómicas, la cutícula y la faringe. La cutícula recubre completamente al nematodo y actúa como un exoesqueleto flexible que lo protege del medio ambiente, mantiene la forma y permite la movilidad. La faringe está formada por dos bulbos: el bulbo proximal actúa como filtro y el distal como un triturador de los microorganismos de los que se alimenta antes de que entren al intestino. Además, existe un tercer sistema de defensa constituido por los movimientos peristálticos intestinales que ayudan a eliminar a los microorganismos, dificultando la colonización.

El nematodo puede presentar mecanismos específicos de reconocimiento que pueden relacionarse evolutivamente con una respuesta inmune primitiva contra algunos microorganismos, mediante la detección directa de PAMP. Estos mecanismos están regulados por tres componentes principales, que se basan en el receptor de insulina (ILR), la proteína tipo G y la señalización neuronal de la serotonina. Una de las toxinas de *Bacillus thuringiensis* activa la transcripción de un conjunto muy específico de genes de ILR cuya respuesta no está dirigida al estrés general causado por las sustancias tóxicas, si no al daño y/o estrés causado por las toxinas. Otro tipo de respuesta está mediada por los quimiorreceptores presentes en los nematodos, que están acoplados a una proteína G y que son capaces de detectar y evitar específicamente la serrawetina W2, un lipopeptido tensioactivo producido por *Serratia marcescens* que daña la

cutícula del nematodo. También se ha observado respuesta a las serrawetinas W1 y W3, que son bioquímicamente distintas e inducen conductas de evasión que parecen depender de otros genes. Con la señalización neuronal de la serotonina, *Caenorhabditis elegans* asocia una molécula de comunicación intercelular, la homoserina lactona acilada, con una cepa patógena de *Pseudomonas aeruginosa*. Por lo tanto, estas moléculas son percibidas por *Caenorhabditis elegans* como una señal específica para la activación de las respuestas de defensa [Melo y Ruvkun 2012; Pradel et al. 2007; Schulenburg et al. 2008]. Asimismo, *Caenorhabditis elegans* posee vías de inmunidad innata similares a las del sistema inmune de los mamíferos, que parecen basarse en distintos fenómenos de reconocimiento y cascadas de señalización que finalmente conducen a la producción y liberación de moléculas de defensa. Estas cascadas son la proteína quinasa activada por el mitógeno p38 (MAPK), el ILR, el factor de crecimiento transformante β , la muerte celular programada, la señal extracelular regulada por quinasa, la quinasa N-terminal c-Jun y las vías del receptor de tipo Toll (TLR). En *Caenorhabditis elegans* sólo se ha encontrado el gen *tol-1*, que contribuye en la resistencia a *Salmonella enterica* y en la conducta de evasión de *Serratia marcescens*. El TLR contiene un dominio intracitoplasmático llamado dominio TIR (Toll/IL-1 Receptor) que parece actuar independientemente de TOL-1 como parte de la vía de p38 MAPK. También se activan reguladores adicionales, como son el factor de choque térmico HSF-1 y el factor de transcripción GATA ELT-2 [Schulenburg et al. 2008]. La proteína SEK-1 tiene actividad en la vía MAPKK, por lo que los mutantes que carecen del gen *sek-1* son nematodos con una inmunodeficiencia relativa. La vía de p38 MAPK desempeña un papel crítico en la integración de varias de estas cascadas de señalización y en la expresión de genes inducidos por la infección que llevan a la síntesis proteínas y péptidos antimicrobianos [Couillault et al. 2004; O'Rourke et al. 2006; Schulenburg et al. 2008; Troemel et al. 2006].

El genoma de *Caenorhabditis elegans* codifica proteínas y péptidos antimicrobianos, algunos similares a los encontrados en otras especies, pero otros no tienen equivalentes en otros nematodos [Ewbank y Zugasti 2011]. Los caenóforos son una familia de proteínas que se expresan en el intestino delgado y que comparten características estructurales y funcionales con las proteínas citotóxicas granulisina y NK-lisina de vertebrados, que forman poros en los microorganismos [Roeder et al. 2010]. Las lisozimas se expresan en el intestino inducidas por algunos patógenos y actúan directamente sobre ellos. Se ha demostrado que algunas son importantes tanto contra bacterias Gram positivas como Gram negativas [Ewbank y Zugasti 2011].

Las lectinas están reguladas por un complejo patrón genético en respuesta al reconocimiento de carbohidratos de superficie de los patógenos [O'Rourke et al. 2006; Troemel et al. 2006]. Podrían tener funciones de opsonización de microorganismos y enmascarar epitopos del nematodo que son las dianas de los efectores microbianos específicos [Schulenburg et al. 2008]. Los factores antibacterianos son péptidos similares a las defensinas de los vertebrados, que actúan directamente sobre la membrana de diversos grupos de patógenos (Figura 6). Se piensa que

incluso en ausencia de estímulos inmunológicos forman parte de la faringe y el intestino [Ewbank y Zugasti 2011]. Los neuropéptidos y la familia de péptidos estrechamente relacionados a las caenacinas, responden a estímulos provenientes de la cutícula del nematodo.

La transcripción de los efectores inmunes antibacterianos en *Caenorhabditis elegans* son reprimidos selectivamente en respuesta a patógenos fúngicos, es decir, los nematodos despliegan selectivamente sus defensas antifúngicas específicas a expensas de la respuesta antibacteriana (Pukkila-Worley, Ausubel & Mylonakis 2011).

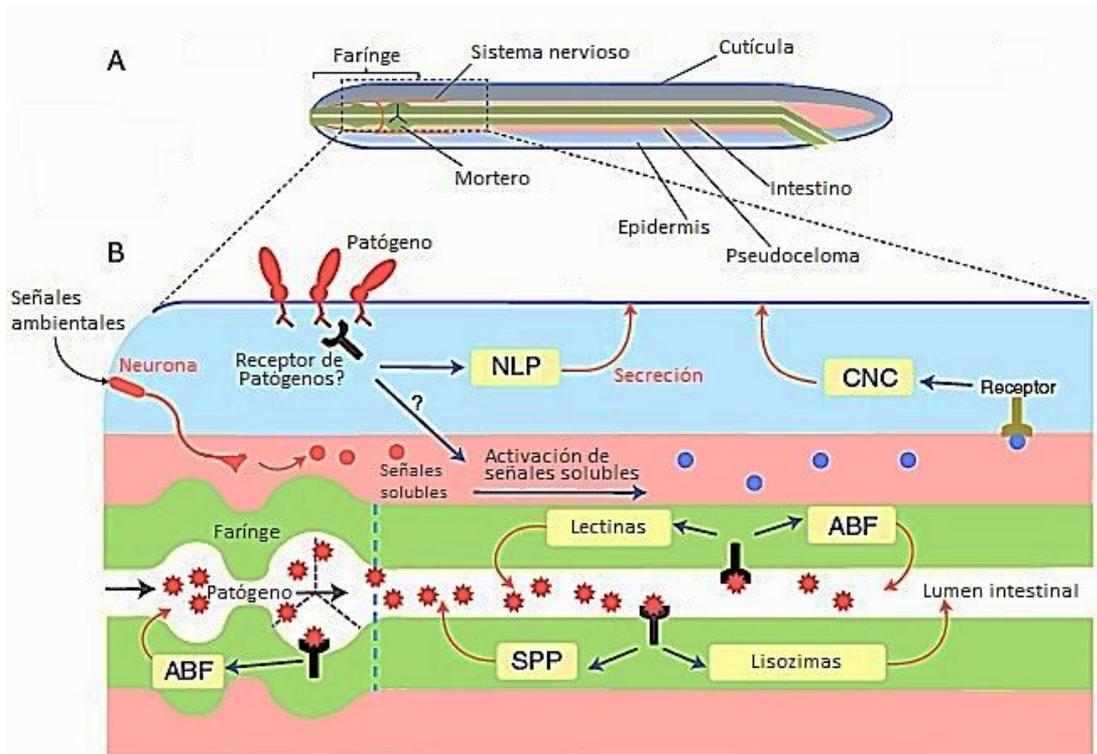


Figura 6. Sistema defensivo de *Caenorhabditis elegans*. (A) Anatomía básica del nematodo. Se compone esencialmente de dos tubos concéntricos, la epidermis (cutícula y músculos) y el intestino, ambos separados por una cavidad líquida llamada pseudoceloma. Las barreras físicas del nematodo incluyen la cutícula que lo envuelve y la faringe o mortero que rompe mecánicamente los microorganismos que forman la dieta normal. (B) Péptidos antimicrobianos y proteínas de *Caenorhabditis elegans*. Los microorganismos que penetran al interior causan daño celular. Algunos pueden ser detectados a través de receptores específicos. Estos dos eventos desencadenan vías específicas de señalización con la producción y liberación de varias proteínas y péptidos antimicrobianos específicos (rectángulos amarillos). Estos péptidos son: los neuropéptidos (NLP), las caenacinas (CNC), los factores antibacterianos (ABF) y caenoforos como las proteínas tipo saposinas (SPP). Estos efectores antimicrobianos se expresan específicamente en un tejido particular, tal como la faringe, el intestino o la epidermis, según el patógeno [Ewbank y Zugasti 2011].

HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas se han conseguido importantes avances en la terapia de las infecciones fúngicas invasivas con la incorporación de nuevos fármacos antifúngicos y la subsiguiente mejora tanto en la morbimortalidad asociada, como en la supervivencia global de los pacientes. Sin embargo, no se han obtenido progresos sustanciales en el diagnóstico micológico que sigue siendo relativamente lento y difícil, lo que causa una excesiva utilización de tratamientos empíricos en la práctica clínica. El uso de triazoles en pacientes de alto riesgo ha dado lugar a una presión selectiva con un incremento de la frecuencia de las especies resistentes de *Candida*. Además, la variabilidad en la biodisponibilidad de los fármacos antifúngicos en pacientes con inmunodeficiencias, la escasez de formulaciones orales o intravenosas, la toxicidad y las interacciones con otros medicamentos, limitan la utilidad de los fármacos antifúngicos disponibles y hacen necesaria la búsqueda de nuevos compuestos. Es importante conocer las diferencias en la virulencia y en el perfil de sensibilidad a los fármacos antifúngicos que presentan las diferentes especies emergentes de *Candida*. Los modelos in vivo son una prometedora herramienta para realizar este tipo de investigación. Sin embargo, las infecciones fúngicas experimentales con mamíferos presentan diversas limitaciones éticas y económicas que hacen necesaria la búsqueda de nuevos modelos con otros seres vivos. Pese a que algunos de los huéspedes propuestos, como *Caenorhabditis elegans* y *Galleria mellonella*, son filogenéticamente muy distantes de los mamíferos, los resultados obtenidos en este tipo de modelos de micosis invasiva son prometedores.

El uso del nematodo *Caenorhabditis elegans* en el estudio de la historia natural de las candidiasis y como modelo experimental útil para el cribado de nuevos compuestos, podría resolver algunos de los principales obstáculos en el descubrimiento de nuevos productos antifúngicos y predecir la eficacia de los tratamientos. Por tanto, es importante realizar la validación externa de estos modelos experimentales para ponerlos al servicio del estudio de compuestos con actividad antifúngica.

Existen dos premisas que apoyan la validez externa de los resultados obtenidos en el modelo de infección fúngica invasiva (IFI) en *Caenorhabditis elegans* y por tanto justifican su uso en la investigación de factores de virulencia y el cribado de compuestos con actividad fungicida. Por una parte, es que es muy probable que la expresión y la regulación de los mecanismos de virulencia de ciertos microorganismos patógenos haya evolucionado debido a las interacciones con sus huéspedes naturales en el medio ambiente, como es el caso de *Caenorhabditis elegans*. Por otra, muchos microorganismos patógenos estudiados en modelos experimentales en huéspedes invertebrados, como este nematodo, causan una infección persistente y letal con los mismos o similares factores de virulencia utilizados para causar la infección en mamíferos. Estos dos antecedentes sugieren que los modelos de micosis en *Caenorhabditis elegans* pueden tener una elevada validez externa y las conclusiones obtenidas ser extrapolables en gran medida a los efectos que se pudieran observar en otros animales superiores en la escala evolutiva [Pukkila-

Worley et al. 2009a]. Todo esto abre la posibilidad de desarrollar nuevas terapias que estén dirigidas específicamente contra los mecanismos de virulencia [Ewbank y Zugasti 2011].

Para lograr estudiar posibles terapias frente a *Candida albicans* y a las especies emergentes de este género es fundamental conocer la patogenicidad que presentan, lo que aún no ha sido convenientemente investigado en este modelo. Hasta ahora, sólo se han publicado estudios realizados con cepas de las especies *Candida albicans*, *Candida krusei* y *Candida parapsilosis* [Breger et al. 2007; Okoli et al. 2009; Pukkila-Worley et al. 2009a; Scorzoni et al. 2013; Tampakakis et al. 2008]. En ninguna de estas investigaciones se ha estudiado la influencia sobre el nematodo del dimetilsulfóxido (DMSO), uno de los solventes utilizados con más frecuencia en los ensayos de sensibilidad in vitro de los fármacos antifúngicos más empleados, limitándose únicamente a mencionar que no tiene efectos tóxicos [Breger et al. 2007]. Además otros estudios similares realizados en otros campos de la biología son contradictorios. Mientras algunas publicaciones señalan que un 1% de DMSO se considera una concentración segura para *Caenorhabditis elegans*, otros indican que ésta fue la concentración más baja con un efecto significativo sobre su crecimiento y desarrollo. Se ha descrito que al exponer nematodos en la etapa L4 a DMSO se produce una reducción de aproximadamente el 30% en la progenie [McLaggan et al. 2012]. Dada la amplia utilización de este solvente, es importante estudiar con detalle los efectos que puede tener sobre la integridad del nematodo.

Pese a las evidentes diferencias evolutivas, fisiológicas, anatómicas, así como su inviabilidad a temperaturas mayores de 30 °C, se considera que los modelos de infección in vivo utilizando a este animal invertebrado son una excelente herramienta para la detección de la actividad antimicrobiana, consolidándose como un buen sistema tanto para el cribado de compuestos, como para la evaluación de la capacidad infectiva de microorganismos de importancia clínica [Anastassopoulou et al. 2011; Artal-Sanz et al. 2006; Breger et al. 2007; Chamilos et al. 2007; Ewbank y Zugasti 2011; Giacomotto y Segalat 2010; Moy et al. 2009; Pukkila-Worley et al. 2009a].

Los estudios de la patogenia de las enfermedades infecciosas en los mamíferos a menudo son complicados debido a sus ciclos reproductivos largos, pequeños tamaños de cría y complejidad genética. Además, se ha de tener en cuenta que los experimentos en mamíferos pueden ser muy costosos y a menudo presentan dilemas éticos.

En la presente Tesis Doctoral se van a estudiar las ventajas prácticas potenciales que presenta *Caenorhabditis elegans* en los estudios de infección in vivo y en la evaluación de la actividad de los fármacos antifúngicos. Entre estas ventajas destaca la capacidad de ser infectado con levaduras del género *Candida*, el crecimiento a gran escala de su población, los bajos costes de desarrollo y que no plantea problemas técnicos de importante magnitud [Mylonakis et al. 2003].

Objetivos

1. Objetivos generales

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se propone como principal objetivo el desarrollo de un modelo experimental de candidiasis invasiva en *Caenorhabditis elegans* con cepas de referencia de las especies de *Candida* que muestran mayor relevancia clínica en el ser humano, y evaluar la utilidad de este modelo animal tanto en el estudio de la patogenia de la candidiasis como en la realización de diferentes aproximaciones terapéuticas con fármacos antifúngicos de uso habitual en la práctica clínica.

2. Objetivos específicos

Los objetivos específicos propuestos han sido los siguientes:

- Desarrollar un modelo de infección in vivo, en el nematodo *Caenorhabditis elegans* para el estudio de las interacciones huésped-patógeno en las candidiasis invasivas.
- Estudiar la variabilidad de la virulencia fúngica de las especies de *Candida* que se aíslan con más frecuencia en las infecciones invasivas.
- Estudiar el efecto de distintos solventes, como el DMSO y el agua, en el desarrollo y supervivencia de *Caenorhabditis elegans*.
- Evaluar la eficiencia de diferentes compuestos antifúngicos, como anfotericina B, azoles (fluconazol, voriconazol y posaconazol) y equinocandinas (anidulafungina, caspofungina y micafungina), aplicados en monoterapia, en la supervivencia de los nematodos infectados con distintas especies de *Candida*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas y condiciones previas a los ensayos

1.1 *Caenorhabditis elegans*

Se utilizó la cepa doble mutante *glp-4; sek-1* (AU37) de *Caenorhabditis elegans* que se obtuvo del *Caenorhabditis Genetics Center* (University of Minnesota, EEUU). La cepa fue mantenida a 15 °C en el medio de cultivo *Nematode Growth Medium* (NGM) previamente sembrado con la cepa de *Escherichia coli* OP50. La bacteria se utilizó como fuente de alimentación para los nematodos y fue sembrada en caldo Luria Bertani (LB) e incubada durante 18 h a 30 °C, manteniéndose útil hasta 4 meses a 4 °C.

1.1.1 Crecimiento de la población de *Caenorhabditis elegans* en agar NGM

La población original de *Caenorhabditis elegans* desarrollada en una placa de agar NGM donde la fuente de alimentación puede encontrarse prácticamente agotada, necesita ser traspasada a un nuevo ambiente más propicio para crecer en número. Existen varias técnicas de reproducción de la población. En esta Tesis se ha empleado la técnica de troceado, por la que una placa con *Caenorhabditis elegans* es dividida en 16 partes. Grupos de cuatro trozos del agar NGM original se colocaban en los bordes de nuevas placas de NGM preparadas con *Escherichia coli* OP50, poniendo en contacto ambas superficies (Figura 7). Los nematodos pueden pasar desde la porción de agar original, hacia la nueva placa. Ambos agares se dejaron en contacto durante 5-15 min, según la población de nematodos que se encuentre en las placas. Después, se retiraron los trozos de agar y se incubaron las nuevas placas durante dos días a 15 °C [Stiernagle 2006].

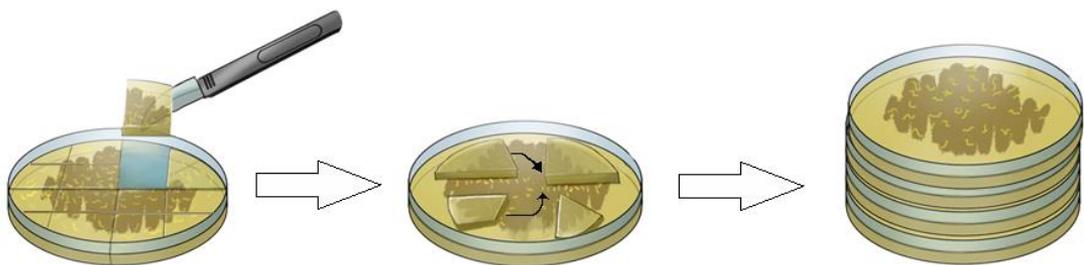


Figura 7. Esquema de la técnica de troceado. En la placa del medio las flechas negras indican el paso de nematodos desde el trozo original hacia la nueva placa

1.1.2 Lisis alcalina para coordinar y descontaminar poblaciones de *Caenorhabditis elegans*

Para lograr el crecimiento sincronizado de *Caenorhabditis elegans* y para eliminar posibles contaminaciones ambientales de los cultivos, se utilizó la técnica de lisis alcalina. El tratamiento de los adultos hermafroditas grávidos con una solución de hipoclorito alcalino (compuesto por 1 ml de Na(ClO) al 10% y 0,5 ml de NaOH 5N) durante 10 min, los desintegraba sin afectar a los huevos. Los huevos se recolectaron mediante centrifugación a 3500 rpm durante 30 segundos, se depositaron sobre placas de agar NGM (o se dejaron en tampón M9) sin proporcionarles ninguna fuente de alimentación y se incubaron 18 h a 15 °C. Durante ese tiempo, los huevos eclosionaron, pero los nematodos permanecieron de forma estacionaria en la fase larvaria L1. Al transferir estos nematodos a nuevas placas de NGM, esta vez con *Escherichia coli* OP50, se inició de manera coordinada su desarrollo hasta convertirse en adultos [Stiernagle 2006].

La incubación se realizó a 15 °C para el mantenimiento de la población de *Caenorhabditis elegans* cepa AU37, mientras que para obtener nematodos sin capacidad reproductiva se incubaron a 25 °C durante 72 h.

1.2 Cepas de *Candida*

Para los ensayos de infección, se utilizaron cepas de referencia de *Candida* procedentes de la colección estadounidense *American Type Culture Collection* (ATCC) (Rockville MD, EEUU) y de la británica *National Collection of Pathogenic Fungi* (NCPF) (Salisbury, Inglaterra), que se cultivaron en agar glucosado de Sabouraud (AGS) (Becton, Dickinson, Madrid, España) (Tabla 2).

Tabla 2. Cepas de referencia de *Candida*, origen y aislamiento clínico

Especie	Referencia	Origen	Aislamiento clínico
<i>Candida albicans</i>	NCPF 3153	Estados Unidos	Desconocido
<i>Candida dubliniensis</i>	NCPF 3949	Irlanda	Oral (infectado por el VIH)
<i>Candida glabrata</i>	ATCC 90030	Estados Unidos	Sangre
<i>Candida krusei</i>	ATCC 6258	Sri Lanka	Espujo
<i>Candida metapsilosis</i>	ATCC 96143	Estados Unidos	Humano
<i>Candida orthopsilosis</i>	ATCC 96139	Estados Unidos	Catéter venoso central
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 22019	Puerto Rico	Esprue Tropical

1.3 Fármacos antifúngicos

Los fármacos antifúngicos fueron preparados siguiendo las recomendaciones del *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) en los documentos M27-A3 y su suplemento M27 S4. Se prepararon soluciones madre de anfotericina B (Sigma-Aldrich Química SA, Madrid, España), posaconazol (Merck Sharp & Dohme SLU Madrid, España), voriconazol (Pfizer SLU, Madrid, España), anidulafungina (Pfizer SLU), caspofungina (Merck, Sharp & Dohme SLU) y micafungina (Astellas Pharma SLU, Madrid, España), a una concentración de 5120 µg/ml. La solución madre de fluconazol (Sigma-Aldrich) fue preparada a una concentración igual a 3200 µg/ml. Tanto fluconazol, como caspofungina y micafungina fueron disueltos en agua, mientras que el resto de los antifúngicos fueron preparados empleando dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) a una concentración final del 1%. Todas las soluciones madre fueron almacenadas a -80 °C hasta el momento de su utilización.

1.4 Tampones y medios de cultivo

Se utilizaron los tampones M9 para la incubación de los huevos de los nematodos, M9K (tampón M9 suplementado con kanamicina), para evitar la contaminación de los nematodos adultos con bacterias) y el tampón KPO₄, que forma parte del medio NGM. En cuanto a los medios de cultivo, se utilizaron los agares infusión cerebro corazón (BHI), NGM, LB y AGS, además del caldo L. Las finalidades y composiciones de los tampones y medios de cultivo se detallan en las tablas 3 y 4.

Tabla 3. Tampones

Tampón	Composición	Suplementos	Utilización
M9	6 g Na ₂ HPO ₄ 3 g KH ₂ PO ₄ 5 g NaCl 1 ml MgSO ₄ 1M H ₂ O hasta 1l		Incubación de huevos.
M9K	1l M9	1 ml kanamicina 45 mg/ml	Lavado e incubación de nematodo adultos.
KPO ₄	35,6 g K ₂ HPO ₄ 108,3 g KH ₂ PO ₄ H ₂ O hasta 1l		Forma parte del medio NGM.

Los tampones fueron autoclavados a 121 °C durante 15 min y el suplemento fue agregado a temperatura ambiente. El tampón KPO₄ fue ajustado a pH 6.

Tabla 4. Medios de cultivo

Medio	Composición		Suplementos		Utilización
NGM	2,4 g	NaCl	800 µl	CaCl ₂ 1M	Cultivo de <i>Caenorhabditis elegans</i> , previa siembra de <i>Escherichia coli</i> OP50
	2,0 g	Peptona	800 µl	MgSO ₄ 1M	
	13,6 g	Agar	800 µl	Colesterol*	
	780 ml	H ₂ O	20 ml	Tampón KPO ₄	
Agar BHI	10 g	Infusión de corazón (desde sólidos)	1,8 ml	Kanamicina 25 mg/ml	Siembra de <i>Candida</i> para la infección de <i>Caenorhabditis elegans</i>
	7,5 g	Infusión de cerebro (desde sólidos)			
	10 g	Gelatina digerida por peptona			
	5 g	NaCl			
	2,5 g	Na ₂ HPO ₄			
	2 g	Glucosa			
	17 g	Agar			
	1 l	H ₂ O			
Agar LB	10 g	Triptona			Recuperación de colonias de <i>Escherichia coli</i> OP50
	5 g	Extracto de levadura			
	5 g	NaCl			
	5 g	Agar			
	1 l	H ₂ O			
AGS	5 g	Digerido pancreático de caseína			Cultivo de <i>Candida</i>
	5 g	Digerido péptico de tejido animal			
	40 g	Glucosa			
	15 g	Agar			
	1 l	H ₂ O			
Caldo L	10 g	Triptona			Cultivo y mantenimiento de <i>Escherichia coli</i>
	5 g	Extracto de levadura			
	5 g	NaCl			
	1 l	H ₂ O			

Todos los medios fueron autoclavados durante 15 min a 121 °C y los suplementos fueron agregados cuando la temperatura del medio era de 65 °C. *Colesterol disuelto en etanol a una concentración de 5 mg/ml. AGS: Se utilizó AGS (Becton, Dickinson and Company, Madrid, España). Agar BHI: Se preparó a partir de caldo BHI Conda (Laboratorios Conda, Madrid, España).

2. Diseño del estudio

El trabajo presente desarrolla un modelo experimental de candidiasis invasora en el nematodo *Caenorhabditis elegans* para la evaluación de la patogenia, virulencia y diferentes aproximaciones terapéuticas contra las especies de *Candida* que se aíslan con más frecuencia en los episodios de candidiasis invasora humana.

3. Sensibilidad in vitro de las cepas de *Candida* a los fármacos antifúngicos

Los estudios de sensibilidad antifúngica in vitro se realizaron según el método estandarizado propuesto por el CLSI en el documento M27-A3 y su suplemento M27-S4. Para las diluciones madre de caspofungina, fluconazol y micafungina se empleó agua como solvente, mientras que anfotericina B, anidulafungina, posaconazol y voriconazol se diluyeron en DMSO, quedando este último a una concentración final del 1%. Las distintas concentraciones de los fármacos antifúngicos se alcanzaron mediante diluciones seriadas en base 2 utilizando medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), tamponado con ácido morfolino propano sulfónico (MOPS) (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 0,165 M a pH 7. El fluconazol se agregó en diluciones sucesivas que fueron desde 0,06 a 64 µg/ml, mientras que el rango de concentraciones de los demás fármacos antifúngicos ensayados fue entre 0,03 y 16 µg/ml.

Para la preparación del inóculo fúngico, se cultivaron las cepas de *Candida* en AGS durante 24 h a 37 °C; posteriormente las células fueron suspendidas en una solución salina estéril hasta obtener una concentración de 0,5 McFarland. Esta suspensión tiene una concentración aproximada de 1×10^6 a 5×10^6 células/ml, la cual es diluida 1:1000 con medio RPMI, quedando a una concentración aproximada de 1×10^3 a 5×10^3 células/ml. Se inocularon 100 µl de esta suspensión en cada pocillo de una microplaca previamente preparada con las distintas concentraciones de fármacos antifúngicos. Las microplacas se incubaron a 37 °C y se registró la concentración mínima inhibitoria (CMI) como la concentración más baja a la que se observa una inhibición del 50% del crecimiento después de 24 y 48 h de incubación. Para la anfotericina B se consideró la inhibición del 100% del crecimiento.

Dado que *Caenorhabditis elegans* no sobrevive a temperaturas mayores de 30 °C, el mismo ensayo descrito en los párrafos anteriores se realizó paralelamente incubando otra microplaca a 25 °C.

4. Estudios de supervivencia de *Caenorhabditis elegans*

Con objeto de estudiar la virulencia de las distintas especies de *Candida* así como la efectividad de la terapia con distintos fármacos antifúngicos, se determinaron las curvas de supervivencia

de *Caenorhabditis elegans* para la infección con cada una de las especies y en las distintas condiciones experimentales planteadas en el modelo: con y sin tratamiento antifúngico asociado, empleando DMSO o agua como solvente, etc. Se empleó el modelo estadístico de Kaplan y Meier por la sencillez de su manejo y el mínimo condicionamiento inicial para su aplicación, ya que es un método no paramétrico. Todas las pruebas fueron hechas por triplicado.

Los objetivos del análisis descrito fueron la estimación de los siguientes parámetros:

- a) Virulencia de las distintas especies de *Candida* en un medio acuoso
- b) Virulencia de las distintas especies de *Candida* en un medio con DMSO 1%
- c) Efectividad de distintos fármacos antifúngicos en monoterapia para el tratamiento de la candidiasis invasora en el modelo in vivo propuesto

Se emplearon las siguientes curvas de supervivencia como control:

- a) Curva de supervivencia obtenida a partir de nematodos que fueron expuestos a las distintas especies de *Candida* estudiadas, previamente muertas por calor, para el estudio los factores de virulencia.
- b) Curva de supervivencia obtenida a partir de nematodos sin infectar a los cuales se les administraron los tratamientos antifúngicos a las mismas concentraciones que las utilizadas posteriormente en el estudio experimental, para el estudio de la toxicidad intrínseca de los fármacos antifúngicos ensayados frente al huésped.
- c) Curva de supervivencia obtenida a partir de nematodos sin infectar en un medio que contenía agua o el solvente DMSO a la concentración final posteriormente empleada en el estudio experimental, para evaluar el efecto del solvente empleado en la solución antifúngica frente al huésped.

En todos los ensayos de supervivencia se utilizaron nematodos sin infectar y sin tratamiento antifúngico como control negativo de referencia para poder establecer las comparaciones oportunas en cada caso.

4.1 Preparación de las cepas

4.1.1 *Caenorhabditis elegans*

La reproducción de los nematodos y la sincronización de su crecimiento se realizaron por los métodos de troceado y lisis alcalina descritos en los apartados 1.1.1 y 1.1.2 de la sección de Material y métodos. En condiciones de esterilidad, se recolectaron los nematodos según lo descrito por Breger et al, con algunas modificaciones [Breger et al. 2007]. Se lavaron las placas de NGM que los contenían en estado larvario L3-L4 y que debido a su incubación durante 70 h a 25 °C, habían perdido su capacidad de reproducción. Se agregaron 3,5 ml de tampón M9 suplementado con kanamicina 45 µg/ml (M9K) y los nematodos fueron recolectados con pipetas

Pasteur de vidrio, para posteriormente ser depositados en tubos de fondo cónico de 15 ml. La solución con nematodos se lavó utilizando el mismo tampón y se centrifugó a 1200 rpm durante 2 min. El sobrenadante fue eliminado y la suspensión concentrada de nematodos resultante se utilizó posteriormente para el desarrollo del modelo de infección.

4.1.2 *Candida*

Las distintas cepas de *Candida* se cultivaron en AGS a 37 °C durante 24 h. Después se preparó un inóculo ajustado a 2,0 McFarland utilizando un nefelómetro (Biomérieux, Marcy L'Etoile, Francia). Para la siembra en césped se utilizaron placas de Petri de 50 mm; se agregaron 25 µl de cada inóculo en distintas placas de agar BHI suplementado con 50 µg/ml de kanamicina y se incubaron durante 48 h a 30 °C. Posteriormente el cultivo de *Candida* fue tratado según el procedimiento descrito por Pukkila-Worley y colaboradores, con algunas modificaciones. Brevemente, con una torunda de algodón y una pipeta Pasteur de vidrio moldeada con la forma de un asa de extensión, se retiró el exceso de cultivo para facilitar tanto el desplazamiento de los nematodos como los lavados posteriores [Pukkila-Worley et al. 2012].

4.2 Estudios de supervivencia de *Caenorhabditis elegans*

4.2.1 Infección de los nematodos

Para la infección de los nematodos se utilizó el procedimiento descrito por Breger et al, con algunas modificaciones [Breger et al. 2007]. Se depositaron aproximadamente 1000 nematodos, con una pipeta Pasteur de vidrio, sobre placas previamente sembradas en césped con *Candida*. Estas placas se incubaron durante 2 h a 25 °C para infectar a *Caenorhabditis elegans* mediante la ingestión de las levaduras. Posteriormente, se recolectaron los nematodos de la forma descrita en el apartado 4.1.1 de material y métodos, dejando decantar durante 4-5 minutos y se eliminó el exceso de *Candida* que se encontraba en el sobrenadante. Los nematodos sedimentados se lavaron dos veces con 12 ml de tampón M9K, se centrifugaron 1 min a 1200 rpm y luego fueron depositados sobre una placa de agar BHI suplementado con 50 µg/ml de kanamicina donde se permitió su desplazamiento para eliminar las levaduras pegadas a su cutícula. A partir de esta placa se recolectaron los nematodos utilizando un asa de platino de punta plana y se depositaron 20 de ellos en cada pocillo de una placa de microtitulación para estudiar su supervivencia.

4.2.2 Estudio de la infección por *Candida* en un medio acuoso

Se dispensó un volumen final de 1300 µl/pocillo de una solución compuesta por tampón M9K, suplementado con 5 µg/ml de colesterol disuelto en etanol en microplacas de poliestireno de fondo plano de 24 pocillos (Tissue Culture Plate, Sarstedt Inc., EEUU). Posteriormente se depositaron en cada pocillo, aproximadamente 20 nematodos que previamente habían sido infectados con una de las distintas especies de *Candida*.

Se realizó una lectura inicial para determinar el número de nematodos en cada pocillo y se incubaron las microplacas a 25 °C. Se realizaron lecturas sucesivas cada 24 h durante 120 h para determinar la cantidad de nematodos vivos y muertos.

4.2.3 Estudio de la infección por *Candida* en DMSO

El procedimiento seguido fue igual al descrito en el apartado anterior 4.2.2, con la salvedad de que el volumen final por pocillo contenía DMSO al 1%. El DMSO se añadía después de haber depositado los nematodos (Figura 8).

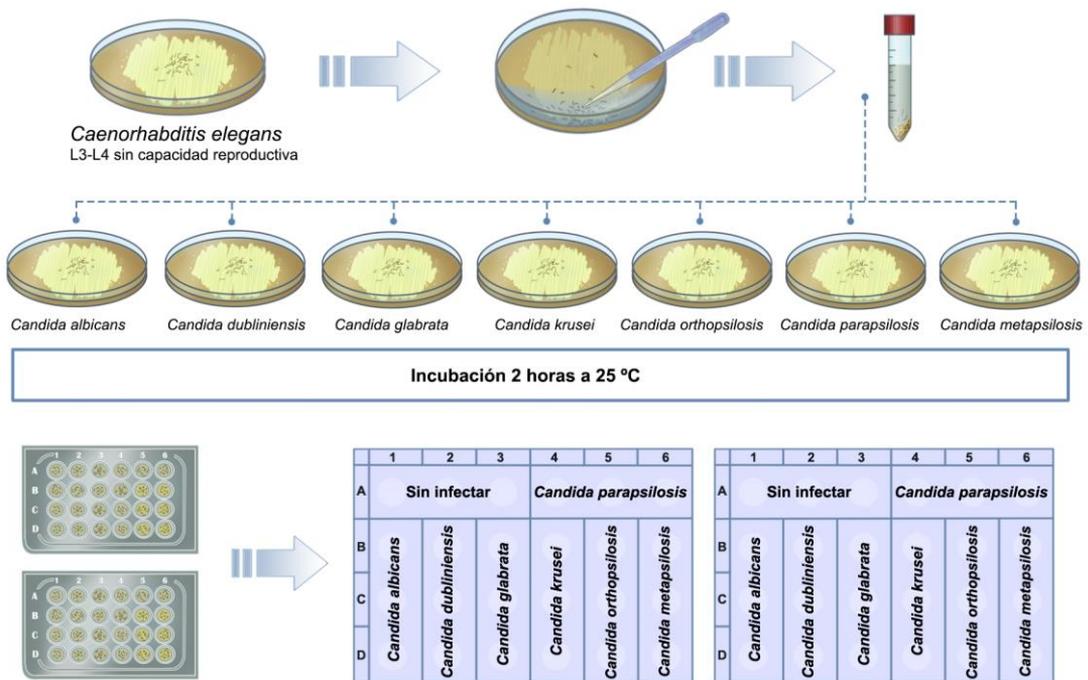


Figura 8. Esquema del protocolo para infección por *Candida*. La diferencia entre la capacidad de producir infección en medio acuoso y en un medio con DMSO se produce en el llenado de las microplacas; en presencia de DMSO, ya que se agrega este compuesto al 1%.

4.3 Tratamiento antifúngico de la candidiasis en *Caenorhabditis elegans*

Para estudiar la actividad de los fármacos antifúngicos en el desarrollo de la candidiasis invasiva experimental, esta se llevó a cabo como está descrito en el apartado 4.2.1. La única diferencia en la metodología radicó en que después de la distribución de los nematodos en los pocillos, se

agregaron los fármacos antifúngicos en los volúmenes y concentraciones que se detallan en la tabla 5. La distribución de los fármacos antifúngicos en las placas de microtitulación se ilustra en la figura 9.

Tabla 5. Concentraciones de los fármacos antifúngicos y solventes utilizados

Fármaco antifúngico	Concentración (µg/ml)	Solvente
Anfotericina B	1	DMSO
	2	
Fluconazol	32	agua
	64	
	128	
Voriconazol	1	DMSO
	2	
Posaconazol	1	DMSO
	2	
Anidulafungina	8	DMSO
Caspofungina	4	agua
	8	
Micafungina	4	agua
	8	

Como control de la infección se estudió el efecto de las células de *Candida* inactivadas por calor en la supervivencia de los nematodos. Se sembraron en césped las distintas especies de *Candida* y fueron inactivadas exponiéndolas durante 90 min a 65 °C; la muerte de las levaduras fue corroborada por ausencia de crecimiento tras la resiembra en AGS. Las placas con *Candida* inactivada se dejaron enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente, para posteriormente ponerlas en contacto con los nematodos. El procedimiento posterior es igual al descrito en el punto 4.2.2 de la sección material y métodos.

Los nematodos sin infectar fueron puestos en contacto con los diferentes fármacos antifúngicos, para estudiar el efecto tóxico de éstos sobre el modelo animal.

	1	2	3	4	5	6
A	SI	SI	ST	Anidulafungina 8 µg/ml		
B	Voriconazol 1 µg/ml	Voriconazol 2 µg/ml	Posaconazol 1 µg/ml	Posaconazol 2 µg/ml	Anfotericina B 1 µg/ml	Anfotericina B 2 µg/ml
C						
D						

Placa 1 (fármacos antifúngicos disueltos en DMSO)

	1	2	3	4	5	6
A	SI	ST	ST	Micafungina 4 µg/ml		
B	Fluconazol 32 µg/ml	Fluconazol 64 µg/ml	Fluconazol 128 µg/ml	Micafungina 8 µg/ml	Caspofungina 8 µg/ml	Caspofungina 4 µg/ml
C						
D						

Placa 2 (fármacos antifúngicos disueltos en agua)

Figura 9. Disposición de los fármacos antifúngicos en las microplacas. SI: nematodos sin infectar. ST: nematodos infectados, pero que no recibieron tratamiento.

4.4 Estudio estadístico de las variables y modelos empleados

Se procedió a un estudio descriptivo de las diferentes variables. Para las variables cuantitativas se emplearon medidas de tendencia central (media, moda y mediana) y medidas de dispersión (varianza y/o desviación estándar). Las variables cualitativas se han resumido mediante porcentajes. La comparación 2 a 2 de las medias de variables cuantitativas se realizó mediante la prueba de la t de student para muestras independientes con un estudio previo de las condiciones de normalidad de las variables estudiadas. La comparación de múltiples medias se realizó con un modelo de ANOVA de uno o dos factores según fue preciso. Los porcentajes estimados en las variables cualitativas se compararon mediante la prueba de chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher, si se produjeron situaciones en las que fue necesaria su aplicación.

Se empleó el modelo no paramétrico de Kaplan y Meier para la obtención y estudio de las distintas curvas de supervivencia. La comparación de las distintas curvas de supervivencia obtenidas en las distintas condiciones experimentales ensayadas se realizó calculando el estadístico de Wilcoxon mediante la prueba de contraste de hipótesis de rango logaritmo (test de log-rank). Por defecto para todos los contrastes de hipótesis empleados a lo largo de este trabajo se escogió un valor de significación estadística (α) igual a 0,05 (5%).

En el apartado de Resultados se emplean los términos “virulencia” y “tasa de letalidad” [Jenicek 1996], en referencia a la capacidad de una cepa de *Candida* de causar una mortalidad efectiva en la población de *Caenorhabditis elegans* que desarrolla una candidiasis invasiva experimental. No obstante, conviene remarcar que ambos conceptos pueden o no guardar relación con los factores de patogenicidad que cada microorganismo emplee en la infección. El concepto de

«supervivencia» expresa la cantidad de nematodos, en términos numéricos absolutos o en porcentaje relativo, que permanecen vivos en un intervalo de tiempo determinado respecto a la población inicial de los mismos.

4.5 Implicaciones éticas

En el Real Decreto 53/2013, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia [BOE núm. 34 2013], no aparece *Caenorhabditis elegans* entre las especies con limitaciones, por lo cual *Caenorhabditis elegans* no está amparado por las leyes de ética y bienestar animal.

RESULTADOS

1. Efecto del solvente en la supervivencia de *Caenorhabditis elegans*

Con objeto de estudiar el efecto del solvente empleado en los modelos de tratamiento de la candidiasis experimental, un grupo de nematodos fueron incubados en un medio que contenía únicamente *Escherichia coli* OP50 y el solvente (agua o DMSO) sin ser infectados con *Candida*.

En el medio libre de DMSO no se observó descenso alguno en la población inicial de nematodos (supervivencia del 100%) tras un periodo de incubación de 72 h. A partir de las 96 h se produjo un leve descenso de la supervivencia (98%), que permaneció invariable hasta la finalización del experimento a las 120 h.

Cuando los nematodos fueron mantenidos en el medio que contenía DMSO al 1%, la primera disminución del porcentaje de nematodos vivos se produjo a las 48 h con una proporción de supervivencia del 99%. En cada uno de los siguientes recuentos se observó una disminución paulatina de dicho porcentaje de supervivencia, hasta llegar a un 93% de nematodos vivos al final del estudio. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas para cada tramo de lectura (Tabla 6 y Figura 10). Además, la comparación de las curvas de supervivencia para ambos solventes obtenidas mediante el método de Kaplan y Meier arrojó un estadístico de contraste en la prueba de rango logaritmo (log-rank) que tampoco resultó ser significativo ($p = 0,141$). Por tanto, con independencia del solvente empleado en el medio de cultivo, la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* fue similar cuando los nematodos no fueron infectados.

Tabla 6. Supervivencia de los nematodos sin infectar.

Incubación	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
En agua	120 (100)	120 (100)	120 (100)	120 (100)	118 (98)	118 (98)
En DMSO 1%	149 (100)	149 (100)	147 (99)	146 (98)	141 (95)	139 (93)
Valor p (χ^2)	-	-	0,367	0,268	0,233	0,140

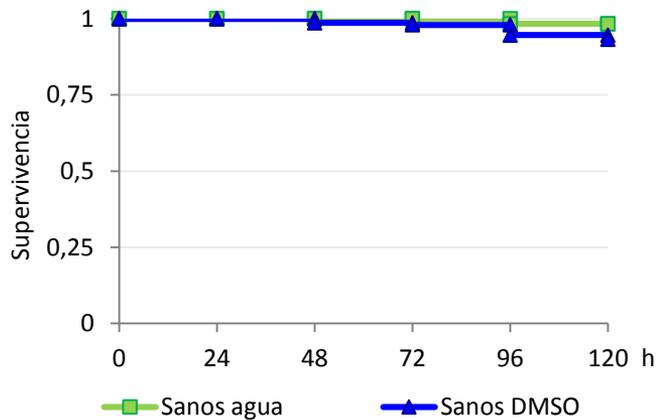


Figura 10. Curvas de supervivencia de nematodos no infectados, incubados en un medio acuoso o en uno con DMSO al 1%.

2. Virulencia de las distintas especies de *Candida* y estimación del efecto del medio de incubación

Para evaluar la historia natural de la infección causada por las distintas especies de *Candida* en *Caenorhabditis elegans*, se analizaron las curvas de supervivencia de los nematodos infectados con cada una de las especies estudiadas en un medio con distintos solventes, a fin de comprobar si existen fenómenos de interacción entre la virulencia de cada especie y la presencia o no de un solvente en el medio de cultivo. Con esta finalidad, un grupo de nematodos se incubó en un medio líquido que contenía DMSO al 1% y otro grupo se incubó en un medio libre de este solvente y se compararon las curvas de supervivencia obtenidas en ambos grupos.

2.1 Infección por *Candida albicans*

Cuando *Caenorhabditis elegans* fue infectado con *Candida albicans* NCPF 3153, se observó una disminución del porcentaje de supervivencia en ambos medios a partir de las 24 h. Este descenso fue mayor en la población de nematodos incubada en un medio acuoso. Sin embargo, a partir de las 72 h se equipararon los porcentajes de supervivencia, para posteriormente ser significativamente menores en el medio que contenía DMSO al 1%. La proporción de nematodos supervivientes a las 120 h fue del 3% cuando se expusieron a DMSO y del 9% en los incubados en medio acuoso (Tabla 7). En ambos casos se observaron diferencias estadísticamente significativas respecto a las curvas de supervivencia de los nematodos que no fueron infectados;

ambas curvas de supervivencia se compararon con las curvas observadas en nematodos incubados en un medio similar respecto a la presencia o no de DMSO. La mediana de supervivencia de los nematodos en el medio acuoso se estimó en 48 h, mientras que en los nematodos incubados en presencia de DMSO fue superior a las 72 h. El contraste estadístico de Wilcoxon calculado mediante la prueba de log-rank indicó que las diferencias entre las curvas de supervivencia de los nematodos incubados en un medio acuoso, no fueron significativas respecto a aquellos incubados en un medio con DMSO ($p = 0,652$). Sin embargo, cuando se analizaron individualmente las lecturas realizadas en cada tramo horario por separado, las diferencias en la proporción de nematodos vivos entre ambos grupos fueron estadísticamente significativas a las 24, 96 y 120 h (Tabla 7). Es de destacar que a las 24 h estas diferencias significativas en la supervivencia fueron mayores en los nematodos incubados en DMSO, mientras que en las otras dos lecturas mencionadas, la supervivencia fue significativamente mayor en los nematodos incubados con agua (Figura 11).

Tabla 7. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida albicans*.

Incubación	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
En agua	178 (100)	131 (74)	87 (49)	66 (34)	42 (24)	16 (9)
En DMSO 1%	120 (100)	103 (86)	67 (56)	40 (33)	14 (12)	3 (3)
Valor p (χ^2)	-	0,012	0,239	0,508	0,010	0,025

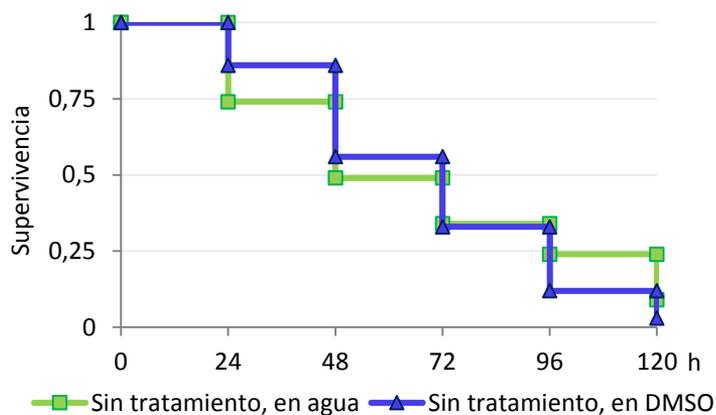


Figura 11. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados por *Candida albicans*, incubados en un medio acuoso o en un medio con DMSO al 1%.

2.2 Infección por *Candida dubliniensis*

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* durante las primeras 24 h de infección con la cepa *Candida dubliniensis* NCPF 3949, ya que el 98 y 99% de los nematodos sobrevivió, en presencia y ausencia de DMSO al 1%, respectivamente. Sin embargo, a partir de las 48 h la disminución en la supervivencia fue más acentuada en presencia de DMSO, mientras que en el medio acuoso los porcentajes de supervivencia disminuyeron más lentamente y con diferencias muy significativas (Figura 12 y Tabla 8). La mediana estimada de supervivencia en los nematodos incubados en un medio con DMSO fue de 72 h, mientras que en un medio libre del mismo, fue superior a las 120 h. De hecho, la prueba log-rank, indicó que las diferencias entre ambas curvas de supervivencia eran estadísticamente muy significativas ($p = 1,03 \times 10^{-18}$). Este resultado es coherente con el obtenido al analizar las proporciones de nematodos supervivientes en cada tramo de lectura a partir de las 48 h del inicio del experimento (Tabla 8).

Tabla 8. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida dubliniensis*.

Incubación	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
En agua	163 (100)	162 (99)	156 (96)	141 (87)	114 (70)	96 (59)
En DMSO 1%	197 (100)	193 (98)	155 (79)	96 (49)	59 (30)	35 (18)
Valor p (χ^2)	-	0,253	$2,7 \times 10^{-6}$	$5,4 \times 10^{-14}$	$4,1 \times 10^{-14}$	$6,8 \times 10^{-16}$

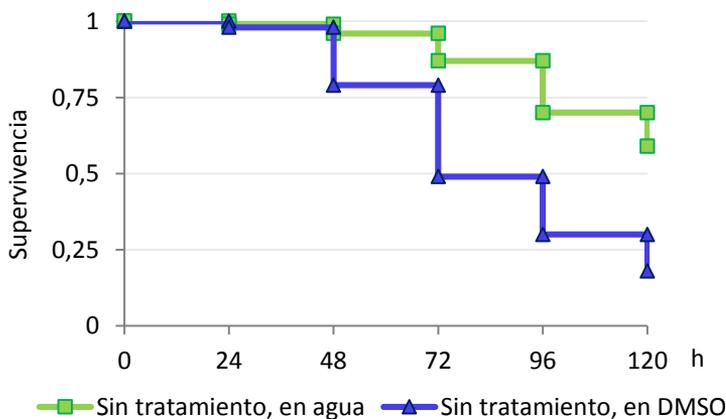


Figura 12. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados por *Candida dubliniensis*, incubados en un medio acuoso o en un medio con DMSO al 1%.

2.3 Infección por *Candida glabrata*

Cuando los nematodos fueron infectados con la cepa *Candida glabrata* ATCC 90030, se observó una situación similar a la producida por la infección de *Caenorhabditis elegans* con la cepa de *Candida dubliniensis*. No obstante, en este caso, a las 48 h se observaba una diferencia estadísticamente significativa en la proporción de nematodos vivos entre ambos tipos de solvente ($p = 0,006$). Sin embargo, conviene puntualizar que mientras que en el medio sin DMSO se mantuvo vivo el 99% de la población inicial de nematodos, en presencia del mismo la proporción disminuía al 92%. A partir de las 72 h, estas diferencias eran más notorias (Figura 13 Tabla 9). La mediana estimada de supervivencia en el medio que contiene DMSO al 1% era de 96 h aproximadamente, mientras que en el medio acuoso alcanzaba las 120 h. Las diferencias entre ambas curvas de supervivencia fueron significativas ($p = 0,00005$).

Tabla 9. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida glabrata*.

Incubación	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
En agua	119 (100)	119 (100)	118 (99)	99 (83)	82 (69)	50 (42)
En DMSO 1%	189 (100)	189 (100)	174 (92)	125 (66)	70 (37)	50 (26)
Valor p (χ^2)	-	-	0,006	0,001	$5,1 \times 10^{-8}$	0,005

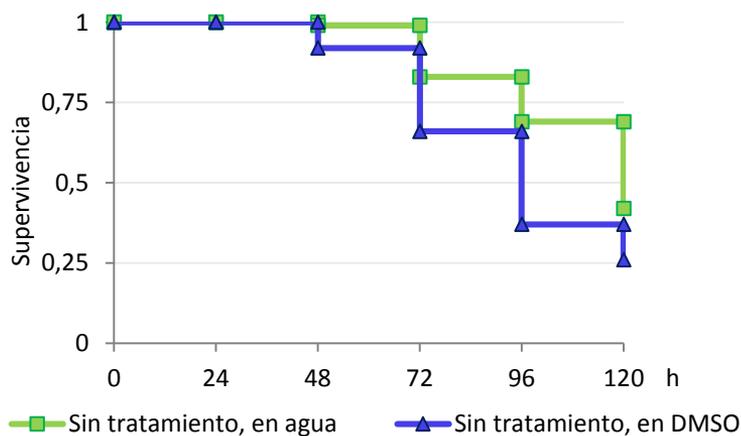


Figura 13. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida glabrata*, incubados en un medio acuoso o en un medio con DMSO al 1%.

2.4 Infección por *Candida krusei*

Cuando *Caenorhabditis elegans* fue infectado con la cepa *Candida krusei* ATCC 6258 no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos medios durante toda la duración del experimento (120 h) (Figura 14 y Tabla 10). Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar las curvas de supervivencia de los nematodos incubados en un medio con DMSO o incubados en un medio acuoso ($p = 0,145$). En ambos medios de incubación la mediana de supervivencia estimada fue de 72 h.

Tabla 10. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida krusei*.

Incubación	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
En agua	187 (100)	182 (97)	137 (73)	78 (42)	50 (27)	16 (9)
En DMSO 1%	120 (100)	118 (98)	82 (68)	56 (47)	40 (33)	19 (16)
Valor p (χ^2)	-	0,564	0,351	0,393	0,216	$5,03 \times 10^{-2}$

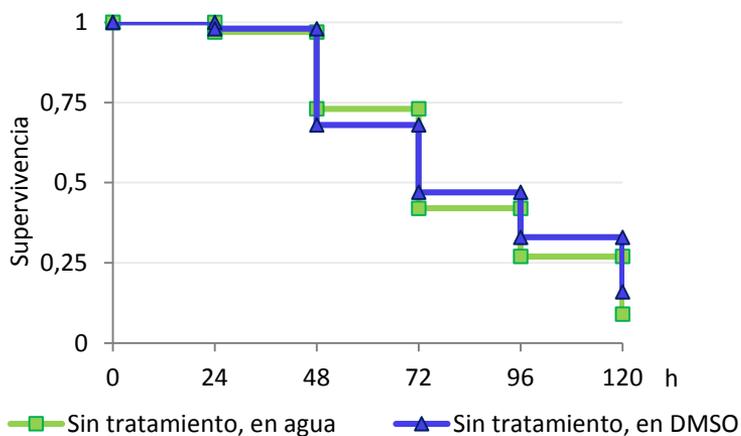


Figura 14. Curvas de supervivencia de nematodos infectados con *Candida krusei*, incubados en un medio acuoso o con DMSO al 1%.

2.5 Infección por *Candida metapsilosis*

Tras la infección de *Caenorhabditis elegans* con la cepa *Candida metapsilosis* ATCC 96143, se observó que no había descenso alguno de la supervivencia a las 24 h del inicio del experimento, mientras que a las 48 h de incubación la supervivencia disminuyó al 68 y 88% en el medio con y sin DMSO respectivamente, observándose diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p = 0,001$). Sin embargo, a partir de las 96 h los porcentajes tendieron a igualarse (30 y 38% respectivamente) y las diferencias dejaron de ser significativas ($p = 0,156$), quedando ambas en 11% a las 120 h (Tabla 11). La mediana de supervivencia estimada de los nematodos incubados en DMSO fue de 72 h, mientras que en el medio acuoso alcanzó las 96 h. No obstante, la comparación de las curvas de supervivencia entre ambos medios (Figura 15) no mostró diferencias significativas ($p = 0,092$).

Tabla 11. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida metapsilosis*.

Incubación	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
En agua	104 (100)	104 (100)	91 (88)	61 (59)	40 (38)	11 (11)
En DMSO 1%	122 (100)	122 (100)	83 (68)	54 (44)	36 (30)	14 (11)
Valor p (χ^2)	-	-	0,001	0,031	0,156	0,831

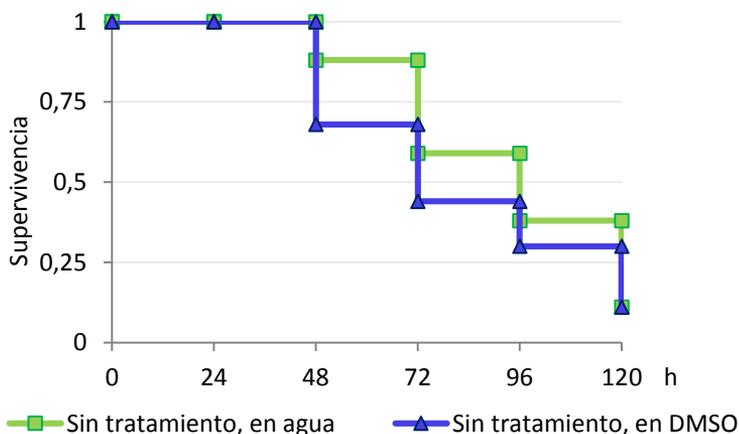


Figura 15. Curvas de supervivencia de nematodos infectados con *Candida metapsilosis*, incubados en un medio acuoso o con DMSO al 1%.

2.6 Infección por *Candida orthopsilosis*

Las curvas de supervivencia obtenidas en ambos medios tras la infección de *Caenorhabditis elegans* con la cepa *Candida orthopsilosis* ATCC 96139 (Figura 16) fueron en cierto modo análogas a las obtenidas para la infección producida por la cepa de *Candida metapsilosis*, si bien se observaron algunas pequeñas diferencias. El porcentaje de *Caenorhabditis elegans* vivos a las 24 h fue del 100%. A las 48 h el porcentaje disminuyó al 89% en el medio acuoso y al 74% en presencia de DMSO (cifras similares a las obtenidas con el modelo de *Candida metapsilosis*). De ahí en adelante, el porcentaje de nematodos vivos fue siempre menor en el medio que contenía DMSO hasta el final del experimento siendo la supervivencia a punto final del 21% en el medio acuoso y del 10% en presencia de DMSO (Tabla 12). La mediana estimada de supervivencia fue de 96 h en ambos casos. Asimismo, se observaron diferencias significativas ($p = 0,003$) entre las curvas de supervivencia obtenidas en ambos medios.

Tabla 12. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida orthopsilosis*.

Incubación	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
En agua	236 (100)	236 (100)	211 (89)	134 (57)	91 (39)	50 (21)
En DMSO 1%	124 (100)	124 (100)	92 (74)	64 (52)	34 (27)	13 (10)
Valor p (χ^2)	-	-	$1,72 \times 10^{-4}$	0,345	0,035	0,011

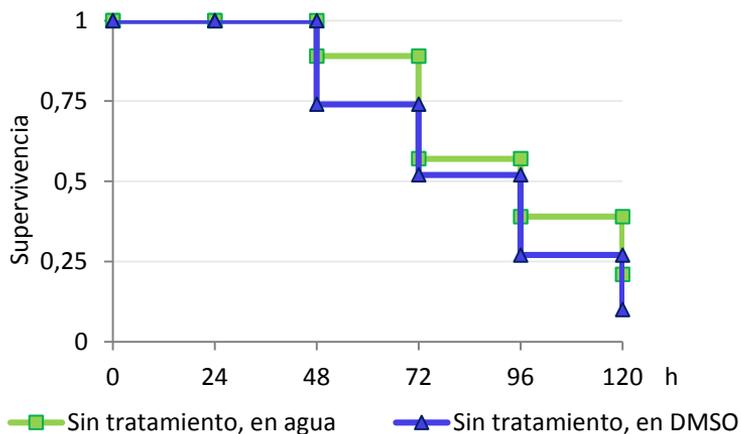


Figura 16. Curvas de supervivencia de nematodos infectados con *Candida orthopsilosis*, incubados en un medio acuoso o en DMSO al 1%.

2.7 Infección con *Candida parapsilosis sensu stricto*

En la infección de *Caenorhabditis elegans* con la cepa *Candida parapsilosis* ATCC 22019 se obtuvo una dinámica de las curvas de supervivencia similar a las obtenidas en la infección por *Candida orthopsilosis*, con un descenso en las proporciones de nematodos vivos en ambos medios a partir de las 48 h de incubación, con un 90% en el medio acuoso y un 65% en presencia de DMSO, si bien este descenso siempre fue mayor en este grupo hasta el final del experimento (120 h) (Tabla 13 y Figura 17). La mediana estimada de supervivencia de *Caenorhabditis elegans* fue de 72 h en presencia de DMSO y de 120 h en el medio acuoso. La prueba de contraste de log-rank indicó que existen diferencias significativas entre ambas curvas de supervivencia ($p = 2,3 \times 10^{-11}$).

Tabla 13. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida parapsilosis*.

Incubación	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
En agua	189 (100)	189 (100)	171 (90)	144 (76)	118 (62)	77 (41)
En DMSO 1%	124 (100)	124 (100)	81 (65)	60 (48)	36 (29)	16 (13)
Valor p (χ^2)	-	-	$3,9 \times 10^{-8}$	$4,4 \times 10^{-7}$	$7,4 \times 10^{-9}$	$1,4 \times 10^{-7}$

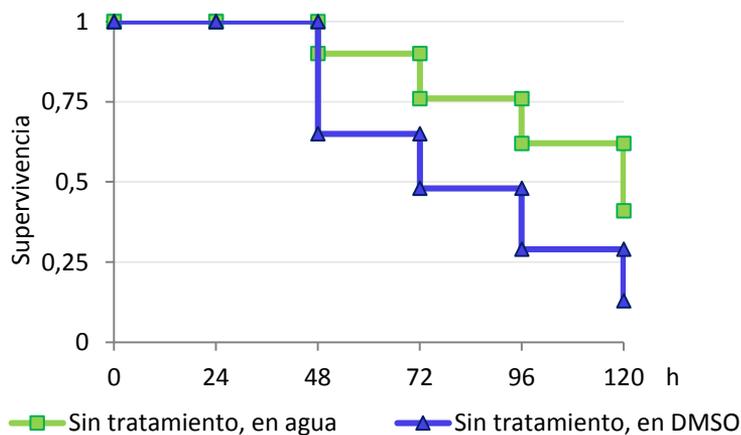


Figura 17. Curvas de supervivencia de nematodos infectados con *Candida parapsilosis*, incubados en un medio acuoso o con DMSO al 1%.

3. Comparación de la virulencia de las especies de *Candida*

El grado de infección causado por las distintas especies de *Candida* mostró variaciones de acuerdo a la presencia o no de DMSO en el medio de incubación. En ausencia del solvente, hubo diferencias significativas en la virulencia de las distintas especies (Tabla 15). *Candida albicans* fue la especie más virulenta ($p < 0,05$). Aunque *Candida krusei* mostró también un 9% de supervivientes a las 120 h (Tabla 14), la diferencia de supervivencia de los nematodos infectados con una especie fue significativamente distinta de la otra ($p = 0,021$) (Figura 18).

Las candidiasis que no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia del nematodo, fueron las causadas por *Candida parapsilosis*, respecto a la infección causada por *Candida glabrata* ($p = 0,429$) (Figura 19) y la infección causada por *Candida orthopsilosis*, en relación a aquella causada por *Candida metapsilosis* ($p = 0,209$), que mostraron curvas de supervivencia similares (Figura 20). En el medio de incubación acuoso, *Candida dubliniensis* resultó ser la especie menos virulenta para el nematodo.

Tabla 14. Supervivencia de los nematodos infectados con las distintas especies de *Candida* en ausencia de DMSO.

Especies	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
<i>Candida albicans</i>	178 (100)	131 (74)	87 (49)	66 (34)	42 (24)	16 (9)
<i>Candida dubliniensis</i>	163 (100)	162 (99)	156 (96)	141 (87)	114 (70)	96 (59)
<i>Candida glabrata</i>	119 (100)	119 (100)	118 (99)	99 (83)	82 (69)	50 (42)
<i>Candida krusei</i>	187 (100)	182 (97)	137 (73)	78 (42)	50 (27)	16 (9)
<i>Candida metapsilosis</i>	104 (100)	104 (100)	91 (88)	61 (59)	40 (38)	11 (11)
<i>Candida orthopsilosis</i>	236 (100)	236 (100)	211 (89)	134 (57)	91 (39)	50 (21)
<i>Candida parapsilosis</i>	189 (100)	189 (100)	171 (90)	144 (76)	118 (62)	77 (41)

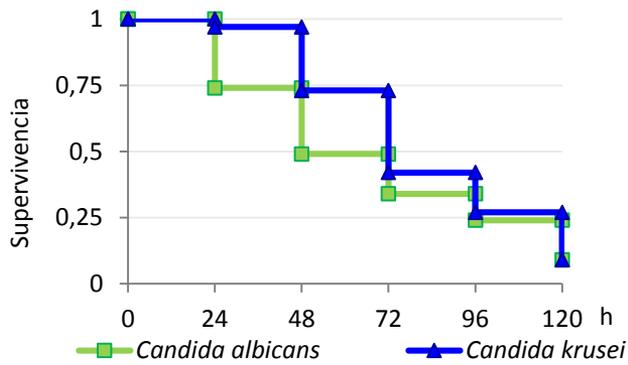


Figura 18. Curvas de supervivencia de nematodos infectados con *Candida albicans* con respecto a los infectados con *Candida krusei*, en un medio libre de DMSO.

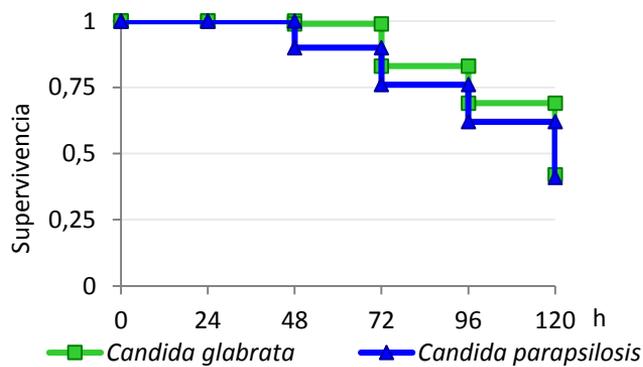


Figura 19. Curvas de supervivencia de nematodos infectados con *Candida glabrata* con respecto a los infectados con *Candida parapsilosis*, en un medio libre de DMSO.

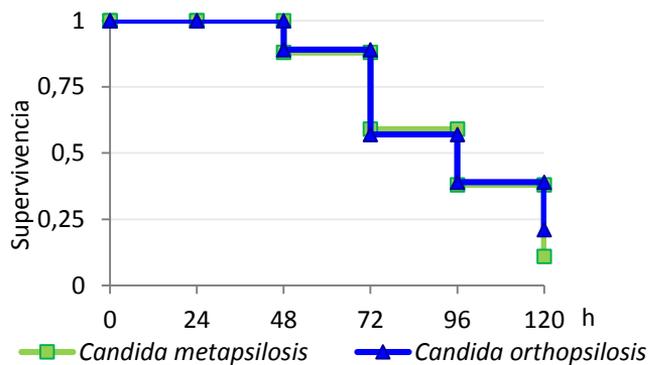


Figura 20. Curvas de supervivencia de nematodos infectados con *Candida metapsilosis* con respecto a los infectados con *Candida orthopsilosis*, en un medio libre de DMSO.

Tabla 15. Valores de p resultantes de la comparación de la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* infectados con las distintas especies de *Candida*. En sombreado se indican los valores obtenidos en presencia de DMSO 1% y en blanco aquellos valores obtenidos en ausencia de dicho solvente, destacando en negrita cuando no hubo diferencias estadísticamente significativas.

Especie	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. metapsilosis</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
<i>C. albicans</i>	-	0,000	0,000	0,021	0,000	0,000	0,000
<i>C. dubliniensis</i>	0,000	-	0,022	0,000	0,000	0,000	0,001
<i>C. glabrata</i>	0,000	0,002	-	0,000	0,000	0,000	0,429
<i>C. krusei</i>	0,000	0,582	0,001	-	0,015	0,000	0,000
<i>C. metapsilosis</i>	0,000	0,174	0,000	0,473	-	0,209	0,000
<i>C. orthopsilosis</i>	0,000	0,322	0,000	0,635	0,773	-	0,000
<i>C. parapsilosis</i>	0,000	0,267	0,000	0,600	0,845	0,953	-

Cuando se utilizó DMSO al 1% en el medio de incubación, las diferencias de la virulencia entre las distintas especies la mayoría de las veces fue no significativa. Sin embargo, cuando este solvente no se encontraba presente en el medio, aunque se observó sistemáticamente una menor mortalidad de nematodos, hubo mayores diferencias de la virulencia de las distintas especies entre sí (Tabla 16). En ambos casos, *Candida albicans* fue la especie más virulenta. En el medio con DMSO al 1%, la infección con *Candida glabrata* resultó ser significativamente la menos virulenta.

Tabla 16. Supervivencia de los nematodos infectados con las distintas especies de *Candida* en un medio con DMSO 1%.

Especies	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
<i>Candida albicans</i>	120 (100)	103 (86)	67 (56)	40 (33)	14 (12)	3 (3)
<i>Candida dubliniensis</i>	197 (100)	193 (98)	155 (79)	96 (49)	59 (30)	35 (18)
<i>Candida glabrata</i>	189 (100)	189 (100)	174 (92)	125 (66)	70 (37)	50 (26)
<i>Candida krusei</i>	120 (100)	118 (98)	82 (68)	56 (47)	40 (33)	19 (16)
<i>Candida metapsilosis</i>	122 (100)	122 (100)	83 (68)	54 (44)	36 (30)	14 (11)
<i>Candida orthopsilosis</i>	124 (100)	124 (100)	92 (74)	64 (52)	34 (27)	13 (10)
<i>Candida parapsilosis</i>	124 (100)	124 (100)	81 (65)	60 (48)	36 (29)	16(13)

En resumen, considerando los datos obtenidos en presencia o no de DMSO en el solvente, se puede ordenar las distintas especies de *Candida* de acuerdo con su virulencia, utilizando el signo > para representar «significativamente más virulento que» y el signo ≈ para “sin diferencias significativas en la virulencia”:

En el medio libre de DMSO: *Candida albicans* > *Candida krusei* > *Candida metapsilosis* ≈ *Candida orthopsilosis* > *Candida parapsilosis* ≈ *Candida glabrata* > *Candida dubliniensis*.

En el medio con DMSO: *Candida albicans* > *Candida metapsilosis* ≈ *Candida krusei* ≈ *Candida orthopsilosis* ≈ *Candida parapsilosis* ≈ *Candida dubliniensis* > *Candida glabrata*.

4. Observación de microscopía de la infección por *Candida*

La observación microscópica de los nematodos infectados mostró que la infección comenzó con la invasión de la faringe y la zona proximal del intestino, pese a que en la mayoría de casos los nematodos continuaban con vida. Parte de las levaduras siguieron desplazándose por todo el lumen intestinal (Figura 21) para posteriormente colonizar todo el cuerpo de *Caenorhabditis elegans*. Pese a que inmediatamente después de las dos horas de infección, los nematodos fueron transferidos a un medio líquido y libre del patógeno, éstos fueron incapaces de eliminar las células de *Candida*.

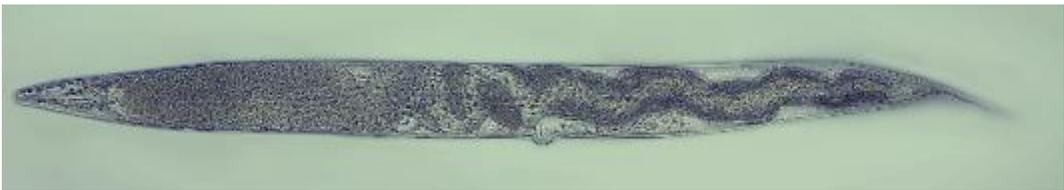


Figura 21. *Caenorhabditis elegans* AU37 a las 48 h de incubación en medio líquido, tras la infección con *Candida albicans* NCPF 3153. La imagen es un montaje a partir de 7 fotos tomadas con aumento de 40x con microscopía de contraste de fases.

Aparentemente, uno de los factores de virulencia fundamentales para destruir los órganos del nematodo fue la formación de hifas y pseudohifas. Se observó que estas crecieron hasta salir del nematodo, para posteriormente llegar a invadir la totalidad del cuerpo y destruir la cutícula (Figura 22). Tras la muerte del nematodo, la filamentación avanzó rápidamente formando un micelio a su alrededor, sin o con escaso desprendimiento de estructuras fúngicas (*Caenorhabditis elegans* “fantasma”) (Figura 24 G).

Salvo *Candida krusei*, las especies distintas de *Candida albicans* no mostraron daños por filamentación, pero sí por colonización, con desprendimiento de estructuras fúngicas y destrucción de la cutícula del nematodo (Figura 23).



Figura 22. *Caenorhabditis elegans* AU37 infectados con *Candida albicans* NCPF 3153 (microscopía de contraste de fases, 40x) A: Nematodo completamente invadido, con salida de pseudohifas por vulva y ano (montaje de 6 fotos). B: Detalle de salida de pseudohifas por la boca. C: Nematodo completamente invadido, con destrucción de cutícula.

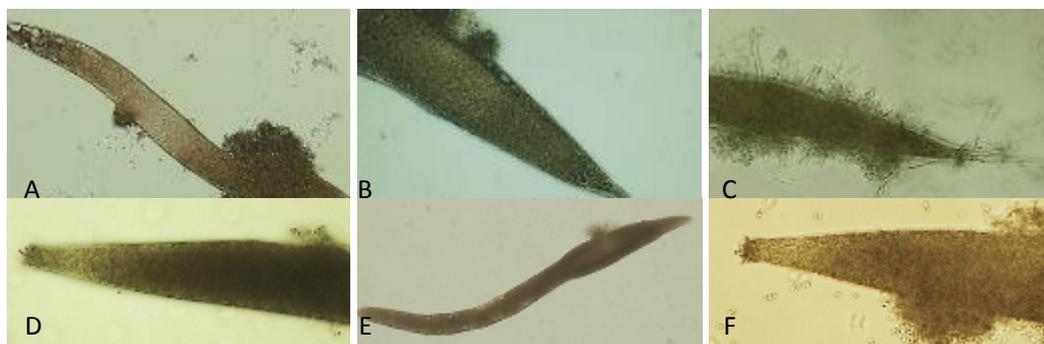


Figura 23. *Caenorhabditis elegans* AU37 incubados durante 7 días tras la infección con distintas especies de *Candida* (microscopía de contraste de fases, imágenes A y E en 20x y B, C, D y F en 40x). A: *Candida dubliniensis*. B: *Candida glabrata*. C: *Candida krusei*. D: *Candida orthopsilosis*. E: *Candida metapsilosis*. F: *Candida parapsilosis*.

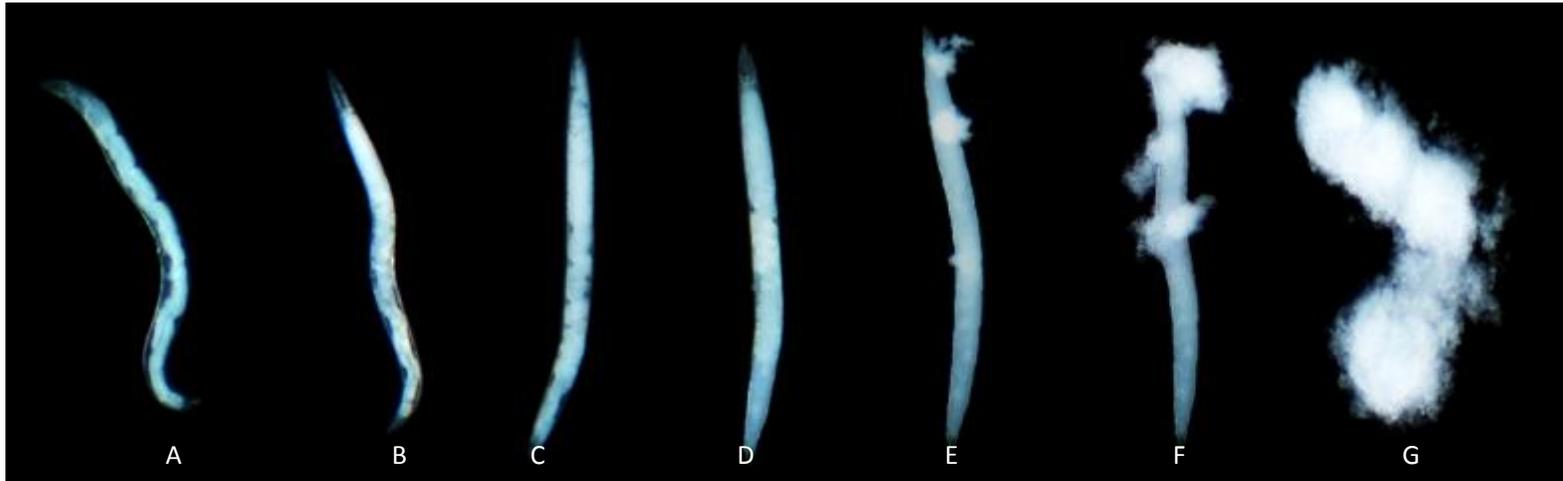


Figura 24. Evolución de la infección de *Caenorhabditis elegans* AU37 con *Candida albicans* NCPF 3153 (microscopía estereoscópica, 5x). A: Nematodo que acaba de ser infectado. B: Nematodo infectado en las primeras 24 h. C: Progresión de la infección, se observa un nematodo vivo con la zona proximal y el intestino colonizados (48-72 h). D: Nematodo muerto completamente colonizado por *Candida* (48-96 h). E: Aparición de pseudohifas adheridas a la cutícula (96-120 h). F: Crecimiento de las pseudohifas (≥ 120 h). G: Hifas o micelio de *Candida albicans* alrededor de los restos del nematodo (*Caenorhabditis elegans* fantasma) (> 120 h).

5. Efecto de *Candida* inactivada sobre la supervivencia de *Caenorhabditis elegans*

Cuando *Caenorhabditis elegans* fue expuesto a las distintas especies de *Candida* inactivadas por calor, la supervivencia de los nematodos no se vio alterada, observándose los mismos porcentajes que en el grupo de los nematodos control.

Tabla 17. Porcentaje de supervivencia a las 120 h de *Caenorhabditis elegans* infectados con *Candida* versus los expuestos a *Candida* inactivadas por calor

Agente	Nematodos vivos (%)			
	En medio acuoso		En medio con DMSO	
	Células inactivadas	Células vivas	Células inactivadas	Células vivas
<i>Candida albicans</i>	98	9	100	3
<i>Candida dubliniensis</i>	99	59	98	18
<i>Candida glabrata</i>	98	42	97	26
<i>Candida krusei</i>	98	9	98	16
<i>Candida metapsilosis</i>	98	11	98	11
<i>Candida orthopsilosis</i>	98	21	95	10
<i>Candida parapsilosis</i>	100	41	91	13
<i>Escherichia coli</i> OP50	99	98	98	93

6. Sensibilidad in vitro de *Candida* a los fármacos antifúngicos

La tabla 18 muestra los resultados del estudio de sensibilidad in vitro a los fármacos antifúngicos de las cepas de *Candida* utilizadas, a ambas temperaturas de incubación (25 y 37 °C). Se observa que en el 59% de los ensayos las CMI a 25 °C son iguales que a 37 °C, mientras que en el 41% restante hay diferencias a las distintas temperaturas. Sin embargo, se observa que las candidas muestran mayores CMI a 25 °C en más de un tercio de los ensayos (principalmente la anidulafungina, seguida de la micafungina), mientras que la tendencia de los azoles es mostrar CMI mayores a 37 °C, aunque en menor proporción. Anfotericina B muestra mayores CMI únicamente a 37 °C, frente a *Candida glabrata*, *Candida metapsilosis* y *Candida parapsilosis*. Todas las diferencias mencionadas se dan en una dilución, salvo el fluconazol frente a *Candida parapsilosis*, cuya CMI a 37 °C fue dos diluciones mayor.

Tabla 18. Concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas a 25 °C (fondo en blanco) y 37 °C (fondo sombreado)

Fármaco antifúngico (µg/ml)	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida metapsilosis</i>	<i>Candida orthopsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
Anfotericina B	2	2	2	4	4	4	2
	2	2	4	4	8	4	4
Fluconazol	0,12	0,25	1	32	2	2	1
	0,12	0,25	2	32	2	2	4
Posaconazol	0,03	0,06	0,12	0,25	0,25	0,12	0,12
	0,03	0,06	0,12	0,12	0,25	0,25	0,12
Voriconazol	0,03	0,03	0,03	0,12	0,06	0,06	0,03
	0,03	0,03	0,03	0,12	0,12	0,12	0,03
Anidulafungina ^a	0,03	0,03	2	0,5	2	1	2
	0,03	0,12	1	0,12	1	1	1
Caspofungina	0,12	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	0,25	0,12	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Micafungina	0,06	0,12	1	0,12	1	1	1
	0,06	0,12	1	0,25	0,5	0,5	0,5

7. Eficacia del tratamiento antifúngico de la candidiasis en *Caenorhabditis elegans*

7.1 Tratamiento antifúngico de la candidiasis experimental por *Candida albicans*

7.1.1 Anfotericina B

Los tratamientos con 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$ de anfotericina B aumentaron significativamente la supervivencia de los *Caenorhabditis elegans* infectados con *Candida albicans* ($p = 0,001$ y $p = 1,6 \times 10^{-6}$, respectivamente), aunque la mediana estimada de supervivencia fue ligeramente inferior (48 h con ambos tratamientos respecto a las más de 48 h de los que no fueron tratados) (Figura 25). En las primeras 48 h, el porcentaje de nematodos vivos fue menor en aquellos que recibieron tratamiento, respecto al grupo control. Estas diferencias fueron significativas sólo en el tratamiento con 1 $\mu\text{g/ml}$ de anfotericina B ($p = 0,03$) (Tabla 19).

Tabla 19. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida albicans* tratados con anfotericina B

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	120 (100)	103 (86)	67 (56)	40 (33)	14 (12)	3 (3)
Anfotericina B (1 $\mu\text{g/ml}$)	121 (100)	97 (80)	51 (42)	50 (41)	43 (36)	34 (28)
Anfotericina B (2 $\mu\text{g/ml}$)	112 (100)	88 (79)	54 (48)	53 (47)	50 (45)	47 (42)

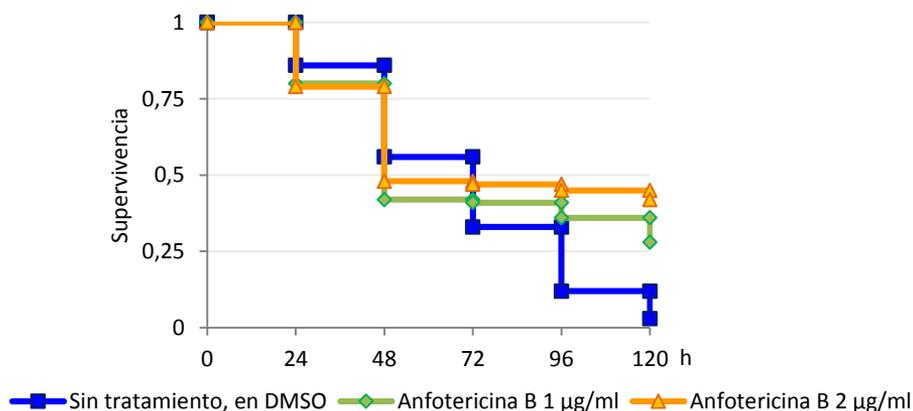


Figura 25. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida albicans* tratados con anfotericina B y sin tratar.

7.1.2 Azoles

7.1.2.1 Fluconazol

El tratamiento con fluconazol a cada una de las tres concentraciones ensayadas (32, 64 y 128 $\mu\text{g/ml}$) aumentó significativamente la supervivencia de los nematodos infectados con *Candida albicans* ($p = 5,4 \times 10^{-35}$, $7,3 \times 10^{-26}$ y $2,1 \times 10^{-37}$, respectivamente). Asimismo, los tres tratamientos aumentaron la mediana estimada de supervivencia de los nematodos a más de 120 h, con porcentajes de supervivencia de 76, 68 y 80%, respectivamente (Tabla 20 y Figura 26).

Tabla 20. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida albicans* tratados con fluconazol

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	178 (100)	131 (74)	87 (49)	66 (34)	42 (24)	16 (9)
Fluconazol (32 $\mu\text{g/ml}$)	123 (100)	123 (100)	118 (96)	113 (92)	105 (85)	93 (76)
Fluconazol (64 $\mu\text{g/ml}$)	118 (100)	118 (100)	105 (89)	94 (80)	86 (73)	80 (68)
Fluconazol (128 $\mu\text{g/ml}$)	126 (100)	126 (100)	120 (95)	118 (94)	112 (89)	101 (80)

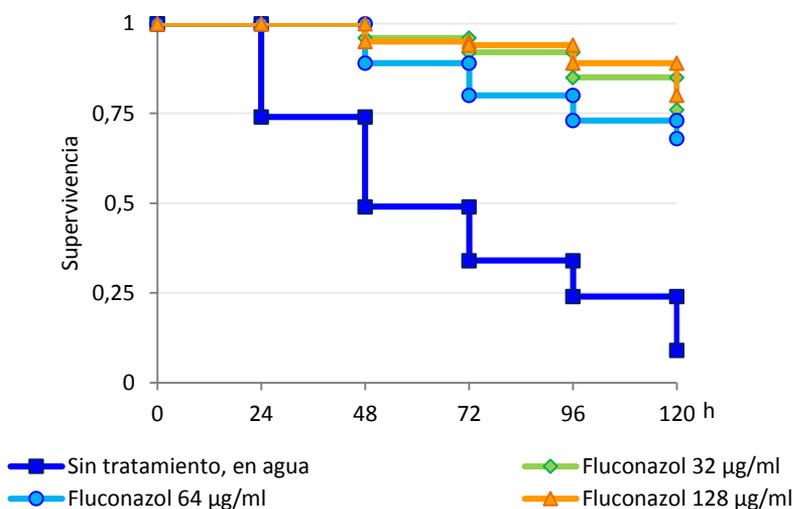


Figura 26. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida albicans* tratados con fluconazol y sin tratar.

7.1.2.2 Posaconazol

El tratamiento con 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$ de posaconazol aumentó de manera significativa la supervivencia de los *Caenorhabditis elegans* infectados con *Candida albicans* ($p = 2 \times 10^{-16}$ y 2×10^{-13} respectivamente). En ambos casos la mediana estimada de supervivencia aumentó a 96 h y los porcentajes de nematodos que sobrevivieron hasta el final del estudio fueron 45 y 38% respectivamente.

Tabla 21. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida albicans* tratados con posaconazol.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	120 (100)	103 (86)	67 (56)	40 (33)	14 (12)	3 (3)
Posaconazol (1 $\mu\text{g/ml}$)	132 (100)	131 (99)	111 (84)	86 (65)	65 (49)	60 (45)
Posaconazol (2 $\mu\text{g/ml}$)	115 (100)	115 (100)	97 (84)	71 (62)	54 (47)	44 (38)

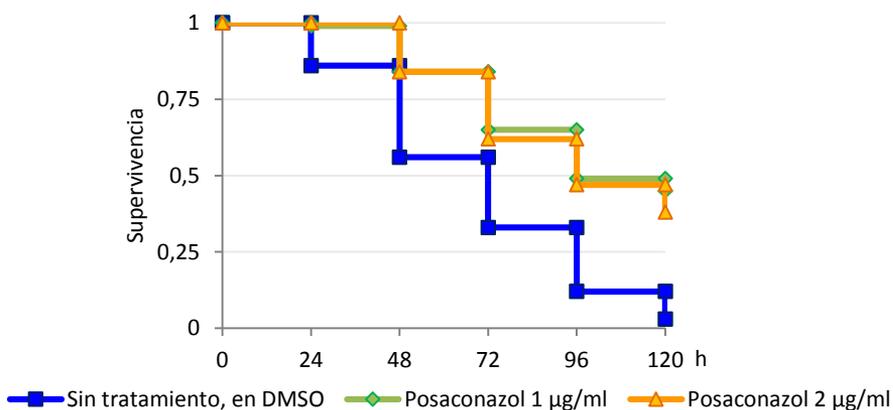


Figura 27. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida albicans* tratados con posaconazol y sin tratar.

7.1.2.3 Voriconazol

Los tratamientos con 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$ de voriconazol aumentaron significativamente la supervivencia de los nematodos que fueron infectados con *Candida albicans* ($p = 3,5 \times 10^{-14}$ y $p = 1,5 \times 10^{-12}$, respectivamente). En ambos casos la mediana estimada de supervivencia fue de 96 h, permaneciendo el 42 y 35% de los nematodos vivos al final del estudio, respectivamente (Tabla 22 y Figura 28).

Tabla 22. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida albicans* tratados con voriconazol.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	120 (100)	103 (86)	67 (56)	40 (33)	14 (12)	3 (3)
Voriconazol (1 $\mu\text{g/ml}$)	118 (100)	117 (99)	97 (82)	75 (64)	57 (48)	49 (42)
Voriconazol (2 $\mu\text{g/ml}$)	123 (100)	123 (100)	101 (82)	73 (59)	57 (46)	43 (35)

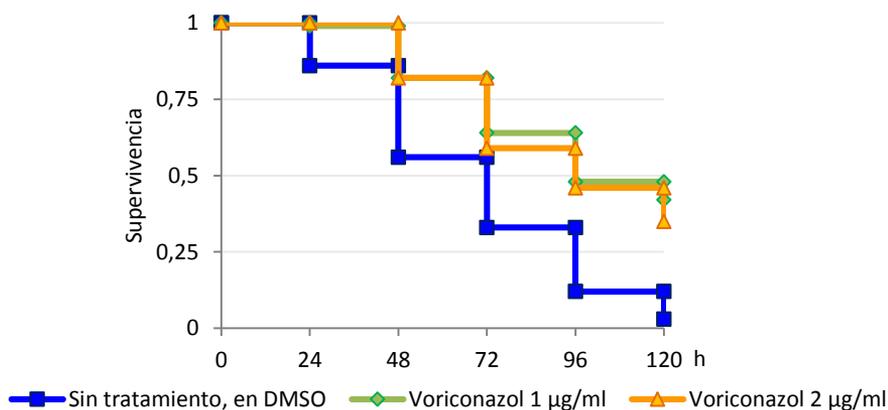


Figura 28. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida albicans* tratados con voriconazol y sin tratar.

7.1.3 Equinocandinas

7.1.3.1 Anidulafungina

El tratamiento con 4 µg/ml de anidulafungina aumentó la supervivencia de los nematodos infectados con *Candida albicans* ($p = 0,0004$). En presencia de DMSO, el porcentaje de *Caenorhabditis elegans* que sobrevivió hasta el final del estudio fue del 25%, versus el 3% de supervivencia de los que no recibieron tratamiento. Sin embargo, la mediana estimada de supervivencia no mejoró, manteniéndose ligeramente superior a las 48 h (Tabla 23 y figura 29).

Tabla 23. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida albicans* tratados con anidulafungina.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	120 (100)	103 (86)	67 (56)	40 (33)	14 (12)	3 (3)
Anidulafungina (4 µg/ml)	115 (100)	86 (75)	61 (53)	50 (43)	46 (40)	29 (25)

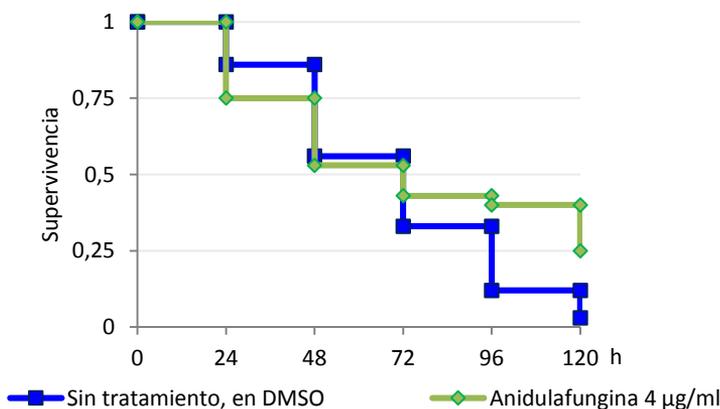


Figura 29. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida albicans* tratados con anidulafungina y sin tratar.

7.1.3.2 Caspofungina

Se observó un aumento significativo de la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* en el tratamiento con 4 y 8 µg/ml de caspofungina ($p = 0,001$ y $1,2 \times 10^{-31}$, respectivamente). Con la concentración más baja, el porcentaje de individuos vivos a las 120 h era del 26%, mientras que con 8 µg/ml fue del 78%. De los nematodos no tratados, únicamente sobrevivió el 9% a las 120 h (Tabla 24). La mediana estimada de supervivencia alcanzó las 72 h y superó las 120 h con la dosis más alta de caspofungina, mientras que la mediana estimada de supervivencia de los nematodos sin tratamiento, alcanzó las 48 h (Figura 30).

Tabla 24. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida albicans* tratados con caspofungina.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	178 (100)	131 (74)	87 (49)	66 (34)	42 (24)	16 (9)
Caspofungina (4 µg/ml)	121 (100)	92 (76)	67 (56)	60 (50)	48 (40)	31 (26)
Caspofungina (8 µg/ml)	125 (100)	125 (100)	107 (86)	102 (82)	100 (80)	95 (76)

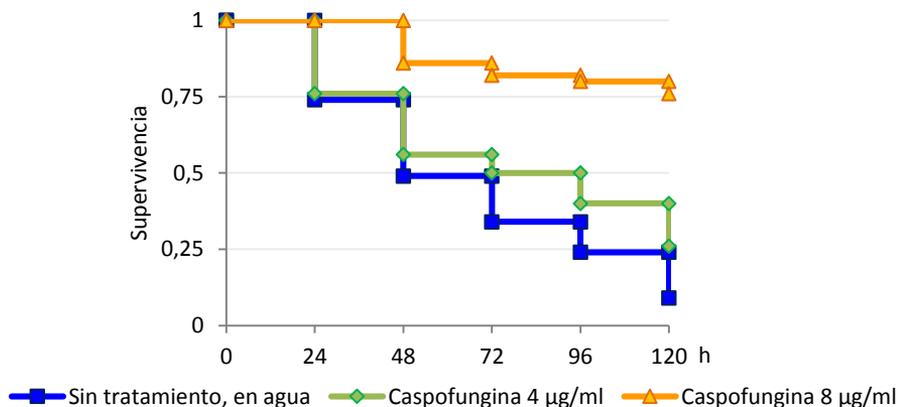


Figura 30. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida albicans* tratados con caspofungina y sin tratar.

7.1.3.3 Micafungina

Los tratamientos con 4 y 8 $\mu\text{g/ml}$ de micafungina, aumentaron significativamente la supervivencia de los nematodos infectados con *Candida albicans* ($p = 9,9 \times 10^{-5}$ y $8,1 \times 10^{-10}$, respectivamente). La supervivencia a las 120 h fue del 9% en el grupo de nematodos que no recibieron tratamiento, mientras que sobrevivió el 33% de los nematodos tratados con 4 $\mu\text{g/ml}$ de micafungina y el 48% de los tratados con la concentración más alta (Tabla 25 y Figura 31). El tratamiento también aumentó la mediana estimada de supervivencia de los nematodos, pasando de 48 h en los nematodos sin tratamiento, a 72 h con 4 $\mu\text{g/ml}$ de micafungina y a 120 h con 8 $\mu\text{g/ml}$.

Tabla 25. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida albicans* tratados con micafungina

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	178 (100)	131 (74)	87 (49)	66 (34)	42 (24)	16 (9)
Casposfungina (4 $\mu\text{g/ml}$)	116 (100)	90 (78)	61 (53)	55 (47)	49 (42)	38 (33)
Casposfungina (8 $\mu\text{g/ml}$)	117 (100)	91 (78)	79 (68)	66 (56)	61 (52)	55 (47)

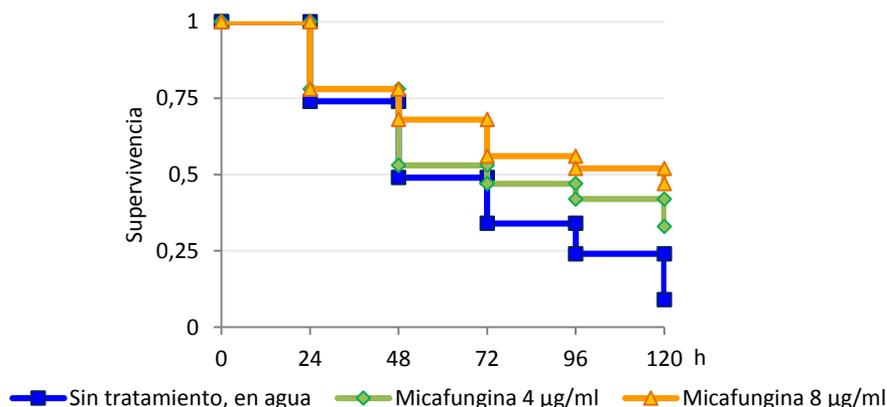


Figura 31. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida albicans* tratados con micafungina y sin tratar.

Tabla 26. Resumen de los resultados obtenidos con los tratamientos de *Caenorhabditis elegans* infectados con *Candida albicans*.

<i>Candida albicans</i> NCPF 3153		Medio de incubación	Mediana estimada supervivencia (h)	Nematodos vivos 120 h (%)
		En agua	48	9
		En DMSO	72	3

Tratamiento	Concentración (µg/ml)	Mediana estimada supervivencia (h)	Nematodos vivos 120 h (%)	Valor p
Anfotericina B	1	48	28	0,001
	2	48	42	0,000
Fluconazol	32	>120	76	0,000
	64	>120	68	0,000
	128	>120	80	0,000
Posaconazol	1	96	45	0,000
	2	96	38	0,000
Voriconazol	1	96	42	0,000
	2	96	35	0,000
Anidulafungina	4	72	25	0,000
Caspofungina	4	72	26	0,001
	8	>120	76	0,000
Micafungina	4	72	33	0,000
	8	120	47	0,000

En la parte superior se indican los resultados en los nematodos que no recibieron tratamiento y en la parte inferior los resultados obtenidos con los diferentes tratamientos. Los resultados de los nematodos que fueron incubados en un medio sin DMSO (tanto sin tratamiento como con él) se indican en fondo blanco y los que estuvieron en presencia del solvente, en fondo gris.

7.2 Tratamiento antifúngico de la candidiasis experimental por *Candida dubliniensis*

7.2.1 Anfotericina B

Los tratamientos con anfotericina B a las concentraciones de 1 y 2 µg/ml aumentaron significativamente la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* infectados con *Candida dubliniensis* ($p = 3,7 \times 10^{-30}$ y $2,1 \times 10^{-34}$, respectivamente). A la concentración más baja el porcentaje de nematodos vivos a las 120 h fue 85%, mientras que a la mayor concentración de anfotericina B los nematodos que sobrevivieron alcanzaron el 93% (Tabla 27). La mediana estimada de supervivencia superó las 120 h en ambas concentraciones (Figura 32).

Tabla 27. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida dubliniensis* tratados con anfotericina B.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	197 (100)	193 (98)	155 (79)	96 (49)	59 (30)	35 (18)
Anfotericina B (1 µg/ml)	116 (100)	116 (100)	113 (97)	111 (96)	103 (89)	99 (85)
Anfotericina B (2 µg/ml)	110 (100)	110 (100)	108 (98)	108 (98)	105 (95)	102 (93)

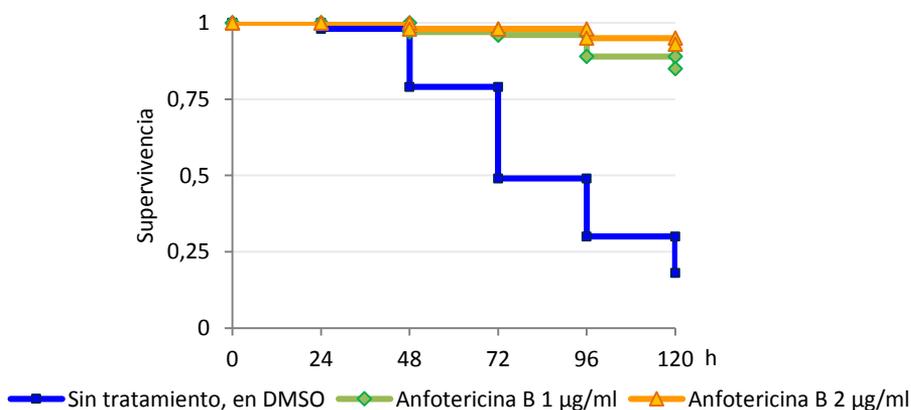


Figura 32. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida dubliniensis* tratados con anfotericina B y sin tratar.

7.2.2 Azoles

7.2.2.1 Fluconazol

El tratamiento con fluconazol a las tres concentraciones ensayadas (32, 64 y 128 $\mu\text{g/ml}$), aumentó significativamente la supervivencia de los nematodos infectados con *Candida dubliniensis* ($p = 9,5 \times 10^{-11}$, $7,8 \times 10^{-9}$ y 2×10^{-11} , respectivamente). Con independencia de la concentración estudiada, el tratamiento con fluconazol aumentó la mediana estimada de supervivencia a más de 120 h, logrando respectivamente 95, 92 y 96% de supervivencia, en el tiempo final de estudio (Tabla 28 y Figura 33).

Tabla 28. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida dubliniensis* tratados con fluconazol.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	163 (100)	162 (99)	156 (96)	141 (87)	114 (70)	96 (59)
Fluconazol (32 $\mu\text{g/ml}$)	108 (100)	108 (100)	107 (99)	104 (96)	104 (96)	103 (95)
Fluconazol (64 $\mu\text{g/ml}$)	105 (100)	105 (100)	104 (99)	100 (95)	98 (93)	97 (92)
Fluconazol (128 $\mu\text{g/ml}$)	107 (100)	107 (100)	107 (100)	104 (97)	104 (97)	103 (96)

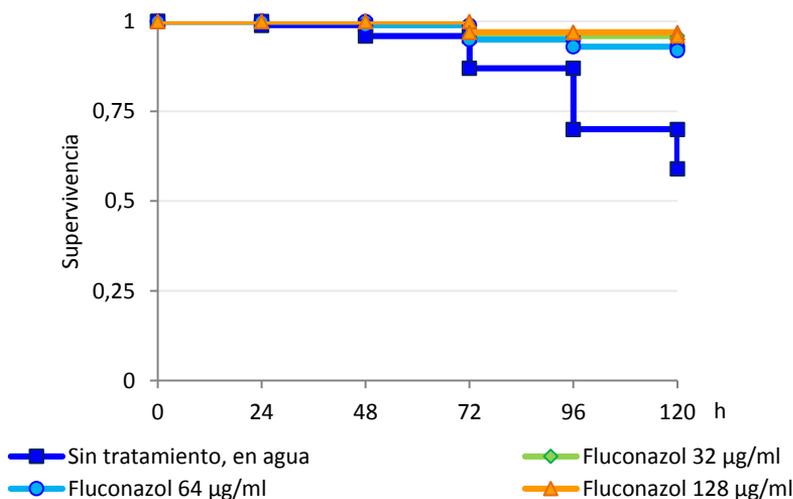


Figura 33. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida dubliniensis* tratados con fluconazol y sin tratar.

7.2.2.2 Posaconazol

El tratamiento con 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$ de posaconazol aumentó de manera significativa la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* infectados con *Candida dubliniensis* ($p = 6,7 \times 10^{-33}$ y $2,7 \times 10^{-31}$, respectivamente). En ambos casos la mediana estimada de supervivencia llegó a ser mayor de 120 h y los porcentajes de nematodos que sobrevivieron hasta el final del estudio fueron 91 y 88%, respectivamente (Tabla 29 y Figura 34).

Tabla 29. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida dubliniensis* tratados con posaconazol.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	197 (100)	193 (98)	155 (79)	96 (49)	59 (30)	35 (18)
Posaconazol (1 $\mu\text{g/ml}$)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	107 (98)	100 (92)	99 (91)
Posaconazol (2 $\mu\text{g/ml}$)	110 (100)	110 (100)	110 (100)	106 (96)	100 (91)	97 (88)

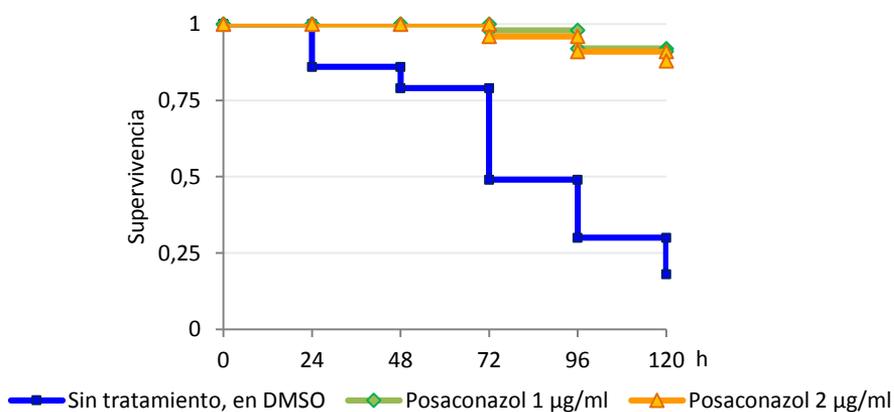


Figura 34. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida dubliniensis* tratados con posaconazol y sin tratar.

7.2.2.3 Voriconazol

Los tratamientos con 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$ de voriconazol aumentaron significativamente la supervivencia de los nematodos que fueron infectados con *Candida dubliniensis* ($p = 3 \times 10^{-33}$ y 7×10^{-34} , respectivamente). En ambos casos la mediana estimada de supervivencia superó las 120 h, permaneciendo en ambos tratamientos el 93% de los nematodos vivos al final del estudio (Tabla 30 y Figura 35).

Tabla 30. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida dubliniensis* tratados con voriconazol.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	197 (100)	193 (98)	155 (79)	96 (49)	59 (30)	35 (18)
Voriconazol (1 $\mu\text{g/ml}$)	106 (100)	106 (100)	105 (99)	102 (96)	99 (93)	99 (93)
Voriconazol (2 $\mu\text{g/ml}$)	106 (100)	106 (100)	105 (99)	104 (98)	101 (95)	99 (93)

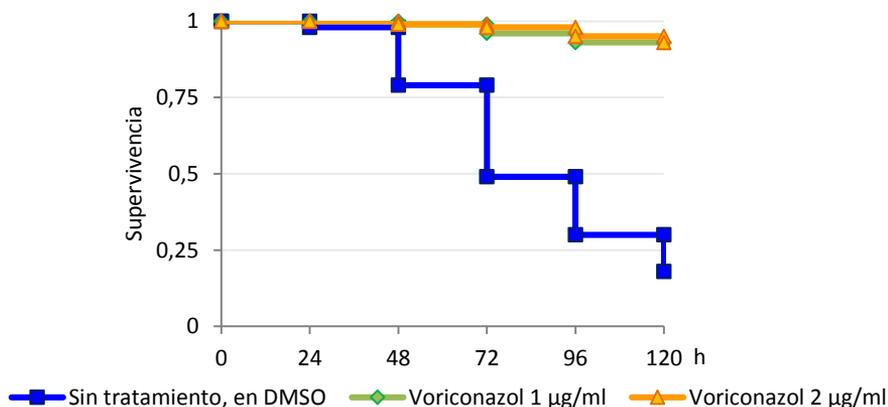


Figura 35. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida dubliniensis* tratados con voriconazol y sin tratar.

7.2.3 Equinocandinas

7.2.3.1 Anidulafungina

El tratamiento con 4 µg/ml de anidulafungina aumentó significativamente la supervivencia de los *Caenorhabditis elegans* infectados con *Candida dubliniensis* ($p = 1,6 \times 10^{-24}$). Además, la mediana estimada de supervivencia de los nematodos que recibieron tratamiento con este fármaco antifúngico fue mayor de 120 h y el porcentaje de supervivientes al final del estudio alcanzó el 82% (Tabla 31 y Figura 36).

Tabla 31. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida dubliniensis* tratados con anidulafungina.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	197 (100)	193 (98)	155 (79)	96 (49)	59 (30)	35 (18)
Anidulafungina (4 µg/ml)	101 (100)	101 (100)	96 (95)	91 (90)	89 (88)	83 (82)

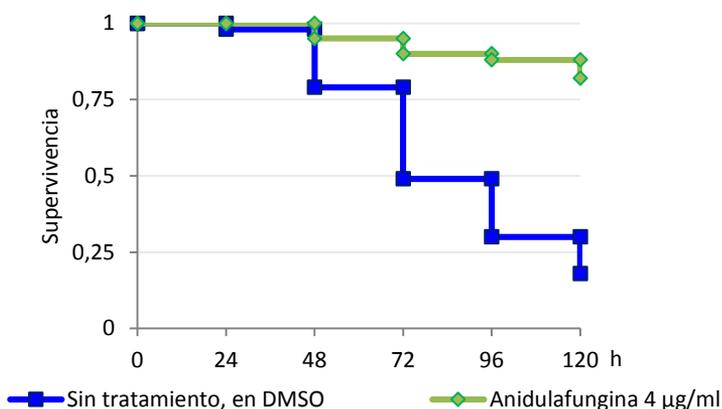


Figura 36. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida dubliniensis* tratados con anidulafungina y sin tratar.

7.2.3.2 Caspofungina

Se constató un aumento significativo de la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* en los tratamientos con 4 y 8 µg/ml de caspofungina ($p = 1,1 \times 10^{-6}$ y $8,1 \times 10^{-8}$), con 88 y 89% de supervivencia a las 120 h, ambos respectivamente. Además, la mediana estimada de supervivencia superó las 120 h en ambos casos.

Tabla 32. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida dubliniensis* tratados con caspofungina

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	163 (100)	162 (99)	156 (96)	141 (87)	114 (70)	96 (59)
Caspofungina (4 µg/ml)	108 (100)	108 (100)	102 (94)	100 (93)	97 (90)	95 (88)
Caspofungina (8 µg/ml)	124 (100)	124 (100)	121 (98)	115 (93)	113 (91)	110 (89)

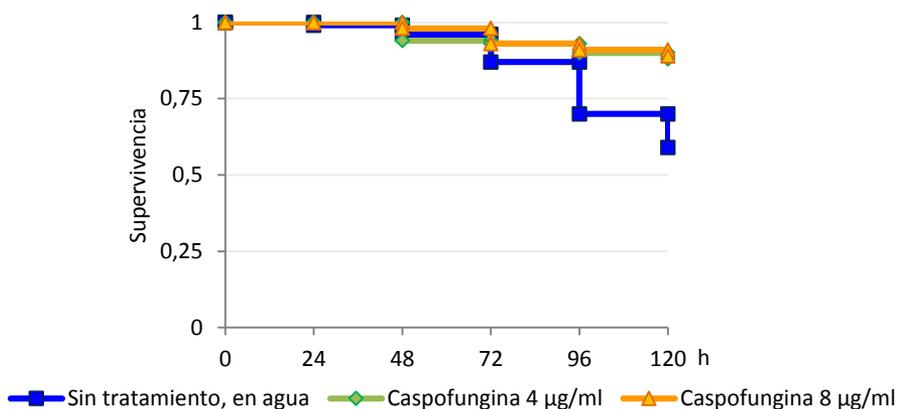


Figura 37. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida dubliniensis* tratados con caspofungina y sin tratar.

7.2.3.3 Micafungina

Independientemente de la concentración de fármaco empleada, ambos tratamientos con micafungina aumentaron significativamente la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* ($p = 3,8 \times 10^{-04}$ y $1,1 \times 10^{-6}$ para 4 y 8 $\mu\text{g/ml}$ de micafungina, respectivamente). Los porcentajes de supervivencia al final del estudio fueron de 80% en el tratamiento con 4 $\mu\text{g/ml}$ de micafungina y 87% con 8 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 33). El tratamiento también aumentó la mediana estimada de supervivencia de los nematodos a más de 120 h con ambas concentraciones (Figura 38).

Tabla 33. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida dubliniensis* tratados con micafungina

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	163 (100)	162 (99)	156 (96)	141 (87)	114 (70)	96 (59)
Micafungina (4 $\mu\text{g/ml}$)	114 (100)	113 (99)	111 (97)	105 (92)	97 (85)	91 (80)
Micafungina (8 $\mu\text{g/ml}$)	106 (100)	105 (99)	105 (99)	101 (95)	100 (94)	92 (87)

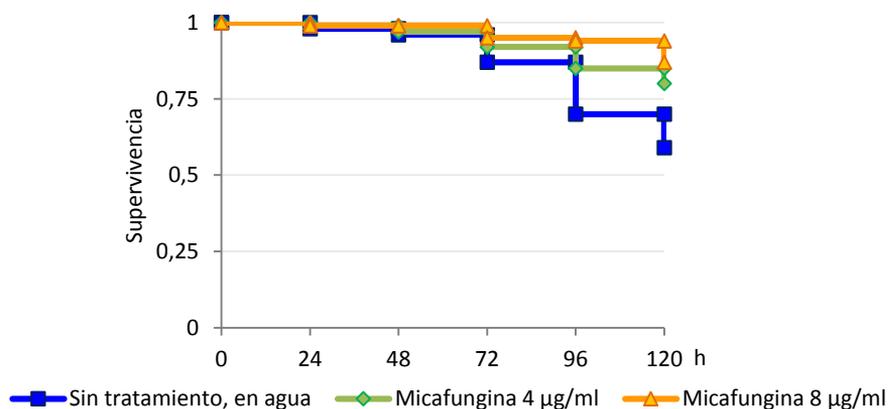


Figura 38. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida dubliniensis* tratados con micafungina y sin tratar.

Tabla 34. Resumen de los resultados obtenidos con los tratamientos de *Caenorhabditis elegans* infectados con *Candida dubliniensis*.

<i>Candida dubliniensis</i> NCPF 3949		Medio de incubación	Mediana estimada supervivencia (h)	Nematodos vivos 120 h (%)
		En agua	>120	59
		En DMSO	72	18

Tratamiento	Concentración (µg/ml)	Mediana estimada supervivencia (h)	Nematodos vivos 120 h (%)	Valor p
Anfotericina B	1	>120	85	0,000
	2	>120	93	0,000
Fluconazol	32	>120	95	0,000
	64	>120	92	0,000
	128	>120	96	0,000
Posaconazol	1	>120	91	0,000
	2	>120	88	0,000
Voriconazol	1	>120	93	0,000
	2	>120	93	0,000
Anidulafungina	4	>120	82	0,000
Caspofungina	4	>120	88	0,000
	8	>120	89	0,000
Micafungina	4	>120	80	0,000
	8	>120	87	0,000

En la parte superior se indican los resultados en los nematodos que no recibieron tratamiento y en la parte inferior los resultados obtenidos con los diferentes tratamientos. Los resultados de los nematodos que fueron incubados en un medio sin DMSO (tanto sin tratamiento como con él) se indican en fondo blanco y los que estuvieron en presencia del solvente, en fondo gris.

7.3 Tratamiento antifúngico de la candidiasis experimental por *Candida glabrata*

7.3.1 Anfotericina B

Los tratamientos con 1 y 2 µg/ml de anfotericina B aumentaron significativamente la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* infectados con *Candida glabrata* ($p = 8,9 \times 10^{-10}$ y $5,8 \times 10^{-8}$, respectivamente). No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de nematodos vivos a las 120 h a ambas concentraciones (78 y 80%, respectivamente, con un valor $p = 0,8126$) y en ambos casos la mediana estimada de supervivencia superó las 120 h (Tabla 35 y Figura 39).

Tabla 35. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida glabrata* tratados con anfotericina B.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	189 (100)	189 (100)	174 (92)	125 (66)	70 (37)	50 (26)
Anfotericina B (1 µg/ml)	185 (100)	185 (100)	183 (99)	161 (87)	157 (85)	145 (78)
Anfotericina B (2 µg/ml)	122 (100)	122 (100)	121 (99)	104 (85)	100 (82)	97 (80)

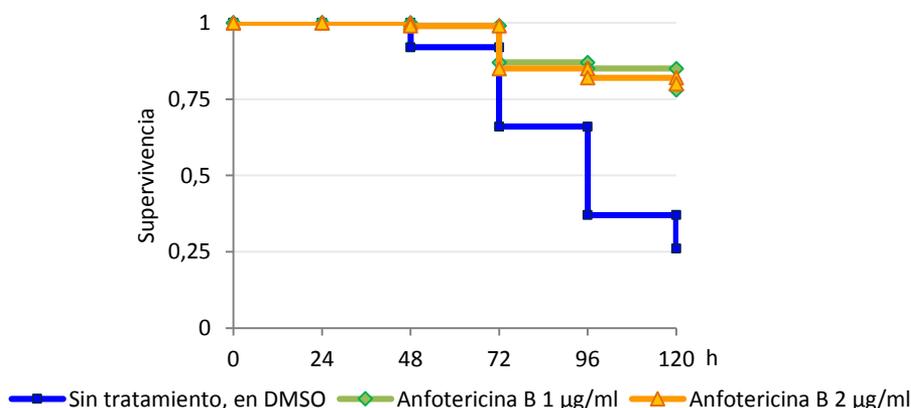


Figura 39. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida glabrata* tratados con anfotericina B y sin tratar.

7.3.2 Azoles

7.3.2.1 Fluconazol

El tratamiento con fluconazol a las tres concentraciones ensayadas (32, 64 y 128 $\mu\text{g/ml}$), aumentó la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* infectados con *Candida glabrata* de manera significativa ($p = 9 \times 10^{-4}$, $2,1 \times 10^{-8}$ y $2,5 \times 10^{-5}$, respectivamente). Además independientemente de la concentración de fluconazol empleada se observó un aumento de la mediana estimada de supervivencia de los nematodos a más de 120 h. Los porcentajes de supervivencia al final del estudio para las tres concentraciones de fluconazol ensayadas, fueron 64, 79 y 70%, respectivamente (Tabla 36 y Figura 40).

Tabla 36. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida glabrata* tratados con fluconazol.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	119 (100)	119 (100)	118 (99)	99 (83)	82 (69)	50 (42)
Fluconazol (32 $\mu\text{g/ml}$)	120 (100)	120 (100)	118 (98)	109 (91)	98 (82)	77 (64)
Fluconazol (64 $\mu\text{g/ml}$)	124 (100)	124 (100)	124 (100)	114 (92)	104 (84)	98 (79)
Fluconazol (128 $\mu\text{g/ml}$)	121 (100)	121 (100)	117 (97)	111 (92)	103 (85)	85 (70)

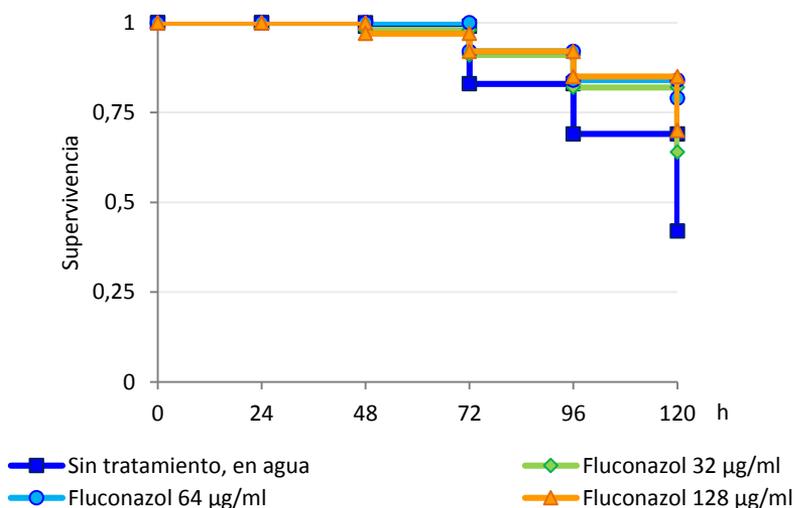


Figura 40. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida glabrata* tratados con fluconazol y sin tratar.

7.3.2.2 Posaconazol

El tratamiento con 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$ de posaconazol aumentó de manera significativa la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* infectados con *Candida glabrata* ($p = 1,5 \times 10^{-14}$ y $7,8 \times 10^{-19}$, respectivamente). En ambos casos la mediana estimada de supervivencia llegó a ser mayor de 120 h y los porcentajes de nematodos que sobrevivieron hasta el final del estudio fueron 73 y 82% para las concentraciones de 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$ de posaconazol, respectivamente (Tabla 37 y Figura 41).

Tabla 37. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida glabrata* tratados con posaconazol.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	189 (100)	189 (100)	174 (92)	125 (66)	70 (37)	50 (26)
Posaconazol (1 $\mu\text{g/ml}$)	114 (100)	114 (100)	111 (97)	98 (86)	95 (83)	83 (73)
Posaconazol (2 $\mu\text{g/ml}$)	119 (100)	119 (100)	116 (97)	103 (87)	101 (85)	97 (82)

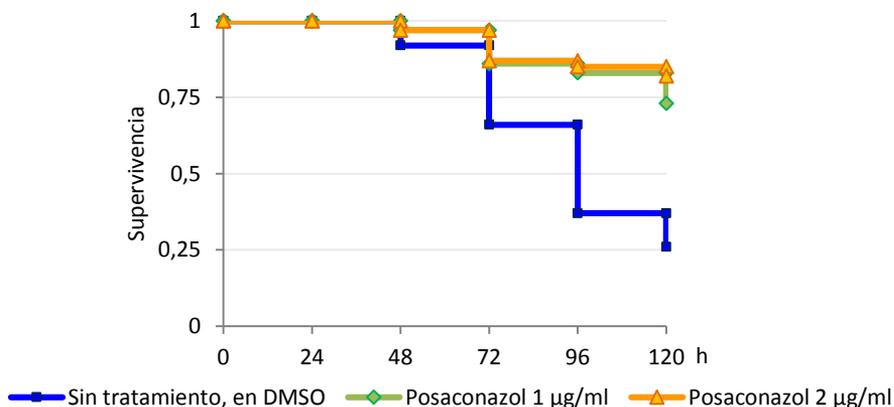


Figura 41. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida glabrata* tratados con posaconazol y sin tratar.

7.3.2.3 Voriconazol

Los tratamientos con 1 o 2 $\mu\text{g/ml}$ de voriconazol aumentaron significativamente la supervivencia de los nematodos infectados por *Candida glabrata* ($p = 1,1 \times 10^{-11}$ y $5,9 \times 10^{-20}$, respectivamente). En ambos casos la mediana estimada de supervivencia superó las 120 h, mientras que la proporción de nematodos vivos fue del 69 y 82%, respectivamente (Tabla 38 y Figura 42).

Tabla 38. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida glabrata* tratados con voriconazol.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	189 (100)	189 (100)	174 (92)	125 (66)	70 (37)	50 (26)
Voriconazol (1 $\mu\text{g/ml}$)	116 (100)	116 (100)	111 (96)	94 (81)	88 (76)	80 (69)
Voriconazol (2 $\mu\text{g/ml}$)	117 (100)	117 (100)	112 (96)	107 (91)	104 (89)	96 (82)

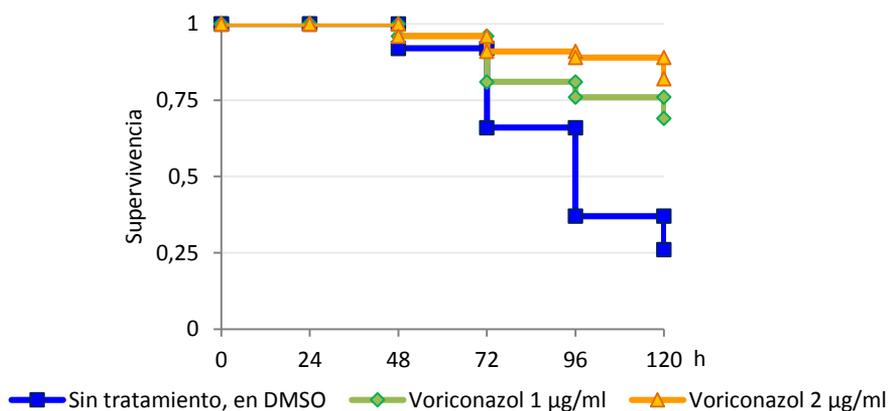


Figura 42. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida glabrata* tratados con voriconazol y sin tratar.

7.3.3 Equinocandinas

7.3.3.1 Anidulafungina

El tratamiento con 4 µg/ml de anidulafungina aumentó significativamente la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* infectados con *Candida glabrata* ($p = 4,8 \times 10^{-7}$). La mediana estimada de supervivencia de los nematodos que recibieron tratamiento con este fármaco antifúngico fue mayor de 120 h y el porcentaje de supervivientes al final del estudio alcanzó el 58% (Tabla 39 y Figura 43).

Tabla 39. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida glabrata* tratados con anidulafungina

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	189 (100)	189 (100)	174 (92)	125 (66)	70 (37)	50 (26)
Anidulafungina (4 µg/ml)	134 (100)	134 (100)	126 (94)	96 (72)	86 (64)	78 (58)

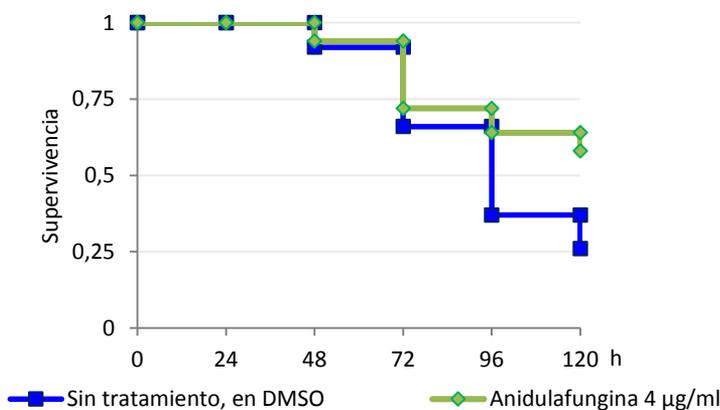


Figura 43. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida glabrata* tratados con anidulafungina y sin tratar.

7.3.3.2 Caspofungina

Los tratamientos con 4 y 8 µg/ml de caspofungina aumentaron significativamente la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* ($p = 3,2 \times 10^{-14}$ y $2,4 \times 10^{-7}$, respectivamente). Los porcentajes de nematodos supervivientes a las 120 h fueron de 90 y 76% y la mediana estimada de supervivencia superó las 120 h en ambos casos, independientemente de la concentración de caspofungina empleada para el tratamiento (Tabla 40 y Figura 44).

Tabla 40. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida glabrata* tratados con caspofungina.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	119 (100)	119 (100)	118 (99)	99 (83)	82 (69)	50 (42)
Caspofungina (4 µg/ml)	125 (100)	125 (100)	124 (99)	117 (94)	114 (91)	112 (90)
Caspofungina (8 µg/ml)	130 (100)	130 (100)	129 (99)	117 (90)	108 (83)	99 (76)

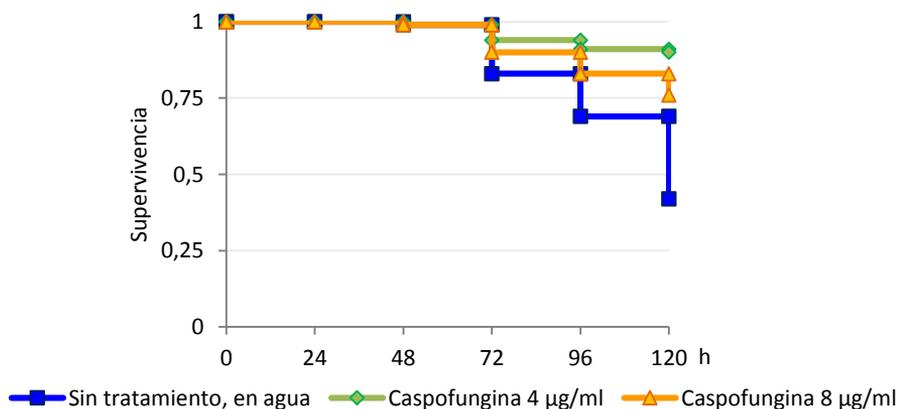


Figura 44. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida glabrata* tratados con caspofungina y sin tratar.

7.3.3.3 Micafungina

Los tratamientos con 4 y 8 µg/ml de micafungina en los nematodos infectados con *Candida glabrata*, aumentaron significativamente la supervivencia respecto al grupo control ($p = 4,8 \times 10^{-11}$ y $2,4 \times 10^{-23}$, respectivamente), con 84% y 93% de supervivencia al final del estudio (Tabla 41). Al igual que lo descrito para las otras candidinas, el tratamiento también aumentó la mediana estimada de supervivencia de los nematodos a más de 120 h con ambas concentraciones (Figura 45).

Tabla 41. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida glabrata* tratados con micafungina.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	119 (100)	119 (100)	118 (99)	99 (83)	82 (69)	50 (42)
Micafungina (4 µg/ml)	128 (100)	128 (100)	127 (99)	121 (95)	113 (88)	107 (84)
Micafungina (8 µg/ml)	190 (100)	190 (100)	188 (99)	183 (96)	181 (95)	177 (93)

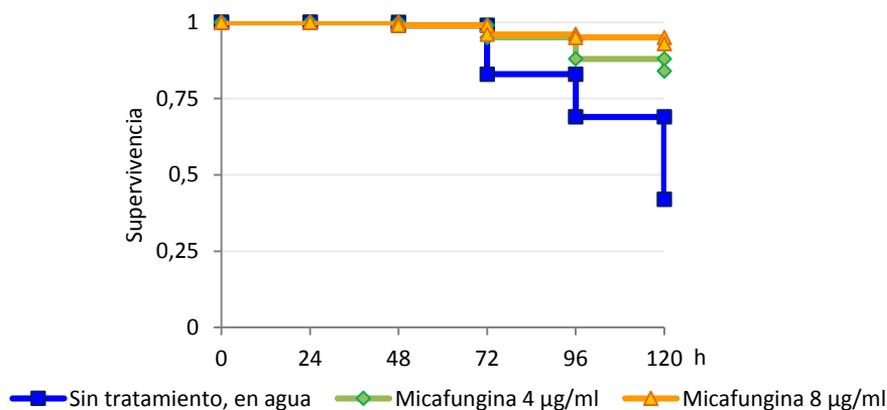


Figura 45. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida glabrata* tratados con micafungina y sin tratar.

Tabla 34. Resumen de los resultados obtenidos con los tratamientos de *Caenorhabditis elegans* infectados con *Candida glabrata*.

<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030		Medio de incubación	Mediana estimada supervivencia (h)	Nematodos vivos 120 h (%)
		En agua	120	42
		En DMSO	96	26

Tratamiento	Concentración (µg/ml)	Mediana estimada supervivencia (h)	Nematodos vivos 120 h (%)	Valor p
Anfotericina B	1	>120	78	0,000
	2	>120	80	0,000
Fluconazol	32	>120	64	0,001
	64	>120	79	0,000
	128	>120	70	0,000
Posaconazol	1	>120	73	0,000
	2	>120	82	0,000
Voriconazol	1	>120	69	0,000
	2	>120	82	0,000
Anidulafungina	4	>120	58	0,000
Caspofungina	4	>120	90	0,000
	8	>120	76	0,000
Micafungina	4	>120	84	0,000
	8	>120	93	0,000

En la parte superior se indican los resultados en los nematodos que no recibieron tratamiento y en la parte inferior los resultados obtenidos con los diferentes tratamientos. Los resultados de los nematodos que fueron incubados en un medio sin DMSO (tanto sin tratamiento como con él) se indican en fondo blanco y los que estuvieron en presencia del solvente, en fondo gris.

7.4 Tratamiento antifúngico de la candidiasis experimental por *Candida krusei*

7.4.1 Anfotericina B

Los tratamientos con 1 y 2 µg/ml de anfotericina B aumentaron significativamente la supervivencia de los nematodos infectados con *Candida krusei* ($p = 1,2 \times 10^{-4}$ y $1,4 \times 10^{-8}$), ampliando en ambos casos la mediana estimada de supervivencia a 96 y más de 120 h, respectivamente (Figura 46). A la concentración más baja, el 39% de los nematodos permaneció vivo a las 120 h, mientras que a la mayor concentración de anfotericina B los nematodos que sobrevivieron llegaron al 51% (Tabla 43). La diferencia entre ambos porcentajes no resultó ser estadísticamente significativa ($p = 0,054$).

Tabla 43. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida krusei* tratados con anfotericina B.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	120 (100)	118 (98)	82 (68)	56 (47)	40 (33)	19 (16)
Anfotericina B (1 µg/ml)	128 (100)	128 (100)	106 (83)	75 (59)	61 (48)	50 (39)
Anfotericina B (2 µg/ml)	128 (100)	128 (100)	108 (84)	86 (67)	77 (60)	65 (51)

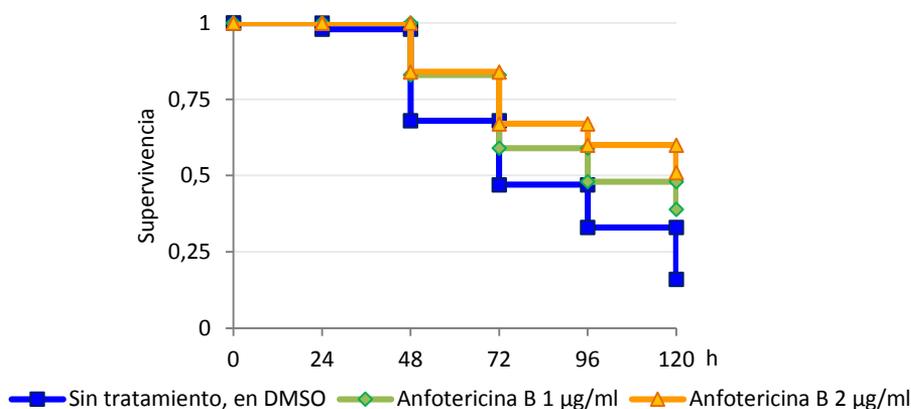


Figura 46. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida krusei* tratados con anfotericina B y sin tratar.

7.4.2 Azoles

7.4.2.1 Fluconazol

El tratamiento con 32, 64 o 128 µg/ml de fluconazol no aumentó la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* infectados con *Candida krusei*, independientemente de la concentración ensayada ($p = 0,061, 0,194$ y $0,084$ respectivamente). Los porcentajes de supervivencia al final del estudio fueron bajos (6, 8 y 9% para cada concentración de fluconazol respectivamente) mientras la mediana estimada de supervivencia se mantuvo en 72 h (Tabla 44 y Figura 47).

Tabla 44. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida krusei* tratados con fluconazol.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	187 (100)	182 (97)	137 (73)	78 (42)	50 (27)	16 (9)
Fluconazol (32 µg/ml)	126 (100)	117 (93)	87 (69)	52 (41)	33 (26)	7 (6)
Fluconazol (64 µg/ml)	144 (100)	142 (99)	95 (66)	67 (47)	41 (28)	11 (8)
Fluconazol (128 µg/ml)	116 (100)	112 (97)	75 (65)	49 (42)	26 (22)	10 (9)

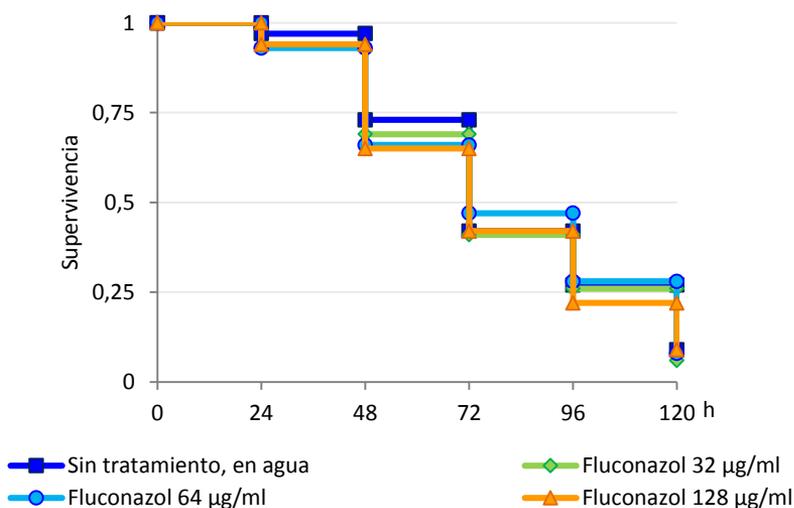


Figura 47. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida krusei* tratados con fluconazol y sin tratar.

7.4.2.2 Posaconazol

Después de ser infectados con *Candida krusei*, los nematodos tratados con 1 y 2 µg/ml de posaconazol aumentaron de manera significativa su supervivencia ($p = 7,8 \times 10^{-6}$ y $7,1 \times 10^{-9}$, respectivamente). El tratamiento con 1 µg/ml de posaconazol aumentó la mediana estimada de supervivencia a 96 h, mientras que cuando se trató con 2 µg/ml de posaconazol, superó las 120 h. Los porcentajes de nematodos que sobrevivieron hasta el final del estudio fueron 47 y 54%, respectivamente (Tabla 45 y Figura 48).

Tabla 45. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida krusei* tratados con posaconazol.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	120 (100)	118 (98)	82 (68)	56 (47)	40 (33)	19 (16)
Posaconazol (1 µg/ml)	118 (100)	116 (98)	99 (84)	65 (55)	58 (49)	55 (47)
Posaconazol (2 µg/ml)	117 (100)	117 (100)	102 (87)	77 (66)	67 (57)	63 (54)

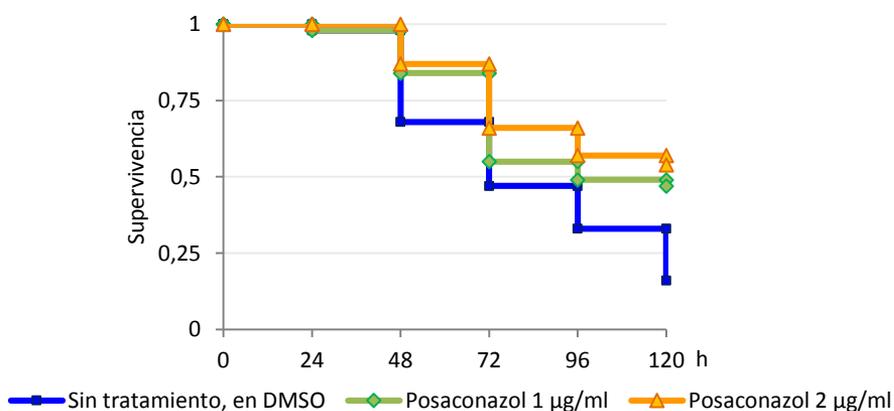


Figura 48. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida krusei* tratados con posaconazol y sin tratar.

7.4.2.3 Voriconazol

Los tratamientos con 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$ de voriconazol aumentaron significativamente la supervivencia de los nematodos infectados con *Candida krusei* ($p = 4,5 \times 10^{-4}$ y $9,3 \times 10^{-9}$, respectivamente). A la concentración más baja, la mediana estimada de supervivencia llegó a 96 h, mientras que con 2 $\mu\text{g/ml}$ de voriconazol llegó a las 120 h, permaneciendo respectivamente el 30 y 48% de los nematodos vivos al final del estudio, siendo significativa la diferencia entre ambos ($p = 7,27 \times 10^{-3}$) (Tabla 46 y Figura 49).

Tabla 46. Cantidad (porcentaje) de nematodos vivos en cada hora de lectura, que fueron infectados con *Candida krusei* y posteriormente tratados con voriconazol.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	120 (100)	118 (98)	82 (68)	56 (47)	40 (33)	19 (16)
Voriconazol (1 $\mu\text{g/ml}$)	115 (100)	115 (100)	111 (97)	72 (63)	51 (44)	35 (30)
Voriconazol (2 $\mu\text{g/ml}$)	113 (100)	113 (100)	109 (96)	79 (70)	67 (59)	54 (48)

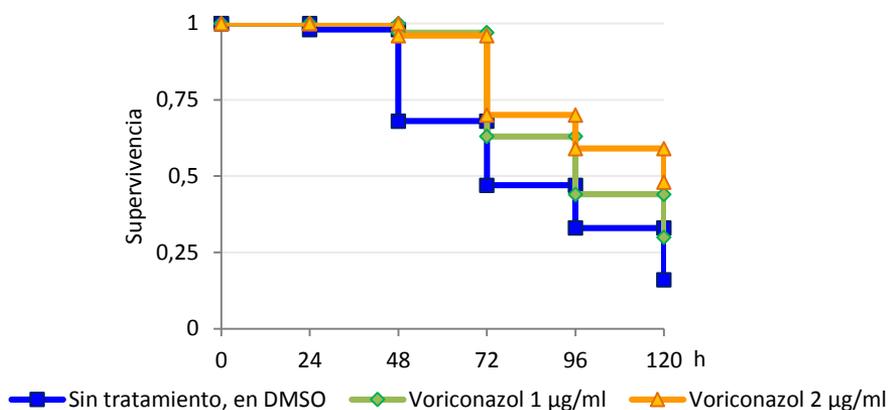


Figura 49. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida krusei* tratados con voriconazol y sin tratar.

7.4.3 Equinocandinas

7.4.3.1 Anidulafungina

El tratamiento con 4 µg/ml de anidulafungina aumentó significativamente la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* infectados con *Candida krusei* ($p = 2,4 \times 10^{-9}$). Además, la mediana estimada de supervivencia en los nematodos que recibieron tratamiento fue mayor de 120 h y el porcentaje de supervivientes al final del estudio alcanzó el 56% (Tabla 47 y Figura 50).

Tabla 47. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida krusei* tratados con anidulafungina

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	120 (100)	118 (98)	82 (68)	56 (47)	40 (33)	19 (16)
Anidulafungina (4 µg/ml)	129 (100)	128 (99)	98 (76)	85 (66)	82 (64)	72 (56)

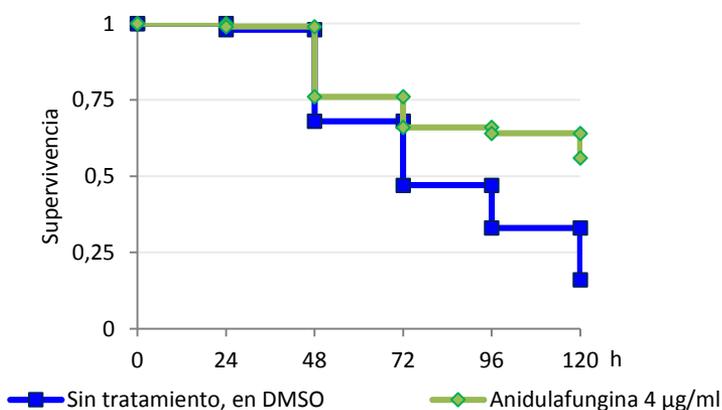


Figura 50. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida krusei* tratados con anidulafungina y sin tratar.

7.4.3.2 Caspofungina

La supervivencia de *Caenorhabditis elegans* aumentó significativamente con el tratamiento con 4 y 8 µg/ml de caspofungina ($p = 4,7 \times 10^{-23}$ y $4,1 \times 10^{-27}$, respectivamente). Las proporciones de nematodos vivos al final del estudio llegaron al 45 y 68% para la concentración menor y mayor de caspofungina y las medianas de supervivencia aumentaron de 72 h en el caso del grupo de nematodos control, a 96 y más de 120 h en los tratados con 4 y 8 µg/ml de caspofungina, respectivamente (Tabla 48 y Figura 51).

Tabla 48. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida krusei* tratados con caspofungina.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	187 (100)	182 (97)	137 (73)	78 (42)	50 (27)	16 (9)
Caspofungina (4 µg/ml)	119 (100)	117 (98)	86 (72)	67 (56)	58 (49)	54 (45)
Caspofungina (8 µg/ml)	122 (100)	122 (100)	116 (95)	100 (82)	92 (75)	83 (68)

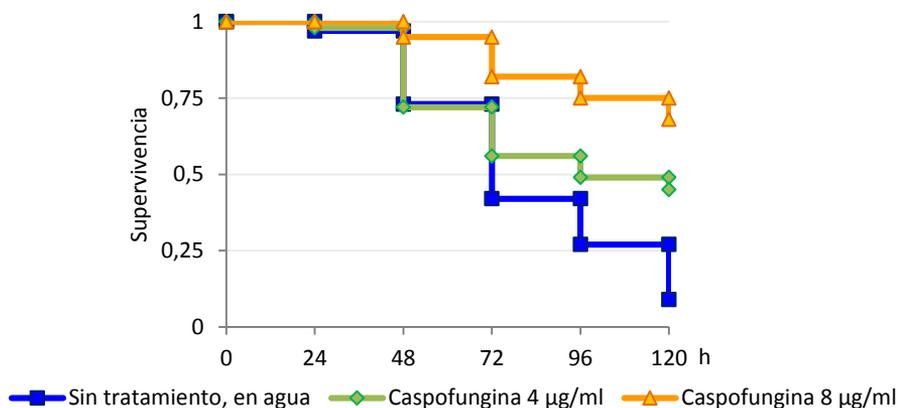


Figura 51. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida krusei* tratados con caspofungina y sin tratar.

7.4.3.3 Micafungina

Los tratamientos con 4 y 8 $\mu\text{g/ml}$ de micafungina aumentaron significativamente la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* ($p = 9 \times 10^{-7}$ y $4,1 \times 10^{-7}$, respectivamente), con 40 y 44% de supervivencia al final del estudio. Sólo el tratamiento con 4 $\mu\text{g/ml}$ de micafungina aumentó la mediana estimada de supervivencia de los nematodos (de 72 h en los que no recibieron tratamiento, a 96 h en los tratados), mientras que a una concentración de 8 $\mu\text{g/ml}$, la mediana estimada de supervivencia se mantuvo en 72 h (Tabla 49 y Figura 52).

Tabla 49. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida krusei* tratados con micafungina.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	187 (100)	182 (97)	137 (73)	78 (42)	50 (27)	16 (9)
Micafungina (4 $\mu\text{g/ml}$)	120 (100)	116 (97)	94 (78)	62 (51)	54 (45)	48 (40)
Micafungina (8 $\mu\text{g/ml}$)	119 (100)	117 (98)	89 (75)	59 (50)	53 (45)	52 (44)

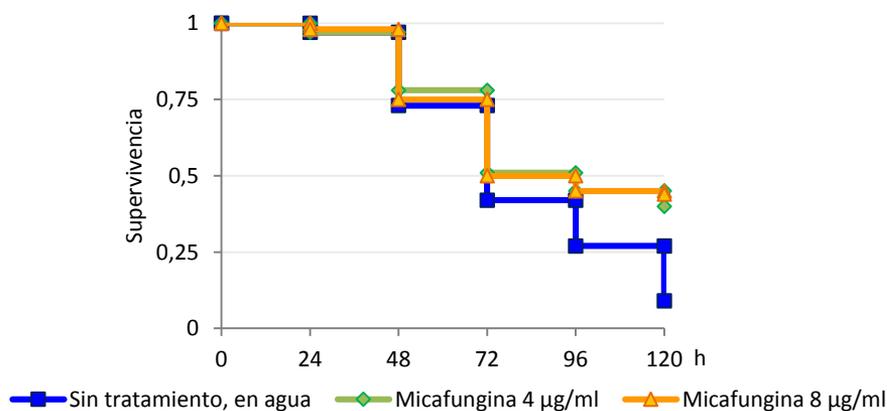


Figura 52. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida krusei* tratados con micafungina y sin tratar.

Tabla 50. Resumen de los resultados obtenidos con los tratamientos de *Caenorhabditis elegans* infectados con *Candida krusei*.

<i>Candida krusei</i> ATCC 6258		Medio de incubación	Mediana estimada supervivencia (h)	Nematodos vivos 120 h (%)
		En agua	72	9
		En DMSO	72	16

Tratamiento	Concentración (µg/ml)	Mediana estimada supervivencia (h)	Nematodos vivos 120 h (%)	Valor p
Anfotericina B	1	96	39	0,000
	2	>120	51	0,000
Fluconazol	32	72	6	0,465
	64	72	8	0,855
	128	72	9	0,475
Posaconazol	1	96	47	0,000
	2	>120	54	0,000
Voriconazol	1	96	30	0,000
	2	120	48	0,000
Anidulafungina	4	>120	56	0,000
Caspofungina	4	96	45	0,000
	8	>120	68	0,000
Micafungina	4	96	40	0,000
	8	72	44	0,000

En la parte superior se indican los resultados en los nematodos que no recibieron tratamiento y en la parte inferior los resultados obtenidos con los diferentes tratamientos. Los resultados de los nematodos que fueron incubados en un medio sin DMSO (tanto sin tratamiento como con él) se indican en fondo blanco y los que estuvieron en presencia del solvente, en fondo gris.

7.5 Tratamiento antifúngico de la candidiasis experimental por *Candida metapsilosis*

7.5.1 Anfotericina B

Los tratamientos con 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$ de anfotericina B aumentaron significativamente la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* infectados con *Candida metapsilosis* ($p = 4,6 \times 10^{-5}$ y $2,2 \times 10^{-5}$ respectivamente), con un incremento de la mediana estimada de supervivencia a 96 h en ambas concentraciones. A la concentración más baja, el 41% de los nematodos permaneció vivo a las 120 h, mientras que a la mayor concentración de anfotericina B los nematodos que sobrevivieron sólo llegaron al 35%, pero el análisis estadístico de los resultados mostró que no existían diferencias significativas ($p=0,329$) (Tabla 51 y Figura 53).

Tabla 51. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida metapsilosis* tratados con anfotericina B.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	122 (100)	122 (100)	83 (68)	54 (44)	36 (30)	14 (11)
Anfotericina B (1 $\mu\text{g/ml}$)	97 (100)	97 (100)	71 (73)	54 (56)	47 (48)	40 (41)
Anfotericina B (2 $\mu\text{g/ml}$)	118 (100)	118 (100)	102 (86)	73 (62)	53 (45)	41 (35)

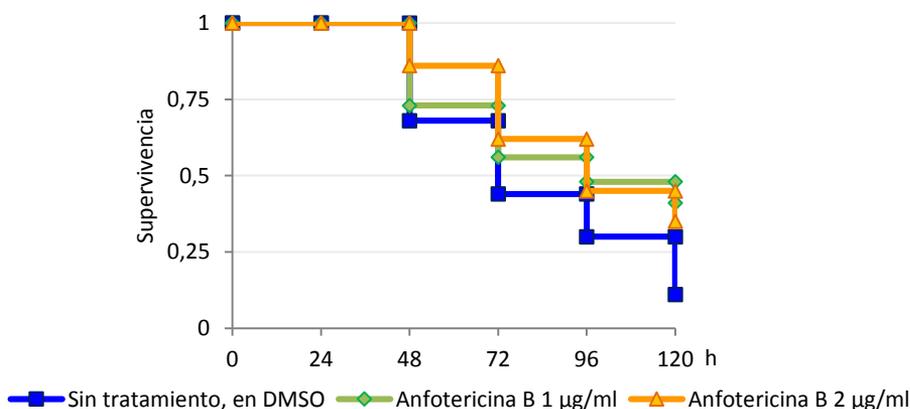


Figura 53. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida metapsilosis* tratados con anfotericina B y sin tratar.

7.5.2 Azoles

7.5.2.1 Fluconazol

El tratamiento con fluconazol aumentó significativamente la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* infectados con *Candida metapsilosis* ($p = 4,1 \times 10^{-5}$, $1,7 \times 10^{-7}$ y $6,2 \times 10^{-10}$ con 32, 64 y 128 $\mu\text{g/ml}$ de fluconazol, respectivamente). Los porcentajes de supervivencia al final del estudio fueron 41, 47 y 55% y la mediana estimada de supervivencia fue de 120 h en las dos concentraciones más bajas y de más de 120 h con 128 $\mu\text{g/ml}$ de fluconazol (Tabla 52 y Figura 54).

Tabla 52. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida metapsilosis* tratados con fluconazol

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos por hora					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	104 (100)	104 (100)	91 (88)	61 (59)	40 (38)	11 (11)
Fluconazol 32 $\mu\text{g/ml}$	114 (100)	114 (100)	106 (93)	73 (64)	60 (53)	47 (41)
Fluconazol 64 $\mu\text{g/ml}$	100 (100)	100 (100)	94 (94)	77 (77)	60 (60)	47 (47)
Fluconazol 128 $\mu\text{g/ml}$	100 (100)	100 (100)	93 (93)	75 (75)	68 (68)	55 (55)

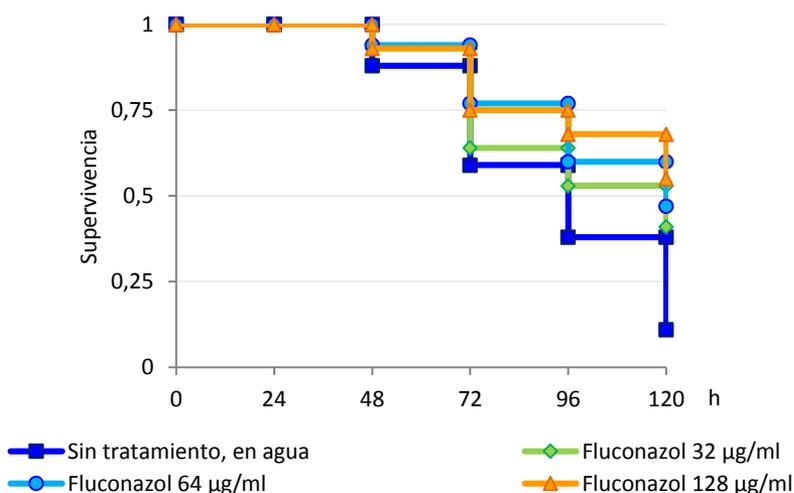


Figura 54. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida metapsilosis* tratados con fluconazol y sin tratar.

7.5.2.2 Posaconazol

El tratamiento con 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$ de posaconazol aumentó significativamente la supervivencia de los nematodos infectados con *Candida metapsilosis*, ($p = 6,6 \times 10^{-11}$ y $5,6 \times 10^{-14}$, respectivamente). En ambos casos, la mediana estimada de supervivencia aumentó a más de 120 h y los porcentajes de supervivientes llegaron al 55 y 64% al final del tratamiento, siendo la diferencias entre ambas proporciones no significativas ($p = 0,20$) (Tabla 53 y Figura 55).

Tabla 53. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida metapsilosis* tratados con posaconazol.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	122 (100)	122 (100)	83 (68)	54 (44)	36 (30)	14 (11)
Posaconazol (1 $\mu\text{g/ml}$)	97 (100)	97 (100)	85 (88)	72 (74)	57 (59)	53 (55)
Posaconazol (2 $\mu\text{g/ml}$)	99 (100)	98 (99)	90 (91)	68 (69)	65 (66)	63 (64)

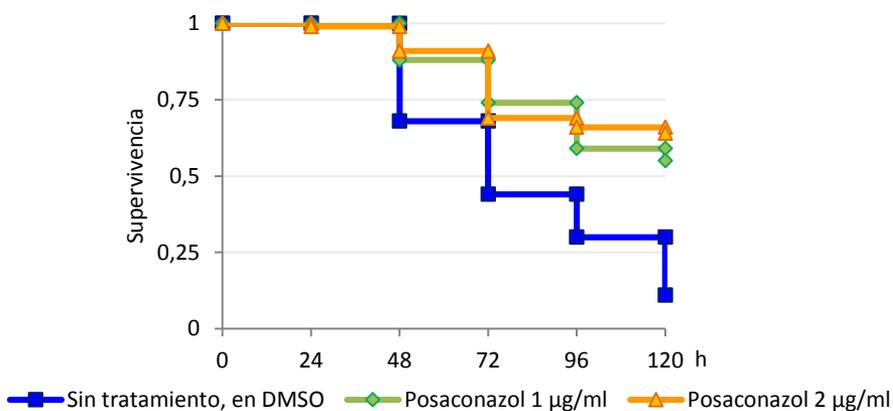


Figura 55. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida metapsilosis* tratados con posaconazol y sin tratar.

7.5.2.3 Voriconazol

Los tratamientos con 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$ de voriconazol, aumentaron significativamente la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* infectados con *Candida metapsilosis* ($p = 2 \times 10^{-8}$ y $3,2 \times 10^{-13}$, respectivamente). A la concentración más baja, la mediana estimada de supervivencia llegó a 120 h, mientras que a 2 $\mu\text{g/ml}$ fue mayor, permaneciendo un 46 y 58% de los nematodos vivos al final del estudio, respectivamente (Tabla 54, Figura 56).

Tabla 54. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida metapsilosis* tratados con voriconazol.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	122 (100)	122 (100)	83 (68)	54 (44)	36 (30)	14 (11)
Voriconazol (1 $\mu\text{g/ml}$)	95 (100)	95 (100)	81 (85)	67 (71)	55 (58)	44 (46)
Voriconazol (2 $\mu\text{g/ml}$)	101 (100)	101 (100)	93 (92)	74 (73)	66 (65)	59 (58)

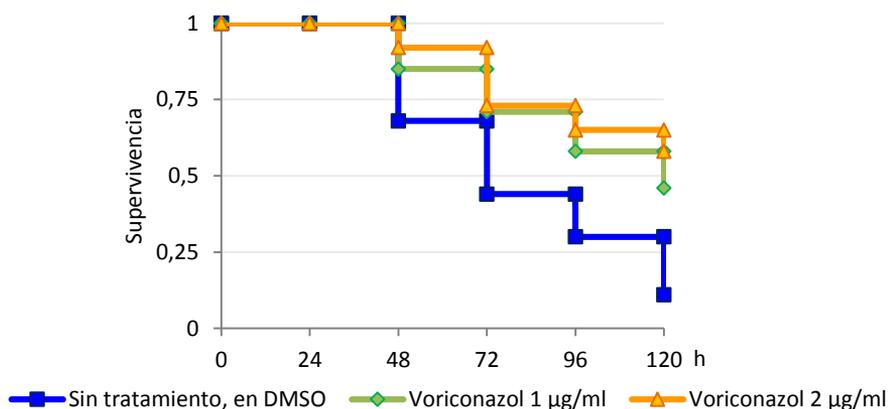


Figura 56. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida metapsilosis* tratados con voriconazol y sin tratar.

7.5.3 Equinocandinas

7.5.3.1 Anidulafungina

El tratamiento con 4 µg/ml de anidulafungina aumentó significativamente la supervivencia de los nematodos infectados con *Candida metapsilosis* ($p = 1,9 \times 10^{-7}$). Además, la mediana estimada de supervivencia aumentó de 72 h en los no tratados a 120 h, mientras que el porcentaje de supervivientes al final del estudio alcanzó el 49% (Tabla 55 y Figura 57).

Tabla 55. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida metapsilosis* tratados con anidulafungina.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	122 (100)	122 (100)	83 (68)	54 (44)	36 (30)	14 (11)
Anidulafungina (4 µg/ml)	96 (100)	96 (100)	80 (83)	55 (57)	49 (51)	47 (49)

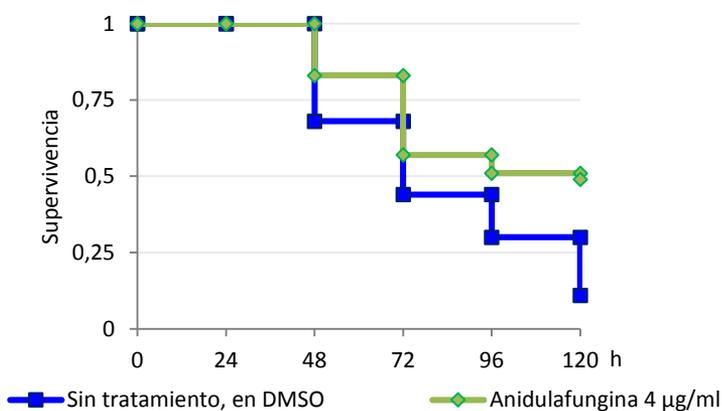


Figura 57. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida metapsilosis* tratados con anidulafungina y sin tratar.

7.5.3.2 Caspofungina

El tratamiento con 4 µg/ml de caspofungina no mostró un aumento significativo de la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* infectados con *Candida metapsilosis* ($p = 0,08$); tampoco aumentó la mediana estimada de supervivencia respecto a los nematodos no tratados, que se mantuvo en 96 h. En cambio, el tratamiento con 8 µg/ml de caspofungina mejoró significativamente la supervivencia ($p = 1,1 \times 10^{-6}$), mostrando además un aumento de la mediana estimada de supervivencia a 120 h. A las concentraciones estudiadas, la proporción de nematodos supervivientes al final del estudio fue de 36 y 40% respectivamente, no objetivándose diferencias estadísticamente significativas entre ambos ($p = 0,227$) (Tabla 56 y Figura 58).

Tabla 56. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida metapsilosis* tratados con caspofungina.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	104 (100)	104 (100)	91 (88)	61 (59)	40 (38)	11 (11)
Caspofungina (4 µg/ml)	101 (100)	101 (100)	87 (86)	63 (62)	45 (45)	36 (36)
Caspofungina (8 µg/ml)	138 (100)	138 (100)	128 (93)	102 (74)	84 (61)	55 (40)

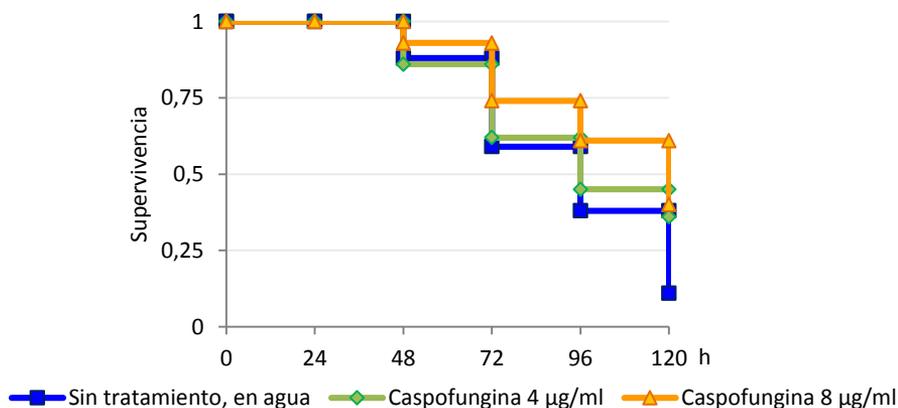


Figura 58. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida metapsilosis* tratados con caspofungina y sin tratar.

7.5.3.3 Micafungina

Los tratamientos con 4 y 8 $\mu\text{g/ml}$ de micafungina aumentaron significativamente la supervivencia de los nematodos infectados con *Candida metapsilosis* ($p = 8 \times 10^{-4}$ y $1,5 \times 10^{-6}$, respectivamente), con 31 y 47% de supervivencia al final del estudio. Ambos tratamientos aumentaron la mediana estimada de supervivencia de los nematodos de 96 h en los no tratados, hasta las 120 h (Tabla 57 y Figura 59).

Tabla 57. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida metapsilosis* tratados con micafungina.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	104 (100)	104 (100)	91 (88)	61 (59)	40 (38)	11 (11)
Micafungina (4 $\mu\text{g/ml}$)	118 (100)	118 (100)	113 (96)	80 (68)	61 (52)	36 (31)
Micafungina (8 $\mu\text{g/ml}$)	107 (100)	107 (100)	96(90)	76 (71)	61 (57)	50 (47)

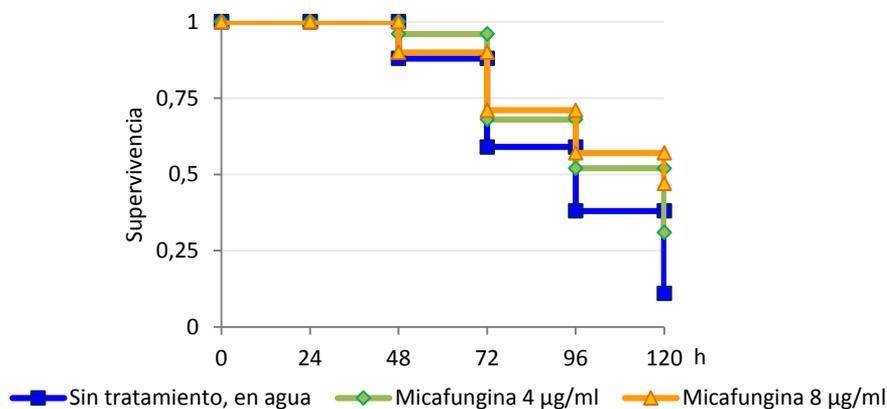


Figura 59. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida metapsilosis* tratados con micafungina y sin tratar.

Tabla 58. Resumen de los resultados obtenidos con los tratamientos de *Caenorhabditis elegans* infectados con *Candida metapsilosis*.

<i>Candida metapsilosis</i> ATCC 96143		Medio de incubación	Mediana estimada supervivencia (h)	Nematodos vivos 120 h (%)
		En agua	96	11
		En DMSO	72	11

Tratamiento	Concentración (µg/ml)	Mediana estimada supervivencia (h)	Nematodos vivos 120 h (%)	Valor p
Anfotericina B	1	96	41	0,000
	2	96	35	0,000
Fluconazol	32	120	41	0,000
	64	120	47	0,000
	128	>120	55	0,000
Posaconazol	1	>120	55	0,000
	2	>120	64	0,000
Voriconazol	1	120	46	0,000
	2	>120	58	0,000
Anidulafungina	4	96	49	0,000
Caspofungina	4	120	36	0,080
	8	96	40	0,000
Micafungina	4	120	31	0,001
	8	120	47	0,000

En la parte superior se indican los resultados en los nematodos que no recibieron tratamiento y en la parte inferior los resultados obtenidos con los diferentes tratamientos. Los resultados de los nematodos que fueron incubados en un medio sin DMSO (tanto sin tratamiento como con él) se indican en fondo blanco y los que estuvieron en presencia del solvente, en fondo gris.

7.6 Tratamiento antifúngico de la candidiasis experimental por *Candida orthopsilosis*

7.6.1 Anfotericina B

Los tratamientos con 1 y 2 µg/ml de anfotericina B aumentaron significativamente la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* infectados con *Candida orthopsilosis* ($p = 1,7 \times 10^{-9}$ y $4,3 \times 10^{-15}$, respectivamente), con una mediana estimada de supervivencia mayor de 120 h en ambos casos. A la concentración más baja, el 52% de los nematodos permaneció vivo a las 120 h, mientras que a la mayor concentración de anfotericina B la proporción de nematodos vivos fue del 63%. Esta diferencia no fue significativa ($p = 0,109$) (Tabla 59 y Figura 60).

Tabla 59. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida orthopsilosis* tratados con anfotericina B.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	124 (100)	124 (100)	92 (74)	64 (52)	34 (27)	13 (10)
Anfotericina B (1 µg/ml)	122 (100)	122 (100)	98 (80)	77 (63)	71 (58)	64 (52)
Anfotericina B (2 µg/ml)	123 (100)	122 (99)	105 (85)	87 (71)	86 (70)	77 (63)

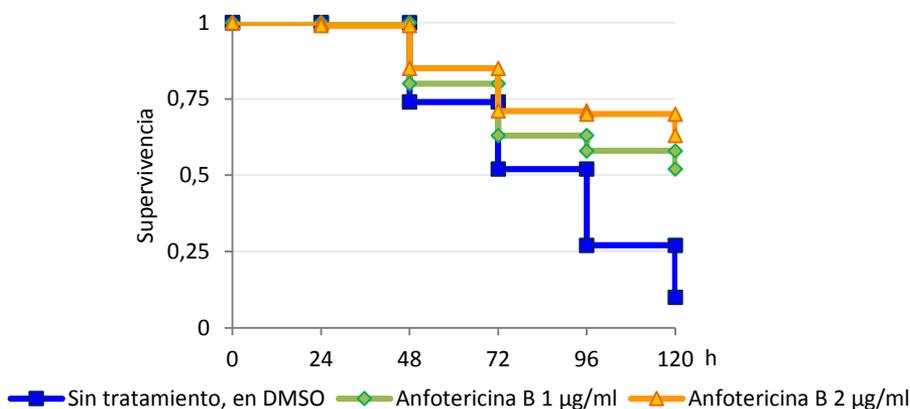


Figura 60. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida orthopsilosis* tratados con anfotericina B y sin tratar.

7.6.2 Azoles

7.6.2.1 Fluconazol

El tratamiento de la infección invasiva por *Candida orthopsilosis* con fluconazol a cualquiera de las tres concentraciones ensayadas (32, 64 y 128 µg/ml), aumentó significativamente la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* ($p = 1,6 \times 10^{-5}$, $2,6 \times 10^{-8}$ y $3,6 \times 10^{-11}$, respectivamente). Los porcentajes de *Caenorhabditis elegans* vivos a las 120 h fueron 38, 45 y 59%, mientras que la mediana estimada de supervivencia fue de 120 h para los tratados con las concentraciones más bajas del fármaco y de más de 120 h para el tratamiento con 128 µg/ml de fluconazol (Tabla 60 y Figura 61).

Tabla 60. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida orthopsilosis* tratados con fluconazol.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	236 (100)	236 (100)	211 (89)	134 (57)	91 (39)	50 (21)
Fluconazol (32 µg/ml)	204 (100)	203 (100)	186 (91)	153 (75)	106 (52)	78 (38)
Fluconazol (64 µg/ml)	123 (100)	123 (100)	121 (98)	101 (82)	86 (70)	55 (45)
Fluconazol (128 µg/ml)	128 (100)	128 (100)	119 (93)	95 (74)	88 (69)	75 (59)

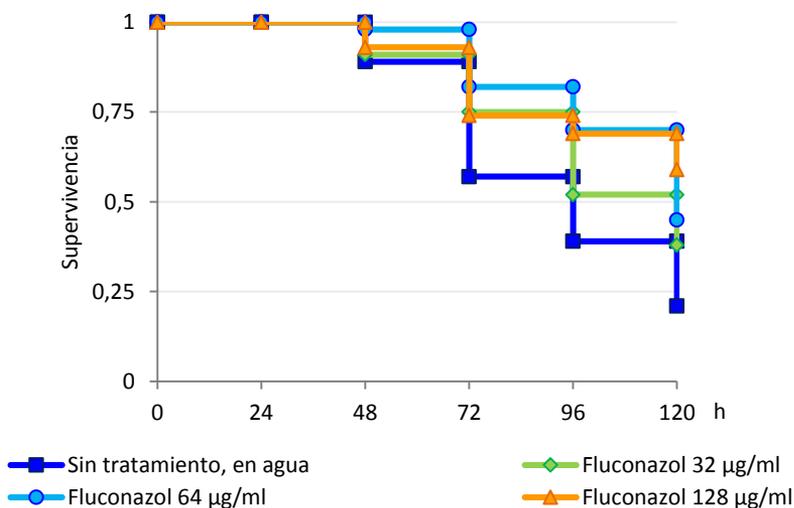


Figura 61. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida orthopsilosis* tratados con fluconazol y sin tratar.

7.6.2.2 Posaconazol

Después de ser infectados con *Candida orthopsilosis*, los nematodos tratados con 1 y 2 µg/ml de posaconazol aumentaron significativamente su supervivencia ($p = 2,1 \times 10^{-13}$ y $9,4 \times 10^{-20}$, respectivamente). El posaconazol a ambas concentraciones aumentó la mediana estimada de supervivencia a más de 120 h, alcanzando un 60 y 65% respectivamente de supervivencia al final del estudio (Tabla 61 y Figura 62).

Tabla 61. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida orthopsilosis* tratados con posaconazol.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	124 (100)	124 (100)	92 (74)	64 (52)	34 (27)	13 (10)
Posaconazol (1 µg/ml)	122 (100)	122 (100)	104 (85)	84 (69)	80 (66)	73 (60)
Posaconazol (2 µg/ml)	126 (100)	126 (100)	122 (97)	101 (80)	93 (74)	82 (65)

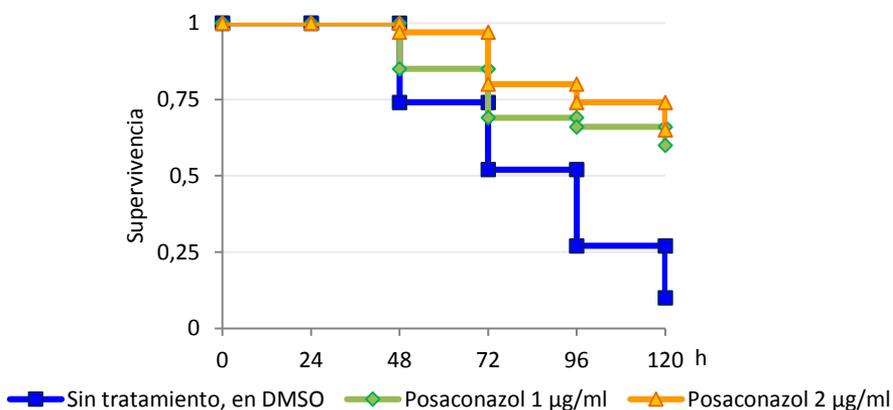


Figura 62. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida orthopsilosis* tratados con posaconazol y sin tratar.

7.6.2.3 Voriconazol

Con independencia de la concentración escogida, ambos tratamientos con voriconazol (1 $\mu\text{g/ml}$ y 2 $\mu\text{g/ml}$) aumentaron significativamente la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* infectados con *Candida orthopsilosis* ($p = 7,1 \times 10^{-13}$ y $5,6 \times 10^{-28}$, respectivamente). Aunque ambas concentraciones aumentaron la mediana estimada de supervivencia a más de 120 h, se constató una diferencia estadísticamente significativa entre la proporción de nematodos vivos a las 120 h, dependiente de la concentración de voriconazol en el medio, que en porcentaje es 60 y 73% respectivamente ($p = 0,0162$) (Tabla 62 y Figura 63).

Tabla 62. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida orthopsilosis* tratados con voriconazol.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	124 (100)	124 (100)	92 (74)	64 (52)	34 (27)	13 (10)
Voriconazol (1 $\mu\text{g/ml}$)	141 (100)	141 (100)	134 (95)	115 (82)	103 (73)	84 (60)
Voriconazol (2 $\mu\text{g/ml}$)	138 (100)	138 (100)	137 (99)	120 (87)	115 (83)	101 (73)

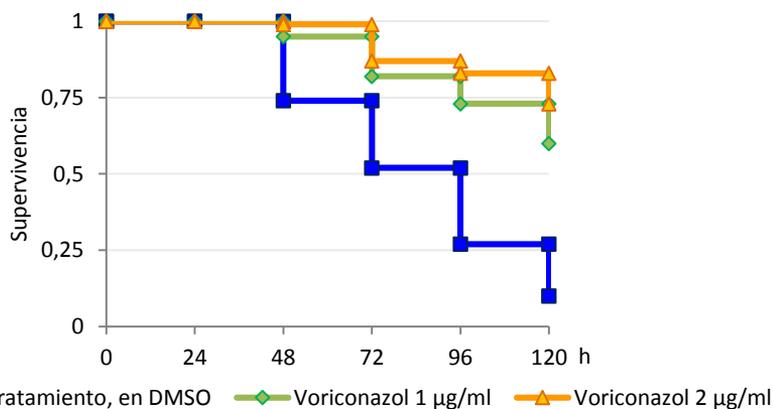


Figura 63. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida orthopsilosis* tratados con voriconazol y sin tratar.

7.6.3 Equinocandinas

7.6.3.1 Anidulafungina

El tratamiento con 4 µg/ml de anidulafungina no mejoró la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* infectados con *Candida orthopsilosis* ($p = 0,717$), ni la mediana estimada de supervivencia, que en los nematodos que recibieron tratamiento antifúngico, fue de 72 h, mientras que en los no tratados llegó a las 96 h. Entre los nematodos que recibieron dicho tratamiento antifúngico, el porcentaje de supervivientes al final del estudio alcanzó el 35% (Tabla 63 y Figura 64).

Tabla 63. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida orthopsilosis* tratados con anidulafungina.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	124 (100)	124 (100)	92 (74)	64 (52)	34 (27)	13 (10)
Anidulafungina (4 µg/ml)	120 (100)	120 (100)	73 (61)	55 (46)	50 (42)	42 (35)

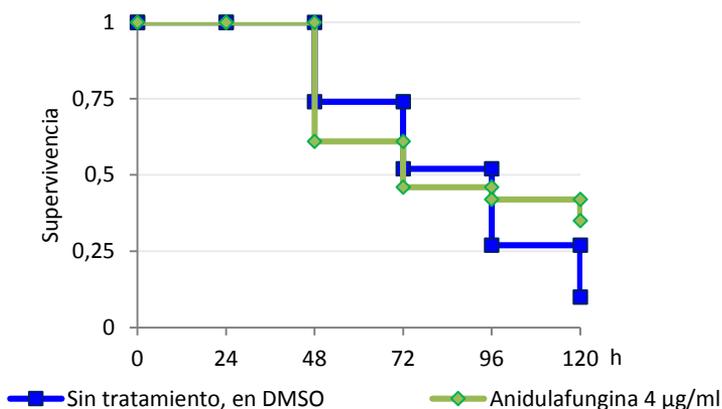


Figura 64. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida orthopsilosis* tratados con anidulafungina y sin tratar.

7.6.3.2 Caspofungina

Los tratamientos con 4 y 8 µg/ml de caspofungina aumentaron significativamente la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* infectados con *Candida orthopsilosis* ($p = 1,5 \times 10^{-3}$ y $1,3 \times 10^{-6}$, respectivamente). En ambos casos, la mediana estimada de supervivencia aumentó a 120 h, respecto a las 96 h estimadas en los no tratados y los porcentajes de nematodos supervivientes al final del estudio fueron del 39 y 38%, respectivamente (Tabla 64 y Figura 65).

Tabla 64. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida orthopsilosis* tratados con caspofungina.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	236 (100)	236 (100)	211 (89)	134 (57)	91 (39)	50 (21)
Caspofungina (4 µg/ml)	123 (100)	122 (99)	107 (87)	85 (69)	75 (61)	48 (39)
Caspofungina (8 µg/ml)	216 (100)	215 (99)	197 (91)	165(76)	137 (63)	82 (38)

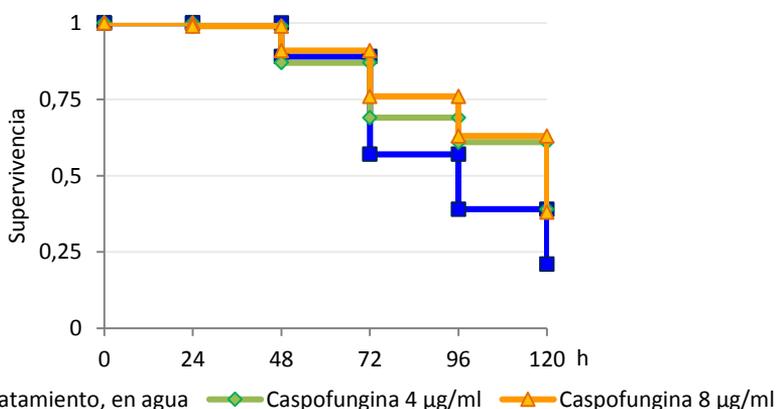


Figura 65. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida orthopsilosis* tratados con caspofungina y sin tratar.

7.6.3.3 Micafungina

Los tratamientos con 4 y 8 µg/ml de micafungina aumentaron significativamente la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* que habían sido infectados con *Candida orthopsilosis* ($p = 3,9 \times 10^{-4}$ y $2,3 \times 10^{-10}$, respectivamente), con 59 y 56% de nematodos vivos al final del estudio. Ambos tratamientos también aumentaron la mediana estimada de supervivencia de los nematodos de 96 h en el grupo control, hasta más de 120 h en ambos grupos de tratamiento (Tabla 65 y Figura 66).

Tabla 65. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida orthopsilosis* tratados con micafungina.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	236 (100)	236 (100)	211 (89)	134 (57)	91 (39)	50 (21)
Micafungina (4 µg/ml)	122 (100)	122 (100)	114 (93)	94 (77)	84 (69)	72 (59)
Micafungina (8 µg/ml)	118 (100)	118 (100)	110 (93)	95 (81)	82 (69)	66 (56)

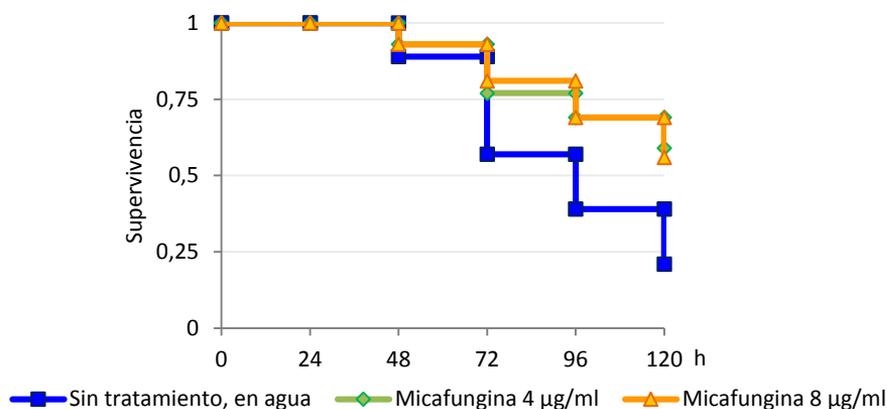


Figura 66. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida orthopsilosis* tratados con micafungina y sin tratar.

Tabla 66. Resumen de los resultados obtenidos con los tratamientos de *Caenorhabditis elegans* infectados con *Candida orthopsilosis*.

<i>Candida orthopsilosis</i> ATCC 96139		Medio de incubación	Mediana estimada supervivencia (h)	Nematodos vivos 120 h (%)
		En agua	96	21
		En DMSO	96	10

Tratamiento	Concentración (µg/ml)	Mediana estimada supervivencia (h)	Nematodos vivos 120 h (%)	Valor p
Anfotericina B	1	>120	52	0,000
	2	>120	63	0,000
Fluconazol	32	120	38	0,000
	64	120	45	0,000
	128	>120	59	0,000
Posaconazol	1	>120	60	0,000
	2	>120	65	0,000
Voriconazol	1	>120	60	0,000
	2	>120	73	0,000
Anidulafungina	4	72	35	0,010
Caspofungina	4	120	39	0,001
	8	120	38	0,000
Micafungina	4	>120	59	0,000
	8	>120	56	0,000

En la parte superior se indican los resultados en los nematodos que no recibieron tratamiento y en la parte inferior los resultados obtenidos con los diferentes tratamientos. Los resultados de los nematodos que fueron incubados en un medio sin DMSO (tanto sin tratamiento como con él) se indican en fondo blanco y los que estuvieron en presencia del solvente, en fondo gris.

7.7 Tratamiento antifúngico de la candidiasis experimental por *Candida parapsilosis*

7.7.1 Anfotericina B

El tratamiento con 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$ de anfotericina B aumentó significativamente la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* infectados con *Candida parapsilosis* ($p = 6,6 \times 10^{-27}$ y $4,2 \times 10^{-15}$, respectivamente). Se observó un aumento de la mediana estimada de supervivencia a más de 120 h y diferencias significativas entre ambas pautas de tratamiento en la proporción de nematodos vivos a tiempo final, un 68% con 1 $\mu\text{g/ml}$ y 80% con 2 $\mu\text{g/ml}$ de anfotericina B ($p = 0,0292$) (Tabla y Figura 67).

Tabla 67. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida parapsilosis* tratados con anfotericina B.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	124 (100)	124 (100)	81 (65)	60 (48)	36 (29)	16 (13)
Anfotericina B (1 $\mu\text{g/ml}$)	127 (100)	127 (100)	111 (87)	99 (78)	92 (72)	86 (68)
Anfotericina B (2 $\mu\text{g/ml}$)	124 (100)	124 (100)	115 (93)	107 (86)	103 (83)	99 (80)

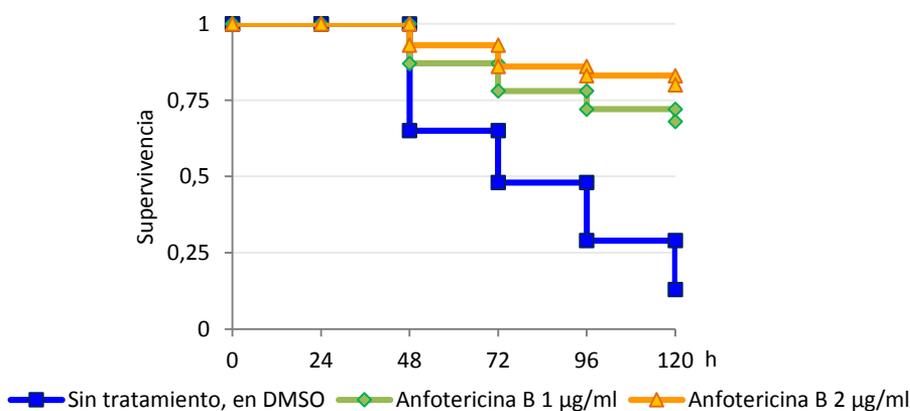


Figura 67. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida parapsilosis* tratados con anfotericina B y sin tratar.

7.7.2 Azoles

7.7.2.1 Fluconazol

Con independencia de la concentración de fluconazol (32, 64 y 128 µg/ml) empleada como tratamiento, se constató un aumento significativo de la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* infectados con *Candida parapsilosis* ($p = 2,1 \times 10^{-15}$, $4,2 \times 10^{-18}$ y $3,2 \times 10^{-21}$, respectivamente). Los porcentajes de supervivencia al final del estudio fueron 87, 92 y 95% para cada una de las pautas terapéuticas, mientras que la mediana estimada de supervivencia fue mayor de 120 h (Tabla y Figura 68).

Tabla 68. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida parapsilosis* tratados con fluconazol.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	189 (100)	189 (100)	171 (90)	144 (76)	118 (62)	77 (41)
Fluconazol (32 µg/ml)	122 (100)	122 (100)	122 (100)	119 (98)	112 (92)	106 (87)
Fluconazol (64 µg/ml)	118 (100)	118 (100)	117 (99)	117 (99)	113 (96)	108 (92)
Fluconazol (128 µg/ml)	123 (100)	123 (100)	123 (100)	121 (98)	120 (98)	117 (95)

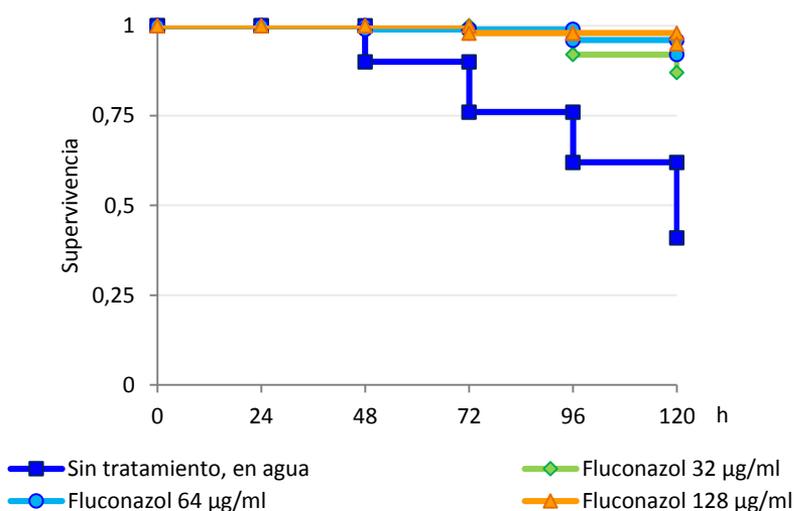


Figura 68. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida parapsilosis* tratados con fluconazol y sin tratar.

7.7.2.2 Posaconazol

Después de ser infectados con *Candida parapsilosis*, los nematodos tratados con 1 y 2 µg/ml de posaconazol, aumentaron de manera significativa su supervivencia ($p = 8,7 \times 10^{-19}$ y $2,3 \times 10^{-29}$, respectivamente). El tratamiento con posaconazol aumentó la mediana estimada de supervivencia a más de 120 h con diferencias significativas en los porcentajes de nematodos vivos al finalizar el experimento, resultando de 67 y 81% respectivamente ($p = 0,0137$) (Tabla y Figura 69).

Tabla 69. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida parapsilosis* tratados con posaconazol.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	124 (100)	124 (100)	81 (65)	60 (48)	36 (29)	16 (13)
Posaconazol (1 µg/ml)	125 (100)	125 (100)	116 (93)	102 (82)	90 (72)	84 (67)
Posaconazol (2 µg/ml)	121 (100)	121 (100)	121 (100)	113 (93)	103 (85)	98 (81)

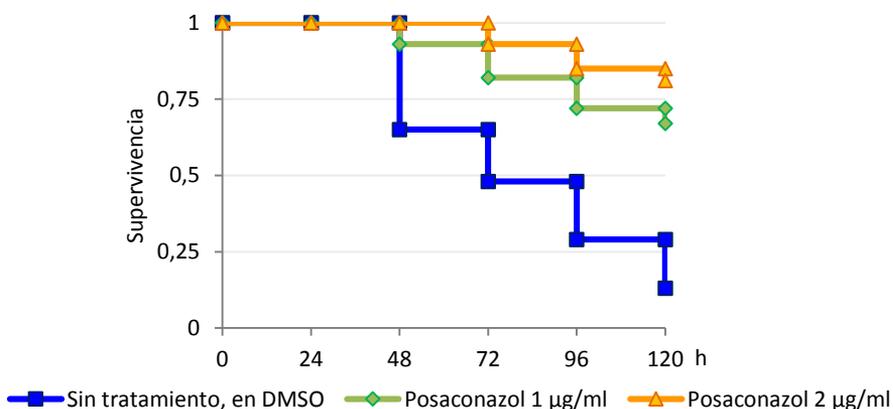


Figura 69. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida parapsilosis* tratados con posaconazol y sin tratar.

7.7.2.3 Voriconazol

Los tratamientos con 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$ de voriconazol aumentaron significativamente la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* infectados con *Candida parapsilosis* ($p = 3,8 \times 10^{-23}$ y $1,6 \times 10^{-22}$, respectivamente). Ambas concentraciones aumentaron la mediana estimada de supervivencia a más de 120 h, con 72% y 68% de nematodos vivos al final del estudio (Tabla y Figura 70).

Tabla 70. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida parapsilosis* tratados con voriconazol.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	124 (100)	124 (100)	81 (65)	60 (48)	36 (29)	16 (13)
Voriconazol (1 $\mu\text{g/ml}$)	120 (100)	120 (100)	116 (97)	106 (88)	98 (82)	86 (72)
Voriconazol (2 $\mu\text{g/ml}$)	126 (100)	126 (100)	123 (98)	112 (89)	101 (80)	86 (68)

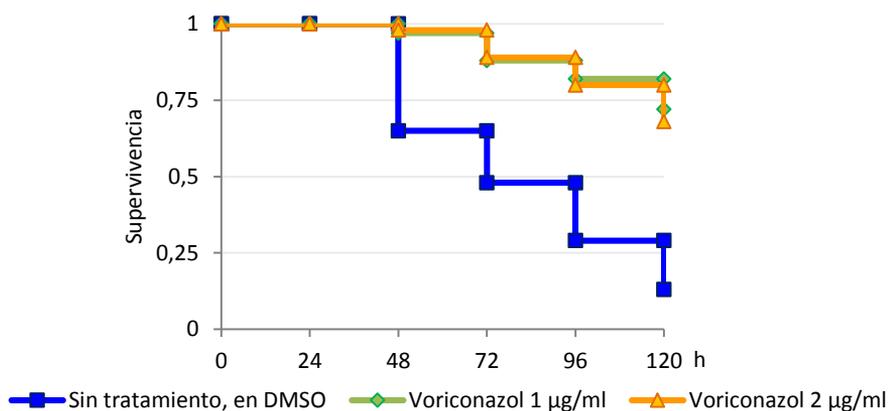


Figura 70. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida parapsilosis* tratados con voriconazol y sin tratar.

7.7.3 Equinocandinas

7.7.3.1 Anidulafungina

El tratamiento con 4 µg/ml de anidulafungina aumentó significativamente la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* infectados con *Candida parapsilosis* ($p = 4,8 \times 10^{-23}$). El tratamiento antifúngico también aumentó la mediana estimada de supervivencia a más de 120 h y el porcentaje de supervivientes al final del estudio, que alcanzó el 78% (Tabla y Figura 71).

Tabla 71. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida parapsilosis* tratados con anidulafungina.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	124 (100)	124 (100)	81 (65)	60 (48)	36 (29)	16 (13)
Anidulafungina (4 µg/ml)	120 (100)	120 (100)	102 (85)	98 (82)	96 (80)	94 (78)

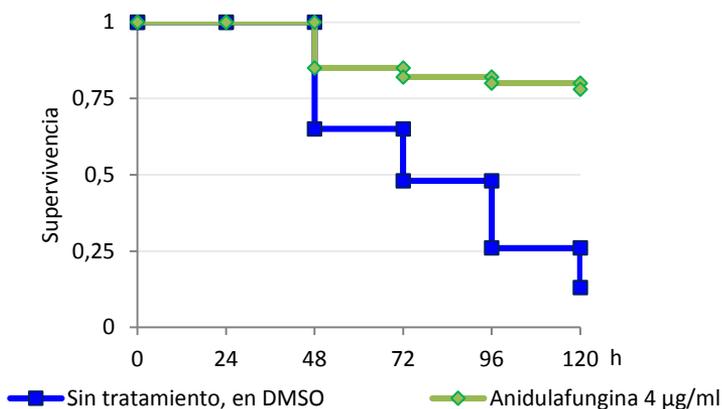


Figura 71. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida parapsilosis* tratados con anidulafungina y sin tratar.

7.7.3.2 Caspofungina

El tratamiento con 4 µg/ml de caspofungina aumentó significativamente la supervivencia de los nematodos infectados con *Candida parapsilosis* ($p = 7,2 \times 10^{-4}$), además de un ligero aumento a más de 120 h de la mediana de supervivencia estimada y alcanzando un 60% de la población de nematodos vivos al final del estudio. Sin embargo, cuando se aplicó un tratamiento con 8 µg/ml de caspofungina, no se observó aumento en la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* respecto al grupo control ($p = 0,799$), manteniéndose la mediana estimada de supervivencia en 120 h tanto en el grupo con tratamiento antifúngico, como en el grupo control. Además, comparando las proporciones de nematodos vivos a tiempo final, se observó que en el grupo de *Caenorhabditis elegans* tratado con 8 µg/ml de caspofungina fue del 44% mientras que en el grupo control se observó una proporción del 41% (Tabla y Figura 72).

Tabla 72. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida parapsilosis* tratados con caspofungina.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	189 (100)	189 (100)	171 (90)	144 (76)	118 (62)	77 (41)
Caspofungina (4 µg/ml)	130 (100)	129 (99)	121 (93)	115 (88)	98 (75)	78 (60)
Caspofungina (8 µg/ml)	136 (100)	136 (100)	123 (90)	101 (74)	85 (73)	60 (44)

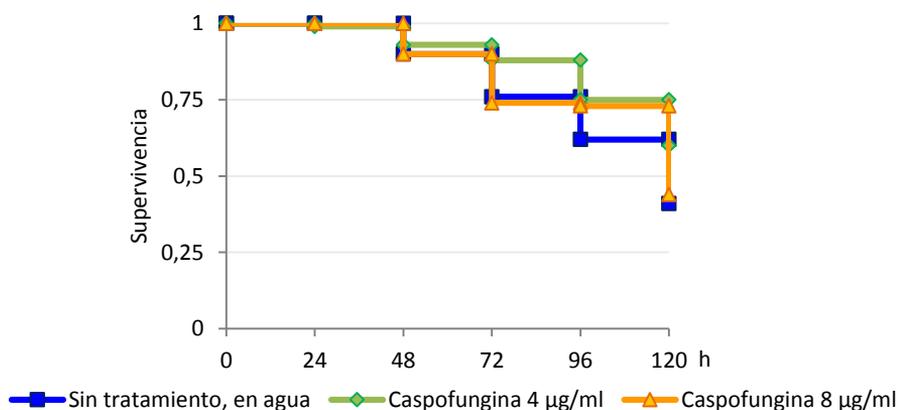


Figura 72. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida parapsilosis* tratados con caspofungina y sin tratar.

7.7.3.3 Micafungina

Los tratamientos con 4 y 8 µg/ml de micafungina, aumentaron significativamente la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* infectados con *Candida parapsilosis* ($p = 2,8 \times 10^{-15}$ y $8,5 \times 10^{-11}$, respectivamente), con 88 y 81% de supervivencia al final del estudio. Ambos tratamientos también aumentaron la mediana estimada de supervivencia a más de 120 h en los grupos que recibieron tratamiento con micafungina, en comparación con las 96 h del grupo de nematodos que no recibió tratamiento (Tabla y Figura 73).

Tabla 73. Supervivencia de los nematodos infectados con *Candida parapsilosis* tratados con micafungina.

Tratamiento	N (%) de nematodos vivos por hora					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Sin tratamiento	189 (100)	189 (100)	171 (90)	144 (76)	118 (62)	77 (41)
Micafungina (4 µg/ml)	117 (100)	117 (100)	113 (97)	113 (97)	108 (92)	103 (88)
Micafungina (8 µg/ml)	125 (100)	125 (100)	114 (91)	112 (90)	105 (84)	101 (81)

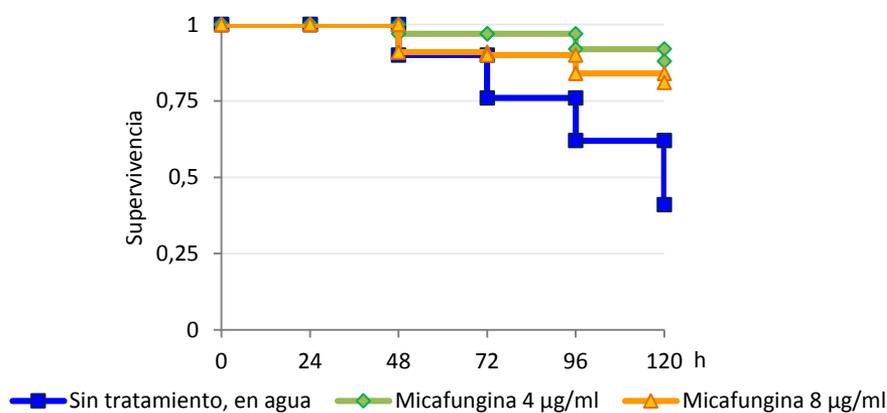


Figura 73. Curvas de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida parapsilosis* tratados con micafungina y sin tratar.

Tabla 74. Resumen de los resultados obtenidos con los tratamientos de *Caenorhabditis elegans* infectados con *Candida parapsilosis*.

<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019		Medio de incubación	Mediana estimada supervivencia (h)	Nematodos vivos 120 h (%)
		En agua	120	41
		En DMSO	72	13

Tratamiento	Concentración (µg/ml)	Mediana estimada supervivencia (h)	Nematodos vivos 120 h (%)	Valor p
Anfotericina B	1	>120	68	0,000
	2	>120	80	0,000
Fluconazol	32	>120	87	0,000
	64	>120	92	0,000
	128	>120	95	0,000
Posaconazol	1	>120	67	0,000
	2	>120	81	0,000
Voriconazol	1	>120	72	0,000
	2	>120	68	0,000
Anidulafungina	4	>120	78	0,000
Caspofungina	4	>120	60	0,000
	8	120	44	0,799
Micafungina	4	>120	88	0,000
	8	>120	81	0,000

En la parte superior se indican los resultados en los nematodos que no recibieron tratamiento y en la parte inferior los resultados obtenidos con los diferentes tratamientos. Los resultados de los nematodos que fueron incubados en un medio sin DMSO (tanto sin tratamiento como con él) se indican en fondo blanco y los que estuvieron en presencia del solvente, en fondo gris.

7.8 Toxicidad de los fármacos antifúngicos sobre *Caenorhabditis elegans*

La supervivencia a las 120 h de los nematodos que no fueron infectados con *Candida* y que recibieron tratamiento antifúngico no mostró variación estadísticamente significativa respecto de aquellos nematodos que no recibieron ningún tipo de intervención, tanto en los disueltos en agua como en los disueltos en DMSO ($p > 0,05$) (Tabla 75).

Tabla 75. Supervivencia de los nematodos en presencia de fármacos antifúngicos

Compuesto	Concentración (µg/ml)	Supervivencia 120 h (%)	Valor p
Anfotericina B	1	93	0,632
	2	92	0,896
Fluconazol	32	100	0,080
	64	96	0,638
	128	98	0,261
Posaconazol	1	97	0,210
	2	85	0,404
Voriconazol	1	96	0,247
	2	95	0,455
Anidulafungina	4	89	0,763
Caspofungina	4	93	0,966
	8	91	0,679
Micafungina	4	92	0,724
	8	98	0,311
Agua		93	
DMSO		91	

DISCUSIÓN

1. Candidiasis y modelos experimentales para su estudio

La incidencia de IFI ha aumentado debido principalmente al creciente número de pacientes que están sometidos a múltiples maniobras diagnósticas y terapéuticas, a tratamiento con fármacos antibacterianos de amplio espectro, antivirales, antineoplásicos, etc. y de aquellos que necesitan el uso de catéteres u otros dispositivos intravasculares [Ortega et al. 2011; Sardi et al. 2013]. La candidiasis invasora es una enfermedad grave y difícil de diagnosticar con las pruebas microbiológicas tradicionales. Es clínicamente inespecífica, con síntomas y signos clínicos que suelen ser de aparición tardía o estar ausentes, mientras que en un porcentaje no despreciable de enfermos graves el diagnóstico de la candidiasis invasora se realiza postmortem. En una UCI general, cerca del 15-20% de las IFI se manifiestan como candidemia [Borges-Sa y Aranda-Pérez 2012]. En el estudio ENVIN-HELICS del año 2013, los aislamientos fúngicos representaron el 11% de los aislamientos totales, por detrás de los bacilos gramnegativos (57,6%) y de los cocos grampositivos (30,6%), con *Candida albicans* ocupando el séptimo lugar de los patógenos más frecuentemente aislados, una vez excluidas las bacteriemias secundarias a otros focos (5,4% del total) [Sociedad Española de Medicina Intensiva Crítica y Unidades Coronarias (SEMICYUC) Grupo de Trabajo de Enfermedades Infecciosas 2014]. Las candidemias son la presentación clínica más frecuente de IFI y las especies distintas de *Candida albicans* muestran una prevalencia cada vez mayor [Cisterna et al. 2010; Cornistein et al. 2013; Pemán y Salavert 2012; Puig-Asensio et al. 2014]. Varias especies de *Candida* están entre las cinco causas más frecuentes de infecciones fúngicas [Sociedad Española de Medicina Intensiva Crítica y Unidades Coronarias (SEMICYUC) Grupo de Trabajo de Enfermedades Infecciosas 2014] y además cursan con una mortalidad global elevada, ya sea por las graves enfermedades previas, como por la acción patógena directa de *Candida* [Pemán y Salavert 2012; Perloth et al. 2007; Quindós 2014]. La epidemiología de las candidiasis invasoras ha ido variando y muchas especies de *Candida* muestran resistencia al fluconazol y otros triazoles y, en menor frecuencia, a las equinocandinas. Los aislamientos más frecuentes de especies diferentes de *Candida albicans* pertenecen a las especies *Candida parapsilosis* (asociada a recién nacidos, niños y adultos jóvenes que reciben nutrición parenteral en Europa, mientras que en América Latina se aísla de pacientes de cualquier edad) y *Candida glabrata* (principalmente en pacientes con neoplasias hematológicas y ancianos), seguidas de *Candida tropicalis*, *Candida krusei* y *Candida guilliermondii*. Estas últimas causan candidiasis invasoras en pacientes de edad avanzada o se asocian con cirugía abdominal reciente, tumores sólidos, trasplantes de órganos y/o tratamiento prolongado con corticoides [Nucci et al. 2013; Puig-Asensio et al. 2014; Quindós 2014].

Se han encontrado diferencias geográficas en la distribución de las especies emergentes de *Candida* que causan candidiasis invasora. En Australia, América Latina y los países

mediterráneos de África, Asia y Europa, *Candida parapsilosis* es la primera o segunda causa de candidiasis invasora. En cambio, en EEUU y Europa central y del norte, *Candida glabrata* se aísla con más frecuencia [Quindós 2014]. En España casi la mitad de las candidemias están causadas por especies emergentes y su alta mortalidad hace indudable la importancia de caracterizar sus mecanismos de virulencia y evaluar las formas de tratamiento más adecuados. La incidencia actual de la candidiasis invasora ha disminuido en Europa en los últimos años, siendo significativamente menor que en EEUU [Quindós 2014]. Sin embargo, en España la incidencia global de la candidiasis invasora es más alta que gran parte del continente europeo [Puig-Asensio et al. 2014]. En Latinoamérica existen importantes diferencias entre los distintos países en la incidencia global de candidiasis invasora o incluso entre los distintos centros hospitalarios de un mismo país. Existen factores que influyen en estas diferencias, como las características de los hospitales, las normas de profilaxis o el tratamiento empírico de los pacientes.

1.1 Modelos experimentales de candidiasis invasora

Para la mejor comprensión de las interacciones huésped-patógeno, es imprescindible realizar estudios de la historia natural de la infección en animales. Los modelos experimentales permiten establecer una infección y seguir su desarrollo desde el momento en que las células fúngicas se introducen en el huésped hasta que causan su muerte o son eliminadas, ya sea por el sistema inmune o por tratamientos antifúngicos. Un buen modelo debe ser reproducible, fácil de configurar y debe expresar los principales síntomas clínicos y lesiones orgánicas desarrollados en la enfermedad humana [Desalermos et al. 2012]. Si se cumplen estas condiciones, aumenta la validez externa del modelo y permite relacionar la virulencia de *Candida* en el modelo experimental con las candidiasis en seres humanos. Las normas éticas sobre experimentación animal tratan de refinar, reducir y reemplazar los modelos experimentales tradicionales y el empleo de modelos alternativos a los clásicamente utilizados con mamíferos es una necesidad importante.

La utilización del nematodo *Caenorhabditis elegans* permite realizar estudios de patogenicidad y evaluar el tratamiento antimicrobiano. El intestino es uno de los principales órganos de *Caenorhabditis elegans*; además de ser responsable de la síntesis y almacenamiento de macromoléculas, su función de digestión y asimilación de alimentos permite el estudio de los mecanismos de infección y colonización por *Candida* y otros microorganismos patógenos para el ser humano. La utilización del modelo de infección experimental en *Caenorhabditis elegans* es cada vez más frecuente, pese a la desventaja que supone su incapacidad de sobrevivir a temperaturas mayores de 30 °C o la imposibilidad de estudiar variables farmacocinéticas como la absorción y la distribución de los fármacos antifúngicos [Breger et al. 2007]. La facilidad de su manipulación y el bajo coste de su mantenimiento en laboratorio, junto con la disponibilidad de

cepas mutantes más susceptibles a la infección debido a su carencia de rutas de señalización involucradas en mecanismos de respuesta inmune, hacen de *Caenorhabditis elegans* un modelo ideal para estudios de cribado de agentes patógenos y de fármacos potencialmente útiles para el tratamiento de las infecciones que provocan [Glavis-Bloom et al. 2012; Scorzoni et al. 2013].

1.2 Progreso de la infección por *Candida*

Caenorhabditis elegans se alimenta de microorganismos en la naturaleza, en un entorno en que las barreras anatómicas y fisiológicas son efectivas para desintegrar a los microorganismos ingeridos; además, el peristaltismo intestinal, los péptidos antimicrobianos y los intermediarios reactivos de oxígeno evitan la infección. Por otra parte, *Caenorhabditis elegans* tiene la capacidad de no ingerir microorganismos potencialmente perjudiciales o disminuir la intensidad de su alimentación en presencia de ellos. Ooi y colaboradores consideran que esta respuesta posiblemente confiera al nematodo una ventaja para la supervivencia, ya que le proporcionaría el tiempo necesario para que el sistema inmune haga frente a los daños ocasionados por el consumo de microorganismos patógenos [Ooi et al. 2012].

En condiciones experimentales *Caenorhabditis elegans* es expuesto a agentes patógenos para el ser humano y que muchas veces son letales para el nematodo. En este trabajo de Tesis, los ensayos se realizaron mediante la transferencia de los nematodos desde un medio con un cultivo de la cepa OP50 de *Escherichia coli*, a otro medio con un cultivo de una especie de *Candida*. Una vez ingerida, *Candida* es capaz de adherirse y colonizar rápidamente los tejidos de *Caenorhabditis elegans*. En los ensayos iniciales observamos que exposiciones de 5 min a *Candida albicans* pueden causar una disminución significativa de la supervivencia de los nematodos. Cuando los adultos de *Caenorhabditis elegans* se transfieren a un medio líquido libre de *Candida*, no son capaces de eliminarla y las células de este hongo se reproducen y colonizan la faringe y el intestino. El sistema digestivo de *Caenorhabditis elegans* está compuesto por varios tejidos y tipos celulares con escasas conexiones con el resto del cuerpo, formando un tubo epitelial independiente separado por el espacio pseudocelómico. En la faringe hay células capaces de secretar enzimas digestivas y estructuras que tienen la función de filtrar y triturar los microorganismos ingeridos y de actuar como una válvula que regula el tráfico en un solo sentido hacia el intestino [McGhee 2007].

La transparencia del nematodo permite observar en las candidiasis experimentales que la colonización comienza con la invasión de la parte posterior de la faringe y de la zona proximal del intestino en un proceso favorecido por el menor contenido de agua, fundamental en los procesos de bombeo durante la ingestión y la digestión de los microorganismos. Un ambiente más denso como el que se encuentra en las placas de agar mientras *Caenorhabditis elegans* ingiere las levaduras, hace que disminuya la potencia del bombeo. Además, se ha observado que después de la infección se produce una disminución casi inmediata en las tasas de bombeo faríngeo, aumentando el tiempo entre un bombeo y otro [Ooi et al. 2012; Williams et al. 2004].

Esta ralentización si bien tiene el objetivo de ingerir menos cantidad de microorganismos, aumenta las posibilidades de adhesión de *Candida* a las células del nematodo. *Candida albicans* y *Candida krusei* desarrollaron hifas en el intestino antes de invadir los tejidos en los que provoca una alteración de su estructura y función, y finalmente la muerte de los nematodos.

Durante la puesta a punto de la metodología, infectamos *Caenorhabditis elegans* directamente a partir de un medio acuoso y observábamos que los índices de mortalidad eran significativamente menores que cuando se infectaban en el medio sólido. El poder de asimilación de las células intestinales de *Caenorhabditis elegans* es alto y el tiempo promedio de permanencia de un microorganismo en el lumen intestinal es menos de dos minutos; sin embargo, la mayoría de la masa corporal del nematodo corresponde al alimento que circula por él [Avery y Shtonda 2003]. La colonización intestinal es un paso crítico para la infección por *Candida* en *Caenorhabditis elegans*. Además, las especies que no filamentos, causan una menor mortalidad o la infección tiene una evolución más lenta. En el presente estudio hemos observado que la presencia de DMSO favoreció el aumento de la mortalidad causada por *Candida glabrata*, aunque esta mortalidad fue significativamente menor respecto a las otras especies. La acción directa del DMSO sobre la integridad de los tejidos del nematodo probablemente favorece la invasión por parte de las especies con capacidad filamentosas, mientras que *Candida glabrata* utiliza otros factores para colonizarlo. *Candida dubliniensis* no mostró capacidad filamentosas en estos ensayos y también su mortalidad fue baja, sobre todo en el medio acuoso.

El intestino de *Caenorhabditis elegans* está compuesto por 20 enterocitos que están dispuestos en pares, formando nueve unidades básicas o anillos intestinales. El anillo int I es el más cercano a la faringe y es el único formado por cuatro enterocitos. Cada enterocito se une lateralmente a las células contiguas mediante cadherinas [Vogel y Hedgecock 2001]. La capacidad invasora de *Candida albicans* es proporcional a su capacidad de degradar cadherina por medio de la Sap5p [Villar et al. 2007]. El mayor número de uniones adherentes del anillo int I favorece la invasión de *Candida*. Precisamente, en nuestro estudio observamos que la colonización del intestino medio comenzó por esta zona, para ir avanzando por el lumen intestinal. Breger y colaboradores sugieren que *Candida* no es lo suficientemente grande como para no atravesar el tubo digestivo del nematodo y ser defecada, y que por lo tanto, en el proceso de infección intervienen de forma activa distintos factores de virulencia. Esto ha sido corroborado en nuestros ensayos al exponer a un grupo de nematodos a las diferentes especies de *Candida* previamente inactivadas por calor, donde observamos que no disminuyó la supervivencia de los nematodos. En estudios con infecciones bacterianas, se ha observado que estos microorganismos pueden colonizar las microvellosidades del borde en cepillo de *Caenorhabditis elegans* después de escapar con éxito del triturador y resistir a los péptidos antimicrobianos en la faringe, lo que conduce a la distensión de la luz intestinal, detectándose sutiles diferencias entre las distintas especies bacterianas en la forma en que colonizan el lumen intestinal [Alegado et al. 2003; Gravato-Nobre y Hodgkin 2005; Ooi et al. 2012]. En la presente investigación, también hemos observado diferencias entre las distintas especies de *Candida* respecto a las estrategias de colonización de *Caenorhabditis elegans*; sin embargo, esta es una cuestión que requiere estudios más específicos. Después de la colonización de la superficie del aparato digestivo, se observan

procesos de filamentación y formación de biopelículas y al igual que en estudios anteriores, se observó que *Candida* invadía todo el cuerpo del nematodo y que la filamentación intensa desintegraba la cutícula después de la muerte de los nematodos. Sin embargo, las estructuras fúngicas permanecían conectadas entre sí [Breger et al. 2007; Irazoqui et al. 2010].

Se han estudiado las interacciones de *Candida albicans* en cultivos de células intestinales y se ha observado que tras una fase de fijación temprana, entre una y dos horas después del contacto con las células intestinales, las levaduras se transforman en hifas. En los primeros estadios de la infección, las microvellosidades interactúan y cubren parcialmente las hifas de *Candida*. Además, *Candida albicans* invade el enterocito por penetración activa [Dalle et al. 2010]. La endocitosis inducida de *Candida* es otra posible vía de entrada en las células intestinales [Dieterich et al. 2002].

La digestión en el nematodo está estrechamente ligada con su sistema inmune; en un breve lapso se secretan una gran cantidad de enzimas que degradan la pared celular y perforan las membranas de los microorganismos [Banyai y Patthy 1998; Mallo et al. 2002; McGhee 2007; O'Rourke et al. 2006]. La vía p38 MAPK desempeña un papel crítico tanto en la integración de varias de estas cascadas de señalización, como en la expresión de genes inducidos por la infección y que llevan a la síntesis de lectinas, lisozimas y péptidos antimicrobianos [Troemel et al. 2006]. En *Caenorhabditis elegans*, la proteína SEK-1 centra la actividad en la vía MAPKK. La cepa AU37, utilizada en nuestro estudio, carece del gen *sek-1* y es más susceptible a la infección.

Conviene mencionar un apunte metodológico en referencia a la medición de la supervivencia a lo largo de todo el estudio. Se ha considerado que la tasa de producir infección en los grupos de nematodos fue del 100%, premisa sobre la cual podrían albergarse dudas, ya que como se ha descrito anteriormente, existen fenómenos de colonización por *Candida* en *Caenorhabditis elegans*. No obstante, dado que la colonización es un paso previo a la infección y que la cepa que hemos empleado es defectiva en la vía MAPKK (por tanto su capacidad inmunitaria se haya reducida), se ha creído razonable y conveniente simplificar el modelo asumiendo que en la cepa AU37 la probabilidad de sufrir una infección tras la colonización por levaduras es cercana al 100%. A pesar de ello y considerando el escenario más desfavorable, el sesgo introducido al adoptar dicha simplificación afectaría de manera aleatoria a todos los grupos sujetos a comparación y por lo tanto tendería hacia el nulo, lo que no alteraría el resultado obtenido en nuestro estudio frente a la adopción de modelos de análisis de supervivencia más complejos.

1.3 Efecto del DMSO sobre *Caenorhabditis elegans*

Existen trabajos anteriores en los que se ha probado en *Caenorhabditis elegans* la acción de fármacos antifúngicos clásicos y algunos nuevos compuestos contra la candidiasis [Breger et al. 2007; Ewbank y Zugasti 2011; Okoli et al. 2009; Pukkila-Worley et al. 2009a; Pukkila-Worley et al.

2009b; Tampakakis et al. 2008], sin embargo, no se ha tenido en cuenta el papel del DMSO en la fisiología de *Caenorhabditis elegans*. En este estudio hemos comparado entre sí dos grupos de nematodos sin infectar, uno en presencia de DMSO al 1% y otro en ausencia del solvente; aunque las diferencias entre ambos grupos no fueron estadísticamente significativas, la supervivencia del grupo expuesto a DMSO fue menor. El DMSO aumenta la permeabilidad de la membrana, por lo que es utilizado como un vehículo de entrada de algunos fármacos al interior de la célula mediante la generación de poros [Boyd et al. 2010; He et al. 2012]. En los primeros ensayos con los fármacos antifúngicos, observamos que al agregar aquellos que estaban diluidos en DMSO se producía una alteración en los nematodos, tanto en su movilidad como en su integridad. Esto nos llevó a pensar que este disolvente podría dañar la cutícula y la membrana de los enterocitos, generando brechas por las que *Candida* podría adherirse y penetrar más fácilmente. No existen estudios que apoyen directamente esta teoría, pero existen investigaciones que recomiendan ajustar la actividad de los fármacos ensayados considerando controles de disolvente en el cálculo de las tasas de supervivencia [Katiki et al. 2011] o disolver los fármacos en concentraciones < 0,6% de DMSO para no acortar la vida del nematodo [Solis y Petrascheck 2011]

Con las cuatro especies que mostraron mayor patogenicidad para el nematodo (*Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida metapsilosis* y *Candida orthopsilosis*), las curvas de supervivencia tanto en presencia como en ausencia de DMSO fueron similares. En un segundo grupo, compuesto por *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata* y *Candida parapsilosis* el DMSO era un factor coadyuvante de la infección, ya que cuando los nematodos se incubaron en presencia de DMSO, los porcentajes de letalidad fueron similares a los obtenidos con las cuatro especies más patógenas.

La incubación de los nematodos en presencia de DMSO tuvo como consecuencia que su susceptibilidad a ser infectados fue similar para todas las especies de *Candida*, excepto para *Candida albicans* y *Candida glabrata*, que fueron las especies más y menos patógenas, respectivamente. El efecto de un determinado solvente en estudios de patogenicidad se puede considerar como una interferencia o un factor de confusión que se debe tener en consideración para los estudios de la acción de los fármacos antifúngicos al momento de realizar las comparaciones estadísticas.

1.4 Capacidad de causar infección de las especies de *Candida*

El DMSO influye en el estado anatómico y fisiológico de *Caenorhabditis elegans* y sería preferible emplear un medio acuoso para llevar a cabo el estudio de la patogenicidad de *Candida*. Sin embargo, la tendencia actual de diluir los fármacos antifúngicos en DMSO no desmedra *Caenorhabditis elegans* como modelo de estudio, porque el solvente a bajas concentraciones no muestra efectos tóxicos y la alteración en la integridad del nematodo parece ser reversible. En el medio libre de dicho solvente, las especies con mayor capacidad de producir pseudohifas,

Candida albicans y *Candida krusei*, fueron las que mostraron mayor patogenicidad para el nematodo, con diferencias significativas entre sí y frente a las otras especies. El grupo de Scorzoni asoció también la muerte del nematodo con la capacidad de filamentosidad de estas cepas pero no observaron diferencias significativas entre *Candida albicans* y *Candida krusei* [Scorzoni et al. 2013]. Esto se puede explicar por el mayor tiempo de infección al que expusieron a los nematodos, lo que puede suponer una mayor adquisición de carga fúngica de *Candida krusei*, más pequeña en tamaño y por lo tanto más fácil de traspasar las barreras anatómicas del nematodo.

Las especies del complejo *Candida parapsilosis* fueron las siguientes con mayor capacidad patógena. La patogenicidad de *Candida parapsilosis sensu stricto* fue menor que la de sus especies genéticamente emparentadas, quienes entre sí no mostraron diferencias significativas. Gago y colaboradores utilizaron cinco cepas de cada una de estas especies para comparar la virulencia en el complejo *Candida parapsilosis*, empleando un modelo con *Galleria mellonella*. Encontraron que *Candida metapsilosis* fue la menos patógena, sin observar diferencias entre las otras dos especies ni entre las cepas de la misma especie. Estas diferencias se debían tanto por la fagocitosis más eficiente de *Candida metapsilosis* por parte de los hemocitos de *Galleria mellonella*, como por la menor producción de factores de virulencia de *Candida metapsilosis* [Gago et al. 2014]. En el estudio publicado por Treviño-Rangel y colaboradores, utilizando un modelo en ratones BALB/c, no se detectaron diferencias significativas entre las tres especies de este complejo, sugiriendo que las tres especies poseen un potencial patógeno similar en la candidiasis diseminada, independientemente de las enzimas que expresen como factores de virulencia [Treviño-Rangel et al. 2014]. Existen diferencias importantes entre estos tres modelos; mientras *Caenorhabditis elegans* no tiene sistema inmune adaptativo y en ratones BALB/c este está suprimido, el modelo con *Galleria mellonella* aún no dispone de mutantes inmunosuprimidos, lo que hace pensar que la fagocitosis desempeña un papel fundamental en las diferencias de virulencia. Por otra parte, tanto las distintas temperaturas de incubación en estos modelos, como la imposibilidad de regular la carga fúngica en *Caenorhabditis elegans*, son factores que pueden explicar las diferencias en estos resultados.

Otro aspecto a destacar de nuestro estudio es que, pese a que no filamentosidad, el grado de patogenicidad de *Candida glabrata* haya resultado similar al registrado para *Candida parapsilosis*; sin embargo, en un modelo murino se observó que *Candida glabrata* era incluso más patógena que *Candida parapsilosis* y *Candida krusei* [Arendrup 2013]. En ratones con inmunosupresión, la mortalidad causada por *Candida glabrata* ATCC 2001 fue mayor que en nuestro estudio, llegando a cerca del 80% a los 14 días [West et al. 2013]. Las infecciones por *Candida glabrata* tienen una alta mortalidad en los seres humanos y la inmunosupresión podría ser un factor clave. En ratones sin inmunodeficiencia la infección por *Candida glabrata* no causa mortalidad [Jacobsen 2014], ni tampoco la causa en *Galleria mellonella* [Cotter et al. 2000], aunque en este modelo otros autores han descrito una mortalidad del 20% a las 100 h [Junqueira et al. 2011]. La cepa de referencia que hemos utilizado procede de una candidiasis invasora y

aunque no se observó filamentación en los nematodos durante los ensayos, se pudo constatar una alta capacidad de invasión en *Caenorhabditis elegans*.

Candida dubliniensis fue la especie que presentó el menor grado de patogenicidad. Es probable que el grado de virulencia de esta especie presente una importante variabilidad entre cepas como se ha observado en modelos de candidiasis por *Candida dubliniensis* en ratones, donde se han observado cepas particularmente virulentas [Asmundsdottir et al. 2009; Mariné et al. 2009b]. En un modelo con *Galleria mellonella* se ha comprobado que *Candida dubliniensis* causa una mortalidad del 100% de las larvas a las 100 h, igual que *Candida albicans* o *Candida tropicalis* [Junqueira et al. 2011]. Por otra parte, en estudios con modelos murinos se ha visto que los ratones infectados con *Candida dubliniensis* sobreviven durante períodos más largos que los infectados con *Candida albicans* [Koga-Ito et al. 2011]. La menor patogenicidad de *Candida dubliniensis* respecto a *Candida albicans* puede deberse a su escasa capacidad de transición levadura-hifa, secreción de proteasas o de invasinas específicas, fundamentales en la virulencia [Sullivan y Moran 2011]. Utilizando modelos murinos, Asmundsdottir y colaboradores han observado una patogenicidad similar entre *Candida albicans* y *Candida dubliniensis*, pero también han encontrado que pueden existir diferencias significativas entre cepas de la misma especie [Asmundsdottir et al. 2009]. Aunque ambas especies están estrechamente relacionadas, la frecuencia de aislamientos de *Candida dubliniensis* es baja, probablemente debido a su menor virulencia. Se ha demostrado que el genoma de *Candida dubliniensis* carece de genes de virulencia importantes relacionados con la formación de hifas (por ejemplo, *ALS3* y *HYR1*), además de tener una limitada capacidad de transición levadura-micelio, lo que afecta su potencial de invasión [Moran et al. 2012; Stokes et al. 2007]. Por otra parte, diversas investigaciones han mostrado que los aislamientos de diferentes sitios anatómicos pueden diferir en su virulencia [Cassone et al. 1995; Dagdeviren et al. 2005; Shin et al. 2002].

1.5 Tratamiento de la candidiasis en *Caenorhabditis elegans*

Las altas tasas de morbilidad asociadas a la infección por *Candida* representan un desafío importante para las estrategias terapéuticas y profilácticas empíricas. Son de particular preocupación las candidiasis diseminadas causadas por especies con resistencias emergentes a los fármacos antifúngicos, ya sean azoles, polienos o equinocandinas [Hakki et al. 2006; Perlin 2007]. Aunque los fracasos terapéuticos que implican la presencia de resistencia en *Candida albicans* son raros, hay una tendencia al aumento de la resistencia en *Candida glabrata* [Pappas et al. 2009; Perlin 2007]. Las pruebas in vitro a veces muestran perfiles de sensibilidad antifúngica que no siempre se correlacionan con la clínica, por lo que el uso de modelos de candidiasis en animales facilita el estudio de las distintas alternativas de tratamiento.

1.5.1 Tratamiento de la infección por *Candida albicans*

El tratamiento con anfotericina B a una concentración igual a la CMI de *Candida albicans* no fue efectivo contra la candidiasis causada por esta especie. Scorzoni y colaboradores probaron la misma concentración utilizada en el presente estudio, con resultados similares en *Caenorhabditis elegans*. En *Galleria mellonella* los resultados fueron comparables, aunque a concentraciones mayores [Scorzoni et al. 2013]. Estudios anteriores como el de Breger y colaboradores han utilizado una concentración más alta de este fármaco antifúngico (16 µg/ml), que ha demostrado una actividad incluso mayor que la de fluconazol en la candidiasis por *Candida albicans* y por otras especies [Breger et al. 2007].

En nuestro estudio de Tesis, los nematodos tratados con fluconazol mostraron los mayores porcentajes de supervivencia. Sin embargo, las proporciones de nematodos vivos obtenidas con el tratamiento con posaconazol y voriconazol fueron casi el doble que las alcanzadas tras el tratamiento con fluconazol. Este resultado que a primera vista parece contradictorio, está determinado por la influencia del DMSO. Debido a que posaconazol y voriconazol están preparados con dicho solvente, sus valores deben ser comparados con el grupo de nematodos sin tratamiento que fueron incubados en presencia de DMSO, quienes arrojaron un menor porcentaje de supervivientes a las 120 h, mientras que los tratados con fluconazol se comparan con los nematodos no tratados que fueron dispuestos en un medio acuoso. Los resultados de los tratamientos con posaconazol y voriconazol no mostraron diferencias significativas entre sí. En estudios como el de Scorzoni y colaboradores, el voriconazol mostró una excelente actividad en el control de la infección de *Caenorhabditis elegans* por *Candida albicans*, alcanzando cerca del 90% de supervivencia incluso a concentraciones bajas (0,25 µg/ml). Por el contrario, el fluconazol sólo consiguió un 20% de supervivencia a las 96 h, aunque la concentración utilizada (12 µg/ml) fue menor que la de este estudio [Scorzoni et al. 2013]. Breger y colaboradores observaron peores resultados terapéuticos con concentraciones elevadas de fluconazol (128 µg/ml), asociados a unos probables efectos tóxicos sobre el nematodo [Breger et al. 2007]; sin embargo, en nuestro estudio de Tesis esta concentración era la más efectiva sin observarse una disminución en la supervivencia cuando solo se añadía el fluconazol.

Los tratamientos con equinocandinas en sus concentraciones más bajas mostraron un aumento en la supervivencia sólo en las últimas horas del estudio; de ahí que en todos estos ensayos, la mediana estimada de vida no haya sido superior que la que presentaron los nematodos que no recibieron tratamiento. Pese al aumento del porcentaje de individuos vivos hasta el final del estudio, estas observaciones hacen cuestionable la afirmación de la prueba estadística de Kaplan–Meier, que nos indica que los tratamientos con equinocandinas a bajas concentraciones aumentaron significativamente la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* infectados con *Candida albicans*. Es necesario el empleo de criterios como los propuestos por Breger y colaboradores, quienes utilizaron otras dos reglas que permiten valorar de forma más adecuada y estricta las pautas terapéuticas: que el agente mostrara una actividad antifúngica mayor del

50% y que aumentara la mediana estimada de vida de los nematodos, con respecto al control sin tratamiento antifúngico [Breger et al. 2007]. En base a estos criterios, la concentración más baja de equinocandinas que se ha utilizado no consiguió un éxito terapéutico.

La caspofungina en sus concentraciones altas, aumentó significativamente la supervivencia a partir del primer día de tratamiento, con un incremento de más de ocho veces en el porcentaje de nematodos vivos a las 120 h respecto al porcentaje de nematodos vivos que no recibieron tratamiento. Por su parte, el aumento de la supervivencia con la concentración más baja de caspofungina fue significativamente menor, lo que sugiere que este tratamiento es dependiente de la dosis. Una respuesta positiva a caspofungina se ha observado en *Galleria mellonella* y en estudios clínicos en seres humanos, donde se ha llegado a una efectividad cercana al 70% en el tratamiento de infecciones por *Candida albicans* [Breger et al. 2007; Colombo et al. 2010; Cornely et al. 2014; Földi et al. 2012; Scorzoni et al. 2013]. La micafungina también aumentó significativamente la supervivencia y la mediana estimada de vida, pero con valores menos sólidos que caspofungina. La efectividad de la micafungina ha sido exitosamente evaluada en modelos con mamíferos, donde se muestra más eficaz que el fluconazol en el tratamiento experimental de las infecciones producidas por *Candida albicans* sensible in vitro a ambos fármacos antifúngicos [Pastor y Guarro 2009]. Se ha visto que la alta sensibilidad de esta especie a las equinocandinas puede estar relacionada con diferencias en las dianas del receptor para dicha familia de fármacos antifúngicos. En *Candida albicans*, las dianas son más numerosas que las observadas en *Candida glabrata* o *Candida parapsilosis*, por lo cual es más sensible a estos fármacos antifúngicos [Andes et al. 2010].

1.5.2 Tratamiento de la infección por *Candida dubliniensis*

En el ensayo con este microorganismo, la mediana estimada de vida se debe considerar como un indicador de éxito sólo en los casos de tratamientos donde el fármaco antifúngico se disuelve en DMSO debido a que la insuficiente mortalidad en el medio acuoso no permite determinar un aumento de la mediana estimada de vida. Los tratamientos con anfotericina B aumentaron significativamente la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* infectado con *Candida dubliniensis*, ampliando la mediana estimada de vida de los nematodos, con concentraciones de anfotericina B utilizadas menores o iguales que la CMI.

Todos los tratamientos con azoles aumentaron de manera significativa la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* infectados con *Candida dubliniensis*, con porcentajes de nematodos vivos al final del estudio superiores al 90%. No se han encontrado en la literatura estudios en modelos animales que permitan comparar estos resultados, pero son concordantes con que la gran mayoría de los aislamientos clínicos de *Candida dubliniensis* son sensibles a los azoles. Sin embargo, se han encontrado cepas con una sensibilidad disminuida o con resistencia a fluconazol aisladas de pacientes infectados por el VIH [Pinjon et al. 2005]. Por otra parte, se ha demostrado

que la CMI₅₀ de los azoles para los aislamientos clínicos de *Candida dubliniensis*, son significativamente más altas que los de *Candida albicans*, mostrando un posible efecto fungistático a las concentraciones de fármaco antifúngico que se pueden alcanzar en el suero [Odds et al. 1998; Szabo et al. 2010].

Las equinocandinas aumentaron significativamente la supervivencia de *Caenorhabditis elegans*, con porcentajes de nematodos vivos al final del estudio mayores del 80% en todos los casos. Los ensayos de curvas de letalidad de Gil-Alonso y colaboradores han mostrado una buena actividad de las equinocandinas, principalmente la anidulafungina, contra *Candida dubliniensis* [Gil-Alonso et al. 2015]. En el modelo en *Caenorhabditis elegans*, el tratamiento con anidulafungina fue efectivo a partir de las 48 h, mientras que los tratamientos con caspofungina y micafungina mostraron una efectividad más tardía, ya que la supervivencia de los nematodos tratados y no tratados fue similar durante los tres primeros días.

A pesar de la buena efectividad observada de las equinocandinas, Mariné y colaboradores han reportado que puede haber variabilidad respecto a la sensibilidad in vitro a estos fármacos antifúngicos. Sus ensayos en un modelo murino de candidiasis diseminada, mostraron que todos los tratamientos redujeron la carga fúngica de los tejidos, pero sólo altas concentraciones de micafungina mejoraban significativamente la supervivencia de los ratones infectados con una cepa más virulenta. Los autores consideran que esto puede ser debido a la mayor virulencia de la cepa ensayada y a los tratamientos a corto plazo utilizados, en lugar de tratarse de una menor eficacia de los fármacos contra esta cepa [Mariné et al. 2009b].

1.5.3 Tratamiento de la infección por *Candida glabrata*

Los tratamientos con anfotericina B aumentaron rápidamente la supervivencia de los nematodos infectados con *Candida glabrata*. A partir de las 48 h de tratamiento ya existían diferencias estadísticamente significativas. Aunque los porcentajes eran algo menores que los obtenidos con los azoles, la rapidez en que se observaron diferencias significativas en la supervivencia, hacen que el tratamiento con anfotericina B fuera el más efectivo. En modelos murinos se ha demostrado que la anfotericina B es más eficaz que las equinocandinas y los azoles, observándose además una eficacia similar entre las distintas formulaciones que se comercializan [Cornely et al. 2014; Golas et al. 2014; Mariné et al. 2009a].

Aunque el tratamiento con fluconazol consiguió valores excelentes de supervivencia de los nematodos infectados con *Candida glabrata*, han aparecido aislamientos clínicos resistentes a este fármaco. Esta amenaza potencial llega en un momento en el que está aumentando el uso de equinocandinas como terapia de primera línea de la candidemia [Pappas et al. 2009].

Los tratamientos con posaconazol y voriconazol mostraron los mayores porcentajes de supervivencia, siendo voriconazol el más efectivo. Algunos autores han descrito un aumento en

los aislamientos de *Candida glabrata* resistentes in vitro a voriconazol, que puede llegar al 20% [Cuenca-Estrella et al. 2011; Golas et al. 2014]. Esta resistencia puede estar asociada a una disminución en la expresión de la proteína Hsp70, pero el mecanismo exacto de la resistencia a voriconazol aún se desconoce [Yoo et al. 2013]. Por otra parte, se ha encontrado que las cepas resistentes muestran sobre regulación del gen *CDR1* que codifica la bomba de expulsión de voriconazol [Szweda et al. 2015].

El posaconazol fue efectivo en el tratamiento de la infección por *Candida glabrata*, resultados que concuerdan con los encontrados en el tratamiento de las infecciones refractarias al fluconazol y en los modelos murinos con cepas resistentes a fluconazol [González et al. 2011; Spreghini et al. 2008]. Sin embargo, alrededor del 15-20% de los aislamientos clínicos de *Candida glabrata* muestran resistencia in vitro al posaconazol [Golas et al. 2014; Pemán et al. 2012].

Todas las equinocandinas aumentaron significativamente la supervivencia de los nematodos infectados, mejorando además su mediana estimada de vida; de ellas, el tratamiento más efectivo fue con micafungina. Estos resultados difieren de los obtenidos por Mariné y colaboradores en un modelo murino, donde la micafungina no reducía la carga fúngica en los tejidos de los animales infectados con *Candida glabrata* [Mariné et al. 2005].

En las candidiasis invasoras por *Candida glabrata*, la tasa de respuesta global a caspofungina es de 85-100% [Colombo et al. 2010; Cornely et al. 2014; Golas et al. 2014]. Sin embargo, se ha observado un aumento de las resistencias tanto a las equinocandinas como al fluconazol. Aunque no hay datos que sugieran que se produce resistencia cruzada, el uso extenso de equinocandinas podría favorecer el desarrollo de multirresistencias en *Candida glabrata* [Alexander et al. 2013; Pfaller et al. 2012]. Estas resistencias se asocian a mutaciones en los genes *FKS1* y *FKS2*, que inducen sustituciones de aminoácidos en la enzima 1,3- β -D-glucano sintetasa de *Candida glabrata* y reducen la acción de las equinocandinas sobre la enzima.

1.5.4 Tratamiento de la infección por *Candida krusei*

Los tratamientos con anfotericina B aumentaron la supervivencia de los nematodos infectados con *Candida krusei*. Estos resultados fueron similares a los obtenidos en dos estudios con *Caenorhabditis elegans* para medir la actividad de la anfotericina B contra *Candida krusei*, en los que el tratamiento fue efectivo a concentraciones superiores a 16 $\mu\text{g/ml}$ [Breger et al. 2007; Scorzoni et al. 2013]. En un modelo con *Galleria mellonella* se consiguieron resultados similares, aunque con concentraciones de anfotericina B más altas. Los aislamientos clínicos de *Candida krusei* son sensibles in vitro a anfotericina B [Golas et al. 2014; Pemán et al. 2012].

Debido a la resistencia intrínseca de *Candida krusei*, se probó el tratamiento con fluconazol en concentraciones altas (32, 64 y 128 $\mu\text{g/ml}$) como una forma de controlar la efectividad del modelo in vivo, con nula efectividad en cualquiera de las concentraciones ensayadas. Los

tratamientos con posaconazol y voriconazol aumentaron la supervivencia de los nematodos y su mediana estimada de vida. Las diferencias respecto a los no tratados comenzaron a ser significativas a partir de las 48 h. El tratamiento con 2 µg/ml posaconazol fue el más efectivo, llegando a aumentar en más de tres veces el ratio de supervivencia. Otros investigadores han probado la actividad del voriconazol en el modelo con *Caenorhabditis elegans*, observando que a concentraciones tan altas como 7,5 y 10 µg/ml se alcanzaba una supervivencia superior al 90% de los nematodos infectados con *Candida krusei*. En el modelo en *Galleria mellonella*, una concentración de voriconazol tan alta como 10 mg/Kg por larva era efectiva contra *Candida krusei*, aunque sólo alcanzó porcentajes de supervivencia cercanos al 40%, más bajos que los obtenidos en este estudio de Tesis [Scorzoni et al. 2013]. Las tasas de resistencia in vitro en *Candida krusei* son bajas para voriconazol y posaconazol [Golas et al. 2014; Pemán et al. 2012]

Todos los tratamientos con equinocandinas aumentaron significativamente la supervivencia de los nematodos infectados con *Candida krusei*, pero sólo la anidulafungina y la mayor concentración de caspofungina lograron aumentar al máximo la mediana de vida estimada. La caspofungina mostró mayor efectividad que la anidulafungina, puesto que las diferencias en la supervivencia fueron estadísticamente significativas con mayor rapidez y el porcentaje de nematodos vivos al final del estudio fue el más alto. El tratamiento con caspofungina fue el más efectivo para la candidiasis por *Candida krusei*, mostrando resultados similares a los obtenidos por Breger y colaboradores [Breger et al. 2007]. Utilizando *Galleria mellonella* como modelo, Scorzoni y colaboradores describieron una supervivencia cercana al 90% en la infección con *Candida krusei* tratada con 4 µg/Kg larva de caspofungina [Scorzoni et al. 2013]. Sin embargo, no observaron una adecuada efectividad a concentraciones menores, como se observó en el modelo con *Caenorhabditis elegans*. Esto puede guardar relación con la alta carga fúngica inyectada en *Galleria mellonella* y que en el modelo con el nematodo no puede ser controlada. Con micafungina se observaron porcentajes de supervivencia similares a las otras equinocandinas al final del estudio, sin embargo, de forma más tardía que en el tratamiento con la menor concentración de caspofungina.

1.5.5 Tratamiento de la infección por *Candida metapsilosis*

Los tratamientos con anfotericina B aumentaron significativamente la supervivencia y la mediana estimada de vida de los nematodos infectados con *Candida metapsilosis*, pero menos de la mitad de ellos permanecieron vivos al final del estudio. Resultados similares fueron observados en un modelo de candidiasis invasora en ratones con inmunosupresión, donde el tratamiento con anfotericina B mostró excelente actividad tanto frente a *Candida metapsilosis* como a sus especies genéticamente emparentadas [Szilágyi et al. 2012].

Una efectividad similar se observó en el tratamiento con fluconazol que aumentó significativamente la supervivencia y la mediana estimada de vida de los nematodos infectados

con *Candida metapsilosis*. La mayor efectividad se observó con la concentración más alta que conseguía una supervivencia de más del 50% al final del estudio. La CMI de fluconazol para *Candida metapsilosis* es la más alta del complejo de especies de *Candida parapsilosis* y se han aislado algunas cepas resistentes [Gómez-López et al. 2008; Miranda-Zapico et al. 2011; Szabó et al. 2009; van Asbeck et al. 2008]. Sin embargo, en un modelo de candidiasis con *Candida metapsilosis* en ratones con inmunosupresión se observó que el fluconazol disminuía la carga fúngica, siendo tan eficaz como la anfotericina B [Szilágyi et al. 2012].

Todos los tratamientos realizados con los nuevos triazoles aumentaron la supervivencia de los nematodos al final del estudio. Se ha visto que la actividad in vitro de posaconazol y voriconazol contra *Candida metapsilosis* es menor con que contra *Candida parapsilosis*; sin embargo, ambos fármacos constituyen una excelente alternativa terapéutica [Szabó et al. 2009]. Miranda-Zapico y colaboradores han encontrado una excelente actividad in vitro de posaconazol y voriconazol contra las tres especies del complejo *Candida parapsilosis* [Miranda-Zapico et al. 2011]. Además se han detectado muy pocos los aislamientos clínicos de *Candida metapsilosis* con altas CMI de voriconazol [Chen et al. 2010].

Así como los azoles son efectivos contra *Candida metapsilosis*, la sensibilidad in vitro a las equinocandinas es menor [Silva et al. 2009]. A pesar de esto, su eficacia in vivo es importante tanto en modelos experimentales como en pacientes [Andes et al. 2010; Földi et al. 2012; Pappas et al. 2009]. En este estudio de Tesis de Doctorado, todos los tratamientos con equinocandinas aumentaron significativamente la supervivencia de *Caenorhabditis elegans*. Sin embargo, los porcentajes de nematodos vivos al final del estudio fueron siempre menores del 50%, lo que no permitiría considerar efectivo ninguno de los tratamientos aplicados contra *Candida metapsilosis*. Al comparar la actividad de las tres equinocandinas en un modelo de candidiasis en ratones con neutropenia, se observó que *Candida metapsilosis* fue la especie más sensible a caspofungina y micafungina y tan sensible a la anidulafungina como *Candida orthopsilosis* y *Candida parapsilosis* [Spreghini et al. 2012]. Földi y colaboradores observaron en un modelo murino que bastaban dosis estándar de caspofungina para disminuir la carga fúngica renal de *Candida metapsilosis* [Földi et al. 2012].

1.5.6 Tratamiento de la infección por *Candida orthopsilosis*

Los tratamientos con anfotericina B aumentaron significativamente la supervivencia de los nematodos infectados con *Candida orthopsilosis*, mostrando en general mayor efectividad que las equinocandinas pero menor que los nuevos triazoles. Estos resultados concuerdan con los que han observado en un modelo murino, donde el tratamiento con anfotericina B tenía una efectividad similar al tratamiento con fluconazol [Szilágyi et al. 2012]. Los aislamientos de sangre de *Candida orthopsilosis* han mostrado una buena sensibilidad a la anfotericina B [Blanco-Blanco et al. 2014; Miranda-Zapico et al. 2011; Ruiz et al. 2013; Silva et al. 2009].

Los tratamientos con los nuevos azoles fueron muy efectivos contra la infección por *Candida orthopsilosis*, con altos porcentajes de nematodos vivos la final de estudio. La efectividad del fluconazol aunque significativa, no fue tan marcada y dependía de la dosis, siendo el tratamiento con 64 µg/ml de este fármaco antifúngico el que aumentó la supervivencia en menos tiempo. El tratamiento con fluconazol también ha sido eficaz en un modelo en ratones con inmunosupresión, disminuyendo la carga fúngica renal de *Candida orthopsilosis* [Szilágyi et al. 2012]. In vitro, los aislamientos de *Candida orthopsilosis* de candidemias fueron sensibles tanto a fluconazol como a voriconazol [Blanco-Blanco et al. 2014; Ruiz et al. 2013].

La micafungina mostró la mayor efectividad a partir de las 72 h, alcanzando porcentajes finales de supervivencia superiores al 50%. Aunque la caspofungina también aumentó la supervivencia significativamente, los porcentajes no alcanzaron al 40%. En ratones con inmunosupresión se ha visto que caspofungina es altamente eficaz contra *Candida orthopsilosis* [Szilágyi et al. 2012] y ha demostrado ser útil frente a aislamientos clínicos de *Candida orthopsilosis* causantes de fungemias en niños y en adultos de distintas partes del mundo [Blanco-Blanco et al. 2014; Ruiz et al. 2013]. Aunque el tratamiento con anidulafungina triplicó la cantidad de nematodos vivos al final del estudio, estas diferencias se manifestaron demasiado tarde como para llegar a ser significativas.

1.5.7 Tratamiento de la infección por *Candida parapsilosis*

Los tratamientos con anfotericina B aumentaron significativamente la supervivencia de los nematodos infectados con *Candida parapsilosis*. Resultados similares se observaron en un estudio anterior, en el que Breger y colaboradores utilizaron la misma cepa de *Candida parapsilosis*, pero aplicaron un tratamiento de 16 µg/ml de anfotericina B, por lo que una concentración más alta del fármaco antifúngico no parece guardar relación con un mayor aumento en la supervivencia [Breger et al. 2007]. In vitro se han observado cepas de *Candida parapsilosis* resistentes a anfotericina B o con CMI mayores que para *Candida metapsilosis* y *Candida orthopsilosis*, aunque el número de aislamientos estudiado ha sido bajo [Gómez-López et al. 2008; Lockhart et al. 2008; Silva et al. 2009; Szabó et al. 2009].

Los ratios de supervivencia de los nematodos tras los tratamientos con los nuevos triazoles son casi el doble que con fluconazol, pero las tres concentraciones de este fármaco antifúngico parecen ser bastante más efectivas que posaconazol y voriconazol en tanto en cuanto su porcentaje de supervivencia fue de alrededor de 90% a las 120 h para todos los tratamientos con fluconazol, versus alrededor de 70% para todos los tratamientos con los otros azoles. Esto se explica por la presencia o no de DMSO en el medio de incubación, donde los nematodos infectados que no recibieron tratamiento antifúngico mostraron indicadores de supervivencia marcadamente distintos entre sí. Mientras que los porcentajes de supervivencia tras los tratamientos con fluconazol fueron mayores en el medio sin DMSO, el ratio estandarizado de

supervivencia, es decir, el número de veces que un tratamiento aumentaba la supervivencia respecto a los nematodos no tratados, era mayor tras los tratamientos con posaconazol y voriconazol, preparados en un medio con DMSO. El porcentaje de supervivientes obtenido con 32 µg/ml de fluconazol fue levemente superior al observado por Breger y colaboradores a la misma concentración [Breger et al. 2007]. Una discrepancia importante respecto a sus resultados radica en que estos autores observaron que a concentraciones mayores a 100 µg/ml de fluconazol se perdía el efecto beneficioso del fármaco antifúngico y los nematodos morían más rápido que aquellos infectados que no recibieron tratamiento, argumentando que el efecto tóxico del fármaco antifúngico pudo ser mayor que el efecto beneficioso. Sin embargo, en este trabajo de Tesis se observaron efectos terapéuticos a concentraciones de fluconazol aún mayores. Además se observó que la supervivencia de los nematodos expuestos a altas concentraciones de fluconazol y que no fueron infectados, no mostraba diferencias significativas con la supervivencia del grupo de nematodos utilizados como control.

Todos los azoles mostraron una acción rápida sobre la supervivencia de los nematodos, con valores estadísticamente significativos a partir de las 48 h. Se ha demostrado que los nuevos azoles presentan una excelente actividad in vitro contra *Candida parapsilosis* [Miranda-Zapico et al. 2011; Szabó et al. 2009], pero también se han descrito cepas multirresistentes [Moudgal et al. 2005; Silva et al. 2009].

Todos los tratamientos con equinocandinas resultaron muy eficaces contra la candidiasis por *Candida parapsilosis*. Breger y colaboradores observaron valores similares de supervivencia con 8 µg/ml de caspofungina [Breger et al. 2007]. En nuestro estudio de Tesis, no se han observado grandes diferencias entre caspofungina y micafungina, pero la anidulafungina aumentaba cuatro veces más los porcentajes de supervivencia en comparación al tratamiento con estas dos equinocandinas. Sin embargo, estos resultados deben ser tomados con cautela porque la influencia del DMSO en este modelo, no permite la comparación directa de los tratamientos con anidulafungina versus las otras dos equinocandinas. Los modelos murinos muestran una mayor correlación con los resultados in vitro, ya que se ha observado que la CMI de anidulafungina es 2-3 veces superior que la de caspofungina o micafungina y los ratones con neutropenia muestran una menor respuesta con este fármaco antifúngico [Andes et al. 2010]. Por otra parte, Földi y colaboradores observaron que se requerían altas dosis de caspofungina para disminuir la carga fúngica renal de *Candida parapsilosis* [Földi et al. 2012]. En general, *Candida parapsilosis sensu stricto* muestra una menor sensibilidad in vitro a las equinocandinas que otras especies de *Candida*. La correspondencia de los resultados in vitro con la realidad clínica es débil. La mayor semejanza se ha observado con los aislamientos de muestras orofaríngeas de pacientes infectados por el VIH, pero el tratamiento con equinocandinas sigue siendo efectivo contra *Candida parapsilosis* [Scorzoni et al. 2013].

1.6 Limitaciones del modelo en *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans ha sido utilizado como modelo de infección para una amplia gama de patógenos bacterianos y fúngicos que presentan factores de virulencia muy diversos y que por lo tanto varían en los mecanismos y en la velocidad a la que causan la infección y la muerte en los nematodos. Las numerosas ventajas que *Caenorhabditis elegans* hacen de este un modelo atractivo en Micología para identificar y comparar virulencias de distintas especies, identificar cepas atenuadas o hipervirulentas, estudiar tratamientos como monoterapia o terapias combinadas, realizar cribado de alto rendimiento de compuestos y como una primera etapa para ensayar nuevos fármacos. Sin embargo, la aplicación del modelo con *Caenorhabditis elegans* para el estudio de infecciones fúngicas del ser humano, tiene importantes limitaciones que se deben tener en cuenta.

La primera de ellas es que aunque hay cierta semejanza de los mecanismos de patogenicidad que ocurren en *Caenorhabditis elegans*, respecto al ser humano, la diferencias son enormes. Un mecanismo típico de las infecciones en los vertebrados superiores es la invasión y posterior diseminación hematógena hacia los órganos del huésped. Un modelo con mamíferos permite estudiar varios de estos procesos, incluyendo la carga fúngica en macerados de los órganos infectados. Lógicamente en *Caenorhabditis elegans* estos mecanismos no pueden ser analizados y la carga fúngica sólo se puede estudiar haciendo un macerado de nematodos enteros, con la imprecisión que conlleva la contaminación con cepas que realmente no se encuentran invadiendo al nematodo.

Al ser un organismo tan pequeño, resulta imposible controlar la dosis de microorganismos con que se infecta, limitándose a adquirir la infección mediante la ingestión del patógeno. Sin embargo, la importancia de esta limitación se puede aminorar por la gran cantidad de individuos que participa en los estudios, tratándose estadísticamente como estudios poblacionales y no como organismos individuales.

Una limitación técnica importante radica en que la temperatura a la que los nematodos deben ser incubados no permite replicar con precisión las condiciones de una infección en el ser humano. No obstante, muchos de los resultados son comparables a los obtenidos en modelos con animales superiores, aunque a este respecto es necesario analizar una mayor cantidad de cepas y/o comparar con otros modelos.

Existen especies de *Candida* y de otros microorganismos cuya virulencia es tan baja en *Caenorhabditis elegans* que su utilización como modelo puede ser desacertada. Según los criterios sugeridos por Breger y colaboradores [Breger et al. 2007] para considerar como efectivo un tratamiento antifúngico este debe aumentar la mediana estimada de supervivencia respecto a quienes no han recibido tratamiento. Teniendo esto en consideración, sugerimos que el modelo en *Caenorhabditis elegans* no debiera utilizarse con cepas de *Candida* que no causen una mortalidad del nematodo mayor al 50% a las 120 h (como sucede en la infección por

Candida dubliniensis en un medio acuoso), ya que su mediana no puede estimarse en un tiempo determinado. Una forma de paliar este inconveniente es prolongando el tiempo del estudio, bajo la condición de que se observen diferencias significativas respecto a los nematodos que no hayan sido infectados.

Existen diferencias considerables entre los perfiles de inmunidad de *Caenorhabditis elegans* y de los vertebrados superiores. La ausencia de inmunidad mediada por células en *Caenorhabditis elegans* hace que su defensa dependa de la secreción de péptidos antimicrobianos, lo que limita la posibilidad de realizar estudios acerca de la respuesta inmune frente a algunos factores de virulencia. Los vertebrados superiores tienen tanto un sistema innato más complejo, como un sistema adaptativo altamente especializado, que en conjunto permite una gran versatilidad en la respuesta inmune.

A pesar de estos inconvenientes, la oportunidad de estudiar a tiempo real todos los procesos de infección y de tratamiento antes mencionados, junto con la gran variedad de beneficios logísticos mencionados anteriormente y la automatización de muchos métodos, ofrece importantes ventajas para la utilización de *Caenorhabditis elegans* como modelo para el estudio de las interacciones huésped-patógeno. Este trabajo de Tesis de Doctorado amplía el conocimiento de la utilidad del modelo de candidiasis en *Caenorhabditis elegans*. Este modelo solo o complementado con otros modelos en animales invertebrados, puede ser utilizado para examinar las diferencias en la patogenicidad de las distintas especies emergentes de *Candida*, la respuesta a diversos tipos de tratamientos antifúngicos y el estudio de nuevos compuestos con propiedades antifúngicas.

CONCLUSIONES

1. *Caenorhabditis elegans* ha demostrado ser un modelo experimental idóneo para el estudio de las candidiasis invasoras emergentes.
2. El DMSO actúa como un factor coadyuvante de la candidiasis experimental aunque no tiene efectos tóxicos directos sobre *Caenorhabditis elegans*.
3. *Candida albicans* y *Candida krusei* fueron las especies más virulentas contra *Caenorhabditis elegans*. Ambas infecciones se caracterizaban por la presencia de un micelio exuberante en el nematodo.
4. *Candida glabrata* y *Candida dubliniensis* fueron las especies menos patógenas. La morfología levaduriforme predominaba durante la infección por ambas especies.
5. La anfotericina B fue muy activa contra las especies de *Candida* distintas de *Candida albicans*, incluso con concentraciones más bajas que la CMI, mientras que contra *Candida albicans* se requerían concentraciones más elevadas de este fármaco.
6. Los tres triazoles estudiados, fluconazol, posaconazol y voriconazol, mostraron una excelente actividad anticandidiásica aunque el fluconazol no mostró ninguna actividad contra *Candida krusei*.
7. La supervivencia de los nematodos infectados fue menor cuando la candidiasis se trató con equinocandinas. Los peores resultados se observaron en las candidiasis causadas por el complejo de especies de *Candida parapsilosis*.
8. Las candidiasis causadas por *Candida dubliniensis* y *Candida glabrata* fueron las que mejor respondieron a todas las terapias ensayadas.
9. La respuesta terapéutica fue dependiente de la dosis de fármaco antifúngico administrada en la mayoría de las candidiasis experimentales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adimi P, Hashemi SJ, Mahmoudi M, Mirhendi H, Shidfar MR, Emmami M, Rezaei-Matehkolaei A, Gramishoar M, Kordbacheh P. In-vitro activity of 10 antifungal agents against 320 dermatophyte strains using microdilution method in Tehran. *Iran J Pharm.Res.* 2013; 12: 537-545.
2. Alcoba-Florez J, Méndez-Álvarez S, Cano J, Guarro J, Pérez-Roth E, del Pilar Arévalo M. Phenotypic and molecular characterization of *Candida nivariensis* sp. nov., a possible new opportunistic fungus. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 4107-4111.
3. Alegado RA, Campbell MC, Chen WC, Slutz SS, Tan MW. Characterization of mediators of microbial virulence and innate immunity using the *Caenorhabditis elegans* host-pathogen model. *Cell Microbiol.* 2003; 5: 435-444.
4. Alexander BD, Johnson MD, Pfeiffer CD, Jiménez-Ortigosa C, Catania J, Booker R, Castanheira M, Messer SA, Perlin DS, Pfaller MA. Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of *FKS* mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. *Clin Infect Dis.* 2013; 56: 1724-1732.
5. Almirante B, Rodríguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, Mensa J, Sánchez F, Ayats J, Giménez M, Saballs P, Fridkin SK, Morgan J, Rodríguez-Tudela JL, Warnock DW, Pahissa A, Barcelona Candidemia Project Study Group. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 1829-1835.
6. Alonso-Vargas R, Elorduy L, Eraso E, Cano FJ, Guarro J, Pontón J, Quindós G. Isolation of *Candida africana*, probable atypical strains of *Candida albicans*, from a patient with vaginitis. *Med Mycol.* 2008; 46: 167-170.
7. Altun, Z.F. & Hall, D.H. 2012, *The Handbook of C. elegans Anatomy. Introduction*. Disponible en: <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/hermaphroditehomepage.htm>. Consultado en abril 2015.
8. Anastassopoulou CG, Fuchs BB, Mylonakis E. *Caenorhabditis elegans*-based model systems for antifungal drug discovery. *Curr.Pharm.Des.* 2011; 17: 1225-1233.
9. Andes D, Diekema DJ, Pfaller MA, Bohrmuller J, Marchillo K, Lepak A. In vivo comparison of the pharmacodynamic targets for echinocandin drugs against *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54: 2497-2506.
10. Aoki W, Kitahara N, Miura N, Morisaka H, Yamamoto Y, Kuroda K, Ueda M. Comprehensive characterization of secreted aspartic proteases encoded by a virulence gene family in *Candida albicans*. *J Biochem.* 2011; 150: 431-438.

11. Aperis G y Mylonakis E. Newer triazole antifungal agents: pharmacology, spectrum, clinical efficacy and limitations. *Expert Opin Investig Drugs* 2006; 15: 579-602.
12. Arendrup MC. *Candida* and candidaemia. Susceptibility and epidemiology. *Dan Med J*. 2013; 60: B4698.
13. Arendrup MC, Fisher BT, Zaoutis TE. Invasive fungal infections in the paediatric and neonatal population: diagnostics and management issues. *Clin Microbiol Infect*. 2009; 15: 613-624.
14. Artal-Sanz M, de Jong L, Tavernarakis N. *Caenorhabditis elegans*: a versatile platform for drug discovery. *Biotechnol J*. 2006; 1: 1405-1418.
15. Asmundsdottir LR, Erlendsdottir H, Agnarsson BA, Gottfredsson M. The importance of strain variation in virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*: results of a blinded histopathological study of invasive candidiasis. *Clin Microbiol Infect*. 2009; 15: 576-585.
16. Avery L y Shtonda BB. Food transport in the *C. elegans* pharynx. *J Exp Biol*. 2003; 206: 2441-2457.
17. Avni T, Leibovici L, Paul M. PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol*. 2011; 49: 665-670.
18. Axelsson-Olsson D, Olofsson J, Ellström P, Waldenström J, Olsen B. A simple method for long-term storage of *Acanthamoeba* species. *Parasitol Res*. 2009; 104: 935-937.
19. Ayats J, Martín-Mazuelos E, Pemán J, Quindós G, Sánchez F, García-Rodríguez J, Guarro J, Guinea J, Linares MJ, Pontón J, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Grupo de Estudio de Micología Médica de la SEIMC (GEMICOMED). Spanish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (SEIMC) guidelines for the diagnosis of invasive fungal infections. 2010 update. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011; 29: 39.e1-39.15.
20. Banville N, Browne N, Kavanagh K. Effect of nutrient deprivation on the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection. *Virulence* 2012; 3: 497-503.
21. Banyai L y Patthy L. Amoebapore homologs of *Caenorhabditis elegans*. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1429: 259-264.
22. Bassetti M, Merelli M, Righi E, Díaz-Martín A, Rosello EM, Luzzati R, Parra A, Trecarichi EM, Sanguinetti M, Posteraro B, Garnacho-Montero J, Sartor A, Rello J, Tumbarello M. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility, and outcome of candidemia across five sites in Italy and Spain. *J Clin Microbiol*. 2013; 51: 4167-4172.

23. Beanan MJ y Strome S. Characterization of a germ-line proliferation mutation in *C. elegans*. *Development* 1992; 116: 755-766.
24. Bier E. *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nat Rev Genet.* 2005; 6: 9-23.
25. Bishop JA, Chase N, Magill SS, Kurtzman CP, Fiandaca MJ, Merz WG. *Candida bracarensis* detected among isolates of *Candida glabrata* by peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization: susceptibility data and documentation of presumed infection. *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 443-446.
26. Biswas C, Zuo X, Chen SC, Schibeci SD, Forwood JK, Jolliffe KA, Sorrell TC, Djordjevic JT. Functional disruption of yeast metacaspase, Mca1, leads to miltefosine resistance and inability to mediate miltefosine-induced apoptotic effects. *Fungal Genet Biol.* 2014; 67: 71-81.
27. Blanco-Blanco MT, Gómez-García AC, Hurtado C, Galán-Ladero MA, Lozano MdelC., García-Tapias A, Blanco MT. *Candida orthopsilosis* fungemias in a Spanish tertiary care hospital: incidence, epidemiology and antifungal susceptibility. *Rev Iberoam Micol.* 2014; 31: 145-148.
28. Blankenship JR, Steinbach WJ, Perfect JR, Heitman J. Teaching old drugs new tricks: reincarnating immunosuppressants as antifungal drugs. *Curr Opin Investig Drugs* 2003; 4: 192-199.
29. BOE núm. 34. Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. 2013; BOE núm. 34.
30. BOPV 1991136. ORDEN de 25 de junio de 1991, del Consejero de Agricultura y Pesca, por la que se dictan normas sobre protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos. 2005; disposición: 05527.
31. Borges-Sa M y Aranda-Pérez M. Clinical features of critically ill patients with invasive fungal infection. *Rev Iberoam Micol.* 2012; 29: 102-107.
32. Boyd WA, McBride SJ, Rice JR, Snyder DW, Freedman JH. A high-throughput method for assessing chemical toxicity using a *Caenorhabditis elegans* reproduction assay. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010; 245: 153-159.
33. Brand A. Hyphal growth in human fungal pathogens and its role in virulence. *Int J Microbiol.* 2012; 2012: 517529.
34. Breger J, Fuchs BB, Aperis G, Moy TI, Ausubel FM, Mylonakis E. Antifungal chemical compounds identified using a *C. elegans* pathogenicity assay. *PLoS Pathog.* 2007; 3: e18.

35. Butts A y Krysan DJ. Antifungal drug discovery: something old and something new. *PLoS Pathog.* 2012; 8: e1002870.
36. Cabezón V, Llama-Palacios A, Nombela C, Monteoliva L, Gil C. Analysis of *Candida albicans* plasma membrane proteome. *Proteomics* 2009; 9: 4770-4786.
37. Carrillo-Muñoz A, Giusiano G, Ezkurra P, Quindós G. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Rev Esp Quimioter.* 2006; 19: 130-139.
38. Cassone A, De Bernardis F, Pontieri E, Carruba G, Girmenia C, Martino P, Fernández-Rodríguez M, Quindós G, Pontón J. Biotype diversity of *Candida parapsilosis* and its relationship to the clinical source and experimental pathogenicity. *J Infect Dis.* 1995; 171: 967-975.
39. CEID, Comisión de Ética UPV/EHU 2014, *Ética en la investigación con animales*. Disponible en: <http://www.ehu.es/es/web/ceid/ceea/normativa#4>. Consultado en marzo 2015.
40. Chamilos G, Lionakis MS, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Role of mini-host models in the study of medically important fungi. *Lancet Infect Dis.* 2007; 7: 42-55.
41. Chamilos G, Nobile CJ, Bruno VM, Lewis RE, Mitchell AP, Kontoyiannis DP. *Candida albicans* Cas5, a regulator of cell wall integrity, is required for virulence in murine and toll mutant fly models. *J Infect Dis.* 2009; 200: 152-157.
42. Chandrasekar P. Management of invasive fungal infections: a role for polyenes. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66: 457-465.
43. Chang W, Zhang M, Li Y, Li X, Gao Y, Xie Z, Lou H. Lichen endophyte derived pyridoxatin inactivates *Candida* growth by interfering with ergosterol biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1850: 1762-1771.
44. Chen SC, Slavin MA, Sorrell TC. Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: a comparison. *Drugs* 2011; 71: 11-41.
45. Chen Y, Lin Y, Chen K, Lü J, Teng H, Li S. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis* sensu stricto, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010; 68: 284-292.
46. Cheng SC, van de Veerdonk FL, Lenardon M, Stoffels M, Plantinga T, Smeekens S, Rizzetto L, Mukaremera L, Preechasuth K, Cavalieri D, Kanneganti TD, van der Meer JW, Kullberg BJ, Joosten LA, Gow NA, Netea MG. The dectin-1/inflammasome pathway is responsible for the induction of protective T-helper 17 responses that discriminate between yeasts and hyphae of *Candida albicans*. *J Leukoc Biol.* 2011; 90: 357-366.

47. Cisterna R, Ezpeleta G, Telleria O, Spanish Candidemia Surveillance Group. Nationwide sentinel surveillance of bloodstream *Candida* infections in 40 tertiary care hospitals in Spain. *J Clin Microbiol.* 2010; 48: 4200-4206.
48. Clarke M, Lohan AJ, Liu B, Lagkouvardos I, Roy S, Zafar N, Bertelli C, Schilde C, Kianianmomeni A, Burglin TR, Frech C, Turcotte B, Kopec KO, Synnott JM, Choo C, Paponov I, Finkler A, Heng Tan CS, Hutchins AP, Weinmeier T, Rattei T, Chu JS, Gimenez G, Irimia M, Rigden DJ, Fitzpatrick DA, Lorenzo-Morales J, Bateman A, Chiu CH, Tang P, Hegemann P, Fromm H, Raoult D, Greub G, Miranda-Saavedra D, Chen N, Nash P, Ginger ML, Horn M, Schaap P, Caler L, Loftus BJ. Genome of *Acanthamoeba castellanii* highlights extensive lateral gene transfer and early evolution of tyrosine kinase signaling. *Genome Biol.* 2013; 14: R11.
49. Coleman JJ, Ghosh S, Okoli I, Mylonakis E. Antifungal activity of microbial secondary metabolites. *PLoS One* 2011; 6: e25321.
50. Colombo AL, Ngai AL, Bourque M, Bradshaw SK, Strohmaier KM, Taylor AF, Lupinacci RJ, Kartsonis NA. Caspofungin use in patients with invasive candidiasis caused by common non-*albicans* *Candida* species: review of the caspofungin database. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54: 1864-1871.
51. Cook SM y McArthur JD. Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. *Virulence* 2013; 4: 350-353.
52. Cornely OA, Vázquez J, De Waele J, Betts R, Rotstein C, Nucci M, Pappas PG, Ullmann AJ. Efficacy of micafungin in invasive candidiasis caused by common *Candida* species with special emphasis on non-*albicans* *Candida* species. *Mycoses* 2014; 57: 79-89.
53. Cornistein W, Mora A, Orellana N, Capparelli FJ, del Castillo M. *Candida*: epidemiology and risk factors for non-*albicans* species. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013; 31: 380-384.
54. Cortés L JA y Russi N JA. Equinocandinas. 2011; 28: 529-536.
55. Cotter G, Doyle S, Kavanagh K. Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2000; 27: 163-169.
56. Couillault C, Pujol N, Reboul J, Sabatier L, Guichou JF, Kohara Y, Ewbank JJ. TLR-independent control of innate immunity in *Caenorhabditis elegans* by the TIR domain adaptor protein TIR-1, an ortholog of human SARM. *Nat Immunol.* 2004; 5: 488-494.
57. Cowen LE, Singh SD, Kohler JR, Collins C, Zaas AK, Schell WA, Aziz H, Mylonakis E, Perfect JR, Whitesell L, Lindquist S. Harnessing Hsp90 function as a powerful, broadly effective therapeutic strategy for fungal infectious disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106: 2818-2823.

58. Cuenca-Estrella M. Laboratory diagnosis of fungal infection diseases. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012; 30: 257-264.
59. Cuenca-Estrella M. Antifungal agents in the treatment of systemic infections: Relevance of mechanism of action, activity profile and resistances. *Rev Esp Quimioter.* 2010; 23: 169-176.
60. Cuenca-Estrella M, Gómez-López A, Cuesta I, Zaragoza O, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL, Antifungal Subcommittee of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Frequency of voriconazole resistance in vitro among Spanish clinical isolates of *Candida* spp. according to breakpoints established by the Antifungal Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55: 1794-1797.
61. Da Silva JB, De Albuquerque CM, De Araujo EC, Peixoto CA, Hurd H. Immune defense mechanisms of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) against *Candida albicans* infection. *J Invertebr Pathol.* 2000; 76: 257-262.
62. Dagdeviren M, Cerikcioglu N, Karavus M. Acid proteinase, phospholipase and adherence properties of *Candida parapsilosis* strains isolated from clinical specimens of hospitalised patients. *Mycoses* 2005; 48: 321-326.
63. Dalle F, Wachtler B, L'Ollivier C, Holland G, Bannert N, Wilson D, Labruere C, Bonnin A, Hube B. Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cell Microbiol.* 2010; 12: 248-271.
64. Damle BD, Dowell JA, Walsky RL, Weber GL, Stogniew M, Inskip PB. In vitro and in vivo studies to characterize the clearance mechanism and potential cytochrome P450 interactions of anidulafungin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53: 1149-1156.
65. Dark P, Blackwood B, Gates S, McAuley D, Perkins GD, McMullan R, Wilson C, Graham D, Timms K, Warhurst G. Accuracy of LightCycler((R)) SeptiFast for the detection and identification of pathogens in the blood of patients with suspected sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med.* 2015; 41: 21-33.
66. Delattin N, De Brucker K, Craik DJ, Cheneval O, Frohlich M, Veber M, Girandon L, Davis TR, Weeks AE, Kumamoto CA, Cos P, Coenye T, De Coninck B, Cammue BP, Thevissen K. Plant-derived decapeptide OSIP108 interferes with *Candida albicans* biofilm formation without affecting cell viability. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58: 2647-2656.
67. Delsing CE, Gresnigt MS, Leentjens J, Preijers F, Frager FA, Kox M, Monneret G, Venet F, Bleeker-Rovers CP, van de Veerdonk FL, Pickkers P, Pachot A, Kullberg BJ, Netea MG. Interferon-gamma as adjunctive immunotherapy for invasive fungal infections: a case series. *BMC Infect.Dis.* 2014; 14: 166.

68. Derengowski L.S., Paes HC, Albuquerque P, Tavares AH, Fernandes L, Silva-Pereira I, Casadevall A. The transcriptional response of *Cryptococcus neoformans* to ingestion by *Acanthamoeba castellanii* and macrophages provides insights into the evolutionary adaptation to the mammalian host. *Eukaryot Cell*. 2013; 12: 761-774.
69. Desalermos A, Fuchs BB, Mylonakis E. Selecting an invertebrate model host for the study of fungal pathogenesis. *PLoS Pathog*. 2012; 8: e1002451.
70. Develoux M. Griseofulvin. *Ann Dermatol Venereol*. 2001; 128: 1317-1325.
71. Dieterich C, Schandar M, Noll M, Johannes FJ, Brunner H, Graeve T, Rupp S. In vitro reconstructed human epithelia reveal contributions of *Candida albicans* EFG1 and CPH1 to adhesion and invasion. *Microbiology* 2002; 148: 497-506.
72. Dimopoulos G, Antonopoulou A, Armaganidis A, Vincent JL. How to select an antifungal agent in critically ill patients. *J Crit Care* 2013; 28: 717-727.
73. European Medicines Agency 2007, *Refusal CHMP assessment report for Mycograb international Nonproprietary Name: Efungumab*, EMEA 2007, London.
74. Ewbank JJ y Zugasti O. *C. elegans*: model host and tool for antimicrobial drug discovery. *Dis.Model.Mech*. 2011; 4: 300-304.
75. Földi R, Kovács R, Gesztelyi R, Kardos G, Berényi R, Juhász B, Szilágyi J, Mózes J, Majoros L. Comparison of in vitro and vivo efficacy of caspofungin against *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. albicans*. *Mycopathologia* 2012; 174: 311-318.
76. Gago S, García-Rodas R, Cuesta I, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A. *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* virulence in the non-conventional host *Galleria mellonella*. *Virulence* 2014; 5: 278-285.
77. Ghosh S, Howe N, Volk K, Tati S, Nickerson KW, Petro TM. *Candida albicans* cell wall components and farnesol stimulate the expression of both inflammatory and regulatory cytokines in the murine RAW264.7 macrophage cell line. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2010; 60: 63-73.
78. Giacomotto J y Segalat L. High-throughput screening and small animal models, where are we? *Br J Pharmacol*. 2010; 160: 204-216.
79. Gil-Alonso S, Jauregizar N, Cantón E, Eraso E, Quindós G. Comparison of the in vitro activity of echinocandins against *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, and *Candida africana* by time-kill curves. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015; 82: 57-61.

80. Gilbert AS, Wheeler RT, May RC. Fungal Pathogens: Survival and Replication within Macrophages. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014.
81. Glavis-Bloom J, Muhammed M, Mylonakis E. Of model hosts and man: using *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* and *Galleria mellonella* as model hosts for infectious disease research. *Adv Exp Med Biol*. 2012; 710: 11-17.
82. Golas M, Netsvtyetayeva I, Sikora M, Piskorska K, Sulik-Tyszka B, Swoboda-Kopec E. Trends in antifungal susceptibility of *Candida* species--one year observation. *Pol J Microbiol*. 2014; 63: 217-222.
83. Gómez-López A, Alastruey-Izquierdo A, Rodríguez D, Almirante B, Pahissa A, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Barcelona Candidemia Project Study Group. Prevalence and susceptibility profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: results from population-based surveillance of candidemia in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52: 1506-1509.
84. González GM, Elizondo M, Garza-González E, González JG. Therapeutic efficacy of posaconazole against *Candida glabrata* in a murine model of vaginitis. *Mycoses* 2011; 54: 119-122.
85. Gravato-Nobre MJ y Hodgkin J. *Caenorhabditis elegans* as a model for innate immunity to pathogens. *Cell Microbiol*. 2005; 7: 741-751.
86. Hagedorn M, Rohde KH, Russell DG, Soldati T. Infection by tubercular mycobacteria is spread by nonlytic ejection from their amoeba hosts. *Science* 2009; 323: 1729-1733.
87. Hakki M, Staab JF, Marr KA. Emergence of a *Candida krusei* isolate with reduced susceptibility to caspofungin during therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50: 2522-2524.
88. Hamill RJ. Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. *Drugs* 2013; 73: 919-934.
89. He F, Liu W, Zheng S, Zhou L, Ye B, Qi Z. Ion transport through dimethyl sulfoxide (DMSO) induced transient water pores in cell membranes. *Mol Membr Biol*. 2012; 29: 107-113.
90. Heeres J, Meerpoel L, Lewi P. Conazoles. *Molecules* 2010; 15: 4129-4188.
91. Hoffman HL, Ernst EJ, Klepser ME. Novel triazole antifungal agents. *Expert Opin Investig Drugs* 2000; 9: 593-605.
92. Irazoqui JE, Troemel ER, Feinbaum RL, Luhachack LG, Cezairliyan BO, Ausubel FM. Distinct pathogenesis and host responses during infection of *C. elegans* by *P. aeruginosa* and *S. aureus*. *PLoS Pathog*. 2010; 6: e1000982.

93. Ishibashi K, Fukazawa R, Miura NN, Adachi Y, Ogawa S, Ohno N. Diagnostic potential of antibody titres against *Candida* cell wall beta-glucan in Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol.* 2014; 177: 161-167.
94. Jacobsen ID. *Galleria mellonella* as a model host to study virulence of *Candida*. *Virulence* 2014; 5: 237-239.
95. Jenicek M. Valoración de la salud de los individuos y de las poblaciones. 1996; 43-78.
96. Jiménez-López C y Lorenz MC. Fungal immune evasion in a model host-pathogen interaction: *Candida albicans* versus macrophages. *PLoS Pathog.* 2013; 9: e1003741.
97. Junqueira JC, Fuchs BB, Muhammed M, Coleman JJ, Suleiman JM, Vilela SF, Costa AC, Rasteiro VM, Jorge AO, Mylonakis E. Oral *Candida albicans* isolates from HIV-positive individuals have similar in vitro biofilm-forming ability and pathogenicity as invasive *Candida* isolates. *BMC Microbiol.* 2011; 11: 247-2180-11-247.
98. Kabir MA, Hussain MA, Ahmad Z. *Candida albicans*: A Model Organism for Studying Fungal Pathogens. *ISRN Microbiol.* 2012; 2012: 538694.
99. Kading RC, Biggerstaff BJ, Young G, Komar N. Mosquitoes used to draw blood for arbovirus viremia determinations in small vertebrates. *PLoS One* 2014; 9: e99342.
100. Kaito C, Akimitsu N, Watanabe H, Sekimizu K. Silkworm larvae as an animal model of bacterial infection pathogenic to humans. *Microb Pathog.* 2002; 32: 183-190.
101. Kalantar E, Assadi M, Pormazaheri H, Hatami S, Barari MA, Asgari E, Mahmoudi E, Kabir K, Amin Marashi SM. *Candida non albicans* with a High Amphotericin B Resistance Pattern Causing Candidemia among Cancer Patients. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014; 15: 10933-10935.
102. Karwa R y Wargo KA. Efungumab: a novel agent in the treatment of invasive candidiasis. *Ann Pharmacother.* 2009; 43: 1818-1823.
103. Katiki LM, Ferreira JF, Zajac AM, Masler C, Lindsay DS, Chagas AC, Amarante AF. *Caenorhabditis elegans* as a model to screen plant extracts and compounds as natural anthelmintics for veterinary use. *Vet Parasitol.* 2011; 182: 264-268.
104. Kicka S, Trofimov V, Harrison C, Ouertatani-Sakouhi H, McKinney J, Scapozza L, Hilbi H, Cosson P, Soldati T. Establishment and validation of whole-cell based fluorescence assays to identify anti-mycobacterial compounds using the *Acanthamoeba castellanii*-*Mycobacterium marinum* host-pathogen system. *PLoS One* 2014; 9: e87834.

105. Koga-Ito CY, Komiyama EY, Martins CA, Vasconcellos TC, Jorge AO, Carvalho YR, do Prado RF, Balducci I. Experimental systemic virulence of oral *Candida dubliniensis* isolates in comparison with *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida krusei*. *Mycoses* 2011; 54: e278-85.
106. Kohno S, Izumikawa K, Yoshida M, Takesue Y, Oka S, Kamei K, Miyazaki Y, Yoshinari T, Kartsonis NA, Niki Y. A double-blind comparative study of the safety and efficacy of caspofungin versus micafungin in the treatment of candidiasis and aspergillosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013; 32: 387-397.
107. Krautz R, Arefin B, Theopold U. Damage signals in the insect immune response. *Front Plant Sci.* 2014; 5: 342.
108. Krenova Z, Pavelka Z, Lokaj P, Skotakova J, Kocmanova I, Teyschl O, Kren L, Mudry P, Sterba J. Successful treatment of life-threatening *Candida* peritonitis in a child with abdominal non-Hodgkin lymphoma using Efungumab and amphotericin B colloid dispersion. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2010; 32: 128-130.
109. Kulshrestha V y Pathak SC. Aspergillosis in German cockroach *Blattella germanica* (L.) (Blattoidea: Blattellidae). *Mycopathologia* 1997; 139: 75-78.
110. Kumar V, Singh GP, Babu AM. Surface ultrastructural studies on the germination, penetration and conidial development of *Aspergillus flavus* Link: Fries infecting silkworm, *Bombyx mori* Linn. *Mycopathologia* 2004; 157: 127-135.
111. Lamoth F, Jatou K, Prod'homme G, Senn L, Bille J, Calandra T, Marchetti O. Multiplex blood PCR in combination with blood cultures for improvement of microbiological documentation of infection in febrile neutropenia. *J Clin Microbiol.* 2010; 48: 3510-3516.
112. Lass-Flörl C. Zygomycosis: conventional laboratory diagnosis. *Clin Microbiol Infect.* 2009; 15 Suppl 5: 60-65.
113. Lass-Flörl C, Mayr A, Perkhöfer S, Hinterberger G, Hausdorfer J, Speth C, Fille M. Activities of antifungal agents against yeasts and filamentous fungi: assessment according to the methodology of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52: 3637-3641.
114. Lee X, Reimann C, Greub G, Sufrin J, Croxatto A. The *Pseudomonas aeruginosa* toxin L-2-amino-4-methoxy-trans-3-butenoic acid inhibits growth and induces encystment in *Acanthamoeba castellanii*. *Microbes Infect.* 2012; 14: 268-272.
115. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; 86: 973-983.

116. Li DD, Deng L, Hu GH, Zhao LX, Hu DD, Jiang YY, Wang Y. Using *Galleria mellonella*-*Candida albicans* infection model to evaluate antifungal agents. *Biol Pharm Bull.* 2013; 36: 1482-1487.
117. Lionakis MS. *Drosophila* and *Galleria* insect model hosts: new tools for the study of fungal virulence, pharmacology and immunology. *Virulence* 2011; 2: 521-527.
118. Lionakis MS y Kontoyiannis DP. Fruit flies as a minihost model for studying drug activity and virulence in *Aspergillus*. *Med Mycol.* 2005; 43 Suppl 1: S111-4.
119. Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, Diekema DJ. Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 2659-2664.
120. Low CY y Rotstein C. Emerging fungal infections in immunocompromised patients. *F1000 Med Rep.* 2011; 3: 14-14. Epub 2011 Jul 1.
121. Lucignano B, Ranno S, Liesenfeld O, Pizzorno B, Putignani L, Bernaschi P, Menichella D. Multiplex PCR allows rapid and accurate diagnosis of bloodstream infections in newborns and children with suspected sepsis. *J Clin Microbiol.* 2011; 49: 2252-2258.
122. Luo G, Ibrahim AS, Spellberg B, Nobile CJ, Mitchell AP, Fu Y. *Candida albicans* Hyr1p confers resistance to neutrophil killing and is a potential vaccine target. *J Infect Dis.* 2010; 201: 1718-1728.
123. Luo S, Skerka C, Kurzai O, Zipfel PF. Complement and innate immune evasion strategies of the human pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Immunol.* 2013; 56: 161-169.
124. MacCallum DM. *Candida* infections and modelling disease. 2010; 41-67.
125. Mahieu LM, Van Gasse N, Wildemeersch D, Jansens H, Ieven M. Number of sites of perinatal *Candida* colonization and neutropenia are associated with nosocomial candidemia in the neonatal intensive care unit patient. *Pediatr Crit Care Med.* 2010; 11: 240-245.
126. Mallo GV, Kurz CL, Couillault C, Pujol N, Granjeaud S, Kohara Y, Ewbank JJ. Inducible antibacterial defense system in *C. elegans*. *Curr Biol.* 2002; 12: 1209-1214.
127. Mariné M, Espada R, Torrado J, Pastor FJ, Guarro J. Efficacy of a new formulation of amphotericin B in murine disseminated infections by *Candida glabrata* or *Candida tropicalis*. *Int J Antimicrob Agents* 2009a; 34: 566-569.

128. Mariné M, Pastor FJ, Sahand IH, Pontón J, Quindós G, Guarro J. Paradoxical growth of *Candida dubliniensis* does not preclude in vivo response to echinocandin therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009b; 53: 5297-5299.
129. Mariné M, Serena C, Fernández-Torres B, Pastor FJ, Guarro J. Activities of flucytosine, fluconazole, amphotericin B, and micafungin in a murine model of disseminated infection by *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 4757-4759.
130. Matsumoto H, Nagao J, Cho T, Kodama J. Evaluation of pathogenicity of *Candida albicans* in germination-ready states using a silkworm infection model. *Med Mycol J.* 2013; 54: 131-140.
131. McGhee JD. The *C. elegans* intestine. *WormBook* 2007; 1-36.
132. McLaggan D, Amezaga MR, Petra E, Frost A, Duff EI, Rhind SM, Fowler PA, Glover LA, Lagido C. Impact of sublethal levels of environmental pollutants found in sewage sludge on a novel *Caenorhabditis elegans* model biosensor. *PLoS One* 2012; 7: e46503.
133. Means TK. Fungal pathogen recognition by scavenger receptors in nematodes and mammals. *Virulence* 2010; 1: 37-41.
134. Melo JA y Ruvkun G. Inactivation of conserved *C. elegans* genes engages pathogen-and xenobiotic-associated defenses. *Cell* 2012; 149: 452-466.
135. Miranda-Zapico I, Eraso E, Hernández-Almaraz JL, López-Soria LM, Carrillo-Muñoz AJ, Hernández-Molina JM, Quindós G. Prevalence and antifungal susceptibility patterns of new cryptic species inside the species complexes *Candida parapsilosis* and *Candida glabrata* among blood isolates from a Spanish tertiary hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66: 2315-2322.
136. Morales DK y Hogan DA. *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. *PLoS Pathog.* 2010; 6: e1000886.
137. Moran GP, Coleman DC, Sullivan DJ. *Candida albicans* versus *Candida dubliniensis*: Why Is *C. albicans* More Pathogenic? *Int J Microbiol.* 2012; 2012: 205921.
138. Moudgal V, Little T, Boikov D, Vázquez JA. Multiechinocandin- and multiazole-resistant *Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 767-769.
139. Moy TI, Conery AL, Larkins-Ford J, Wu G, Mazitschek R, Casadei G, Lewis K, Carpenter AE, Ausubel FM. High-throughput screen for novel antimicrobials using a whole animal infection model. *ACS Chem Biol.* 2009; 4: 527-533.

140. Mylonakis E, Ausubel FM, Tang RJ, Calderwood SB. The art of serendipity: killing of *Caenorhabditis elegans* by human pathogens as a model of bacterial and fungal pathogenesis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2003; 1: 167-173.
141. Nakamura A, Okigaki M, Miura N, Suzuki C, Ohno N, Kametani F, Hamaoka K. Involvement of mannose-binding lectin in the pathogenesis of Kawasaki disease-like murine vasculitis. *Clin Immunol.* 2014; 153: 64-72.
142. Nucci M, Queiróz-Telles F, Alvarado-Matute T, Tiraboschi IN, Cortés J, Zurita J, Guzmán-Blanco M, Santolaya ME, Thompson L, Sifuentes-Osornio J, Echevarría JI, Colombo AL, Latin American Invasive Mycosis Network. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *PLoS One* 2013; 8: e59373.
143. Odds FC, Van Nuffel L, Dams G. Prevalence of *Candida dubliniensis* isolates in a yeast stock collection. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 2869-2873.
144. Office of Laboratory Animal Welfare National Institutes of Health 2002, *Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook*. Disponible en: <http://grants.nih.gov/grants/olaw/guidebook.pdf>. Consultado en julio de 2014.
145. Okoli I, Coleman JJ, Tampakakis E, An WF, Holson E, Wagner F, Conery AL, Larkins-Ford J, Wu G, Stern A, Ausubel FM, Mylonakis E. Identification of antifungal compounds active against *Candida albicans* using an improved high-throughput *Caenorhabditis elegans* assay. *PLoS One* 2009; 4: e7025.
146. Olfert E, Cross B, Mc William A. Guide to the Care & Use of Experimental Animals. 1993.
147. Ooi SK, Lim TY, Lee SH, Nathan S. *Burkholderia pseudomallei* kills *Caenorhabditis elegans* through virulence mechanisms distinct from intestinal lumen colonization. *Virulence* 2012; 3: 485-496.
148. O'Rourke D, Baban D, Demidova M, Mott R, Hodgkin J. Genomic clusters, putative pathogen recognition molecules, and antimicrobial genes are induced by infection of *C. elegans* with *M. nematophilum*. *Genome Res.* 2006; 16: 1005-1016.
149. Ortega M, Marco F, Soriano A, Almela M, Martínez JA, López J, Pitart C, Mensa J. *Candida* species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008. *J Hosp Infect.* 2011; 77: 157-161.
150. Ott E, Saathoff S, Graf K, Schwab F, Chaberny IF. The prevalence of nosocomial and community acquired infections in a university hospital: an observational study. *Dtsch Arztebl Int.* 2013; 110: 533-540.

151. Oz Y y Kiraz N. Diagnostic methods for fungal infections in pediatric patients: microbiological, serological and molecular methods. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011; 9: 289-298.
152. Pammi M, Holland L, Butler G, Gacser A, Bliss JM. *Candida parapsilosis* is a significant neonatal pathogen: a systematic review and meta-analysis. *Pediatr Infect Dis J.* 2013; 32: e206-16.
153. Papon N, Courdavault V, Clastre M, Bennett RJ. Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. *PLoS Pathog.* 2013; 9: e1003550.
154. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK, Jr, Calandra TF, Edwards JE, Jr, Filler SG, Fisher JF, Kullberg BJ, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD, Infectious Diseases Society of America. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2009; 48: 503-535.
155. Parneix P y Rogues AM. Nosocomial infections. *Rev Prat.* 2013; 63: 721-727.
156. Pastor J y Guarro J. Micafungin: experimental therapy of fungal infections in animal models. *Rev Iberoam Micol.* 2009; 26: 42-48.
157. Pathak SC y Kulshrestha V. Experimental aspergillosis in the German cockroach *Blattella germanica*: a histopathological study. *Mycopathologia* 1998; 143: 13-16.
158. Pemán J, Cantón E, Miñana JJ, Florez JA, Echeverria J, Ortega DN, Alarcón JM, Fontanals D, Sard BG, Moreno BB, Torroba L, Ayats J, Pérez MA, Fernández MA, Reus FS, Natal IF, García GR, Ezpeleta G, Martín-Mazuelos E, Iglesias I, Rezusta A, de Ocariz IR, Nieto AG, el Grupo de Estudio FUNGEMYCA. Variación de la epidemiología de las fungemias y de la sensibilidad al fluconazol de los aislamientos de hemocultivos en los últimos 10 años en España: resultados del estudio FUNGEMYCA. *Rev Iberoam Micol.* 2011; 28: 91-99.
159. Pemán J, Cantón E, Quindós G, Eraso E, Alcoba J, Guinea J, Merino P, Ruiz-Pérez-de-Pipaon MT, Pérez-del-Molino L, Linares-Sicilia MJ, Marco F, García J, Rosello EM, Gómez-G-de-la-Pedrosa E, Borrell N, Porrás A, Yague G, FUNGEMYCA Study Group. Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67: 1181-1187.
160. Pemán J y Salavert M. General epidemiology of invasive fungal disease. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012; 30: 90-98.
161. Perlín DS. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist Updat* 2007; 10: 121-130.

162. Perlroth J, Choi B, Spellberg B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol.* 2007; 45: 321-346.
163. Peters BM, Ovchinnikova ES, Krom BP, Schlecht LM, Zhou H, Hoyer LL, Busscher HJ, van der Mei HC, Jabra-Rizk MA, Shirtliff ME. *Staphylococcus aureus* adherence to *Candida albicans* hyphae is mediated by the hyphal adhesin Als3p. *Microbiology* 2012; 158: 2975-2986.
164. Pfaller MA, Castanheira M, Lockhart SR, Ahlquist AM, Messer SA, Jones RN. Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol.* 2012; 50: 1199-1203.
165. Pinjon E, Moran GP, Coleman DC, Sullivan DJ. Azole susceptibility and resistance in *Candida dubliniensis*. *Biochem Soc Trans.* 2005; 33: 1210-1214.
166. Pontón J. The fungal cell wall and the mechanism of action of anidulafungin. *Rev Iberoam Micol.* 2008; 25: 78-82.
167. Pradel E, Zhang Y, Pujol N, Matsuyama T, Bargmann CI, Ewbank JJ. Detection and avoidance of a natural product from the pathogenic bacterium *Serratia marcescens* by *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104: 2295-2300.
168. Puig-Asensio M, Padilla B, Garnacho-Montero J, Zaragoza O, Aguado JM, Zaragoza R, Montejo M, Muñoz P, Ruiz-Camps I, Cuenca-Estrella M, Almirante B, CANDIPOP Project, GEIH-GEMICOMED (SEIMC), REIPI. Epidemiology and predictive factors for early and late mortality in *Candida* bloodstream infections: a population-based surveillance in Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20: O245-54.
169. Pukkila-Worley R, Feinbaum R, Kirienko NV, Larkins-Ford J, Conery AL, Ausubel FM. Stimulation of host immune defenses by a small molecule protects *C. elegans* from bacterial infection. *PLoS Genet.* 2012; 8: e1002733.
170. Pukkila-Worley R, Holson E, Wagner F, Mylonakis E. Antifungal drug discovery through the study of invertebrate model hosts. *Curr Med Chem.* 2009a; 16: 1588-1595.
171. Pukkila-Worley R, Peleg AY, Tampakakis E, Mylonakis E. *Candida albicans* hyphal formation and virulence assessed using a *Caenorhabditis elegans* infection model. *Eukaryot Cell.* 2009b; 8: 1750-1758.
172. Quindós G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Rev Iberoam Micol.* 2014; 31: 42-48.
173. Quindós G. Candidemias y candidiasis invasivas nosocomiales. *Med Clin (Barc)* 2010; 134: 17-19.

174. Quindós G y Eraso E. Actividad antifúngica in vitro de la anidulafungina. *Rev Iberoam Micol.* 2008; 25: 83-91.
175. Quindós G, Eraso E, López-Soria LM, Ezpeleta G. Enfermedad fúngica invasora: ¿Diagnóstico micológico convencional o molecular? *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011; 30: 560-571.
176. Ramage G, Martínez JP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res.* 2006; 6: 979-986.
177. Raschi E, Poluzzi E, Koci A, Caraceni P, Ponti FD. Assessing liver injury associated with antimycotics: Concise literature review and clues from data mining of the FAERS database. *World J Hepatol.* 2014; 6: 601-612.
178. Ravu RR, Chen YL, Jacob MR, Pan X, Agarwal AK, Khan SI, Heitman J, Clark AM, Li XC. Synthesis and antifungal activities of miltefosine analogs. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013; 23: 4828-4831.
179. Rickerts V, Khot PD, Myerson D, Ko DL, Lambrecht E, Fredricks DN. Comparison of quantitative real time PCR with Sequencing and ribosomal RNA-FISH for the identification of fungi in formalin fixed, paraffin-embedded tissue specimens. *BMC Infect Dis.* 2011; 11: 202-2334-11-202.
180. Rippon, J.W. 1988, *Medical mycology: The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes*, 3rd edn, WB Saunders company, Philadelphia, USA.
181. Roeder T, Stanisak M, Gelhaus C, Bruchhaus I, Grotzinger J, Leippe M. Caenopores are antimicrobial peptides in the nematode *Caenorhabditis elegans* instrumental in nutrition and immunity. *Dev Comp Immunol.* 2010; 34: 203-209.
182. Rowan R, Moran C, McCann M, Kavanagh K. Use of *Galleria mellonella* larvae to evaluate the in vivo anti-fungal activity of [Ag₂(mal)(phen)₃]. *Biometals* 2009; 22: 461-467.
183. Ruiz LS, Khouri S, Hahn RC, da Silva EG, de Oliveira VK, Gandra RF, Paula CR. Candidemia by species of the *Candida parapsilosis* complex in children's hospital: prevalence, biofilm production and antifungal susceptibility. *Mycopathologia* 2013; 175: 231-239.
184. Russell W, Burch R. *The Principles of Humane Experimental Technique.* 1959.
185. Sánchez Vargas LO, Eraso E, Carrillo-Muñoz AJ, Aguirre JM, Gaitan-Cepeda LA, Quindós G. In vitro activity of voriconazole against Mexican oral yeast isolates. *Mycoses* 2010; 53: 200-203.

186. Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJ. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol.* 2013; 62: 10-24.
187. Schild L, Heyken A, de Groot PW, Hiller E, Mock M, de Koster C, Horn U, Rupp S, Hube B. Proteolytic cleavage of covalently linked cell wall proteins by *Candida albicans* Sap9 and Sap10. *Eukaryot Cell.* 2011; 10: 98-109.
188. Schulenburg H, Hoepfner MP, Weiner J, 3rd, Bornberg-Bauer E. Specificity of the innate immune system and diversity of C-type lectin domain (CTL) proteins in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Immunobiology* 2008; 213: 237-250.
189. Scorzoni L, de Lucas MP, Mesa-Arango AC, Fusco-Almeida AM, Lozano E, Cuenca-Estrella M, Mendes-Giannini MJ, Zaragoza O. Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile. *PLoS One* 2013; 8: e60047.
190. Shin JH, Kee SJ, Shin MG, Kim SH, Shin DH, Lee SK, Suh SP, Ryang DW. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 1244-1248.
191. Sil A y Andrianopoulos A. Thermally Dimorphic Human Fungal Pathogens-Polyphyletic Pathogens with a Convergent Pathogenicity Trait. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014.
192. Silva AP, Miranda IM, Lisboa C, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Prevalence, distribution, and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* in a tertiary care hospital. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 2392-2397.
193. Simonetti A, Ottaiano E, Diana MV, Onza C, Triassi M. Epidemiology of hospital-acquired infections in an adult intensive care unit: results of a prospective cohort study. *Ann Ig.* 2013; 25: 281-289.
194. Sociedad Española de Medicina Intensiva Crítica y Unidades Coronarias (SEMICYUC) Grupo de Trabajo de Enfermedades Infecciosas 2014, *Estudio Nacional de Vigilancia de Infección Nosocomial en Servicios de Medicina Intensiva.* 2014.
195. Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene 2014. *EPINE: Evolución 1990-2014, con Resumen de 2014.* Disponible en: <http://hws.vhebron.net/epine/Descargas/EPINE%201990-2014%20web.pdf>. Consultado en febrero de .
196. Solis GM y Petrascheck M. Measuring *Caenorhabditis elegans* Life Span in 96 Well Microtiter Plates. *J Vis Exp.* 2011; e2496.

197. Spreghini E, Maida CM, Tomassetti S, Orlando F, Giannini D, Milici ME, Scalise G, Barchiesi F. Posaconazole against *Candida glabrata* isolates with various susceptibilities to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52: 1929-1933.
198. Spreghini E, Orlando F, Tavanti A, Senesi S, Giannini D, Manso E, Barchiesi F. In vitro and in vivo effects of echinocandins against *Candida parapsilosis* sensu stricto, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67: 2195-2202.
199. Staab JF, Datta K, Rhee P. Niche-specific requirement for hyphal wall protein 1 in virulence of *Candida albicans*. *PLoS One* 2013; 8: e80842.
200. Stiernagle T. Maintenance of *C. elegans*. *WormBook* 2006; 1-11.
201. Stokes C, Moran GP, Spiering MJ, Cole GT, Coleman DC, Sullivan DJ. Lower filamentation rates of *Candida dubliniensis* contribute to its lower virulence in comparison with *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol.* 2007; 44: 920-931.
202. Sullivan DJ y Moran GP. Differential virulence of *Candida albicans* and *C. dubliniensis*: A role for Tor1 kinase? *Virulence* 2011; 2: 77-81.
203. Sun L, Liao K, Wang D. Effects of magnolol and honokiol on adhesion, yeast-hyphal transition, and formation of biofilm by *Candida albicans*. *PLoS One* 2015a; 10: e0117695.
204. Sun LM, Liao K, Liang S, Yu PH, Wang DY. Synergistic activity of magnolol with azoles and its possible antifungal mechanism against *Candida albicans*. *J Appl Microbiol.* 2015b; 118: 826-838.
205. Szabo Z, Borbely A, Kardos G, Somogyvari F, Kemény-Beke A, Asztalos L, Rozgonyi F, Majoros L. In vitro efficacy of amphotericin B, 5-fluorocytosine, fluconazole, voriconazole and posaconazole against *Candida dubliniensis* isolates using time-kill methodology. *Mycoses* 2010; 53: 196-199.
206. Szabó Z, Szilágyi J, Tavanti A, Kardos G, Rozgonyi F, Bayegan S, Majoros L. In vitro efficacy of 5 antifungal agents against *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* as determined by time-kill methodology. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009; 64: 283-288.
207. Szilágyi J, Földi R, Gesztelyi R, Bayegan S, Kardos G, Juhász B, Majoros L. Comparison of the kidney fungal burden in experimental disseminated candidiasis by species of the *Candida parapsilosis* complex treated with fluconazole, amphotericin B and caspofungin in a temporarily neutropenic murine model. *Chemotherapy* 2012; 58: 159-164.

208. Szweda P, Gucwa K, Romanowska E, Dzierzanowska-Fangrat K, Naumiuk L, Brillowska-Dabrowska A, Wojciechowska-Koszko I, Milewski S. Mechanisms of azole resistance among clinical isolates of *Candida glabrata* in Poland. *J Med Microbiol.* 2015.
209. Tamang MD, Kim S, Kim SM, Kong HH, Kim J. Interaction of *Acinetobacter baumannii* 19606 and 1656-2 with *Acanthamoeba castellanii*. *J Microbiol.* 2011; 49: 841-846.
210. Tampakakis E, Okoli I, Mylonakis E. A *C. elegans*-based, whole animal, in vivo screen for the identification of antifungal compounds. *Nat Protoc.* 2008; 3: 1925-1931.
211. Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 284-292.
212. te Welscher YM, van Leeuwen MR, de Kruijff B, Dijksterhuis J, Breukink E. Polyene antibiotic that inhibits membrane transport proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109: 11156-11159.
213. Treviño-Rangel RdJ, Rodríguez-Sánchez IP, Elizondo-Zertuche M, Martínez-Fierro ML, Garza-Veloz I, Romero-Díaz VJ, González JG, González GM. Evaluation of in vivo pathogenicity of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* with different enzymatic profiles in a murine model of disseminated candidiasis. *Medical Mycology* 2014; 52: 240-245.
214. Trnovsky J, Merz W, Della-Latta P, Wu F, Arendrup MC, Stender H. Rapid and accurate identification of *Candida albicans* isolates by use of PNA FISHFlow. *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 1537-1540.
215. Troemel ER, Chu SW, Reinke V, Lee SS, Ausubel FM, Kim DH. p38 MAPK regulates expression of immune response genes and contributes to longevity in *C. elegans*. *PLoS Genet.* 2006; 2: e183.
216. Troskie AM, Rautenbach M, Delattin N, Vosloo JA, Dathe M, Cammue BP, Thevissen K. Synergistic activity of the tyrocidines, antimicrobial cyclodecapeptides from *Bacillus aneurinolyticus*, with amphotericin B and caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58: 3697-3707.
217. van Asbeck E, Clemons KV, Martinez M, Tong AJ, Stevens DA. Significant differences in drug susceptibility among species in the *Candida parapsilosis* group. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008; 62: 106-109.

218. Van Waeyenberghe L, Baré J, Pasmans F, Claeys M, Bert W, Haesebrouck F, Houf K, Martel A. Interaction of *Aspergillus fumigatus* conidia with *Acanthamoeba castellanii* parallels macrophage-fungus interactions. *Environ Microbiol Rep.* 2013; 5: 819-824.
219. Vedyappan G, Dumontet V, Pelissier F, d'Enfert C. Gymnemic acids inhibit hyphal growth and virulence in *Candida albicans*. *PLoS One* 2013; 8: e74189.
220. Villar CC, Kashleva H, Nobile CJ, Mitchell AP, Dongari-Bagtzoglou A. Mucosal tissue invasion by *Candida albicans* is associated with E-cadherin degradation, mediated by transcription factor Rim101p and protease Sap5p. *Infect Immun.* 2007; 75: 2126-2135.
221. Vogel BE y Hedgecock EM. Hemicentin, a conserved extracellular member of the immunoglobulin superfamily, organizes epithelial and other cell attachments into oriented line-shaped junctions. *Development* 2001; 128: 883-894.
222. Vogel H, Altincicek B, Glöckner G, Vilcinskas A. A comprehensive transcriptome and immune-gene repertoire of the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. *BMC Genomics* 2011; 12: 308-2164-12-308.
223. Wang P. Rapid differentiation of *Candida albicans* from non-*C. albicans* directly in a variety of clinical specimens using fluorescent in situ hybridisation. *Mycoses* 2011; 54: 331-336.
224. West L, Lowman DW, Mora-Montes HM, Grubb S, Murdoch C, Thornhill MH, Gow NA, Williams D, Haynes K. Differential virulence of *Candida glabrata* glycosylation mutants. *J Biol Chem.* 2013; 288: 22006-22018.
225. Williams JG. Dictyostelium finds new roles to model. *Genetics* 2010; 185: 717-726.
226. Williams RS, Boeckeler K, Gräf R, Müller-Taubenberger A, Li Z, Isberg RR, Wessels D, Soll DR, Alexander H, Alexander S. Towards a molecular understanding of human diseases using *Dictyostelium discoideum*. *Trends Mol Med.* 2006; 12: 415-424.
227. Williams SN, Locke CJ, Braden AL, Caldwell KA, Caldwell GA. Epileptic-like convulsions associated with LIS-1 in the cytoskeletal control of neurotransmitter signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Hum Mol Genet.* 2004; 13: 2043-2059.
228. Yamada N, Kumada K, Kishino S, Mochizuki N, Ohno K, Ogura S. Distribution of micafungin in the tissue fluids of patients with invasive fungal infections. *J Infect Chemother.* 2011; 17: 731-734.
229. Yoo JI, Kim HS, Choi CW, Yoo JS, Yu JY, Lee YS. Proteomic Analysis of Intracellular and Membrane Proteins From Voriconazole-Resistant *Candida glabrata*. *Osong Public Health Res Perspect.* 2013; 4: 293-300.

230. Yoshikane Y, Koga M, Imanaka-Yoshida K, Cho T, Yamamoto Y, Yoshida T, Hashimoto J, Hirose S, Yoshimura K. JNK is critical for the development of *Candida albicans*-induced vascular lesions in a mouse model of Kawasaki disease. *Cardiovasc Pathol*. 2015; 24: 33-40.
231. Zhao LX, Li DD, Hu DD, Hu GH, Yan L, Wang Y, Jiang YY. Effect of tetrandrine against *Candida albicans* biofilms. *PLoS One* 2013; 8: e79671.
232. Zheltikova TM, Glushakova AM, Alesho NA. The yeast community associated with the digestive tract of the German cockroach *Blattella germanica* L. *Med Parazitol (Mosk)* 2011; (2): 18-22.