

Elena Dolader Ballesteros

**Análisis de la actividad antifúngica de nuevas
formulaciones de voriconazol**

Trabajo de Fin de Grado

Grado de Biotecnología



**UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI**

Tutor: Dr. Javier Capilla Luque

Unitat de Micologia i Microbiologia Ambiental

Dep. Ciències Mèdiques Bàsiques (URV)

Tarragona, junio de 2019

ÍNDICE

1. DATOS DEL CENTRO	1
2. RESUMEN.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
3.1. <i>Candida</i> , <i>Aspergillus</i> y géneros de interés clínico.....	5
3.2. Agentes antifúngicos.....	7
3.3. Actividad y eficacia antifúngica	9
4. INTERÉS, HIPÓTESIS Y OBJETIVO	13
5. MATERIALES Y MÉTODOS	14
5.1. Cepas	14
5.2. Antifúngicos	14
5.3. Estudios <i>in vitro</i>	16
5.3.1. Método de microdilución.....	16
5.3.2. Método de difusión	20
5.4. Estudios <i>in vivo</i>	21
5.4.1. Biodistribución y toxicidad	21
5.4.2. Estudio de eficacia	22
5.5. Análisis estadístico	23
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
6.1. Estudios <i>in vitro</i>	24
6.1.1. Método de microdilución.....	24
6.1.2. Método de difusión	27
6.2. Estudios <i>in vivo</i>	34
6.2.1. Biodistribución y toxicidad	34
6.2.2. Estudio de eficacia	36
7. CONCLUSIÓN	38
8. BIBLIOGRAFÍA	39
9. AUTOEVALUACIÓN	43
ANEXO.....	44

1. DATOS DEL CENTRO

El presente Trabajo de Fin de Grado (TFG) ha sido desarrollado durante mi estancia en el Grup de Micologia i Microbiologia Ambiental (gMMA) de la Unitat de Microbiologia de la URV, dirigido por el Dr. Josep Guarro. La Unitat forma parte del Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, ubicado en la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, formando parte el Campus Bellissents de Reus.

Dentro del grupo, hay tres secciones con líneas de investigación y objetivos diferenciados. Dos de ellas, la sección de Micología Médica y la de Biodiversidad Fúngica, se centran en el estudio de los hongos; mientras que la sección de Microbiología Ambiental tiene como objeto de estudio aquellas bacterias patógenas para el ser humano que se transmiten a través del agua.

Los estudios recogidos en el presente TFG se realizaron durante los meses de marzo a junio en el gMMA, sección Micología Médica, cuyo responsable es el Dr Javier Capilla. La sección de Micología Médica centra su investigación en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra infecciones fúngicas de difícil tratamiento. Esta Sección explora la actividad *in vitro* y la eficacia *in vivo* de nuevos fármacos, de nuevas formulaciones de fármacos ya comercializados así como la optimización de tratamientos con el fin de mejorar la eficacia. Asimismo, también se realizan estudios sobre los factores fúngicos responsables de la infectividad de los hongos y así contribuir al desarrollo de nuevos fármacos.

2. RESUMEN

Los hongos son organismos eucariotas con aplicaciones tanto en el mundo de la industria biotecnológica como en el ámbito ecológico. A pesar de presentar estas características, en las dos últimas décadas, la incidencia de infecciones fúngicas se ha visto incrementada debido a patógenos emergentes de carácter oportunista que afectan principalmente a pacientes inmunocomprometidos. Los géneros más frecuentemente aislados en clínica y responsables de infecciones graves son *Candida* y *Aspergillus*. En la actualidad, el tratamiento a este tipo de infecciones se encuentra limitado debido a la poca variedad de antifúngicos, las pocas dianas terapéuticas que se han estudiado, la toxicidad de los fármacos y los mecanismos de resistencia desarrollados por diversas especies. Los triazoles, azoles de segunda generación, son los antifúngicos más usados en la actualidad. En particular, el voriconazol es el primer recurso terapéutico utilizado para tratar la aspergilosis y algunos tipos de candidiasis. Este fármaco tiene un amplio rango de aplicación y es fácil de administrar vía oral pero presenta ciertas limitaciones: hepatotoxicidad y farmacocinética y biodistribución variable. Las nuevas formulaciones de voriconazol analizadas en el estudio, se caracterizan por la formación de sistemas micelares que albergan el voriconazol en su núcleo hidrofóbico. Además de favorecer la permeabilidad y la solubilidad del compuesto, los sistemas micelares pueden alterar la farmacocinética y biodistribución y de esta forma modular su toxicidad. Por tanto, las nuevas formulaciones micelares podrían aumentar la eficacia del voriconazol en infecciones fúngicas. En el estudio se desarrolló un análisis de la actividad *in vitro*, biodistribución, toxicidad y eficacia de las nuevas formulaciones micelares. A pesar de que la actividad antifúngica *in vitro* no mostró diferencias significativas, la biodistribución de una de las formulaciones presentó una reducción de la toxicidad a nivel hepático con respecto al voriconazol de referencia.

Palabras clave: patógenos oportunistas; *Candida*; *Aspergillus*; voriconazol; hepatotoxicidad; biodistribución; formulaciones micelares.

3. INTRODUCCIÓN

Los hongos son organismos eucariotas pertenecientes al reino *Fungi* que pueden ser unicelulares, pluricelulares o dimórficos (pueden presentar ambas morfologías según las condiciones de crecimiento). Los hongos se caracterizan por no presentar sistema vascular y nutrirse por absorción, previa digestión del sustrato en el que crecen. Poseen una pared celular compleja caracterizada por su elevado contenido en quitina y glucanos. Además, su membrana plasmática tiene un alto contenido en ergosterol, importante para la fluidez de la membrana, el tráfico transmembranal y por ser una de las principales dianas de los compuestos antifúngicos (Kirk *et al.*, 2008). La taxonomía de los hongos es compleja y está sujeta a continuos cambios, especialmente desde el uso de herramientas moleculares para su caracterización. En la actualidad el reino *Fungi* se encuentra dividido en dos subreinos: *Dikaria* (incluye *Ascomycota* y *Basidiomycota*) y el llamado “Hongos basales” que incluye a los Mucorales entre otros. La mayoría de los hongos patógenos pertenecen a la división *Ascomycota*, tanto los levaduriformes como los filamentosos. Entre los hongos levaduriformes de mayor interés clínico debido a su elevada incidencia, encontramos el género *Candida* y dentro de los filamentosos el género *Aspergillus* (Guarro, 2012).

Desde el punto de vista ecológico, los hongos tienen gran importancia debido a su capacidad de degradar materia orgánica contribuyendo así al reciclaje de fuentes de carbono y energía en los ecosistemas ya que la mayoría de especies fúngicas son saprófitas. Además de relaciones saprófitas, los hongos se relacionan con otros organismos estableciendo relaciones mutualistas (líquenes y micorrizas) y parasíticas (micosis en plantas, otros hongos y animales incluyendo el ser humano) (Guarro, 2012).

En las últimas décadas, los hongos han ganado interés tanto biotecnológico como comercial, debido a su capacidad de producir metabolitos secundarios que son de interés en el sector industrial. De la misma forma, algunas levaduras son capaces de fermentar azúcares lo cual hace posible su uso para la producción de alcohol

etílico, así como la generación de biocombustibles a partir de sustratos ricos en almidón (Fisher *et al.*, 2013).

A pesar del uso beneficioso para la sociedad que se les puede dar a estos organismos, también causan infecciones graves en plantas comportando grandes pérdidas económicas en los cultivos, y en seres humanos causando una elevada morbilidad y mortalidad (Guarro, 2012).

Los hongos son capaces de provocar infecciones superficiales en los seres humanos (afectando mucosas, piel y anejos), cutáneas o subcutáneas (según la profundidad de los tejidos afectados), profundas (cuando se ven afectados órganos internos) y diseminadas si la infección afecta a dos o más órganos no contiguos incluyendo la sangre (Campoy and Adrio, 2016).

Si bien las infecciones fúngicas profundas y diseminadas han sido clásicamente anecdóticas, éstas se han visto incrementadas en las últimas dos décadas debido al aumento de población que presenta factores de riesgo. Cabe decir que, a excepción de los hongos dimórficos, los hongos presentan una baja capacidad de causar infecciones severas en individuos sanos (Guarro, 2011; Gomes *et al.*, 2011). Sin embargo, en el caso de pacientes con defectos inmunitarios u otras enfermedades de base, pueden dar lugar a infecciones graves denominadas infecciones fúngicas oportunistas. Entre los factores asociados a la adquisición de infecciones fúngicas oportunistas severas podemos destacar la inmunosupresión asociada a los tratamientos oncológicos, trasplantados, uso de corticoesteroides a largo plazo o infecciones inmunosupresoras como el VIH (Campoy and Adrio, 2016), pero también, grandes quemados, pacientes quirúrgicos, uso de antibióticos o diabetes.

3.1. *Candida*, *Aspergillus* y géneros de interés clínico

Los géneros más frecuentemente aislados en clínica y responsables de infecciones graves son *Candida* y *Aspergillus*. Se estima que un 91% de infecciones invasoras son debidas a especies de género *Candida*. *Candida* es una levadura que se reproduce de forma asexual por fisión binaria o gemación dando lugar a nuevas células, que se pueden desprender o no, dando lugar una a una cadena que se denomina pseudohifa. Las levaduras que han resultado patógenas para los seres humanos incluyen especies del género *Candida*.

Entre las especies de *Candida* de interés clínico cabe destacar *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* o la recientemente descrita *C. auris*. *C. albicans* es la especie de mayor incidencia (41%) seguida de *C. glabrata* y *C. parapsilosis* (ambas 17%) (Quindós, 2013; Cadena *et al.*, 2016) si bien otros géneros tales como *Cryptococcus*, *Rhodotorula* o *Trichosporon* pueden dar lugar a infecciones diseminadas graves y de difícil tratamiento (Arendrup, 2013). Cada uno de estos organismos posee factores de virulencia particulares, susceptibilidad antifúngica y epidemiología; pero en términos generales, las infecciones más graves referidas a este género son las candidiasis invasivas (Pappas *et al.*, 2015). *C. auris* es un patógeno fúngico emergente que presenta resistencia a múltiples fármacos. Actualmente es de una elevada preocupación por las altas tasas de mortalidad que genera debido a su resistencia a los medicamentos actuales. Esta especie es difícil de tratar, así como de identificar por métodos tradicionales, teniendo que hacer uso de técnicas de biología molecular para una correcta identificación (Muñoz *et al.*, 2018).

En el caso de infecciones invasoras por hongos filamentosos se estima que la incidencia es aproximadamente del 5% siendo *A. fumigatus* la especie más prevalente con un 3% de casos (Quindós, 2013; Cadena *et al.*, 2016).

Los hongos filamentosos a diferencia de las levaduras, son organismos pluricelulares que se caracterizan principalmente por presentar células vegetativas filamentosas denominadas hifas. Estas estructuras se forman o mediante la

germinación de una espora o a partir de fragmentos de otras hifas. Estas hifas se ramifican formando un conjunto que recibe el nombre de micelio y forma el cuerpo vegetativo del hongo. Las hifas son las estructuras que representan la forma invasiva de los hongos patógenos. Algunos hongos son capaces de esporular en el tejido invadido de forma que se facilita su diseminación (Guarro, 2012). El género más relevante en la clínica humana es *Aspergillus*, siendo las especies con mayor incidencia *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus* o *A. nigri*. Otros géneros implicados en infecciones graves son *Fusarium*, *Scedosporium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Lichtemia*, *Absidia*, *Apophysomyces* o *Saksenaea* (Pemán and Salavert, 2012).

El espectro de la aspergilosis abarca una amplia gama de manifestaciones clínicas, desde formas no invasivas, como la aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA) y los síndromes de aspergilosis pulmonar crónica, hasta la aspergilosis pulmonar invasiva (IPA) con posible diseminación generalizada. A pesar de los avances realizados en el diagnóstico y el tratamiento de este tipo de enfermedades, las tasas de mortalidad se mantienen altas especialmente en pacientes inmunocomprometidos (Cadena *et al.* 2016).

La aspergilosis invasiva (IA) es hoy en día la manifestación de este tipo de infecciones más problemática en términos de mortalidad (Lass-Flörl and Cuenca-Estrella 2017). Aunque *A. fumigatus* es el principal causante de este tipo de infecciones, especies de otras secciones de este género se han visto implicadas (*Flavi*, *Terrei* y *Nigri*). En las pautas actuales que se siguen para el diagnóstico y el tratamiento de IA, el voriconazol (VRC) es el primer recurso terapéutico. En los últimos años, ha destacado un aumento alarmante de aislados de este género mostrando una resistencia a los azoles, lo que reduce las opciones de tratamiento. En particular, en *Aspergillus*, los casos de resistencia a los azoles se han visto aumentados constantemente desde los primeros estudios en la década de los 90 (Pérez-Cantero *et al.*, 2019).

3.2. Agentes antifúngicos

Las infecciones fúngicas de carácter invasivo están asociadas al menos a un total de 1.5 millones de muertes alrededor del mundo cada año. Ha sido estimado que un 30-40% de casos son debidos a candidiasis, 20-30% a criptococosis y un porcentaje similar para la aspergilosis invasiva. De esta forma, los agentes antifúngicos han pasado a convertirse en un esencial de la asistencia sanitaria actual (Campoy & Adrio, 2016).

Los antifúngicos son compuestos naturales o sintéticos que inhiben el crecimiento fúngico de forma parcial (fungistáticos) o total (fungicidas). En comparación a otros antibióticos, por ejemplo antimicrobianos, existen relativamente pocos compuestos con actividad antifúngica disponibles. Según su estructura química y mecanismo de acción los antifúngicos se pueden clasificar en 5 familias (Campoy & Adrio, 2016): polienos, azoles, alilaminas, equinocandinas y análogos de base (Figura 1).

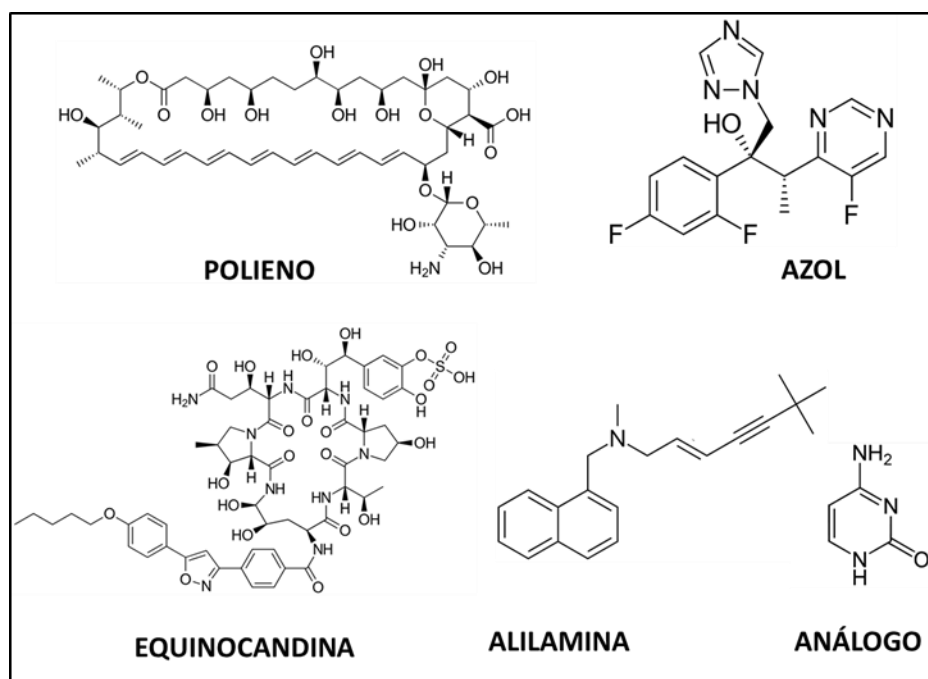


Figura 1. Estructura química de un polieno (amfotericina B), azol (voriconazol), equinocandina (micafungina), alilamina (terbinafina) y el análogo de base 5-fluorocitosina.

Los polienos, son compuestos obtenidos a partir de especies de *Streptomyces*, formados por un gran anillo éster cíclico con múltiples enlaces C=C (polieno)

y un grupo D-micosamina. Los polienos actúan uniéndose al ergosterol de membrana e induciendo la formación de poros que conllevan una pérdida de la viabilidad de la célula fúngica. Entre los polienos de uso clínico cabe destacar la griseofulvina (de uso exclusivamente tópico) y la anfotericina B, ampliamente usada frente a infecciones diseminadas (Campoy and Adrio, 2016).

Los azoles son compuestos heterocíclicos aromáticos donde uno (imidazol) o tres (triazol) átomos de C son sustituidos por átomos de N (Figura 1). Los triazoles son los antifúngicos más usados en la actualidad en clínica ya que presentan menos toxicidad que los imidazoles y tienen como diana la enzima 14a-lanosterol desmetilasa dependiente del citocromo P450 (CYP51) codificada por el gen ERG11. La inhibición de esta enzima interrumpe la síntesis del ergosterol, impidiendo el crecimiento fúngico y promoviendo la acumulación de intermediarios tóxicos del ergosterol. Entre los triazoles más utilizados frente a infecciones profundas y diseminadas son el voriconazol y el posaconazol (Allen *et al.*, 2015).

Las **alilaminas** interactúan con la enzima enzima escualeno 2-3 epoxidasa inhibiendo la síntesis de ergosterol. Al ser moléculas altamente lipofílicas, su uso se restringe al tratamiento de micosis superficiales y celulitis de origen fúngico. El representante de esta familia antifúngica es la terbinafina (Campoy and Adrio, 2016).

Las equinocandinas es la más reciente de las familias de compuestos antifúngicos. Tienen naturaleza lipopeptídica formadas por un gran hexapeptóide cíclico. Interfieren en la síntesis de β -glucanos, un componente estructural de la pared fúngica, al inhibir la enzima 1,3- β glucan sintasa. Actualmente existen tres moléculas pertenecientes a esta familia: micafungina, caspofungina y anidulafungina, todas ellas con una actividad similar (Campoy and Adrio, 2016)

El análogo de base 5-fluorocitosina (5FC), es el único compuesto que actúa inhibiendo la síntesis de DNA i RNA. La 5FC se desarrolló como tratamiento antioncológico, pero debido a su potente efecto antifúngico ha pasado a formar parte de las opciones para el tratamiento de micosis. Debido a su elevada toxicidad,

solamente se utiliza en combinación sinérgica con otros antifúngicos como por frente a la criptococosis (Campoy and Adrio, 2016).

3.3. Actividad y eficacia antifúngica

La actividad de un compuesto antifúngico hace referencia a la capacidad relativa de un compuesto en unirse a la diana fúngica adecuada y promover la muerte, la inhibición del crecimiento o desarrollo normal de la célula fúngica. En cualquier de los tres casos, el resultado es una disminución en las capacidades infectivas del microorganismo. La actividad de un compuesto antifúngico se evalúa mediante ensayos *in vitro* estandarizados. Actualmente existen dos organismos que emiten los protocolos para la determinación de la actividad antifúngica: *El Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) de E.E.U.U (Espinel-Ingroff, et al. 2014) y el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) de Europa (<http://www.eucast.org>). Ambas metodologías mediante técnica de microdilución en caldo permiten determinar la concentración mínima de un fármaco capaz de inhibir el crecimiento fúngico (CMI) (Espinel-Ingroff & Turnidge, 2016).

La eficacia en cambio, hace referencia al éxito terapéutico obtenido en clínica tras la aplicación de una terapia antifúngica. Uno de los objetivos del CLSI y EUCAST es el de relacionar los resultados de CMI obtenidos *in vitro* con la eficacia del tratamiento con el fin de poder predecir el éxito o fracaso terapéutico a partir de los resultados obtenidos en el laboratorio. El éxito de un tratamiento no depende exclusivamente de la actividad del fármaco sino de múltiples parámetros farmacocinéticos, es decir, de la liberación del producto activo, su absorción, biodistribución, toxicidad, metabolismo e inactivación. Para que los resultados *in vitro* puedan ser predecibles del éxito o fracaso terapéutico es necesario contrastar la actividad de los fármacos con la eficacia obtenida en clínica. Esta correlación, basada en la experiencia clínica permite el establecimiento de los puntos de corte clínicos (*Clinical Break Points*, CBP) que diferencian cepas sensibles de cepas resistentes a un fármaco dado. CLSI y sobretodo EUCAST, revisan y publican CBP para fármacos y especies fúngicas según la comunidad científica acumula datos. Sin embargo, dada la relativa frecuencia de infecciones fúngicas, no siempre es

posible disponer de suficiente experiencia clínica para establecer CBP. En este caso los organismos citados, establecen los denominados puntos de corte epidemiológicos (*Epidemiological Cutoff Values*, ECV) (Espinell-Ingroff *et al.*, 2010). Los ECV se obtienen mediante la distribución de valores de CMI de un fármaco para una especie en concreto. Estos datos siguen en general una distribución normal, sin embargo a concentraciones elevadas se puede observar un repunte de cepas con CMIs mucho más elevadas que el valor modal obtenido (Figura 2). Se considera que las cepas dentro de la normalidad son las cepas silvestres (*wild type*, WT) mientras que las que presentan CMIs elevadas corresponden a cepas que han desarrollado mecanismos de resistencia (non-wild type NWT). Si bien los ECV no tienen el valor clínico, los CBP sí indican qué cepas pueden presentar mecanismos de resistencia y por tanto llevar al fracaso terapéutico. Por tanto, los ECV se establecen mediante estudios de CMI y la presencia o no de mecanismos de resistencia mientras que los CBP se establecen a partir de resultados obtenidos en la clínica humana (Espinell-Ingroff *et al.*, 2016).

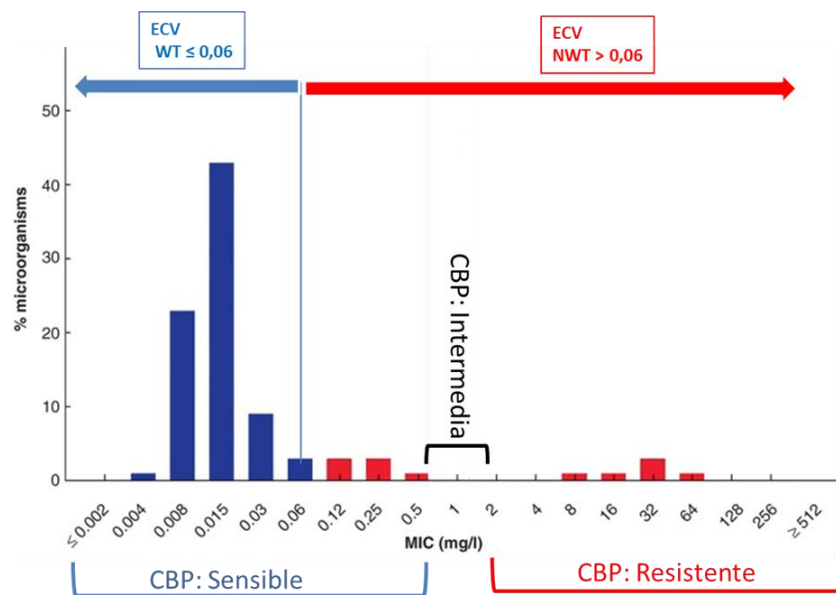


Figura 2. Representación ideal de la distribución de CMI (*Minimum Inhibitory Concentration*, MIC) establecimiento de los puntos de corte clínicos (CBP) y de los puntos de corte epidemiológicos (ECV).

3.4. Nuevas formulaciones

A pesar de los avances en la terapéutica antifúngica, estas infecciones continúan causando una elevada mortalidad. Las principales causas de fallo terapéutico en el tratamiento antifúngico se debe a mecanismos de resistencia adquiridos y a la elevada toxicidad de los fármacos que, junto a otras condiciones patológicas que padecen los pacientes, obligan a menudo a interrumpir el tratamiento. Dados los pocos compuestos comercializados y las escasas dianas farmacológicas de que se dispone, el clínico a menudo se encuentra ante una evidente falta de opciones terapéuticas. Ante esta problemática, la síntesis de nuevos compuestos, el uso de terapias combinadas con efecto sinérgico o el desarrollo de nuevas formulaciones de compuestos ya comercializados son las principales líneas de investigación para salvar la problemática descrita.

El desarrollo de nuevas formulaciones de compuestos ya existentes es una de las opciones más viables a efectos prácticos ya que no precisan de los rigurosos controles a los que son sometidos los compuestos de nueva síntesis. La reformulación de fármacos ha dado lugar a importantes avances en el tratamiento de infecciones fúngicas. Uno de los casos más evidentes es el de la anfotericina B (AMB). La AMB fue comercializada en 1955 y hoy en día continúa siendo ampliamente utilizada debido a su amplio espectro de acción y baja tasa de resistencias. Sin embargo, la AMB es hepatotóxica. A mediados de los años 90, se desarrollaron formulaciones lipídicas como la AMB liposomal (LAMB) que permite una administración 20 veces más elevada que la formulación clásica con menores efectos tóxicos (Cornely, *et al.*, 2007).

A lo largo de los últimos 35 años, la aparición de los azoles ha supuesto un gran impacto en el desarrollo de terapias fúngicas. Debido a las limitaciones de los azoles de primera generación (imidazoles) y el incremento de patógenos resistentes a éstos, los nuevos azoles i.e., triazoles, se encuentran en un constante estudio bajo desarrollo con objetivo de conseguir una mejora en la tolerancia (Allen, *et al.*, 2015). Los triazoles, son los fármacos de más amplio uso frente a infecciones fúngicas

diseminadas y están recomendados como tratamientos primarios (fluconazol y voriconazol) y profilácticos (fluconazol y posaconazol) para infecciones causadas por *Candida* spp. y *Aspergillus* spp. El voriconazol es el triazol con más presencia en la clínica por su fácil administración vía oral y un espectro de acción amplio. Sin embargo, es rápidamente metabolizado por las enzimas del citocromo P450 presentando una farmacocinética variable entre pacientes, con la consiguiente variabilidad en su biodistribución y toxicidad. Las formulaciones de voriconazol (VRC) comercializadas, contienen ciclodextrina, un oligosacárido cíclico, que mejora la solubilidad de VRC pero que según diversos estudios, puede ser en parte responsable de la toxicidad asociada a tratamientos prolongados. Por ello, el desarrollo de nuevas formulaciones podría mejorar la eficacia de los tratamientos basados en VRC.

En esta dirección, las micelas son estructuras compuestas por un conjunto de polímeros anfifílicos autoensamblados que pueden atrapar en su interior moléculas poco hidrosolubles. Estos polímeros anfifílicos poseen una región hidrofílica y una región hidrofóbica que se autoensambla automáticamente cuando el polímero entra en contacto con soluciones acuosas. Están compuestos por un núcleo hidrofóbico, se pueden alojar moléculas poco solubles en agua (como es el caso del voriconazol), mientras la cubierta hidrofílica, está en contacto con el medio (Cagel *et al.*, 2017).

Los sistemas micelares, además de aumentar la solubilidad, permeabilidad y estabilidad de principios activos hidrofóbicos, pueden alterar la farmacocinética, biodistribución y aclaramiento de la sustancia activa y modular su toxicidad (Cagel *et al.*, 2017) por lo que son una opción interesante como vehículo para la administración de fármacos.

En este estudio se analizó la actividad de nuevas formulaciones micelares del voriconazol comparándolo con la formulación comercializada con ciclodextrina, para valorar si la formación de micelas en las nuevas formulaciones resulta favorable.

4. INTERÉS, HIPÓTESIS Y OBJETIVO

A pesar de los avances en el diagnóstico y tratamiento de las infecciones fúngicas, éstas continúan siendo un problema creciente en los países desarrollados y son causa de una elevada morbilidad y mortalidad entre pacientes susceptibles. Las similitudes entre las células fúngicas y de mamíferos, hace difícil la identificación de dianas específicas y la síntesis de compuestos de elevada eficacia. Estas similitudes y los tratamientos de larga duración son los principales responsables de la toxicidad asociada a los fármacos y de forma indirecta responsables del gran fracaso terapéutico frente a las infecciones fúngicas oportunistas. La reformulación de compuestos antifúngicos comercializados es una estrategia válida para disminuir la toxicidad de los fármacos sin mermar su actividad. A pesar de que el VRC, es uno de los antifúngicos más utilizados, puede dar lugar a efectos secundarios indeseables debido a su variable farmacocinética, por ello el desarrollo de formulaciones menos tóxicas y más estables podría incrementar la eficacia del VRC en el tratamiento de infecciones fúngicas.

Hipótesis:

El desarrollo de formulaciones micelares de VRC, mejoraría la biodistribución y reduciría la toxicidad pudiendo mejorar el pronóstico de las infecciones causadas por los géneros *Candida* y *Aspergillus*, los más frecuentes en la clínica humana.

Objetivo principal: ensayar la actividad, biodistribución, toxicidad y eficacia de nuevas formulaciones micelares de VRC. Para ello, se propusieron los siguientes

objetivos específicos:

- Estimar la actividad antifúngica de 7 formulaciones micelares de voriconazol frente a especies de *Candida* y *Aspergillus* de interés clínico.
- Estudiar la biodistribución de aquellas formulaciones micelares de voriconazol que hayan demostrado una buena actividad *in vitro*.
- Estudiar la eficacia de las formulaciones micelares prometedoras debido a su actividad, biodistribución y toxicidad frente a la aspergilosis sistémica en un modelo murino.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cepas

Se estudiaron siete cepas de *Candida* i.e., *Candida krusei* ATCC 6258 (American Type Culture Collection, ATCC), *Candida tropicalis* FMR 14603, *Candida tropicalis* FMR 14600, *Candida parapsilosis* FMR 17180, *Candida parapsilosis* FMR 17181, *Candida auris* FMR 17034 y *Candida auris* FMR 17043 (Facultad de Medicina de Reus, FMR).

Se sembraron (por duplicado) todas las cepas en placas con medio PDA (Patata, Dextrosa, Agar) con cloranfenicol y fueron incubadas a 30 °C, excepto *Candida tropicalis* que se incubó a 28°C y *Candida auris* a 35°C, durante 24h.

En cuanto al género *Aspergillus*, se estudiaron ocho cepas: *Aspergillus calidoustus* FMR 13556, *Aspergillus calidoustus* FMR 13557, *Aspergillus terreus* FMR 11823, *Aspergillus flavus* FMR 8760, *Aspergillus fumigatus* FMR 10522, *Aspergillus fumigatus* FMR 10504, *Aspergillus fumigatus* FMR 7738 y *Aspergillus flavus* ATCC 204304.

Las cepas se cultivaron en medio PDA con cloranfenicol y fueron utilizadas para ensayos de sensibilidad *in vitro* tras ser incubadas durante 48-72h a 30°C.

5.2. Antifúngicos

En los estudios *in vitro*, se ensayaron 7 nuevas formulaciones micelares de VRC. Las formulaciones fueron cedidas por el Dr. Torrado (Fac. Farmacia, Universidad Complutense de Madrid). Las formulaciones micelares consistían en diferentes proporciones Tween80/Voriconazol/Carrier (Tabla 1).

Tabla 1. Formulación comercializada de voriconazol con ciclodextrina (VCZ MP) y formulaciones miceliales incluidas en los ensayos in vitro (SD y (C) SD). Se muestra la proporción VRC(1mg):Carrier:Tween80 en cada formulación micelar.

VCZ MP	Voriconazol de referencia
SD- 1:3:0	VOR004
SD- 1:3:0.05	VOR044
SD- 1:3:0.2	VOR050
SD- 1:6:0.025	VOR041
(C) SD- 1:3:0	VOR051
(C) SD- 1:3:0.05	VOR052
(C) SD- 1:3:0.2	VOR053

El Tween 80 es empleado como agente anfifílico para la formación de las micelas. Se trata de un surfactante no iónico que presenta una baja toxicidad. Combinado con el voriconazol, se añaden a un carrier. En estas formulaciones, el carrier es un excipiente inerte donde quedan absorbidos tanto el tensoactivo como el voriconazol (Figura 3). El objetivo de las nuevas formulaciones de voriconazol es la formación de sistemas micelares. El principio activo del fármaco comercial se mantiene en todas las formulaciones.

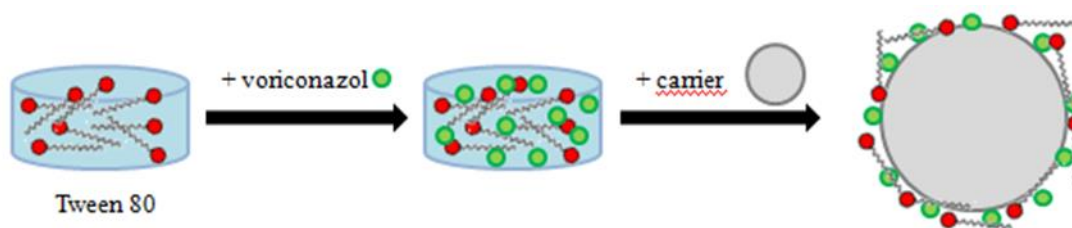


Figura 3. Esquema del proceso de formación de las nuevas formulaciones.

5.3. Estudios *in vitro*

5.3.1. Método de microdilución

Se determinaron las CMI del VRC de referencia y 7 formulaciones micelares frente a 7 cepas de *Candida* y 8 de *Aspergillus* mediante microdilución en caldo según la metodología recogida en los documentos del CLSI M60 para levaduras y M38 ed3 para hongos filamentosos (CLSI M60 (2017), CLSI M38 ed3 (2017)).

- Preparación de diluciones de fármacos.

El voriconazol es un antifúngico insoluble en agua y el CLSI indica que el protocolo de preparación de las diluciones debe seguirse a partir de la disolución del fármaco en DMSO. Las nuevas formulaciones deben disolverse en agua ya que el DMSO es un disolvente orgánico no lo suficientemente polar para formar las micelas. Se sigue el protocolo del CLSI para antifúngicos solubles en agua, teniendo en cuenta el rango de concentraciones estipulado por el CLSI para voriconazol.

Las soluciones *stock* de los antifúngicos que se emplearon se prepararon desde una concentración diez veces mayor a la concentración más alta a ensayar (160 µg/ml). Para preparar los *stocks*, todas las formulaciones fueron disueltas en agua destilada y posteriormente fueron filtradas con jeringa y filtro de 0.2 mm (soluciones madre). Las diluciones se realizaron siguiendo el esquema propuesto por el CLSI (Figura 4).

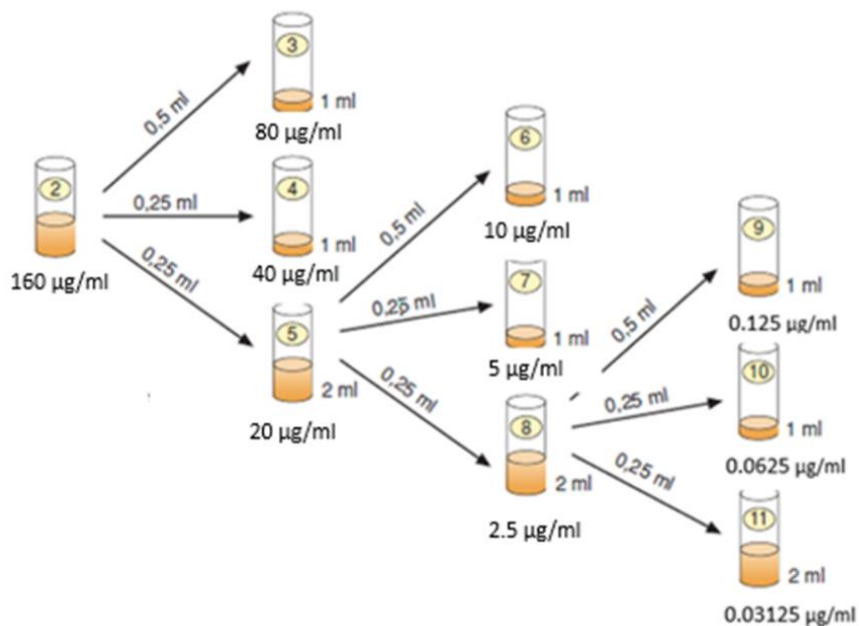


Figura 4. Esquema para la preparación de diluciones dobles seriadas utilizadas para la preparación de microplacas.

Todos los tubos quedaron con un volumen final de 1 ml excepto el 11 del cual se descarta 1 ml. Posteriormente, se realizaron diluciones 1:5 en medio RPMI 1640 sintético (con glutamina, sin bicarbonato y tamponado con ácido morfolino propano sulfónico (MOPS) ajustado a pH $7 \pm 0,1$ y con 0,2% de glucosa). Las diluciones obtenidas se dispensaron en microplacas de 96 pocillos y fondo cóncavo de manera que cada concentración se dispuso en columnas (100µl/pocillo) tal como se esquematiza en la figura 5. Las columnas 11 y 12 fueron dispensadas con 100 µl de medio RPMI 1640 para actuar como control de medio y control de crecimiento.

Tras dispensar el inóculo, se obtuvo el rango de concentraciones de antifúngico desde 16 a 0.03 µg/ml.

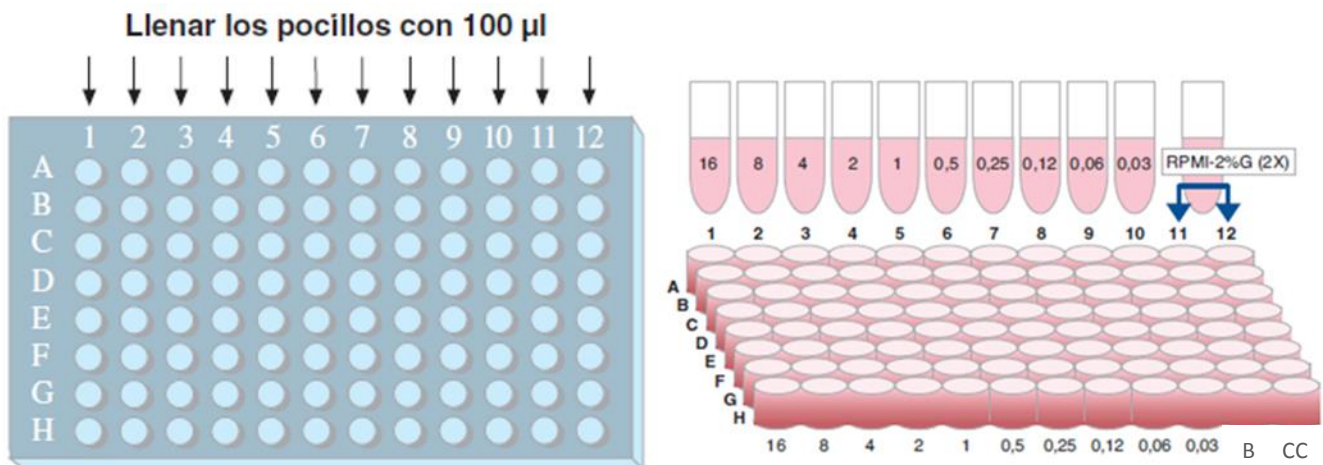


Figura 5. Disposición de las diluciones de VRC en las microplacas. Las columnas 11 y 12 se utilizaron como control del medio de cultivo (B) y control de crecimiento fúngico (CC), respectivamente.

Preparación del inóculo.

La preparación del inóculo varía dependiendo de si se trabaja con levaduras o con hongos filamentosos. Para el inóculo de levaduras se siguió el documento M60 del CLSI mientras que para el inóculo de hongos filamentosos se siguió el documento M38.

En el caso de *Candida* spp., se recogieron 3-4 colonias de crecimiento en placas de agar sólido PDA con ayuda de una asa de siembra y se resuspendieron en agua destilada. Posteriormente se realizaron diluciones 1:10 seriadas y se realizó el recuento de células/ml en una cámara de Neubauer para ajustar las suspensiones (preinóculo) a 3×10^6 células/ml.

Para la preparación de los inóculos de *Aspergillus* spp. se partió de placas de medio sólido PDA. Se utilizó Tween 20 (0.02%) y se rascó la superficie de las colonias para desprender los conidios. Las suspensiones de conidios obtenidas fueron diluidas 1:10 y ajustadas mediante recuento en la cámara de Neubauer a una concentración final de 4×10^6 células/ml.

Los preinóculos de *Candida* fueron diluidos 1:50 en agua destilada y posteriormente 1:20 en medio RPMI 1640 mientras que para *Aspergillus* spp. se realizó una dilución 1:50 en RPMI 1640. De esta forma se obtuvieron los inóculos finales para ensayar.

Se dispensaron 100 µl/pocillo del inóculo final en las microplacas con ayuda de una pipeta multicanal (12 canales) a razón de una cepa por cada fila de la microplaca. Así, cada microplaca permite el ensayo de 8 cepas. La última fila se inoculó con la cepa control *Candida krusei* ATCC 6258 o *Aspergillus flavus* ATCC 204304 y los pocillos de la columna 11 se mantuvieron sin inocular (control de esterilidad).

Tras ser inoculadas, las placas se incubaron a 35°C durante 48h. El experimento se realizó por duplicado.

Tras realizar el experimento, se realizó un estudio de viabilidad de los inóculos utilizados tanto en *Candida* como en *Aspergillus* por duplicado para comprobar que las UFC/ml se encontraran dentro del rango marcado por el CLSI.

Lectura de CMIs.

La lectura de microplacas se realizó con la ayuda de un espejo invertido (Figura 6). La concentración mínima inhibitoria (CMI) para las especies de *Aspergillus* se estableció en aquella concentración menor de fármaco que producía una inhibición total (100%) del crecimiento fúngico; mientras que para *Candida* spp. la CMI se estableció cuando se redujo el crecimiento fúngico en un 50% en comparación con el pocillo control (columna 12, sin compuesto antifúngico).



Figura 6. Espejo invertido para la lectura de concentraciones mínimas inhibitorias en microplacas.

5.3.2. Método de difusión

El ensayo se realizó en medio RPMI semisólido (2X). Se preparó el medio y tras su autoclavado se mantuvo a una temperatura de 52 °C. Alícuotas de 25 ml fueron inoculadas con las cepas de *Candida* y *Aspergillus* sometidas a estudio, a una concentración final de de 2.5×10^7 células/ml (Siopi, 2016). Estas alícuotas una vez inculadas, se dispensaron en placas de Petri (una alícuota por placa).

El voriconazol y las nuevas formulaciones se diluyeron siguiendo el mismo protocolo que en el método de microdilución para llegar a la solución madre. Se prepararon soluciones de 8 µg/ml, 12 µg/ml y 16 µg/ml de VRC.

En cada placa de RPMI se practicaron 4 pocillos con una pipeta Pasteur y se dispensaron 80 µl/pocillo de cada formulación, 4 formulaciones ensayadas por placa. Se ensayaron concentraciones de VRC de 8 µg/ml para todas las cepas y además las dos cepas de *A. calidoustus* fueron estudiadas a una concentración de 16 µg/ml. En las cepas de *Candida*, se ensayó además 12 µg/ml. Tras poner los compuestos a ensayar, las placas se incubaron a 35°C durante 24h.

Lectura de los halos de inhibición formados.

Se midieron los halos formados por cada formulación en las placas con ayuda de una regla. También se tomaron fotos de los resultados obtenidos y se midieron con una mayor precisión en el ordenador mediante el programa Image J.

5.4. Estudios *in vivo*

Para determinar la biodistribución, toxicidad y eficacia de las formulaciones de VRC se emplearon un total de 40 ratones CD-1 (Charles River Francia) de 4 semanas de edad y 30 g de peso, aproximadamente. Los ratones fueron inmunosuprimidos con 200 mg/kg de ciclofosfamida i.p. y 150 mg/kg fluorouracilo.

5.4.1. Biodistribución y toxicidad

Para medir la biodistribución y toxicidad del voriconazol se utilizaron tres formulaciones: voriconazol de referencia (VRC), la formulación 1:3:0.2 (VOR053) y el vehículo de ésta.

Las formulaciones fueron administradas suspendidas en carboximetilcelulosa sódica (CMCNa) al 75%. Se establecieron grupos de 10 ratones excepto el grupo control de vehículo que consistió en 5. Los animales tratados recibieron 30 mg/kg de VRC o VOR053 cada 12 horas (60 mg VCZ/kg al día) en 200 µl mediante sonda oral.

Veinticuatro horas tras la primera dosis se sacrificaron 5 ratones de cada grupo de tratamiento y dos del control se anestesiaron con sevoflurano 5% inhalatorio y se extrajo sangre por punción cardíaca. Se sacrificaron por dislocación cervical. El resto de animales se sacrificó 24 horas tras la última dosis (10 dosis total) previa extracción de sangre (Figura 7). La sangre extraída se centrifugó a 3.000 rppm para obtener el suero. El suero se conservó a -20°C hasta su uso para la determinación de parámetros bioquímicos.

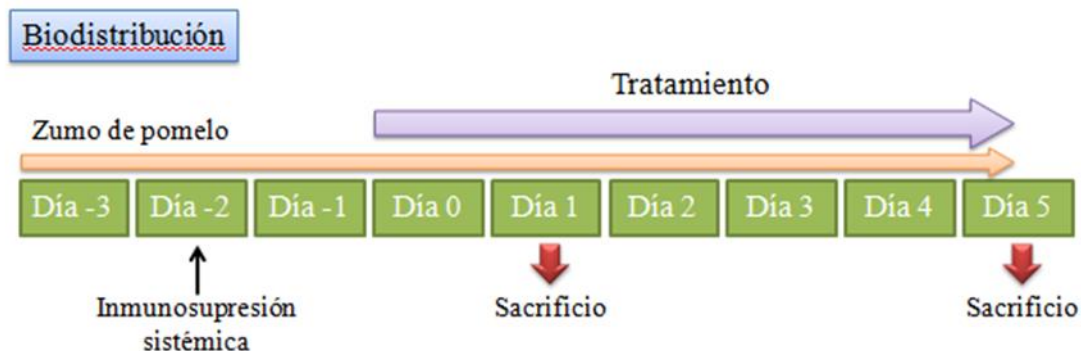


Figura 7. Esquema del proceso seguido en los ratones para el análisis de la biodistribución del fármaco.

Tras el sacrificio, se extrajeron el cerebro, los pulmones, el hígado y los riñones. Las muestras fueron pesadas y posteriormente homogeneizadas con agua destilada y se realizó un proceso de extracción en disolvente orgánico (éter dietílico) para obtener el voriconazol.

La cuantificación del principio activo en cada órgano se realizó mediante análisis con cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en la Universidad Complutense de Madrid.

A partir de las muestras de suero obtenidas, se determinó la concentración de Alanina aminotransferasa (ALT), Aspartato aminotransferasa (AST), Creatinina (CREA) y Nitrógeno ureico en sangre (BUN) mediante un analizador automático de Roche en la Universidad Complutense de Madrid.

5.4.2. Estudio de eficacia

Grupos. Comparamos la eficacia de la formulación VOR053 y VRC referencia a 30 mg/kg dos veces al día administrados durante 10 días, en un modelo murino de aspergilosis diseminada. Los animales se inocularon i.v. a través de la vía lateral de la cola con una suspensión de 1×10^6 UFC/animal en 0,2 ml. Se establecieron 3 grupos (VOR053, VRC referencia y Control) de 15 ratones (5 para determinar la carga fúngica en órganos y 10 para estudios de supervivencia). Cinco días tras la infección 5 animales de cada grupo se sacrificaron por anoxia de CO₂ seguida de

dislocación cervical. Tras el sacrificio, se extrajeron riñones, cerebro, pulmones e hígado para determinar la carga fúngica.

Carga fúngica. Los órganos extraídos se pesaron, se pusieron en tubos de 12 ml y se añadieron 1,5 ml de agua destilada. Con la ayuda de un vórtex y varillas de vidrio, se homogeneizaron los órganos, se diluyeron y se sembraron 200 μ l de los homogenizados en placas de PDA. Tras 48h a 35°C se contaron el número de colonias para calcular las UFC/gramo de tejido. Al conocer el peso del órgano en el volumen del homogeneizado y el volumen de muestra sembrada, se puede calcular las UFC/gramo de tejido.

5.5. Análisis estadístico

La prueba de 'Mann-Whitney' fue usada para comparar valores en los resultados obtenidos en el ensayo de difusión en agar. El análisis estadístico se llevó a cabo con GraphPadPrism 8.0 para Windows. Los valores $p \leq 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Estudios *in vitro*

6.1.1. Método de microdilución

El estudio de la actividad *in vitro*, demostró que la formulación micelar presenta una actividad similar a la de la formulación comercializada. En todos los fármacos micelares ensayados, la CMI fue igual o disminuyó una única dilución en comparación al estándar en el caso de *Aspergillus* spp. y *Candida* spp. (Tabla 2), siendo esta disminución insuficiente para concluir que las micelas otorgan mayor actividad al fármaco. Dado que el compuesto activo, el VRC, es común en todas las formulaciones ensayadas, la equivalente actividad observada era esperable. Sin embargo, las nuevas formulaciones pueden interferir en la exposición del hongo al compuesto activo al demorar su liberación de las micelas. En el caso de la AMB, se ha observado que la actividad fungicida de la AMB clásica i.e., con deoxicolato (dAMB), presenta una actividad fungicida 4 veces superior que la formulación liposomal (LAMB) en condiciones *in vitro* sin embargo, la eficacia *in vivo* de LAMB es superior a la de dAMB (Pahls & Schaffner, 1994); (Cornely, 2007). Este fenómeno es probablemente debido a que si bien *in vitro* la exposición al fármaco es menor (solo el compuesto activo libre realiza su función fungicida); *in vivo* la metabolización de la AMB es menor en el caso de la formulación liposomal, con lo cual los niveles séricos efectivos del fármaco se prolonga en comparación a la dAMB.

Tabla 2. Valores de CMI ($\mu\text{g/ml}$) obtenidos mediante microdilución en caldo, siguiendo los documentos 38 y 60 del CLSI.

	VRC MP ^a	Formulaciones micelares						
		004	044	050	041	051	052	053
Aspergillus								
<i>A. calidoustus</i> (FMR 13556)	8	8	4	8	8	8	8	4
<i>A. calidoustus</i> (FMR 13557)	16	8	16	16	16	16	16	8
<i>A. terreus</i> (FMR 11823)	0,5	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
<i>A. flavus</i> (FMR 8760)	0,5	0,5	0,25	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5
<i>A. fumigatus</i> (FMR 10522)	0,5	0,5	0,25	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5
<i>A. fumigatus</i> (FMR 10504)	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	0,5	0,25	0,25
<i>A. fumigatus</i> (FMR 7738)	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
<i>A. flavus</i> (ATCC 204304)	0.25	0.25	0.12	0.25	0.12	0.25	0.25	0.25
Candida								
<i>C. tropicalis</i> (FMR 14600)	2	2	2	2	2	1	2	2
<i>C. tropicalis</i> (FMR 14603)	4	4	2	4	2	4	2	2
<i>C. parapsilosis</i> (FMR 17180)	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,06	0,12
<i>C. parapsilosis</i> (FMR 17181)	0,25	0,25	0,12	0,12	0,12	0,25	0,12	0,12
<i>C. auris</i> (FMR 17034)	16	16	8	16	16	16	8	8
<i>C. auris</i> (FMR 17043)	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
<i>C. krusei</i> (ATCC 6258)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

^a Formulación de referencia de VRC

Tabla 3. Puntos de corte epidemiológicos (ECV) propuestos por CLSI y puntos de corte clínicos (CBP) propuestos por EUCAST frente a las especies de *Aspergillus* y *Candida* ensayadas en el presente estudio.

	ECV		CBP ^a	
	WT	NWT	Sensible	Resistente
<i>A. calidoustus</i>	ND	ND	ND	ND
<i>A. terreus</i>	≤ 2	> 2	≤ 2 ^b	≤ 4 ^b
<i>A. flavus</i>	≤ 2	> 2	≤ 2 ^b	≤ 4 ^b
<i>A. fumigatus</i>	≤ 1	> 1	≤ 1	> 2
<i>C. tropicalis</i>	≤ 0.03	> 0.03	≤ 0.125	> 0.25
<i>C. parapsilosis</i>	≤ 0.03	> 0.03	≤ 0.125	> 0.25
<i>C. auris</i>	ND	ND	ND	ND
<i>C. krusei</i>	≤ 0.5	> 0.5	≤ 0.5 ^b	> 2 ^b

^a, Los valores intermedios corresponden a cepas con sensibilidad intermedia

^b, Los valores no están sustentados por evidencias clínicas, sino por estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos

WT, Wild type. Cepas sin mecanismos de resistencia conocidos NWT, non-wild-type. Cepas que pueden presentar mecanismos de resistencia intrínsecos o adquiridos

ND, No determinado.

A partir de los datos recopilados por el CLSI (documentos M60, M38 y M59) y EUCAST para ECVs y CBPs en voriconazol, se realizó una aproximación para analizar los resultados obtenidos en las formulaciones micelares. Se debe tener en cuenta que estos datos están estandarizados para estudios realizados con el fármaco comercial y que en el caso de las formulaciones el rango de aplicación para distinguir entre S/R podría variar si se llega a ensayos clínicos.

En el caso de las cepas estudiadas de *Aspergillus*, las nuevas formulaciones mantienen la CMI en comparación a VRC MP o en algunos casos, disminuyen su valor a una dilución. En particular, las dos formulaciones que disminuyen el valor de CMI en la mayoría de las cepas son VOR044 y VOR053. VOR044 presenta una CMI inferior a MP en todas las cepas estudiadas. Después de las dos formulaciones nombradas, la que podría presentar unos resultados similares es VOR041 pero en una menor medida.

Según los ECV y los CBP (Tabla 3) determinados para el voriconazol comercial, todas las especies pueden ser clasificadas como wild-type respecto a las formulaciones a excepción de *A. calidoustus* que está por determinar.

Con respecto a *Candida* spp. VOR044 y VOR053 sí que presentan una CMI más baja que VRC MP en varias cepas pero no en la mayoría como ocurría en *Aspergillus* spp. Hay una actividad antifúngica muy similar en todas las formulaciones. En todas las cepas aparecen formulaciones con una CMI inferior a VRC MP pero tan solo por una dilución, a excepción de VOR051 que consigue disminuir dos diluciones la CMI de *C. tropicalis* (FMR 14600). Cabe destacar que esta última cepa, pertenece a una especie resistente frente a los azoles y según los CBPs observados para el voriconazol comercial (Tabla 3), presenta resistencia en todas las formulaciones probadas. En *C. parapsilosis* FMR 17181, se observa tan solo una dilución de diferencia en las CMIs comparadas, pero respecto a la VRC MP quedaría como resistente y para el resto de formulaciones como sensible.

La categorización de la susceptibilidad de *Candida auris* es arbitraria debido a que los puntos de corte clínicos todavía no han sido establecidos para esta especie. A

partir de la bibliografía (Arendrup *et al.*, 2017) encontramos que su CMI en voriconazol es dependiente del método de análisis estadístico utilizado, encontrando su rango desde 1 a 32 µg/ml para definir el VCE. Por lo tanto, estimamos que las cepas que presenten una CMI <1 µg/ml son susceptibles al voriconazol. Llevamos esta aproximación también a la interpretación de los resultados en las nuevas formulaciones. En este caso, FMR 17043 se mostraría sensible tanto para MP como para el resto de formulaciones y FMR 17034 resistente (Astvad *et al.*, 2017)

En ambos géneros estudiados, se puede decir que se observa actividad fungicida en todas las cepas estudiadas pero que los valores obtenidos de CMIs para las nuevas formulaciones no presentan cambios notables o favorables en comparación con el voriconazol de referencia.

Las CMIs de VOR004 en todas las cepas son iguales e incluso superiores a las de voriconazol de referencia (VCZ MP). Este dato no es de extrañar, ya que la formulación VOR004 no contiene ningún polímero anfifílico y por tanto, no se forman micelas que faciliten la penetración del fármaco en el interior del hongo. Tampoco se forman micelas en VOR051, aunque las CMIs de esta formulación son iguales a las de VCZ MP e incluso inferiores en algún caso (para *C. parapsilosis* FMR 17181). Esto puede ser debido a la celulosa que contiene, que favorece la rápida disolución del voriconazol, permitiendo una mejor actividad antifúngica.

Se considera que las formulaciones con un mejor resultado son VOR044 y VOR053, teniendo en cuenta que las diferencias no son altamente notables comparando todas las formulaciones entre sí y que no se podría decir que proporcionan una mayor actividad antifúngica como ya se ha nombrado.

6.1.2. Método de difusión

A partir de los ECV de voriconazol establecidos por el CLSI (documento M59, tabla 3) para las especies más relevantes de *Aspergillus*, se realizó una aproximación para dividir en dos grupos las cepas estudiadas.

Cepas wild type (CMI \leq 1 $\mu\text{g/ml}$): *A. flavus* FMR 8760, *A. fumigatus* FMR10522, *A. fumigatus* FMR 10504, *A. fumigatus* FMR 7738 y *A. flavus* ATCC 204304.

Cepas non-wild-type (CMI \geq 2 $\mu\text{g/ml}$): *A. terreus* FMR 11823, *A. calidoustus* FMR 13556 y *A. calidoustus* FMR 13557.

Para representar los resultados obtenidos, se realizó la media de los diámetros obtenidos de cada formulación estudiada en ambos grupos descritos (tabla 4).

Tabla 4. Media de los diámetros de los halos de inhibición formados por cada formulación en los dos grupos establecidos de *Aspergillus* spp.

	CEPAS CON CMI \leq 1 $\mu\text{G/ML}$	CEPAS CON CMI \geq 2 $\mu\text{G/ML}$
VCZ MP	19.7 mm	4,66 mm
VOR051	20.2 mm	5.35 mm
VOR053	20.07 mm	6.02 mm
VOR052	21.5 mm	5.67 mm
VOR044	19.6 mm	5.40 mm
VOR004	17.6 mm	5.31 mm
VOR050	19.9 mm	4.29 mm
VOR041	21.6 mm	5.30 mm

Los valores fueron representados en una gráfica comparando los diámetros obtenidos en cada formulación en ambos grupos de cepas (Figura 8).

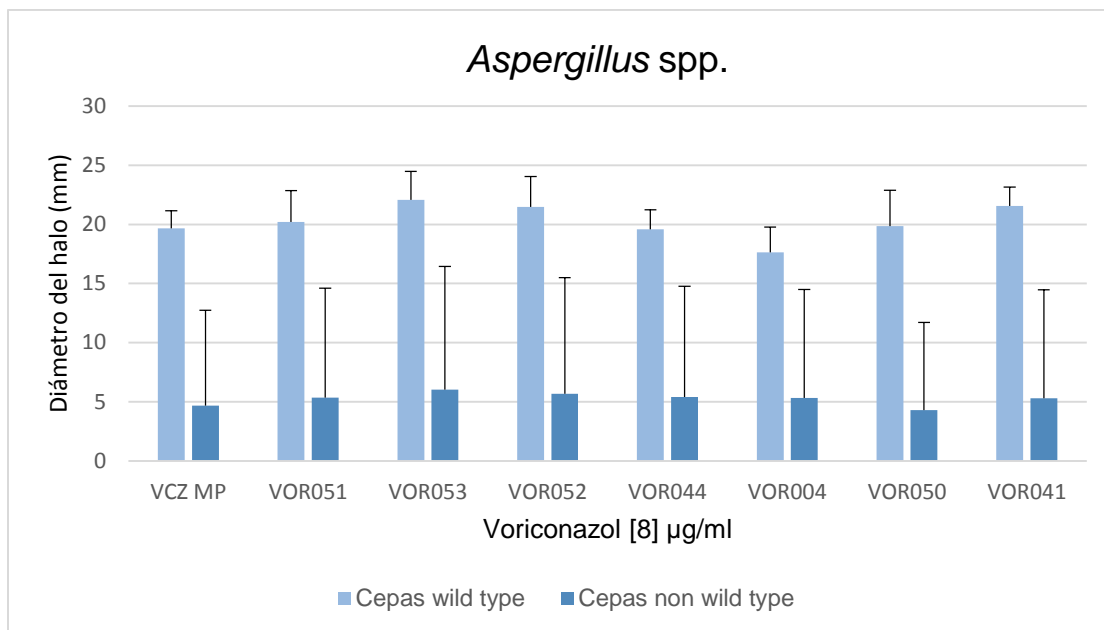


Figura 8. Gráfica del ensayo de difusión en agar realizado en *Aspergillus* spp.

A. calidoustus FMR 13556 y FMR 13357 no mostraron un halo de inhibición en respuesta a la actividad de las diferentes formulaciones a una concentración de 8 µg/ml. Se realizó el mismo *bioensayo* en ambas cepas con todas las formulaciones a una concentración superior de 16 µg/ml. Nuevamente, no se obtuvo halo de inhibición en ningún caso. El diámetro del halo en las dos cepas se consideró 0 mm, lo que explica los altos valores de desviación estándar en las cepas non-wild-type. La única cepa en la que se obtuvo un valor de diámetro para cada formulación fue *A. terreus* FMR 11823 en este grupo.

El motivo de este estudio consistía en valorar si las formulaciones penetran al hongo estudiado en medio sólido. Como se observa en los resultados obtenidos en ambos estudios de sensibilidad *in vitro*, la actividad del antifúngico coincide en el método de microdilución y la difusión en agar. FMR 13556 y FMR 13557 se muestran como las cepas más resistentes en ambas ocasiones.

Como se observa en la figura 8, VOR053 fue la formulación que logró una mayor actividad fungicida en los dos grupos estudiados. En la determinación de los valores de CMI de cada formulación, también es VOR053 una de las formulaciones con

unos resultados más bajos con respecto a VRC de referencia (MP). Sin embargo, VOR044 que había mostrado unos resultados favorables en el estudio anterior, en este caso obtiene los halos de inhibición más pequeños en las cepas consideradas WT.

Con respecto a *Candida* spp. también se establecieron dos grupos para interpretar los resultados, a partir de los valores conocidos de CBP de voriconazol estipulados por el CLSI en el documento M60 y los valores de CMI de las nuevas formulaciones obtenidas en el apartado anterior (método de microdilución).

Cepas sensibles: *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* FMR 17180, *C. auris* FMR 17043.

Cepas resistentes: *C. tropicalis* FMR 14600, *C. tropicalis* FMR 14603, *C. parapsilosis* FMR 17181, *C. auris* FMR 17034.

Se calculó la media de las medidas obtenidas en cada grupo, agrupándolas por formulación (Tabla 5).

Tabla 5. Media de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos en cada formulación para los dos grupos establecidos.

	CEPAS SENSIBLES	CEPAS RESISTENTES
VCZ MP	26 mm	9 mm
VOR051	26,1 mm	8,59 mm
VOR053	28,5 mm	7,59 mm
VOR052	26,2 mm	7,50 mm
VOR044	26,8 mm	7,43 mm
VOR004	26 mm	8,76 mm
VOR050	27 mm	8,24 mm
VOR041	26,9 mm	7,65 mm

Los resultados agrupados de esta forma se muestran en la siguiente figura en una gráfica. Aparece la media de cada halo formado por formulación en ambos grupos de cepas.

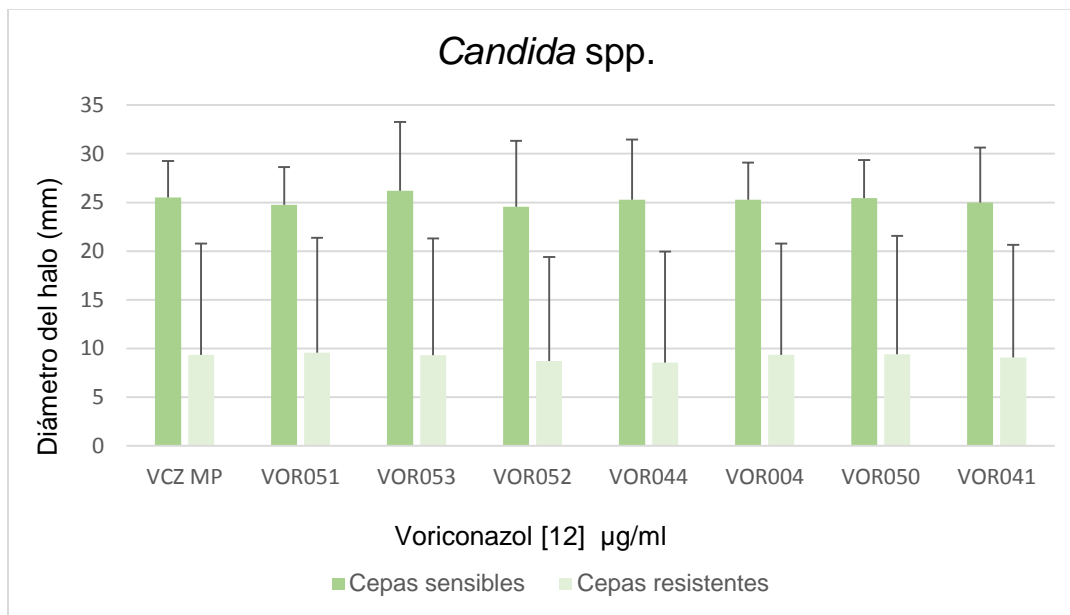


Figura 9. Gráfica del ensayo de difusión en agar realizado en *Candida spp.*

Para las cepas estudiadas del género *Candida*, se realizaron dos ensayos de difusión en agar con diferentes concentraciones de antifúngico valorando los resultados obtenidos en el ensayo de sensibilidad *in vitro* para determinar las CMI de cada formulación. Los dos grupos formados (sensibles y resistentes) se mantuvieron para el análisis de resultados.

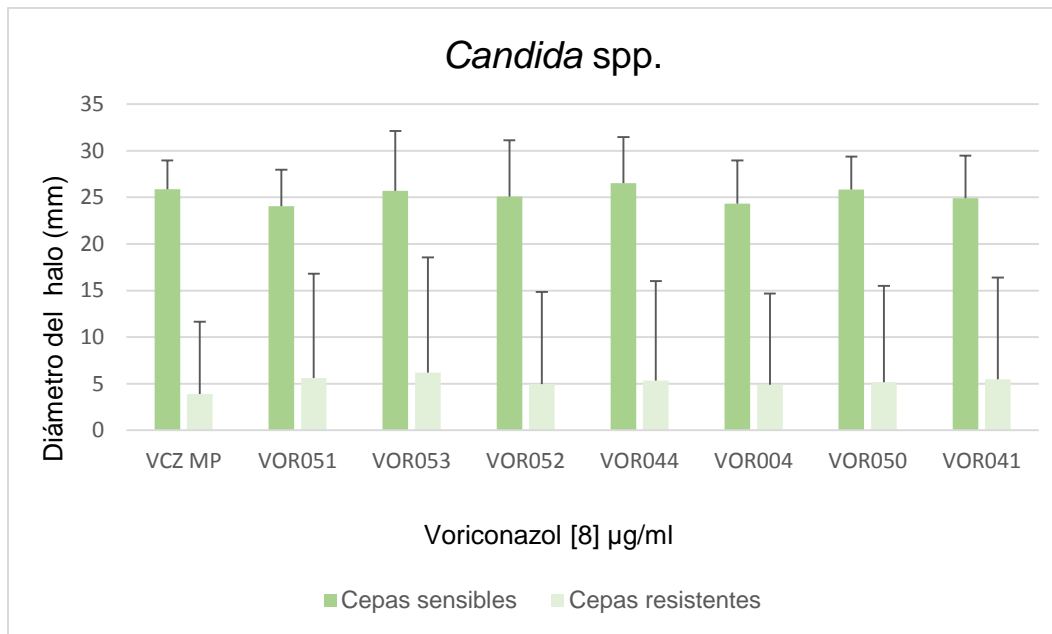


Figura 10. Gráfica del ensayo de difusión en agar realizado en *Candida* spp.

En ambos estudios realizados en las cepas estudiadas de *Candida* durante el trabajo, no se observan diferencias muy notables de una concentración de antifúngico a la otra. La principal diferencia a destacar, se observa con respecto a las cepas resistentes. A una mayor concentración de antifúngico, el halo de inhibición de crecimiento aumentó su tamaño. Esto se debe a que en el antifungigrama realizado a una concentración de 8 µg/ml no hubo crecimiento fúngico para *C. tropicalis* FMR 14600, *C. tropicalis* FMR 14603 y *C. auris* FMR 17034. Sin embargo, a una concentración de 12 µg/ml, sí que hubo una inhibición en FMR 14600 en todas las formulaciones de voriconazol probadas.

Debido a los resultados obtenidos en el estudio de sensibilidad *in vitro* anterior (método de microdilución), la cepa *C. auris* FMR 17034 fue sometida a un antifungigrama con una concentración de antifúngico de 16 µg/ml. A esta concentración su crecimiento tampoco se vio inhibido, lo que sugiere que en el estudio anterior, la CMI de la mayoría de las formulaciones para esta cepa se encuentra alrededor de 16 µg/ml.

En el análisis estadístico realizado se comparó en cada caso los diámetros obtenidos en el voriconazol de referencia con respecto a los obtenidos en cada formulación y ningún resultado se mostró $p \leq 0.05$. Esto indica que los valores comparados no muestran diferencias significativas, como se observa en la gráfica, tanto en cepas sensibles como en cepas resistentes.

El voriconazol se caracteriza por presentar una farmacocinética no lineal y exhibir una variabilidad inter- e intra-paciente. Las variables fisiológicas, patológicas y farmacológicas afectan a la concentración de este antifúngico en el suero del paciente. Por ello, es necesario establecer una correlación entre la dosis y las concentraciones en suero, para tratar de maximizar el efecto terapéutico a la vez que se minimiza la toxicidad. Para optimizar la dosis de voriconazol es necesaria la monitorización del fármaco como herramienta de la terapia individualizada (Allen *et al.*, 2015)

Los niveles de voriconazol en sangre se determinan normalmente a través de métodos cromatográficos (HPLC) o métodos microbiológicos (*bioensayo*). Aunque la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) es el método de elección, también se realizan bioensayos debido a su simplicidad a nivel técnico y su bajo coste económico a nivel de equipo. Para realizar un análisis completo, debe establecerse la correlación entre ambos análisis realizados (Siopi, et al. 2016).

El estudio de difusión en agar realizado en el trabajo se presenta como una adaptación de un *bioensayo* de difusión de agar desarrollado en estudios previos (Siopi, et al. 2016), donde se determina la concentración de voriconazol en muestras aisladas de pacientes. En este caso, se adaptó el procedimiento para estudiar la actividad de las formulaciones de voriconazol a concentraciones superiores a sus CMI para observar el efecto fungicida en medio sólido.

Como se observa en los resultados obtenidos en el ensayo y en el análisis estadístico realizado, no hay diferencias significativas entre el voriconazol de referencia (MP) y las formulaciones micelares. Sí que se observa un halo de inhibición de crecimiento en la mayoría de cepas estudiadas (preferentemente en

las sensibles), por lo que se puede afirmar que la formulación micelar es también capaz de penetrar el hongo o la levadura en medio sólido.

En el **Anexo 1** aparecen las medidas de los halos de inhibición formados por cada formulación en cada cepa de las estudiadas.

6.2. Estudios *in vivo*

6.2.1. Biodistribución y toxicidad

En las gráficas que se muestran a continuación, se establece una comparativa entre las concentraciones de voriconazol de cada órgano ($\mu\text{g/g}$) del voriconazol de referencia (MP) y la formulación micelar analizada (VOR053).

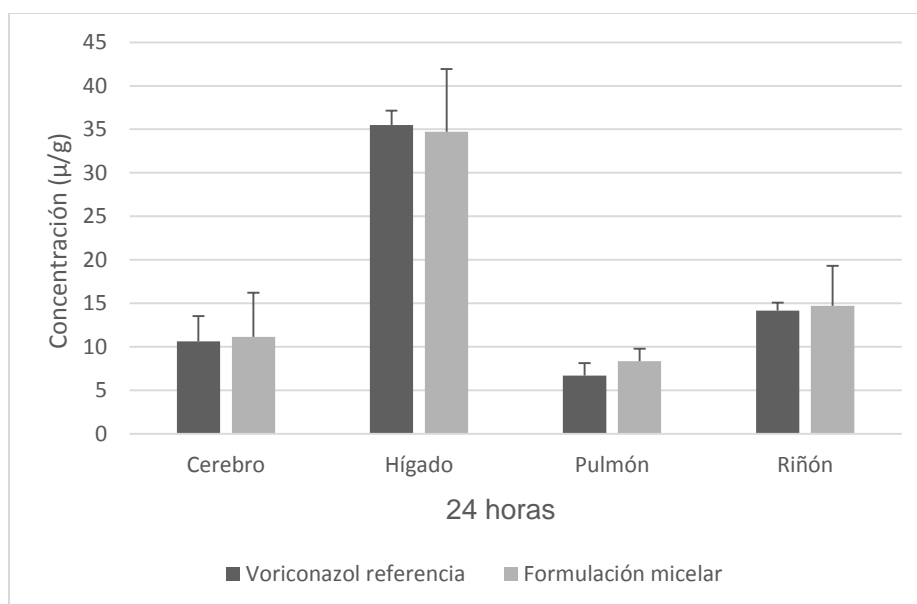


Figura 11. Gráfica con la concentración ($\mu\text{g/g}$) de VCZ MP y VOR053 en cada órgano analizado, pasadas 24 h de la primera dosis.

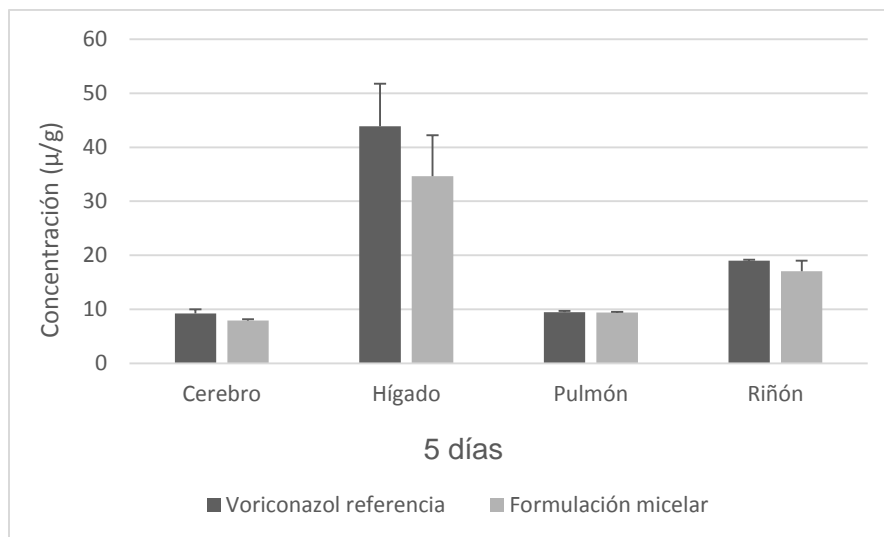


Figura 12. Gráfica de las concentraciones ($\mu\text{g/g}$) de VCZ MP y VOR053 en cada órganos analizado, 5 días después de la primera dosis.

Como se observa, tanto a las 24 horas de la primera dosis de administración como a los 5 días, MP y VOR053 se acumulan mucho más en el hígado que en el resto de órganos extraídos. El riñón sería el siguiente órgano con una mayor acumulación de antifúngico. Como es de esperar, a los 5 días, con un mayor número de dosis administradas (un total de 10, 1dosis/12h) ambas formulaciones se acumulan en mayor medida en todos los órganos. La concentración de voriconazol en pulmones e mantiene idéntica, por lo que la eficacia a nivel local sería muy semejante. Los niveles hepáticos de voriconazol, son menores en la formulación micelar.

El estudio bioquímico del suero de animales tratados mostró que la formulación VOR053 no dio lugar a toxicidad durante el régimen de tratamiento establecido (Tabla 6). La formulación VRC de referencia, aunque presentó niveles más elevados en todos los parámetros estudiados (AST, ALT, CREA y BUN) éstos no fueron significativamente más elevados que los obtenidos de los animales control.

Tabla 6. Parámetros bioquímicos analizados.

	AST (U/l)± SD	ALT (U/l) ± SD	CREA (mg/dl) ± SD	BUN (mg/dl) ± SD
Control	139 ± 35	32.6 ± 5,1	0.05 ± 0.03	35.2 ± 2.3
VRC MP	162 ± 47.3	37 ± 5.7	0.06 ± 0.04	44 ± 9,8
VOR053	142 ± 23.4	33.4 ± 7.2	0.05 ± 0.03	33.7 ± 3.7

Alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), Creatinina (CREA), nitrógeno ureico en sangre (BUN)

6.2.2. Estudio de eficacia

Cinco días tras la infección, 5 animales de cada grupo (control, VOR53 y VRC MP) fueron sacrificados para el recuento de UFC/g en tejidos diana. Tras el procesado y siembra de los especímenes, y tras 24h de incubación, recuperamos *Candida spp.*, en todos los órganos estudiados. No se cuantificaron los cultivos. Se esperaba recuperar *A. fumigatus* de los órganos de los animales a mayor o menor concentración, dependiendo de la eficacia de los tratamientos. Sin embargo, los cultivos aparecieron contaminados.

Se incubaron placas de medio PDA sin sembrar como control de esterilidad, vehículos usados para los fármacos, fármacos inmunosupresores y todas las soluciones utilizadas para el experimento de eficacia *in vivo*. No se recuperaron contaminantes en ningún caso.

Cabe destacar que el voriconazol se encuentra bajo un continuo estudio. A partir del desarrollo de una nueva formulación, no se solucionan los problemas de resistencia desarrollada frente a los azoles, ni se encuentran nuevas dianas terapéuticas, pero se pueden mejorar la principal limitación del voriconazol ya nombrada: su farmacocinética/farmacodinámica variable. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el estudio de biodistribución, se puede afirmar que la nueva formulación micelar analizada presenta ventajas prometedoras. Como se ha observado en el estudio, los análisis de actividad *in vitro* siempre deben ir acompañados de análisis de eficacia *in vivo*. Debido a los resultados obtenidos en

en el estudio de la eficacia, este debería repetirse para concluir la actividad observada de VOR053 puesto que ha mostrado buenas cualidades frente al voriconazol comercial.

La necesidad de encontrar nuevos antifúngicos y/o incluso una mejora de los fármacos actuales nace a raíz de que las tasas de mortalidad con respecto a micosis permanecen entre el 20-40%; la larga duración de las terapias actuales y su consecuente toxicidad; los problemas con respecto a la farmacocinética/farmacodinámica de los antifúngicos y la poca variedad de agentes. (Perfect, 2016).

En lo que respecta al voriconazol, es un tratamiento estandarizado en enfermedades fúngicas como la aspergilosis invasiva pero como se ha demostrado presenta ciertas limitaciones. Una de las principales limitaciones aparte de la resistencia adquirida por varios patógenos, se trata de la interacción con otros fármacos y sus efectos en la salud (Campoy and Adrio, 2016). Hay estudios que afirman que el voriconazol es uno de los antifúngicos que podría ser administrado un largo periodo de tiempo en comparación con otros fármacos como la anfotericina B. Cabe destacar, que el beneficio que se ha observado es muy moderado y se debe tratar con precaución destacando la heterogeneidad de pacientes que pueden quedar afectados por una infección fúngica (Rosanova *et. al.*, 2017).

En general, a pesar de la notable evolución a la que se ha sometido la clase de azoles, todavía hay mucho espacio para mejorar. El agente antifúngico ideal combina el amplio espectro de voriconazol o posaconazol con la farmacocinética confiable, las formas de dosificación parenteral y oral y el perfil de efectos adversos favorables del fluconazol (Allen *et al.*, 2015). Los sistemas micelares no cumplen todas estas perspectivas ideales de futuro pero sí presentan una alternativa para estudiar la liberación del voriconazol en el organismo de la forma menos tóxica posible.

7. CONCLUSIÓN

Los estudios de susceptibilidad *in vitro* por el método de microdilución del CLSI permiten obtener una visión general de los valores de CMI de las formulaciones micelares con respecto a las especies más relevantes de los géneros *Aspergillus* y *Candida*. Para obtener unos datos más fiables, se debería realizar una tercera réplica con las cepas estudiadas. Respecto a los ensayos *in vivo*, resultaría interesante realizar el ensayo de la biodistribución con el resto de formulaciones para comprobar cambios en las concentraciones del principio activo en los diferentes órganos. Posteriormente, debería realizarse un análisis estadístico que estableciese la correlación entre los datos obtenidos en varios estudios. Una vez establecida la biodistribución óptima, debería llevarse a cabo un estudio de eficacia con animales infectados para constatar una posible mejora en el tratamiento actual.

Para estudios futuros, sería interesante valorar una especie en concreto en cada género, destacando *Aspergillus fumigatus* como patógeno altamente resistente a los triazoles. Se deberían llevar a cabo tanto estudios de sensibilidad *in vitro* como análisis de la eficacia *in vivo* de las nuevas formulaciones para poder valorar tanto la actividad y la eficacia antifúngica de estas, pasando a los primeros estudios pre-clínicos.

El presente estudio realizado sobre las nuevas formulaciones micelares, permite tener una visión general de la actividad *in vitro* de las mismas, siempre en comparativa con el voriconazol de referencia. Aunque en la determinación de las CMI de las nuevas formulaciones no se ha observado una mayor actividad que el VRC de referencia, el estudio de biodistribución de VOR053 muestra unos resultados favorables respecto a la acumulación en el hígado. Los resultados se deben tratar con precaución y el estudio se debe considerar como parte preliminar a un proyecto más completo. Se debe profundizar acerca de las posibilidades terapéuticas que presenta una nueva formulación micelar de voriconazol y las ventajas que ofrece, basándonos en la farmacocinética/farmacodinámica del fármaco estudiado.

8. BIBLIOGRAFÍA

Allen D, Wilson D, Drew R, Perfect J. Azole antifungals: 35 years of invasive fungal infection management. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2015; 13: 787-798.

Arendrup MC. Candida and Candidaemia: Susceptibility and Epidemiology. *Dan Med J* 2013; 60: 1–32

Astvad KMT, Hare RK, Arendrup MC. Evaluation of the in vitro activity of isavuconazole and comparator voriconazole against 2635 contemporary clinical *Candida* and *Aspergillus* isolates. *Clin Microbiol Infect.* 2017; 23: 882-887.

Cadena J, Iii GRT, Patterson TF. Invasive Aspergillosis Management. *Infect Dis Clin NA.* 2016; 30: 125-142.

Cagel M, Tesan FC, Bernabeu E, et al. Polymeric mixed micelles as nanomedicines: Achievements and perspectives. *Eur J Pharm Biopharm.* 2017; 113: 211-228.

Campoy S, Adrio JL. Antifungals. 2016.

CLSI. *Epidemiological Cutoff Values for Antifungal Susceptibility Testing.* 2nd ed. CLSI supplement M59. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.

CLSI. *Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts.* 1st ed. CLSI supplement M60. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.

CLSI. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi.* 3rd ed. CLSI standard M38. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.

CLSI. *Epidemiological Cutoff Values for Antifungal Susceptibility Testing.* 2nd ed. CLSI supplement M59. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.

Cornely OA, Maertens J, Bresnik M, et al. Liposomal amphotericin B as initial therapy for invasive mold infection: a randomized trial comparing a high-loading dose regimen with standard dosing (AmBiLoad trial). *Clin Infect Dis.* 2007;44: 1289-1297.

Espinel-Ingroff A, Diekema DJ, Fothergill A, et al. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for the triazoles and six *Aspergillus* spp. for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 document). *J Clin Microbiol.* 2010; 48: 3251-3257.

Espinel-Ingroff A, Pfaller MA, Bustamante B, et al. Multilaboratory Study of Epidemiological Cutoff Values for Detection of Resistance in Eight *Candida* Species to Fluconazole , Posaconazole , and Voriconazole. 2014; 58: 2006-2012.

Espinel-Ingroff A, Turnidge J. The role of epidemiological cutoff values (ECVs /ECOFFs) in antifungal susceptibility testing and interpretation for uncommon yeasts and moulds. *Rev Iberoam Micol.* 2016; 33: 63-75.

Fisher MC, Henk DA, Briggs CJ, Brownstein JS, Madoff LC, McCraw SL, Gurr SL. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* 2012; 11: 484 (7393)

Gomes MZ, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Mucormycosis caused by unusual mucormycetes, non-Rhizopus, Mucor, and Lichtheimia species 2011; 24: 411:445.

Guarro J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012; 30: 33–39.

Guarro J. Lessons from animal studies for the treatment of invasive human infections due to uncommon fungi. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 1447-1466

Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA. Ainsworth & Bisby`s Dictionary of the Fungi. 10th ed. Wallingford: CAB International 2008.

Lass-Flörl C, Cuenca-Estrella M. Changes in the epidemiological landscape of invasive mould infections and disease. *J Antimicrob Chemother.* 2017; 72: 5-11.

Muñoz JF, Gade L, Chow NA, et al. Genomic insights into multidrug-resistance, mating and virulence in *Candida auris* and related emerging species. *Nat Commun.* 2018; 9: 5346.

Pahls S, Schaffner A. Comparison of the Activity of Free and Liposomal Amphotericin B In Vitro and in a Model of Systemic and Localized Murine Candidiasis. *J Infect Dis.* 1994; 169: 1057-1061.

Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2015; 62: 1–50.

Pemán J, Salavert M. General epidemiology of invasive fungal disease. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012; 30: 90-98.

Pérez-Cantero A, López-Fernández L, Guarro J, Capilla J. New insights into the Cyp51 contribution to azole resistance in *Aspergillus* section *Nigri* *Antimicrob Agents Chemother.* May 2019:AAC.00543-19.

Perfect JR. “Is there an emerging need for new antifungals?” *Expert Opin Emerg Drugs.* 2016; 21:129-131

Quindós G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Rev Iberoam Micol.* 2014; 31: 42-48.

Rosanova MT, Bes D, Serrano Aguilar P, Sberna N, Lede R. Efficacy and safety of voriconazole in immunocompromised patients: systematic review and meta-analysis. *Infect Dis (Auckl)*. 2018; 50: 489-494.

Siopi M, Neroutsos E, Zisaki K, et al. Bioassay for Determining Voriconazole Serum Levels in Patients Receiving Combination Therapy with Echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016; 60: 632-636.

9. AUTOEVALUACIÓN

Mi experiencia en la Unitat de Micologia i Microbiologia Ambiental ha sido muy satisfactoria.

Me ha permitido tener un primer contacto con el mundo de la investigación científica, así como ha despertado mi interés por realizar un doctorado en un futuro cercano, que antes veía más lejano. De la misma forma, me he interesado más por el ámbito de la microbiología y más en particular la línea de la micología médica y la situación actual respecto a la patogénesis presente en un gran número de especies fúngicas y el diagnóstico y tratamiento que se sigue.

He aprendido a trabajar en el laboratorio de una forma autónoma y a progresar dentro del estudio realizado. Esto ha hecho que desarrolle más confianza en mí misma dentro del ámbito científico.

Durante mi estancia en el grupo, he observado cómo se estructuran los proyectos científicos a llevar a cabo y me ha permitido valorar las limitaciones y la perspectiva de futuro de los estudios realizados. Han sido unos meses de trabajo y constante aprendizaje gracias a los que he adquirido experiencia con respecto al mundo laboral y me ha hecho sentirme capaz de formar parte activa en proyectos futuros. Cierro esta etapa conociendo los aspectos en los que debo mejorar y con ganas de seguir formándome dentro de la Biotecnología.

Quiero agradecer al Dr. Javier Capilla por darme la oportunidad de desarrollar el Trabajo de Fin de Grado dentro del grupo y su ayuda durante el proceso de redacción.

Gracias a Miri y a Patri por sus consejos y su apoyo siempre que lo he necesitado, a Dayana por enseñarme la rutina dentro del laboratorio y la mayor parte de lo que he aprendido ahí dentro, además de su cariño y amistad; a Alba por su disposición, ánimo y generosidad conmigo; a Tere por adentrarme en este mundo a través de su proyecto y ayudarme en todo momento y al resto del equipo por la cercanía y hacerme sentir una más estos últimos meses.

ANEXO

ANEXO 1. Medidas en mm de los diámetros de los halos de inhibición formados en el estudio de difusión en agar.

[8] µg/ml	<i>A. flavus</i> ATCC 204304	<i>A. fumigatus</i> FMR 7738	<i>A. flavus</i> FMR 8760	<i>A. fumigatus</i> FMR 10522	<i>A. fumigatus</i> FMR 10504	<i>A. terreus</i> FMR 11823	<i>A. calidoustus</i> FMR 13556	<i>A. calidoustus</i> FMR 13557
VCZ MP	18,6	22	18,7	18,6	20,3	14	0	0
VOR051	19,4	22	16,2	20,3	23,1	16	0	0
VOR053	22,9	24	18,6	20,5	24,2	18,1	0	0
VOR052	22,1	24	18,8	18,7	23,7	17	0	0
VOR044	18,3	22	18,5	18,5	20,6	16,2	0	0
VOR004	16,4	20	19,9	15,7	16,0	15,9	0	0
VOR050	18,6	22	16,6	18,1	23,9	12,9	0	0
VOR041	20,9	23	19,3	21,3	23,2	15,9	0	0

[8] µg/ml	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	<i>C. parapsilosis</i> FMR 17181	<i>C. auris</i> FMR 17043	<i>C. parapsilosis</i> FMR 17180	<i>C. auris</i> FMR 17034	<i>C. tropicalis</i> FMR 14600	<i>C. tropicalis</i> FMR 14603
VCZ MP	29,3	23,3	25	15,6	0	0	0
VOR051	27,8	19,9	24,4	22,4	0	0	0
VOR053	32,1	19,3	25,7	24,7	0	0	0
VOR052	29,9	18,3	27	19,8	0	0	0
VOR044	31,9	22,2	25,4	21,3	0	0	0
VOR004	28,4	19,4	25,1	19,6	0	0	0
VOR050	28	21,7	27,7	20,7	0	0	0
VOR041	29,3	20,2	25,2	21,9	0	0	0

[12] µg/ml	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	<i>C. parapsilosis</i> FMR 17181	<i>C. auris</i> FMR 17043	<i>C. parapsilosis</i> FMR 17180	<i>C. auris</i> FMR 17034	<i>C. tropicalis</i> FMR 14600	<i>C. tropicalis</i> FMR 14603
VCZ MP							
VOR051	29,4	21,9	25,4	23,3	0	14	0
VOR053	29,6	20,4	26,1	24,3	0	14	0
VOR052	29,3	18,3	28,2	25,2	0	12	0
VOR044	31	17	26,8	21,8	0	13	0
VOR004	31,6	19,7	24,2	24,2	0	10	0
VOR050	28,8	21	26,3	23,3	0	14	0
VOR041	26	21	27,4	25,6	0	12	0
	30,2	18,6	27,1	24,2	0	12	0