



MECANISMOS DE RESISTENCIA A AZOLES EN ESPECIES DE CANDIDA NO-ALBICANS

Patricia Navarro Rodríguez

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS DE RESISTENCIA A AZOLES EN ESPECIES DE CANDIDA NO-ALBICANS

Patricia Navarro Rodríguez

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS DE RESISTENCIA A AZOLES EN ESPECIES DE CANDIDA NO-ALBICANS

Patricia Navarro Rodríguez

Patricia Navarro Rodríguez

**Mecanismos de resistencia a
azoles en especies de
*Candida no-albicans***

Tesis doctoral 2019

Dirigida por: Javier Capilla Luque, Loida López Fernández,
Josep Guarro Artigas

Departamento de Ciencias Médicas Básicas

Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud. Universitat Rovira i Virgili



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS DE RESISTENCIA A AZOLES EN ESPECIES DE CANDIDA NO-ALBICANS

Patricia Navarro Rodríguez



Javier Capilla Luque, Profesor Agregado de Microbiología de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad Rovira i Virgili, Loida López Fernández, Profesora SECTI de Microbiología de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad Rovira i Virgili y Josep Guarro Artigas, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad Rovira i Virgili.
HACEN CONSTAR QUE:

La Tesis Doctoral titulada “MECANISMOS DE RESISTENCIA A AZOLES EN ESPECIES DE *CANDIDA* NO-*ALBICANS*”, presentada por Patricia Navarro Rodríguez, ha sido realizada bajo su dirección y cumple los requisitos necesarios para optar al título de Doctora.

Y para que así conste y tenga los efectos oportunos, firman la presente

Los directores de la tesis doctoral:

Javier Capilla Luque

Loida López Fernández

Josep Guarro Artigas

Reus, 27/05/2019

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS DE RESISTENCIA A AZOLES EN ESPECIES DE CANDIDA NO-ALBICANS

Patricia Navarro Rodríguez

A los árboles

A la vida, que me la dieron mis padres y le debo todo

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS DE RESISTENCIA A AZOLES EN ESPECIES DE CANDIDA NO-ALBICANS

Patricia Navarro Rodríguez

MÁS DURA LA BATALLA, MÁS DULCE LA VICTORIA.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS DE RESISTENCIA A AZOLES EN ESPECIES DE CANDIDA NO-ALBICANS

Patricia Navarro Rodríguez

Agradecimientos

Quiero empezar agradeciendo estos años de tesis a mis directores, al Dr. Josep Guarro, por la tranquilidad de saber que siempre estás ahí pendiente de nosotros cuando te necesitamos, o cuando no, al Dr. Javier Capilla por todos estos años trabajando en tu equipo y tu apoyo cuando más lo he necesitado y a la Dra. Loida López que empezó a enseñarme a trabajar en el laboratorio cuando aún estaba en el máster y nunca ha dejado de hacerlo, muchos de mis conocimientos (no sólo en ciencia) te los debo a ti, eternamente gracias.

En segundo lugar y especialmente quiero agradecer al Dr. Cano “Cano” o “Pep” y al Dr. Stchigel “Betico”, ya que gracias a vuestras clases durante la carrera empecé a interesarme por el mundo de la microbiología y por eso acabé en esta locura. Quiero dar las gracias también a la Dra. Gené, “Fina” y a la Dra. García “Dania”, que también conocí hace muchos años, un día fuisteis mis profesoras y lo recuerdo con mucho cariño. Años después, he tenido la oportunidad de trabajar en este grupo y aprender mucho más de vosotros.

Muchas veces he sentido que escalaba una montaña con una mochila llena de piedras a la espalda en bicicleta, pero el camino ha sido más fácil gracias a muchas personas que me han ayudado, quitándome piedras o compartiendo conmigo los pedales. Alba “Merluza” cuando te miro me entra la risa de lo tontas que somos, una unión inquebrantable desde el primer día, tu fuerza es algo que me inspira y es admirable. Dra. Martín “Dele” “Adela”, como quieras (cofundadora del gueto *Patriela*) con la que he compartido momentazos tanto dentro como fuera del *lab* (*jajajaja*) me río solo de pensarlos, gracias por haberme enseñado tanto de TODO. Núria (una de mis mamis favoritas), una de esas personas por las que una agradece haber hecho un doctorado, a las DOS, saber que estáis ahí por mucho que haya KM de por medio ha hecho este reto mucho más fácil. Olga, con la que compartí todo el tiempo de mi estancia en Madrid, mano a mano horas y horas en el *labo*, pero siempre con risas y buen humor, siempre siento que estamos cerca, aunque desgraciadamente no sea así, gracias por todo, tu PETSÍ te ama. Ana “primi” por los buenos momentos que hemos pasado juntas, porque empezamos juntas esta locura y juntas acabamos. Y Neto “Sop”, desde que llegaste, por donde pasaste lo cambiaste todo a mejor, MIL GRACIAS por cada palabra, consejo, conversación, ayuda, tiempo, momentos, pelea, pelea de dedo, llanto, sonrisa, risa, broma, tontería y amistad que me has

regalado y, sobre todo, por haberme entendido y por ser el que más me ha aguantado en los peores momentos.

También en especial quiero agradecer a los técnicos del laboratorio por ayudarme en las “tareas” del día a día, Núria, Carme y Jordi, y a estos dos últimos, gracias por haberme hecho reír y ser mi apoyo en innumerables ocasiones.

A todos los demás que habéis compartido conmigo toda o parte de mi tesis doctoral, Dra. Sanchis (Marta), Dra. Paredes (Katy), Dra. Marín (Yas), Dr. Valenzuela (Nico), Emmanuel, Damaris, Dayana, Viry, Isabel, Edu, El niño, Dani, Miriam, Elena, Carlitos y muchos más, gracias.

A mis secretarias favoritas Inma y Nuria ¡Las más guapas de la facultad! gracias por las risas en los pasillos y por vuestra eterna sonrisa.

A las locas de mis amigas, Lorena, Elena, Alba y Vanessa siempre dispuestas a hacerme desconectar de esta locura con más locura.

A la música, que me ha acompañado más horas de las que tiene un año durante toda mi vida, pero sobretodo en estos últimos años.

Y para mi familia...

A Kiwi y Simba, sólo por vuestra existencia, GRACIAS.

Quiero agradecer a las dos personas más importantes de mi vida, a las cuales les dedico esta tesis doctoral, mis padres, ya que evidentemente sin vosotros nada de esto sería posible, gracias por ser los mejores padres que una persona pueda tener. *Cuando tus padres son tus mejores amigos debes sentirte bendecido*, y así me siento yo. A mi hermana, mi ejemplo a seguir en la vida, a mi cuñado y al mejor regalo que ellos me han dado, *mi pequeño bollito*, salir de trabajar y ver vuestras caras y vuestro amor es, simplemente, lo mejor que me puede pasar.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS DE RESISTENCIA A AZOLES EN ESPECIES DE CANDIDA NO-ALBICANS

Patricia Navarro Rodríguez

RESUMEN	1
1. RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
2. INTRODUCCIÓN	5
2.1. Género <i>Candida</i> y candidiasis	7
2.2. Fármacos antifúngicos y tratamiento de la candidiasis	17
2.3. Resistencia a agentes antifúngicos	32
INTERÉS, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	47
3. INTERÉS, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	49
MATERIALES Y MÉTODOS	53
4. MATERIALES Y MÉTODOS	55
4.1. Material biológico y cepas utilizadas.....	55
4.2. Medios de cultivo	57
4.3. Condiciones de cultivo	58
4.4. Inducción con voriconazol.....	58
4.5. Estudios <i>in vitro</i>	59
4.6. Crecimiento en presencia de compuestos tóxicos que afectan a membrana o pared celular	64
4.7. Extracción de ergosterol	65
4.8. Cuantificación de ergosterol	65
4.9. Estudios <i>in vivo</i>	66
4.1. Diseño de cebadores	71
4.2. Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos	73
4.3. Electroforesis de ácidos nucleicos.....	75
4.4. Cuantificación de ácidos nucleicos	76
4.5. Reacción en cadena de la polimerasa.....	76
4.6. Análisis <i>in silico</i> : búsqueda, análisis y edición de secuencias	81
4.7. Análisis estadístico.....	82
RESULTADOS	85
ESTUDIO 1: EXPRESIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN LAS BOMBAS DE EYECCIÓN <i>CDR1</i>, <i>CDR2</i> Y <i>SNQ2</i> Y <i>ERG11</i> AISLADOS DE <i>CANDIDA GLABRATA</i> SENSIBLES Y RESISTENTES A VORICONAZOL.....	87

5.	ESTUDIO 1: <i>CANDIDA GLABRATA</i>	89
5.1.	Sensibilidad antifúngica <i>in vitro</i>	89
5.2.	<i>ERG11</i> , <i>CDR1</i> , <i>CDR2</i> y <i>SNQ2</i> no son inducibles por el voriconazol.....	92
5.1.	Perfiles de expresión de los genes <i>CDR1</i> , <i>CDR2</i> , <i>SNQ2</i> y <i>ERG11</i> en cepas sensibles y resistentes a voriconazol	94
5.2.	Análisis de la secuencia de <i>ERG11</i>	97

ESTUDIO 2: COMPARACIÓN *IN VIVO* E *IN VITRO* DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA RESISTENCIA A AZOLES EN *CANDIDA PARAPSILOSIS*99

6.	ESTUDIO 2: <i>CANDIDA PARAPSILOSIS</i>	101
6.1.	Sensibilidad antifúngica <i>in vitro</i>	101
6.2.	Eficacia en un modelo murino de candidiasis.....	102
6.3.	Análisis de la secuencia nucleotídica de <i>ERG11</i> y las secuencias de aminoácidos deducidas.....	104
6.4.	Expresión de <i>CDR1</i> y <i>ERG11</i> en condiciones <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	106

ESTUDIO 3: VARIACIÓN EN LA EXPRESIÓN Y POLIMORFISMOS DEL GEN *ERG11* Y EL CONTENIDO DE ERGOSTEROL EN CEPAS DE *CANDIDA TROPICALIS* Y SU RELACIÓN CON LA RESISTENCIA AL VORICONAZOL111

7.	ESTUDIO 3: <i>CANDIDA TROPICALIS</i>	113
7.1.	Sensibilidad antifúngica <i>in vitro</i>	113
7.2.	Sensibilidad a SDS	114
7.3.	Cuantificación del contenido de ergosterol	117
7.4.	Eficacia del voriconazol en un modelo murino de candidiasis invasora	119
7.5.	Análisis de la secuencia nucleotídica de <i>ERG11</i> y las secuencias de aminoácidos deducidas.....	120
7.6.	El gen <i>ERG11</i> es inducible por voriconazol en cepas resistentes y sensibles.....	123

DISCUSIÓN 127

8.	DISCUSIÓN	129
8.1.	<i>Candida glabrata</i>	131
8.2.	<i>Candida parapsilosis</i>	137
8.3.	<i>Candida tropicalis</i>	143

CONCLUSIONES 153

9.	CONCLUSIONES	155
9.1.	ESTUDIO 1: Expresión de los genes que codifican las bombas de eyección <i>CDR1</i> , <i>CDR2</i> y <i>SNQ2</i> y <i>ERG11</i> aislados de <i>Candida glabrata</i> sensibles y resistentes a voriconazol	155
9.2.	ESTUDIO 2: Comparación <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de los niveles de expresión de genes implicados en la resistencia a azoles en <i>Candida parapsilosis</i>	156
9.3.	ESTUDIO 3: Variación en la expresión y polimorfismos del gen <i>ERG11</i> y el contenido de ergosterol en cepas de <i>Candida tropicalis</i> y su relación con la resistencia al voriconazol	157
	REFERENCIAS	159
10.	REFERENCIAS.....	161
	ANEXOS	195
11.	ANEXOS	197
11.1.	Publicación derivada de la presente tesis doctoral:.....	197

Índice de figuras

Figura 1. Patogénesis de la candidiasis invasora.	10
Figura 2. Mapa de la distribución mundial de <i>C. glabrata</i> (azul), <i>C. parapsilosis</i> (salmón) y <i>C. tropicalis</i> (morado).	12
Figura 3. Árbol filogenético de <i>Candida</i> y <i>Saccharomyces</i>	15
Figura 4. Mecanismos de acción de los antifúngicos.	19
Figura 5. Estructura química de la anidulafungina (A), micafungina (B) y caspofungina (C).	23
Figura 6. Ruta de biosíntesis del ergosterol.	25
Figura 7. Estructura química de fluconazol (A), voriconazol (B), itraconazol (C) y posaconazol (D).	28
Figura 8. Mecanismos de resistencia a los principales compuestos antifúngicos.	35
Figura 9. Zonas <i>hot spot</i> de la enzima Fks1 en la membrana de <i>C. albicans</i>	37
Figura 10. Esquema de las bombas de eyección MF y ABC en <i>C. albicans</i> y su disposición en la membrana plasmática.	43
Figura 11. Esquema de la sobreexpresión de bombas.	45
Figura 12. (A) Diluciones de antifúngicos solubles en agua, diluyente RPMI 1640, (B) Diluciones de antifúngicos insolubles en agua, diluyente DMSO.	62
Figura 13. (A) Microplaca de 96 pocillos con pocillo de fondo cóncavo. (B) Distribución de la microplaca inoculada. (C) Espejo invertido para la lectura de los resultados.	63
Figura 14. Recuento de neutrófilos en un modelo murino después de la administración de una dosis de ciclofosfamida de 200 mg/kg, en comparación con ratones no inmunosuprimidos.	67

Figura 15. Perfil de expresión génica de <i>CDR1</i> (A), <i>CDR2</i> (B) y <i>ERG11</i> (C), de <i>C. glabrata</i> en presencia de VRC.	93
Figura 16. Perfiles de expresión de <i>ERG11</i> (A) y <i>CDR1</i> , <i>CDR2</i> y <i>SNQ2</i> (B) determinados por qPCR, en dieciocho cepas de <i>C. glabrata</i> cultivadas en condiciones de control.....	95
Figura 17. Expresión relativa de <i>ERG11</i> , <i>CDR1</i> , <i>CDR2</i> y <i>SNQ2</i> en diecisiete cepas de <i>C. glabrata</i> determinada por qPCR.	97
Figura 18. Carga fúngica en riñón de ratones inmunodeprimidos tras 11 días después de la infección con 4×10^6 UFC de <i>C. parapsilosis</i>	103
Figura 19. Alineamiento de las secuencias proteicas <i>CYP51</i> de <i>S. cerevisiae</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> y <i>C. parapsilosis</i>	105
Figura 20. Expresión <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de <i>ERG11</i> y <i>CDR1</i> en <i>C. parapsilosis</i>	107
Figura 21. Incremento de la expresión relativa de <i>ERG11</i> , <i>CDR1</i> <i>in vivo</i> respecto <i>in vitro</i> determinada mediante qPCR.	109
Figura 22. Crecimiento en YPD, en SM y en SM en presencia de 0,0125 y 0,025 % de SDS de <i>C. tropicalis</i> . Se inoculó una suspensión de 1×10^4 células.....	116
Figura 23. Contenido de ergosterol.....	118
Figura 24. Alineamiento de las secuencias proteicas <i>CYP51</i> de <i>S. cerevisiae</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> y las cepas de <i>C. tropicalis</i> que presentan mutaciones puntuales en el gen <i>ERG11</i>	121
Figura 25. Comparación entre la secuencia Erg11p de la cepa de tipo susceptible, FMR 10240 y la cepa resistente que muestra la eliminación de 126 aminoácidos, FMR 8898.....	122
Figura 26. A. Curva de crecimiento de <i>C. tropicalis</i> . B. Expresión de <i>ERG11</i> y el gen de referencia <i>RDN 5.8</i> en condición control (C) y en presencia de 1,	

10 o 100 µg / mL durante 6 o 18 h de incubación, en la cepa FMR 14602 resistente de *C. tropicalis* determinada mediante PCR convencional. 124

Figura 27. Niveles de expresión de *ERG11* de dieciocho aislados de *C. tropicalis* en presencia de VRC. 126

Índice de tablas

Tabla 1. Factores de riesgo asociados a candidiasis invasora (Pappas y col. 2018).....	10
Tabla 2. Diferencias y similitudes entre PCE y PCC (Espinel-Ingroff y col. 2016).....	31
Tabla 3. Puntos de corte clínico (negrita) y puntos de corte epidemiológicos (<i>itálica</i>) establecidos para <i>C. glabrata</i> , <i>C. tropicalis</i> y <i>C. parapsilosis</i> frente a diferentes antifúngicos de uso clínico expresados en µg/mL, basado en las metodologías establecidas por el CLSI y el EUCAST.....	32
Tabla 4. Cepas utilizadas en la presente tesis doctoral.....	56
Tabla 5. Condiciones de inducción con voriconazol para cada una de las especies de <i>Candida</i>	59
Tabla 6. Antifúngicos utilizados en los ensayos de sensibilidad <i>in vitro</i>	60
Tabla 7. Compuestos químicos de interacción con pared y membrana celular.	64
Tabla 8. Antifúngicos empleados en los estudios <i>in vivo</i> , con sus correspondientes características y condiciones de uso.	69
Tabla 9. Cebadores específicos de <i>Candida</i> spp.	72
Tabla 10. Mezclas de reacción y <i>Taq</i> polimerasas utilizadas para la amplificación del gen <i>ERG11</i> en las distintas especies de <i>Candida</i>	77
Tabla 11. Programa utilizado para la amplificación del gen <i>ERG11</i> de cada una de las especies de <i>Candida</i>	77
Tabla 12. Condiciones de la qPCR para cada una de las especies del estudio.	80
Tabla 13. Secuencias de <i>ERG11</i> /Erg11 de referencia para cada una de las especies estudiadas.....	81

Tabla 14. Sensibilidad frente a cuatro azoles y mutaciones en <i>ERG11</i> de dieciocho aislamientos de <i>C. glabrata</i>	91
Tabla 15. Resultados de la sensibilidad antifúngica <i>in vitro</i> . Mutaciones en <i>ERG11</i> y cambios de aminoácidos en Erg11.	102
Tabla 16. Resultados de la actividad <i>in vitro</i> y la eficacia <i>in vivo</i> de VRC.	115
Tabla 17. Contenido de DHE en diez aislados de <i>C. tropicalis</i>	119

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS DE RESISTENCIA A AZOLES EN ESPECIES DE CANDIDA NO-ALBICANS

Patricia Navarro Rodríguez

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS DE RESISTENCIA A AZOLES EN ESPECIES DE CANDIDA NO-ALBICANS

Patricia Navarro Rodríguez



RESUMEN



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS DE RESISTENCIA A AZOLES EN ESPECIES DE CANDIDA NO-ALBICANS

Patricia Navarro Rodríguez

1. RESUMEN

La candidiasis invasora es una infección micótica de gran importancia en clínica que puede ser causada por varias especies de *Candida*. Aunque, la especie más común es *Candida albicans*, en los últimos años ha habido un aumento de infecciones producidas por otras especies tales como *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei*. Todas ellas son responsables del 90 % de las micosis invasoras a nivel mundial. El espectro de la candidiasis varía desde una candidemia mínimamente sintomática hasta una sepsis fulminante con una alta mortalidad asociada. El diagnóstico precoz de esta enfermedad es clave para la elección de un tratamiento antifúngico adecuado, los fármacos de primera línea utilizados son las equinocandinas y los azoles. Sin embargo, uno de los principales problemas de estas infecciones es el reciente aumento de aislados resistentes a los antifúngicos de uso clínico. En la actualidad los azoles son los más frecuentemente usados en el tratamiento de la candidiasis, debido a su baja toxicidad y a la posibilidad de ser administrados por la vía oral. Existe una amplia documentación reciente sobre la resistencia que muchos aislados de diferentes especies de *Candida* presentan frente a los azoles. El objetivo principal de esta tesis doctoral ha sido evaluar los mecanismos de resistencia a voriconazol en tres especies de *Candida*: *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* para intentar arrojar luz sobre este asunto y mejorar el tratamiento terapéutico de estas infecciones fúngicas. Para ello se han llevado a cabo estudios moleculares de los mecanismos de resistencia principalmente descritos, evaluando la relación de los genes candidatos *ERG11*, *CDR1*, *CDR2* y *SNQ2* con la disminución de

Resumen

la sensibilidad a voriconazol de estas especies. En definitiva, los mecanismos de resistencia a azoles involucrados en estas especies son complejos y aunque comparten puntos clave con los descritos hasta la fecha en *C. albicans*, se han observado diferencias que demuestran la importancia del estudio continuo de estos mecanismos.



INTRODUCCIÓN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS DE RESISTENCIA A AZOLES EN ESPECIES DE CANDIDA NO-ALBICANS

Patricia Navarro Rodríguez

2. INTRODUCCIÓN

Se conocen como micosis aquellas infecciones producidas por hongos microscópicos que, en el caso de afectar al ser humano, pueden afectar a cualquier órgano. La mayoría de especies fúngicas tienen un papel fundamental en los ecosistemas como saprófitas, siendo grandes descomponedoras de materia orgánica reincorporando así energía y fuentes de carbono a los ecosistemas. Otras especies establecen relaciones mutualistas (por ejemplo, en líquenes, micorizas) o parasíticas afectando animales y plantas. De las aproximadamente 1,5 millones de especies fúngicas descritas, unas 600 de ellas pueden causar infección en el ser humano (De Hoog y col. 2001; Lass-Flörl 2009; Lass-Flörl y Cuenca-Estrella 2017). Estrictamente, pocas especies fúngicas, mayormente las dimórficas, pueden ser consideradas como patógenos humanos primarios capaces de causar infecciones en individuos sanos. Sin embargo, en las últimas décadas ha habido un aumento constante en la frecuencia y gravedad de micosis humanas. Este hecho se relaciona principalmente con el aumento de población con defectos primarios o secundarios en el sistema inmunitario, como consecuencia del uso fármacos inmunosupresores asociados a trasplantes de órganos o a tratamientos oncológicos o trasplantes de órganos, que favorece el establecimiento y progreso del microorganismo en los tejidos hospedadores. Otros factores de riesgo incluyen el uso de antibióticos de amplio espectro, procedimientos quirúrgicos extensos, largas estancias en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), grandes quemados, pacientes con nutrición parenteral o pacientes infectados con el Virus de la Inmunodeficiencia humana (VIH), entre otros

(Holzheimer y Dralle 2002). Estas micosis reciben el nombre de micosis oportunistas.

Las micosis humanas pueden tener diferentes formas de presentación, pudiendo ser desde superficiales a sistémicas (Ruping y col. 2008), siendo estas últimas causantes de una elevada morbilidad y mortalidad en pacientes que presentan factores de riesgo. La infección suele originarse generalmente por inhalación de propágulos, aunque también pueden ser adquiridas por contacto como en el caso de las dermatomicosis, a partir de la microbiota del huésped, o por inoculación traumática. Tras la primoinfección, y según las características de la especie fúngica y el estado de salud del hospedador, la infección puede diseminarse mediante vía hemática, linfática e incluso nerviosa, dando lugar a una infección invasora (Mayayo y col. 2010).

Las infecciones invasoras suelen ser las más graves siendo *Candida*, *Aspergillus* y *Cryptococcus* los géneros más frecuentemente aislados en la clínica humana. El género *Candida* es el más prevalente en los países desarrollados, con una tasa de mortalidad que oscila entre el 30 y el 60 % (Bouza y Muñoz 2008) mientras la aspergilosis invasora, causada por especies del género *Aspergillus*, ocupa el segundo lugar. Sin embargo hay un número creciente de infecciones causadas por hongos oportunistas, que, aun siendo menos frecuentes, dan lugar a infecciones graves con tasas de mortalidad elevadas, y entre las que cabe destacar especies de los géneros *Pneumocystis*, *Fusarium*, *Scedopsorium*, *Lomentospora*, *Rhizopus* y *Mucor* entre otros (Pfaller y Diekema 2004).

2.1. Género *Candida* y candidiasis

El género *Candida* se encuentra en el *Phylum Ascomycota*, clase *Saccharomycetes*, orden *Saccharomycetales* (Kurtzman y col. 2011) y fue descrito formalmente por primera vez en 1923 por Berkhout (Berkhout 1923; Mackinnon y Artagaveytia-Allende 1945). Aunque este género incluye más de 150 especies, sólo unas pocas han sido relacionadas con enfermedades humanas, ya que únicamente alrededor del 30 % de las especies de *Candida* son capaces de crecer a 37°C, condición necesaria para poder desarrollarse en los tejidos humanos (Schauer y Hanschke 1999). La especie más prevalente en clínica humana es *Candida albicans*, aunque en los últimos años las infecciones causadas por especies de *Candida* no-*albicans* (NCA), tales como *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei* han aumentado considerablemente (Pfaller y Diekema 2007; Foxman y col. 2013) con una incidencia dependiente del área geográfica (Pfaller y col. 2007; Foxman y col. 2013).

La principal vía de infección de *Candida* spp. es de naturaleza endógena, como consecuencia de la transición desde una relación comensal con el huésped a una fase patógena, debida principalmente a alteraciones fisiológicas del propio paciente. Otras formas de transmisión incluyen el contacto con material infectado, el contacto con otros pacientes o con personal sanitario. Tras la exposición, el establecimiento y desarrollo de la infección está vinculada a factores propios del paciente y factores de la especie o cepa infectante. En el caso de individuos con deficiencias en el sistema inmunitario, brechas en las barreras físicas o largos períodos de hospitalización propician la adquisición de una candidiasis invasora (Peman y Salavert 2012).

Además, es importante destacar que los avances en medicina han permitido aumentar la supervivencia de pacientes con enfermedades graves, incrementando así el riesgo de adquisición de micosis profundas y diseminadas (Almirante y col. 2005). Además de la afectación de base en los pacientes, la presencia de diversos factores de virulencia en *Candida* spp. puede favorecer la diseminación dando lugar a candidiasis invasora con afectación multiorgánica (Pappas y col. 2003; Wisplinghoff y col. 2004; Pappas 2006; Kullberg y Arendrup 2015; McCarty y Pappas 2016). Algunos de los factores asociados a la diseminación incluyen la presencia de adhesinas, enzimas líticos, capacidad de formar biopelículas o la capacidad de realizar *switching* fenotípico en algunas especies. La presencia concomitante de estos factores favorecen la invasión y el desarrollo de la infección (Sudbery y col. 2004; Bastidas y Heitman 2009; Williams y col. 2011).

La candidiasis invasora es una infección vinculada a los avances en tecnología médica, reconocida como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el entorno sanitario (Pappas y col. 2003; Wisplinghoff y col. 2004; Pappas 2006; Magill y col. 2014; Cleveland y col. 2015).

Las especies de *Candida* son levaduras comensales que forman parte de la microbiota cutánea e intestinal normal del ser humano y se encuentran en el 60 % de los individuos sanos (Wisplinghoff y col. 2004; Pappas 2006; Kullberg y col. 2015; Pappas y col. 2018). La enfermedad invasora suele ser consecuencia de un aumento de la colonización o una anomalía de la misma. Cuando se producen brechas en las barreras físicas, por ejemplo, después de una cirugía gastrointestinal, *Candida* puede diseminar e invadir el torrente

sanguíneo causando candidemia. En condiciones normales, raramente se produce un proceso infeccioso grave, pero cuando el huésped presenta factores de riesgo concretos, la candidemia puede ser letal. Algunos de estos factores de riesgo incluyen el uso prolongado de antibióticos de amplio espectro, largos periodos de hospitalización, alteración de la integridad intestinal, cirugía abdominal con transfección intestinal, cateterización, nutrición parenteral total, desnutrición extrema, terapias inmunosupresoras, neutropenia, trasplantes de órgano o médula ósea, infección por VIH con recuentos bajos de CD4+, insuficiencia renal con hemodiálisis, diabetes mellitus o quemaduras graves (**Tabla 1**).

La candidiasis no presenta una clínica específica, sino que es un trastorno con innumerables manifestaciones, que pueden afectar a cualquier tejido (Pappas y col. 2018) tal como tejido urinario, pulmonar, nervioso, óseo o causar endocarditis, pericarditis o peritonitis entre otras manifestaciones clínicas. La candidemia es la manifestación clínica más común (**Figura 1**) (Dignani y col. 1998; Pappas y col. 2018).

Tabla 1. Factores de riesgo asociados a candidiasis invasora (Pappas y col. 2018).

Factores de riesgo generales:	
Intrínsecos	Colonización por <i>Candida</i> spp., diabetes mellitus, perforación gastrointestinal, edad elevada, pancreatitis, sepsis, enfermedad severa.
Iatrogénicos	Cualquier tipo de diálisis (especialmente hemodiálisis), antibióticos de amplio espectro, catéter venoso central, corticoides u otros inmunodepresores, cirugía gastrointestinal, u otros tipos de cirugía mayor, dispositivo de asistencia ventricular izquierda, largas hospitalizaciones o en la unidad de curas intensivas (UCI), ventilación mecánica y nutrición parenteral total.
Factores de riesgo adicionales en pacientes inmunocomprometidos:	
Intrínsecos	Mucositis y neutropenia profunda (recuento de neutrófilos absoluto <500 células/mm ³).
Iatrogénicos	Trasplante de órgano sólido y trasplante de células madre.

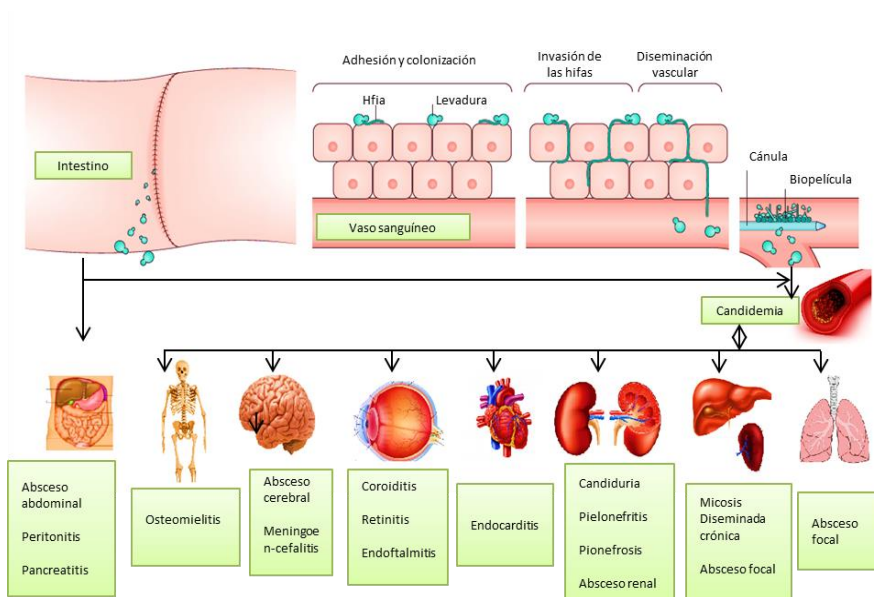


Figura 1. Patogénesis de la candidiasis invasora.

(Imagen modificada de Pappas y col. 2018)

Existe una gran dificultad a la hora de diagnosticar esta infección. Es por ello, que gran parte de las investigaciones se centran en el estudio de las infecciones acompañadas de candidemia (Quindós 2014). Se desconoce con exactitud la incidencia mundial de candidiasis invasora, ya que sólo algunos países llevan a cabo una vigilancia exhaustiva de dicha infección, pero los datos disponibles apuntan que la incidencia varía según la zona geográfica. En los Estados Unidos, Canadá, Australia, y Europa la incidencia de candidiasis se ha mantenido o disminuido por los avances en estrategias terapéuticas y métodos de diagnóstico, aunque sigue siendo más elevada en EEUU que en el resto de zonas mencionadas (Pfaller y col. 2012; Quindós 2014; Rajendran y col. 2016).

La tasa de mortalidad de los pacientes con candidiasis invasora se encuentra entre el 10 y el 47 % de los casos, aumentando el riesgo con la edad del paciente y dependiendo de la enfermedad base (Kullberg y col. 2015; McCarty y col. 2016; Strollo y col. 2016). El diagnóstico precoz y el rápido inicio de la terapia antifúngica apropiada son imprescindibles para el manejo exitoso de la candidemia y la candidiasis invasora.

La elección de una terapia antifúngica adecuada es uno de los mayores retos debido a diferencias en la susceptibilidad antifúngica que presentan las especies patógenas. Si bien existen guías terapéuticas para el manejo de la candidiasis invasora por *C. albicans*, la emergencia de infecciones diseminadas por especies no-*albicans* ha evolucionado más rápidamente que el desarrollo de guías terapéuticas especie-específicas, lo que sumado a los mecanismos de resistencia intrínsecos o adquiridos a los fármacos,

hace que las infecciones causadas por especies emergentes supongan un reto para la micología médica (Peman y col. 2012; Pfaller y Diekema 2012; Quindós 2014; Wisplinghoff y col. 2004; Pappas 2006; Kullberg y col. 2015; McCarty y col. 2016). Aunque *C. albicans* sigue siendo la especie más frecuente causante de candidiasis a nivel mundial (entre un 48-50 % de los casos), la proporción de infecciones causadas por NAC, tales como *C. glabrata*, *C. parapsilosis* o *C. tropicalis* y *C. krusei* ha aumentado, representando un 35-65 % de las candidiasis sistémicas según la zona geográfica (**Figura 2**).

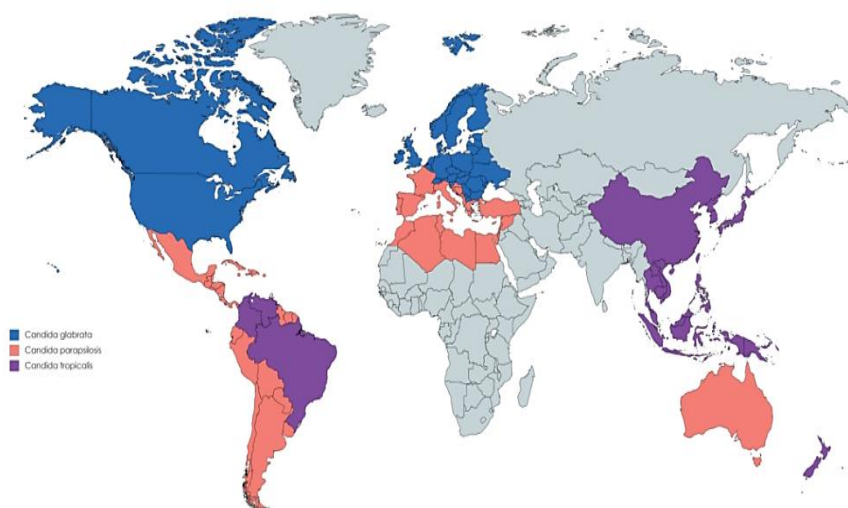


Figura 2. Mapa de la distribución mundial de *C. glabrata* (azul), *C. parapsilosis* (salmón) y *C. tropicalis* (morado).

Un ejemplo reciente de infección emergente por especies de *Candida no-albicans* es *Candida auris*. Dicha especie fue descrita en Japón en el 2009 y se ha convertido en una causa importante de infecciones nosocomiales, de propagación rápida y causante de una elevada mortalidad debido a su elevada resistencia a los fármacos antifúngicos. Diferentes estudios apuntan que esta especie es

resistente a fluconazol en el 93 % de los casos estudiados; a la anfotericina B en un 35 % y a las equinocandinas en un 7 % en brotes localizados en Asia (Japón, India y Pakistán), Reino Unido, España, Colombia, Venezuela, Panamá y Estados Unidos (Clancy y Nguyen 2017; Chowdhary y col. 2017; Lockhart y col. 2017).

2.1.1. *Candida albicans* y especies de *Candida non-albicans* (NCA)

Candida albicans

Candida albicans crece en forma de levadura, produciendo blastoconidios e hifas verdaderas o pseudohifas, estando el crecimiento de hifas favorecido por una temperatura superior a 33°C y pH neutro (Mayer y col. 2013). Este dimorfismo está considerado crucial en el proceso patogénico del hongo como han puesto de manifiesto recientes estudios en los que se atribuye la capacidad invasora a las formas filamentosas mientras que las levaduriformes estarían implicadas en la diseminación del microorganismo (Seman y col. 2018). Es un hongo diploide sin fase haploide conocida lo que lo diferencia de la mayoría de las levaduras (Butler y col. 2009). *C. albicans* sigue siendo el agente etiológico más frecuente de la candidiasis representando entre el 85-95 % de los aislamientos clínicos procedentes de mucosa y piel y el 45-70 % de los aislamientos procedentes de hemocultivos (Peman y col. 2012; Pfaller y col. 2012; Quindós 2014).

Candida glabrata

Candida glabrata presenta un crecimiento levaduriforme, con células ovales y a diferencia de otras especies patógenas, no es dimórfica. Es una especie haploide y más próxima filogenéticamente a *Saccharomyces* (Kurtzman y Robnett 1997; Lue 2010) (**Figura 3**) que el resto de especies patógenas de *Candida*. Forma parte de la microbiota habitual del hombre, siendo su reservorio principal la cavidad oral donde suele producir infecciones concomitantes junto con *C. albicans* (Lockhart y col. 1999). La colonización por esta especie aumenta con la edad (Li y col. 2007), siendo relativamente común su aislamiento en la cavidad oral de pacientes infectados con el VIH (Moran y col. 2012). Es la segunda especie más común en pacientes diabéticos después de *C. albicans* (Kadir y col. 2002).

Es considerada un patógeno emergente y diversos estudios realizados en diferentes partes del mundo han corroborado este hecho con una incidencia de entre un 14 % y un 17 % (Diekema y col. 2002; Cuenca-Estrella y col. 2003; Chakrabarti y col. 2009; Lee y col. 2009; Leroy y col. 2009). La emergencia de esta especie se ha relacionado con el uso profiláctico de fluconazol, ya que este hongo presenta una sensibilidad reducida a este agente y una alta capacidad de adquirir resistencia cruzada a otros azoles tras la exposición a dicho antifúngico (vanden Bossche y col. 1992; Khan y col. 2008; Lee y col. 2009). (Healey y col. 2016). Es el segundo agente etiológico más frecuente tras *C. albicans* en países de Europa central y nórdicos, y en EEUU (Quindós 2014).

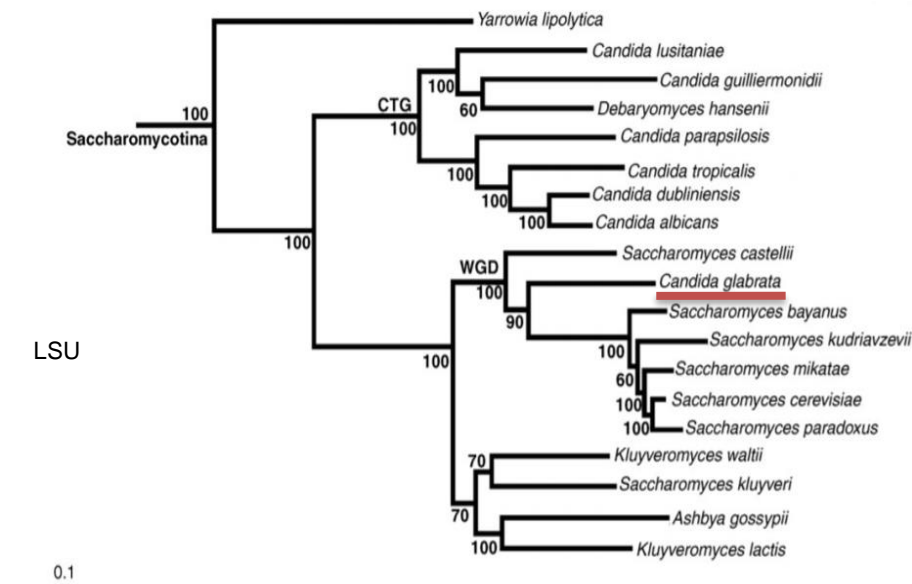


Figura 3. Árbol filogenético de *Candida* y *Saccharomyces*.

El clado CTG incluye la mayoría de especies de *Candida* patógenas. LSU: Large subunit ribosomal ribonucleic acid. (Imagen modificada de Lue 2010)

Candida parapsilosis

Candida parapsilosis crece de forma levaduriforme y tiene la capacidad de formar pseudohifas. Es un organismo diploide (Butler y col. 2009), que se encuentra frecuentemente en las uñas y piel de los pacientes y el personal sanitario. El principal interés clínico de esta especie radica en su elevada presencia en el ambiente hospitalario, especialmente en instrumental médico, como pueden ser catéteres intravasculares, líneas de nutrición parenteral o de dispositivos prostéticos, algo que también se ha observado recientemente en *Candida auris* (Trofa y col. 2008; van Asbeck y col. 2008).

C. parapsilosis es considerado un patógeno emergente importante (Trofa y col. 2008) y su presencia está relacionada frecuentemente con infecciones nosocomiales, especialmente en las

unidades de cuidados intensivos (UCI), neonatos y pacientes con nutrición parenteral (Levin y col. 1998; Cano y col. 2005; van Asbeck y col. 2008). Esta especie es menos virulenta que *C. albicans*, posiblemente por la menor capacidad de adhesión tisular que presenta (van Asbeck y col. 2008), aunque es capaz de adherirse fácilmente a material médico formando biopelículas, especialmente en condiciones con niveles altos de glucosa. Ello explicaría el alto número de aislados en pacientes que reciben nutrición parenteral (Nosek y col. 2009).

C. parapsilosis presenta sensibilidad reducida a las equinocandinas asociada a una mutación en la proteína Fks1p (García-Effron y col. 2008; Perlin 2015). Además el uso generalizado de azoles como tratamiento de la candidiasis producida por esta especie ha conllevado un aumento de aislados resistentes a esta familia de antifúngicos (Whaley y col. 2017). La incidencia de esta especie es significativamente elevada en Australia, América Latina y en países de la zona Mediterránea (Quindós 2014).

Candida tropicalis

Candida tropicalis es un organismo diploide, capaz de producir pseudohifas (Diezmann y col. 2004). Esta especie también pertenece a la microbiota humana, y suele producir infecciones invasoras en pacientes con enfermedades graves de base, como enfermos oncológicos (Wingard 1995; Leung y col. 2002; Kofteridis y col. 2008; Richardson y Lass-Flörl 2008), que suelen presentar elevadas tasas de mortalidad (Viscoli y col. 1999), al ser una de las especies más virulentas del género. La fuente de infección suele ser endógena, principalmente del tracto gastrointestinal, aunque también se han

descrito casos de origen nosocomial (Richardson y col. 2008). En algunas ocasiones esta especie se asocia a candidiasis orofaríngea siendo de las especies más virulentas del género que causan dicha enfermedad (Walsh y Merz 1986). Como en las dos especies anteriormente mencionadas, en *C. tropicalis* también se ha documentado un aumento de aislados resistentes a los azoles por el uso generalizado de estos antifúngicos (Whaley y col. 2017). *C. tropicalis* es más prevalente en países del Pacífico Asiático, de Venezuela y Colombia, tras *C. albicans* (Quindós 2014).

2.2. Fármacos antifúngicos y tratamiento de la candidiasis

Los fármacos antifúngicos son compuestos capaces de alterar las estructuras de la célula fúngica reduciendo su viabilidad o inhibiendo su proliferación lo que facilita la eliminación del microorganismo por los sistemas de defensa del huésped (Odds y col. 2003). La disponibilidad de estos agentes, a diferencia de la de los antimicrobianos, es escasa, debido a que muchas dianas terapéuticas son compartidas con la célula animal, dando lugar a fenómenos tóxicos y la aparición de efectos secundarios en el ser humano (Lattif y Swindell 2010). Los compuestos antifúngicos se pueden clasificar teniendo en cuenta su estructura química, su naturaleza (natural o de síntesis química), su espectro (reducido o amplio), o su mecanismo de acción. Según su mecanismo de acción los fármacos para el tratamiento de micosis invasoras se engloban en 4 familias: **Equinocandinas**, que actúan inhibiendo la síntesis del 1,3 β -D-glucano, un componente estructural de la pared fúngica; los **polienos**, que se unen al ergosterol de membrana produciendo poros y la ruptura de las membranas fúngicas;

los **azoles**, que inhibien la síntesis del ergosterol y el **análogo de base 5-fluorocitosina**, que actúa alterando la síntesis de ARN e interfiriendo la replicación de ADN (**Figura 4**) (Reales-Calderon y col. 2016).

El tratamiento antifúngico se establece según criterios farmacológicos (biodisponibilidad, administración, interacción con otros fármacos, toxicidad y metabolismo del mismo), microbiológicos (etiología, y antifungigrama) y propios del paciente tales como su estado inmunitario, la localización de la infección o la presencia de otros factores de riesgo o enfermedades de base (Georgopapadaku y Walsh 1996; Reales-Calderon y col. 2016). En el caso de la candidiasis invasora, los polienos, equinocandinas y azoles conforman los compuestos de elección.

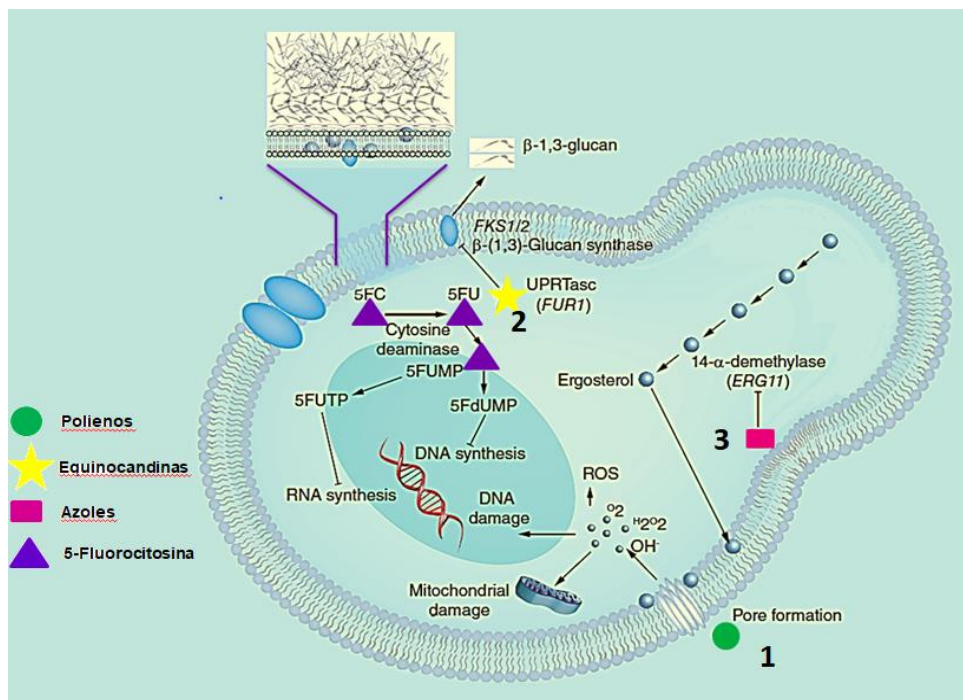


Figura 4. Mecanismos de acción de los antifúngicos.

(1) Los polienos forman poros al unirse al ergosterol de la membrana, y a su vez dañan las mitocondrias aumentando así el estrés oxidativo. (2) Las equinocandinas inhiben el enzima 1,3-β-D-glucano sintetasa de manera irreversible y no competitiva, y como resultado de ello la célula fúngica pierde la integridad de la pared. (3) Los azoles inhiben la síntesis del ergosterol, actuando sobre el enzima Erg11. (4) Los productos de degradación de la 5-fluorocitosina interrumpen la síntesis de ADN y ARN (Imagen Modificada de Reales-Calderon y col. 2016).

2.2.1. Polienos

Los polienos son compuestos producidos por actinomicetos del género *Streptomyces* siendo de los primeros antifúngicos de uso clínico. Poseen efecto fungistático o fungicida según la concentración y la sensibilidad del hongo. Su mecanismo de acción reside en la unión directa al ergosterol y la inducción de poros en la membrana, lo que conlleva a una pérdida del contenido citoplasmático y a una pérdida de la permeabilidad de la membrana (Gray y col. 2012). Se conocen más

de 100 compuestos pertenecientes a este grupo, pero los más utilizados en clínica humana son la nistatina y la anfotericina B (Dismukes 2000).

La **nistatina** es el compuesto poliénico de amplio espectro más utilizado de forma tópica, es el fármaco de primera línea para el tratamiento de candidiasis orales y una alternativa al tratamiento primario de la vulvovaginitis candidiásica, en combinación con azoles, sobre frente a especies poco sensibles a azoles (Patil y col. 2015).

La **anfotericina B** (ANB) se ha utilizado extensamente en el tratamiento de la candidiasis oral, pero hoy en día las preparaciones de uso tópico están prácticamente obsoletas y su principal vía de administración, es la intravenosa para combatir infecciones fúngicas profundas o diseminadas. La anfotericina B deoxicolato administrada intravenosamente está asociada a una elevada nefrotoxicidad que a menudo y durante tratamientos prolongados, obliga a su interrupción. Por ello se han desarrollado formulaciones lipídicas como la anfotericina B liposomal (LANB, AMBISOME®), anfotericina B en dispersión coloidal (ABDC, AMPHOTEC®) o anfotericina B en complejo lipídico (ABCL, ABELCET®) (Azanza y col. 2015), que permiten la administración de dosis más elevadas que la formulación deoxicolato, con menos efectos tóxicos (Laniado-Laborin y Cabrales-Vargas 2009). El uso de ANB en el tratamiento de candidiasis a pasado a ser de segunda línea por la nefrotoxicidad provocada por este antifúngico (Ben-Ami 2018). Sigue siendo de referencia para el tratamiento de micosis invasoras siendo su formulación liposomal el fármaco de elección para el tratamiento aspergilosis y criptococosis, también de la

fusariosis, escedosporiosis y mucormicosis (Laniado-Laborin y col. 2009; Garcia-Ruiz y col. 2013).

2.2.2. Equinocandinas

Las equinocandinas son lipopéptidos semisintéticos, sintetizados químicamente a partir de derivados producidos por el ascomiceto *Glarea lazayensis* y son los agentes antifúngicos comercializados más recientes, utilizándose como monoterapia o en combinación para el tratamiento de micosis invasoras. En su estructura presentan un hexapéptido cíclico y una cadena lipídica como núcleo (Denning 2003). Actúan inhibiendo la enzima encargada de la síntesis del 1,3- β -D-glucano (1,3- β -D-glucano sintetasa), de forma no competitiva e irreversible. El 1,3- β -D-glucano se encuentra en la pared de la célula fúngica aportando rigidez y estructura junto a la quitina (Cleary 2009; Sucher y col. 2009) con lo que esta inhibición provoca inestabilidad osmótica, afectando así el crecimiento y reproducción de la célula fúngica. Dado que la 1,3- β -D-glucano sintetasa no se encuentra en células animales, el uso de equinocandinas se caracteriza por tener baja toxicidad, escasos efectos adversos y poca interacción con otros fármacos antifúngicos debido a su baja metabolización por los enzimas del sistema CYP450 (Cleary 2009). Además, presentan una buena actividad fungicida frente a la mayoría de especies de *Candida*, por lo que son ampliamente utilizadas como tratamiento y profilaxis de elección para prevenir candidiasis invasoras en pacientes críticos, inmunocomprometidos o sometidos a tratamientos que puedan interaccionar con otros antifúngicos (Chaturvedi y col. 2011; Antinori y col. 2016; Ben-Ami 2018). Deben utilizarse por vía parenteral ya que

no existen formulaciones orales, al no ser absorbidas por dicha vía (Chaturvedi y col. 2011).

En este grupo de antifúngicos se incluyen la anidulafungina, la caspofungina y la micafungina (**Figura 5**), que aunque poseen similar espectro de actividad difieren en su uso clínico.

La **anidulafungina** está indicada para el tratamiento de pacientes que presentan candidiasis invasora con o sin neutropenia y también para la candidiasis esofágica (Chen y col. 2011).

La **caspofungina** se administra para el tratamiento de candidiasis invasora así como orofaríngeas y esofágicas refractarias a otros tratamientos antifúngicos (Barchiesi y col. 2007).

Así como la **micafungina**, que además es útil para el tratamiento de todas las formas clínicas de candidiasis invasora

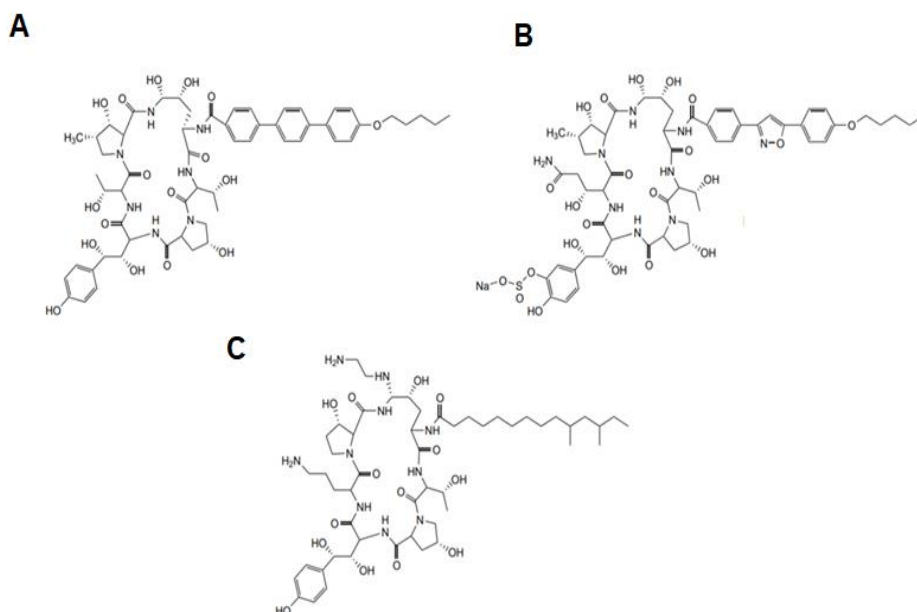


Figura 5. Estructura química de la anidulafungina (A), micafungina (B) y caspofungina (C).

2.2.3. Azoles

Los azoles constituyen el grupo de antifúngicos más utilizados para el tratamiento de micosis dado su buen espectro de acción y la disponibilidad de formulaciones para su administración oral. Son compuestos sintéticos heterocíclicos formados por un anillo azólico de 5 átomos (imidazoles) al cual se unen dos átomos de nitrógeno, (como por ejemplo; ketoconazol, clotrimazol, miconazol y setaconazol) o tres átomos de nitrógeno (triazoles) (como por ejemplo; fluconazol, itraconazol, voriconazol, isavuconazol, posaconazol) (Carrillo-Muñoz y col. 2015). Estos fármacos actúan a nivel de la síntesis del ergosterol (**Figura 6**) mediante el bloqueo de la enzima 14- α -desmetilasa del lanosterol, codificada por el gen *ERG11* (Chau y col. 2004; Pappas y

col. 2018). La inhibición de dicha enzima sucede por la unión de un átomo de nitrógeno del compuesto azólico a un átomo de hierro del grupo hemo de la proteína, lo que comporta una importante reducción en el contenido celular de ergosterol con la subsecuente pérdida de integridad de la membrana que a su vez afecta a su permeabilidad y fluidez. Además, el acúmulo de sustancias intermediarias tiene un efecto tóxico en la célula fúngica (Marichal y col. 1999).

El uso de imidazoles está restringido a su uso tópico frente a candidiasis superficiales, especialmente la vulvovaginitis, como en el caso del cotrimazol, (Wachtler y col. 2011) con un 85 % de éxito (Sobel y col. 1998). En cambio los triazoles al ser moléculas más estables con un mayor espectro de acción y presentar una menor toxicidad que los imidazoles, son utilizados en el tratamiento de candidiasis invasoras (Antinori y col. 2016; Ben-Ami 2018). Los principales triazoles de uso clínico incluyen el fluconazol, voriconazol, itraconazol, posaconazol e isavuconazol.

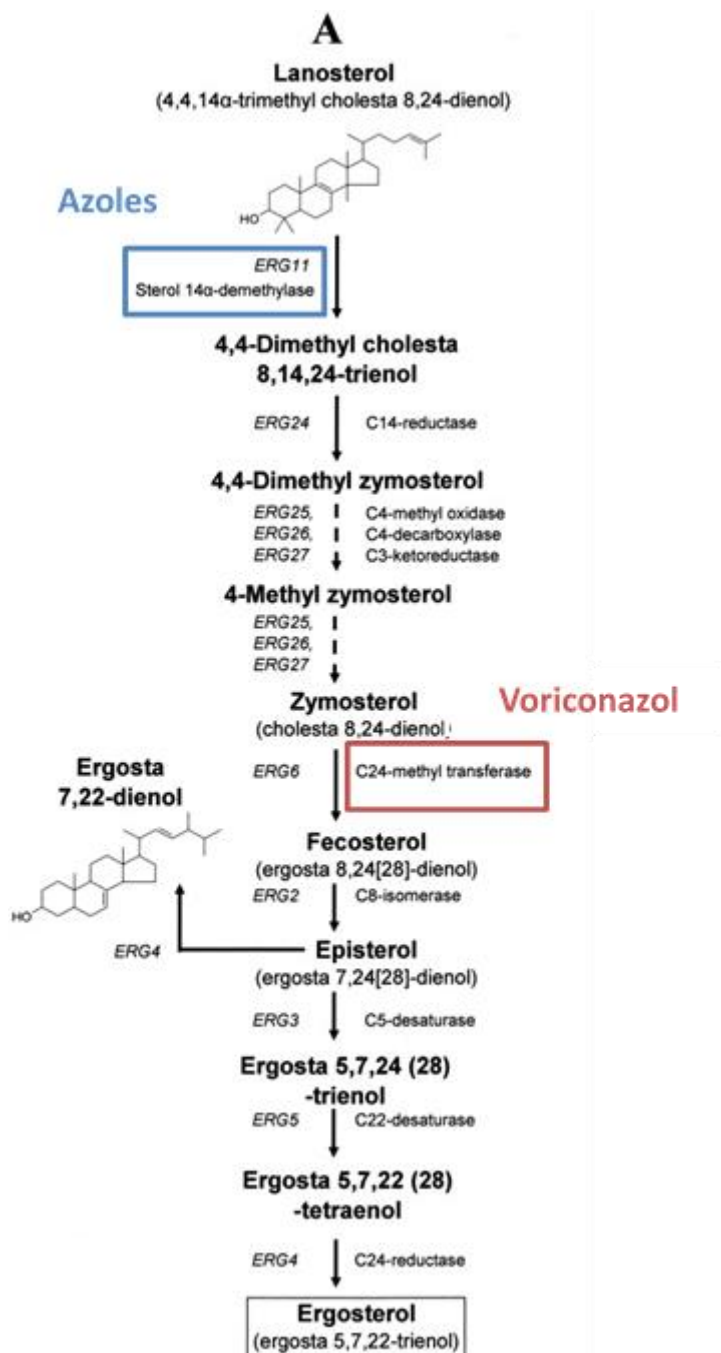


Figura 6. Ruta de biosíntesis del ergosterol.

La diana de los azoles se encuentra especificada en un cuadro azul, otra diana del voriconazol, se encuentra especificada en un cuadro naranja (Imagen modificada de Hull y col. 2012).

El **fluconazol** es un triazol fluorado de segunda generación (**Figura 7**) que al presentar una alta biodisponibilidad y una baja toxicidad, lo convierte en uno de los fármacos más utilizados para el tratamiento de las micosis (Samaranayake 1997). Se puede administrar tanto de forma intravenosa como de forma oral, ya que presenta una elevada absorción y no se ve afectado por el pH ácido del estómago (Brammer y col. 1990). Presenta actividad fungistática frente a casi todos los hongos, y un amplio espectro de acción. Tiene una vida media de 27-37 h y se distribuye por todos los órganos y tejidos del organismo (Wingard y Leather 2004). Este antifúngico es el tratamiento de elección en candidiasis de la piel y de las mucosas, y en candidiasis invasoras padecidas por pacientes no neutropénicos. Además, por su fácil administración y baja toxicidad, se utiliza como tratamiento profiláctico en aquellos pacientes con alto riesgo de padecer candidiasis invasora (Antinori y col. 2016; Ben-Ami 2018). *C. glabrata* presenta una menor sensibilidad a dicho antifúngico, mientras que *C. krusei* presenta resistencia intrínseca (Samaranayake 1997).

El **voriconazol** es un triazol de segunda generación, derivado del fluconazol (**Figura 7**). Este antifúngico, además de la 14- α -desmetilasa del lanosterol inhibe también la 24-metileno dihidrolanosterol demetilasa (**Figura 6**), enzima presente en la ruta biosintética del ergosterol, localizada en pasos posteriores a la 14- α -desmetilasa del lanosterol. Es de amplio espectro y presenta una gran biodisponibilidad y biodistribución además de una relativa baja toxicidad. Ello permite su administración tanto por vía oral como por vía intravenosa. Presenta buena actividad *in vitro* frente a aquellas candidas resistentes al

fluconazol, como *C. krusei* y *C. glabrata* (Valgus 2003; Theuretzbacher y col. 2006) y por ello que se utiliza para el tratamiento de candidiasis vulvovaginales producidas por *C. glabrata* (Danby y col. 2012). Aunque hay que tener en cuenta que esto no siempre se cumple, ya que se ha observado resistencia cruzada de fluconazol y voriconazol (Lyon y col. 2010).

El **itraconazol** es un agente triazólico de primera generación altamente lipofílico (**Figura 7**) que puede ser administrado tanto de forma oral como por vía intravenosa. Constituye una buena alternativa para el tratamiento de cepas resistentes a fluconazol (White 1997). Es muy útil en el tratamiento de la vulvovaginitis, junto con el ketoconazol y el clotrimazol, y frente a cepas con baja sensibilidad a fluconazol; aunque pueden presentar resistencia cruzada. Se utiliza tanto en episodios esporádicos como en vulvovaginitis recidivantes (Sobel 2016).

El **posaconazol** Es un triazol lipofílico de segunda generación, con una estructura similar al itraconazol (**Figura 7**). Tiene una actividad *in vitro* y un espectro de acción parecido al resto de azoles, siendo activo tanto frente a levaduras como hongos filamentosos (Valgus 2003). Únicamente existe en formulaciones orales por lo que se recomienda acompañar con la ingesta para mejorar su absorción. Se utiliza, como el voriconazol, en la vulvovaginitis causada por *C. glabrata* (Danby y col. 2012) y en el tratamiento de candidiasis orofaríngea e invasora asociada a neutropenia (Pappas y col. 2016).

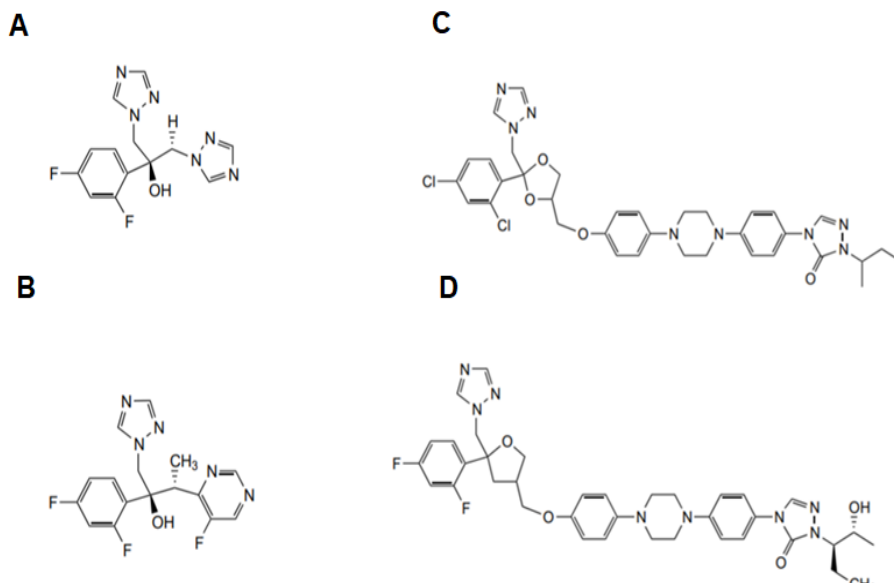


Figura 7. Estructura química de fluconazol (A), voriconazol (B), itraconazol (C) y posaconazol (D).

2.2.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y puntos de corte clínico

La determinación de la sensibilidad *in vitro* de un determinado patógeno frente a los fármacos disponibles constituye un ensayo fundamental para la elección clínica de la terapia antimicótica. Actualmente se dispone de varios métodos de referencia estandarizados para la determinación *in vitro* de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMIs) de compuestos antifúngicos, tanto contra hongos levaduriformes como hongos filamentosos. Estos métodos de referencia han sido desarrollados y son actualizados regularmente por el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) en Estados Unidos y el European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST)

perteneciente a la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas (ESCMID). Si bien el método basado en microdilución es el más utilizado en investigación y laboratorios de referencia, la técnica es laboriosa para su utilización en el laboratorio clínico. Por ello el CLSI ha desarrollado además métodos de disco difusión en agar para levaduras (documento M44-A2) (Clinical and Laboratory Standards Institute 2009a) y para hongos filamentosos (documento M51-A) (Clinical and Laboratory Standards Institute 2010) que facilita la la ejecución, lectura e interpretación de los resultados. Además, existen métodos comercializados basados en el método de microdilución tales como YeastOne (Trek Diagnostics Systems, EE. UU), Vitek-2 y ATB Fungus (Biomerieux, Francia) y métodos basados en difusión en agar como E-test (Biomerieux, Francia) y Neo Sensitabs (Rosco, Dinamarca).

La determinación de CMI sirve de orientación sobre el grado de sensibilidad de una cepa fúngica a un compuesto dado, siendo el valor de CMI bajo no necesariamente señal de éxito terapéutico. En los últimos años, la comunidad científica ha invertido numerosos esfuerzos en correlacionar los valores de CMI obtenidos *in vitro* con el éxito o fracaso terapéutico (Fothergill y col. 2014). Como fruto de dicho esfuerzo, se han establecido puntos de corte clínico (PCCs) que permiten clasificar a los aislados en sensibles, resistentes, o de sensibilidad intermedia. Los PCC se basan en la regla 60 – 90, la cual indica que infecciones debidas a aislados sensibles responden a la terapia antifúngica el 90 % de los casos, y que infecciones debidas a aislados resistentes responden al tratamiento alrededor de un 60 % de las veces (Rex y Pfaller 2002; Espinel-Ingroff y col. 2014; Espinel-

Introducción

Ingroff y Turnidge 2016). Actualmente, tanto CLSI como EUCAST han establecido los PCCs de los compuestos antifúngicos frente a las especies más frecuentes y, por lo tanto, de las que más experiencia clínica existe i.e., *Aspergillus* spp y *Candida* spp. Sin embargo, los PCCs no se han establecido frente a otras especies y géneros debido a la falta de datos clínicos. Ante esta falta de PCCs, se han establecido los denominados puntos de corte epidemiológicos (PCEs). El PCE se basa en el estudio *in vitro* de la distribución de CMI_s de un fármaco para una especie dada y si esta presenta mecanismos de resistencia conocidos o no. Los PCE permiten diferenciar a las cepas en población salvaje (WT, *wild type*) y no salvaje (NWT no-*wild type*), de forma que únicamente establecen que las poblaciones NWT pueden poseer mutaciones que confieren resistencia y por tanto puede conllevar fracaso terapéutico (**Tabla 2**) (Espinel-Ingroff y col. 2014; Espinel-Ingroff y col. 2016).

Tabla 2. Diferencias y similitudes entre PCE y PCC (Espinel-Ingroff y col. 2016).

PCC	PCE
Requiere conocer la distribución de las CMIs, datos farmacocinéticos / farmacodinámicos, y datos clínicos resultantes del tratamiento	Requiere conocer la distribución de las CMIs
Puede ser utilizado para predecir el éxito clínico.	No es útil para predecir el éxito clínico
Puede usarse para identificar aislamientos que pueden albergar mutaciones	Puede usarse para identificar aislamientos que pueden albergar mutaciones
Extremadamente difíciles de generar, ya que la correlación entre CMIs y éxito terapéutico requiere de gran cantidad de casos clínicos bien documentados.	Se pueden generar para cualquier especie siempre que existan suficientes aislados de ésta

Si bien, el tratamiento a establecer frente a una infección micótica debe basarse en los resultados del antifungigrama, existen otros factores que pueden influir en el éxito o fracaso de un tratamiento antifúngico y que deben ser considerados a la hora de elegir una terapia como son la farmacocinética y biodistribución del fármaco, enfermedad de base de los pacientes, estado inmunitario o localización de la infección, entre otros.

Los PCC o PCE establecidos para *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. tropicalis* frente a los diferentes compuestos antifúngicos se detallan en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Puntos de corte clínico (**negrita**) y puntos de corte epidemiológicos (*itálica*) establecidos para *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* frente a diferentes antifúngicos de uso clínico expresados en µg/mL, basado en las metodologías establecidas por el CLSI y el EUCAST.

Antifúngico	<i>C. glabrata</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>C. parapsilosis</i>	
	CLSI	EUCAST	CLSI	EUCAST	CLSI	EUCAST
Anfotericina B	> 2	>1	> 2	>1	> 2	>1
5-fluorocitosina	> 0,5	-	> 0,5	-	> 0,5	-
Fluconazol	≥ 64	>32	≥ 8	> 4	≥ 8	> 4
Voriconazol	>1	<i>EI</i>	≥ 1	> 0.25	≥ 1	< 0,25
Posaconazol	>1	<i>EI</i>	> 0,12	> 0.06	> 0,25	> 0.06
Itraconazol	>2	> 0,06	> 0,5	> 0.12	> 0,5	> 0,12
Anidulafungina	≥ 0,5	> 0,06	≥ 1	>4	≥ 8	> 0.06
Caspofungina	≥ 0,5	^a	≥ 1	^a	≥ 8	^a
Micafungina	≥ 0,25	> 0,03	≥ 1	> 0,25	≥ 8	> 0,25

EI: Evidencia insuficiente para establecer PCC, no se dispone de PCE. ^a Los aislados que son sensibles a anidulafungina y a micafungina deben considerarse susceptibles a caspofungina. – Indica que no se recomiendan llevar a cabo pruebas de susceptibilidad por el poco éxito del antifúngico. Los aislamientos pueden reportarse como resistentes sin pruebas previas.

2.3. Resistencia a agentes antifúngicos

La evaluación del fracaso terapéutico en infecciones micóticas graves puede ser complejo y difícil de identificar. Puede ser debido a factores que dependen tanto del microorganismo infectante, como de factores propios del paciente. Entre las principales causas del fallo terapéutico cabe destacar la dificultad en el diagnóstico y la resistencia a fármacos, aunque la enfermedad de base de los pacientes puede ser un factor decisivo en la resolución de la enfermedad. El

comportamiento y la higiene del personal sanitario también son un importante punto que puede afectar al éxito o fracaso terapéutico (Ture y Alp 2018).

Con la aparición de métodos no basados en los cultivos clásicos, como la amplificación de ácidos nucleicos (secuenciación de genes ribosomales 18S o 28S o de las regiones no codificantes ITS1 y ITS2) (Perlin 2009), inmunoensayos enzimáticos para detectar mananos circulantes, sistemas enzimáticos para la detección de 1,3- β -D-glucano, y MALDI-TOF (Yaman y col. 2012) se ha mejorado la fiabilidad en el diagnóstico de la candidiasis invasora y la rapidez del mismo, siendo ambos parámetros críticos en la elección de un tratamiento exitoso, (McCarthy y Walsh 2017; Walsh y col. 2019). Sin embargo, actualmente existe una gran emergencia en el número de aislados resistentes a los antifúngicos que limita las pocas opciones terapéuticas, siendo una de las principales causas del fracaso. La resistencia a los antifúngicos, puede ser debida a la aparición de resistencia clínica y microbiológica (Arendrup y Patterson 2017). En la resistencia de origen clínico el microorganismo presentará una determinada sensibilidad, frente a un antifúngico *in vitro*, no considerada resistente, pero a pesar de la administración de dicho agente como tratamiento, no se podrá inhibir su crecimiento en el huésped. En cambio, la resistencia microbiológica se debe a factores propios del microorganismo, es decir este podrá crecer a concentraciones más altas del antifúngico *in vitro*, que los aislados que son considerados sensibles.

La resistencia a los antifúngicos puede ser intrínseca (primaria) o adquirida (secundaria). En la primera todos los aislamientos de una

misma especie fúngica son resistentes a un determinado antifúngico sin que haya habido una previa exposición del microorganismo al agente, este sería el caso de *C. krusei* con respecto a fluconazol. Por otro lado, la resistencia adquirida, es la que se da en aislados inicialmente sensibles a un agente antifúngico, que tras la exposición al mismo ha visto disminuida su sensibilidad debido al desarrollo de mecanismos moleculares o celulares de resistencia. La resistencia antifúngica puede implicar la disminución de la sensibilidad a varias familias de antifúngicos (resistencia múltiple) o a diferentes compuestos antifúngicos de una misma familia (resistencia cruzada) (Wisplinghoff y col. 2004; Pfaller 2012; Arendrup y col. 2017).

Se han descrito tres mecanismos principales responsables de resistencia a las diferentes familias antifúngicas: (i) **Expresión de bombas de eyección** (ii) **modificación en la ruta biosintética** de las dianas de los antifúngicos o la presencia de rutas alternativas y (iii) **alteraciones de la diana** del agente antifúngico, por sobreproducción, cambios estructurales o supresión de la misma (**Figura 8**).

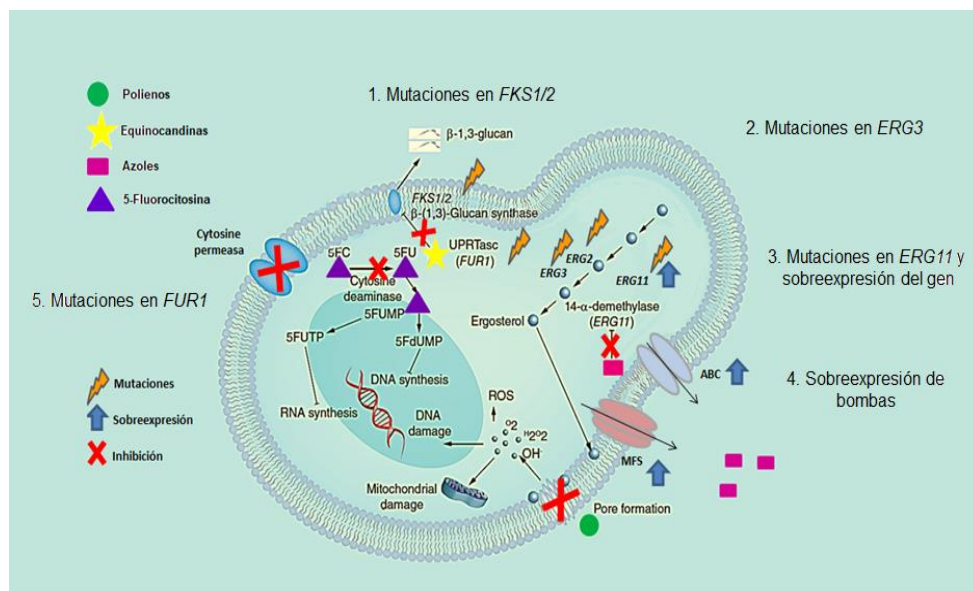


Figura 8. Mecanismos de resistencia a los principales compuestos antifúngicos.

(1) Mutaciones en *FKS1* y *FKS2*, que codifican las subunidades catalíticas del enzima 1,3-β-D-glucano sintetasa. (2) Mutaciones en el gen *ERG3* que conllevan resistencia a azoles y polienos. (3) Mutaciones en el gen *ERG11*, que codifica el enzima 14-α-desmetilasa del lanosterol y/o su sobreexpresión. (4) Sobreexpresión de bombas ABC (*ATP Binding cassette*-transportadores) y MF (*Major Facilitator*-facilitadores principales), por la expresión de los genes *CDR1*, *CDR2*, y *MDR1*, siendo este el mecanismo de resistencia a azoles más común en la célula fúngica. (5) Mutaciones en *FUR1* confieren resistencia a 5-fluorocitosina. (Imagen modificada de Reales-Calderon y col. 2016).

2.3.1. Mecanismos de resistencia a polienos

La resistencia a los polienos (nistatina y anfotericina B) es muy poco usual, a pesar de que estos antifúngicos han venido siendo utilizados durante décadas y de forma generalizada para el tratamiento de micosis tanto invasoras como superficiales. Por ello la importancia clínica de este tipo de resistencia no es alarmante. Sin embargo, cabe destacar que se han reportado casos esporádicos de cepas de *C. glabrata* resistentes a polienos.

En algunas especies de *Candida*, como *C. lipolytica* y *C. lusitanae* se han descrito resistencias primarias a la anfotericina B (Blinkhorn y col. 1989; Belet y col. 2006), y las cepas con resistencia adquirida a este antifúngico presentaban mutaciones puntuales en genes codificantes de la ruta de síntesis del ergosterol (*ERG2*, *ERG3*, *ERG5* o *ERG6*), produciéndose una pérdida de la función de dichos genes, que se traduce en la sustitución del ergosterol de la membrana de la célula fúngica por otro tipo de esteroides hacia los cuales los polienos no tienen afinidad (Vale-Silva y Sanglard 2015).

2.3.2. Mecanismos de resistencia a equinocandinas

La resistencia a las equinocandinas es relativamente baja (entre un 0,1 y un 3 % de los aislamientos de *Candida*), a pesar del amplio uso que se está llevando a cabo para el tratamiento de micosis producidas por dicho hongo en el ámbito clínico (Quindós y col. 2015). El principal mecanismo de resistencia descrito para este tipo de fármaco, se basa en la presencia de mutaciones puntuales en regiones conservadas (*hot spot*) del gen *FKS1* y sus parálogos *FKS2* y *FKS3*. Esto conlleva a una modificación de la diana de acción de las equinocandinas, ya que estos genes codifican el enzima 1,3- β -D-glucano sintetasa (Park y col. 2005). Las citadas mutaciones se encuentran principalmente en la región *hot spot 1*, aunque también en menor medida en las regiones *hot spot 2* y *3*, (Katiyar y col. 2012). Estas tres regiones se encuentran en la membrana plasmática, cercanas al dominio catalítico de la mencionada enzima (**Figura 9**) (Katiyar y Edlind 2015; Perlin 2015).

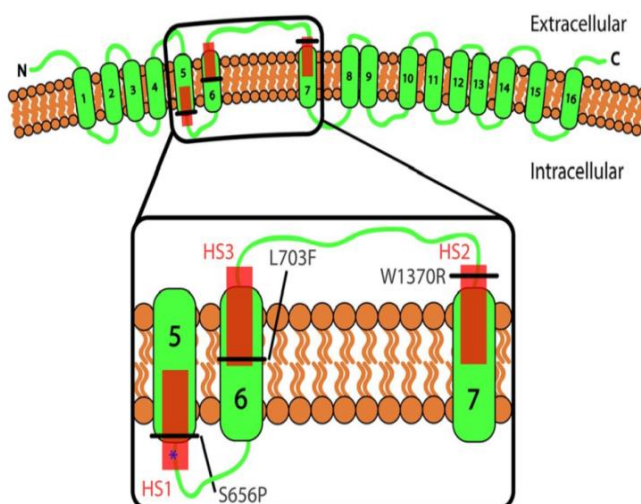


Figura 9. Zonas *hot spot* de la enzima Fks1 en la membrana de *C. albicans*.

(Imagen modificada de Papp y col. 2018)

En *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*, las mutaciones están asociadas al gen *FKS1* (Park y col. 2005; Garcia-Effron y col. 2008; Garcia-Effron y col. 2009; Katiyar y col. 2012; Lackner y col. 2014; Dudiuk y col. 2015; Papp y col. 2018), en cambio las mutaciones en el gen *FKS2* están relacionadas exclusivamente con resistencia en *C. glabrata* (Katiyar y col. 2012). Cabe destacar que la cantidad de aislados resistentes de esta última especie han aumentado drásticamente en los últimos años, probablemente debido a un incremento de las exposiciones a los citados fármacos (Alexander y col. 2013). Los aislados de *C. parapsilosis* y *C. guilliermondii* poseen una sensibilidad intermedia a las equinocandinas, por la sustitución de varios aminoácidos en la región *Hop spot* 1 del gen *FKS1* (Garcia-Effron y col. 2008; Dudiuk y col. 2017).

El 90 % de las mutaciones encontradas en *C. albicans* resistentes que confieren resistencia a las equinocandinas son: Fks1p-S641 y Fks1p-S645 (Perlin 2015) y en *C. glabrata* (88 % de los aislados

resistentes) son: Fks1p-F625, Fks1p-S629, Fks1p-D632, Fks2p-F659 y Fks2p-S663 (Dudiuk y col. 2014). La sensibilidad reducida que *C. parapsilosis* presenta frente a las equinocandinas ha sido asociada a una mutación en Fks1p en el aminoácido 660, donde una prolina sustituye a una alamina (P660A) (Garcia-Effron y col. 2008).

A continuación, se detallan los mecanismos de resistencia a los azoles en especies de *Candida no-albicans*, motivo de la investigación de la presente tesis doctoral.

2.3.3. Mecanismos de resistencia a azoles

Se ha demostrado la capacidad de *Candida* para desarrollar un alto nivel de resistencia a los azoles. La resistencia a azoles es la más común entre las especies del género *Candida* y repercute de manera relevante en clínica, ya que son los antifúngicos más utilizados para el tratamiento de las micosis. Además, algunas especies del género *Candida* tales como *C. glabrata* y *C. krusei* exhiben resistencia intrínseca a los azoles. Los principales mecanismos implicados en la resistencia a esta familia de antifúngicos incluyen mutaciones puntuales y sobreexpresión de genes *ERG* que codifican para la enzimas encargadas de la síntesis del ergosterol y sobreexpresión de los genes que codifican bombas de eyección encargadas del transporte de los azoles del interior al exterior celular (Whale y col. 2017).

Cada uno de los mecanismos involucrados en la resistencia a los azoles reportados hasta la fecha se detallan a continuación.

2.3.3.1. Mutaciones en *ERG3*

Uno de los primeros mecanismos de resistencia a los antifúngicos descritos fue la presencia de mutaciones en el gen. *ERG3*, que codifica para la enzima $\Delta 5,6$ esteroles desaturasa. Su inactivación previene la transformación de esteroides 14α metilados en metabolitos tóxicos (Whaley y col. 2017). Algunos aislados de *C. albicans* son resistentes a los azoles por la inactivación de la citada proteína (Morio y col. 2013), lo que conlleva a una pérdida del ergosterol y una acumulación de esteroides intermediarios de la ruta de biosíntesis del ergosterol, como el ergosta-7,22-dienol (Kelly y col. 1997; Miyazaki y col. 1999; Martel y col. 2010; Morio y col. 2010).

2.3.3.2. Mutaciones en *ERG11*

Las mutaciones en el gen *ERG11* constituyen un mecanismo de resistencia (Favre y col. 1999) ampliamente documentado en la literatura. Se han descrito más de 140 sustituciones nucleóticas no sinónimas en dicho gen en cepas de *C. albicans*, aunque solo algunas se han relacionado directamente con la resistencia a los azoles: A114S, F126L, G129A, Y132F, Y32H, K143R, T229A, Y257H, G3072, I315A, S405F, G448S, F449S, G464S, R467K, 1471T. (Kelly y col. 1997; Lamb y col. 1997; White 1997; Franz y col. 1998; Sanglard y col. 1998; Favre y col. 1999; Kelly y col. 1999; Kelly y col. 1999; Marichal y col. 1999; Kakeya y col. 2000; Perea y col. 2001). Los polimorfismos que confieren un cambio en la estructura aminoacídica de la proteína (14- α -desmetilasa del lanosterol), que codifica el gen *ERG11* conllevan a que la unión del azol se vea afectada. No obstante la actividad enzimática de Erg11p no se ve comprometida, por lo cual el organismo

Introducción

puede seguir sintetizando ergosterol a partir del lanosterol (Rogers y Barker 2012).

En especies de *Candida no-albicans* y hasta la redacción de la presente Tesis, se han descrito pocas mutaciones en *ERG11* que confieran resistencia a los azoles en comparación a *C. albicans*. En el caso de *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* una de las mutaciones la en *ERG11* que se ha asociado a resistencia a los azoles es la mutación Y132F (Tan y col. 2015; Silva y col. 2016). En *C. glabrata*, además, se han encontrado dos mutaciones que se han relacionado directamente con resistencia cruzada entre fluconazol y voriconazol (G236V y G315D) (Hull y col. 2012; Nabili y col. 2016).

En el gen *ERG11* se han identificado 3 regiones, denominadas *hot spot* i.e., *hot spot 1*, localizado en los aminoácidos 105 y 165; *hot spot 2*, del 266 al 287 y *hot spot 3* 405 al 488, en las que mutaciones puntuales que resultan en cambios aminoacídicos, dan lugar a resistencia (Marichal y col. 1999). No obstante, también se han encontrado mutaciones fuera de estas regiones que pueden proporcionar resistencia a azoles (Morio y col. 2010). El gen *ERG11* presenta una gran plasticidad genética por lo que la enzima que codifica suele presentar cambios en su estructura, sin pérdida de actividad. Es muy difícil poder determinar el papel que las mutaciones puntuales en el gen *ERG11* juegan en la resistencia a los antifúngicos, ya que estas mutaciones aparecen normalmente en combinación en el mismo alelo. Además, se ha observado que los aislados resistentes de *C. albicans* que pesentan mutaciones puntuales en el gen *ERG11*, también suelen presentar otros mecanismos de resistencia, como la sobreexpresión de dicho gen o de bombas de eyección (Rogers y col.

2012), lo que hace aún más difícil reconocer el impacto de dicha mutación en la aparición de resistencia.

2.3.3.3. Sobreexpresión de *ERG11*

La sobreexpresión del gen *ERG11* puede ser debida al hecho de que haya más de una copia del gen en el genoma del organismo, debido a una duplicación del cromosoma 5, que es donde se encuentra el gen *ERG11* de *Candida albicans* (Selmecki y col. 2006). Pero por otro lado la sobreexpresión de dicho gen está asociada, en algunos casos, con mutaciones con efecto de ganancia de función (*GOF-gain of function*) en el factor de transcripción *UPC2* (*Upc2- Uptake control 2*). La expresión de *ERG11* está regulada por el factor de transcripción *Upc2* (Flowers y col. 2012), que se une a elementos reguladores tipo *SER* (*sterol regulatory element*) del promotor de *ERG11* controlando la expresión de genes implicados en la ruta de la biosíntesis del ergosterol (Sanglard 2011b). *Upc2* activa la transcripción en ausencia de ergosterol, y cuando hay presencia de azoles en el medio. Cuando los niveles de ergosterol son normales, éste se encuentra unido a *Upc2* (en el extremo carboxilo terminal) y se reprime así su transcripción. En cambio, si los niveles de ergosterol disminuyen o hay ausencia de éste, *Upc2* migra al núcleo, y se une al promotor de *ERG11*, activando la transcripción de *ERG11* y dando así lugar a resistencia (Vik y Rine 2001; Yang y col. 2014).

En *C. albicans* se han descrito mutaciones en el extremo carboxilo de *Upc2*, lugar de unión al promotor *ERG11*, que da lugar a resistencia por activación consecutiva, es decir activación constante y permanente de *Upc2*. Se trata de mutaciones *GOF* de un único

nucleótido que conllevan un único cambio de aminoácido en la proteína. Algunas de las mutaciones descritas en *UPC2* son W378C, Y642F, A646V, G648S (Flowers y col. 2012), A643T (Hoot y col. 2011) y G648D (Dunkel y col. 2008). Cuando hay ausencia de antifúngico, esta ganancia de activación supone una desventaja ya que impone una carga metabólica para el organismo. Pero gracias a la aparición de nuevas mutaciones con efecto compensatorio este desajuste biológico parece que puede ser compensado aunque se desconocen los mecanismos precisos (Sasse y col. 2012).

2.3.3.4. Sobreexpresión de genes que codifican para bombas de eyección

Un mecanismo habitual de resistencia a azoles se basa en la activación de un sistema de bombas que expulsan el antifúngico al medio extracelular, evitando su acumulación en el interior celular. En *C. albicans* este es el mecanismo más habitual de resistencia a los azoles. Un 80 % de los aislados resistentes presentan sobreexpresión de genes relacionados con mecanismos de eyección, pero la mayoría además suelen poseer simultáneamente más de uno (Vale-Silva 2015). La sobreactivación de estas bombas puede dar lugar a la eyección de otros fármacos no relacionados estructuralmente o con diversos mecanismos de acción, lo que se conoce como resistencia múltiple (*MDR*, multidrug resistance) (Morschhauser 2010).

En la célula fúngica, de entre todas las familias de bombas eyectoras asociadas a la membrana plasmática que existen, dos han sido directamente relacionadas con la resistencia a los azoles: las

transportadores ABC (*ATP Binding Cassette*) y los transportadores de la familia MF (*Major Facilitators*)(Whaley y col. 2017) (**Figura 10**).

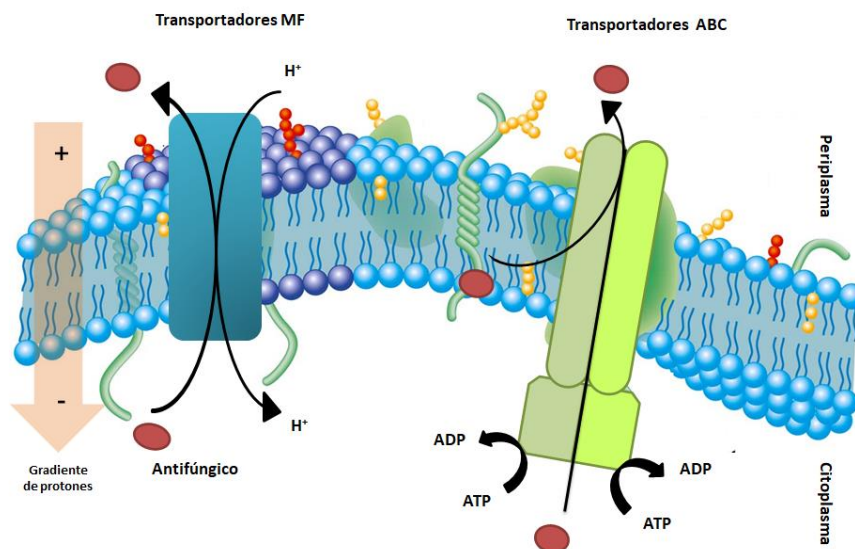


Figura 10. Esquema de las bombas de eyección MF y ABC en *C. albicans* y su disposición en la membrana plasmática.

La sobreactivación de dichas bombas viene dada por la sobreexpresión de los genes codificantes *CDR1*, *CDR2* o *MDR1* (White y col. 2002; Karababa y col. 2004; Kusch y col. 2004; Prasad y col. 2006) (**Figura 11**). Los transportadores tipo ABC utilizan el ATP como fuente de energía para poder llevar a cabo la expulsión activa de compuestos tóxicos al medio extracelular y los mejor caracterizados están codificados por los genes *CDR1*, *CDR2* (*Candida Drug Resistance*) y *SNQ2*, (Prasad y col. 1995; Sanglard y col. 1997; Sanguinetti y col. 2005; Yang y col. 2015; Fling y col. 1991) que llevan a cabo el transporte de varios compuestos azólicos (Vale-Silva 2015). Los transportadores de la familia MF, sin embargo, utilizan como fuente de energía el gradiente de protones de la membrana plasmática, y

están codificados por el gen *MDR1* (*Multidrug resistance*) (Prasad y col. 1995; Sanglard y col. 1997; Sanguinetti y col. 2005; Yang y col. 2015; Fling y col. 1991). Los transportadores Mdr1 transportan principalmente fluconazol al exterior celular (Fling y col. 1991; Vale-Silva 2015).

La sobreexpresión de las bombas de eyección puede ser transitoria, es decir sobreactivarse en presencia del fármaco, y tras la exposición volver a niveles normales; pero en ocasiones la sobreexpresión se da de forma consecutiva y se mantiene aún en ausencia del antifúngico. Este último fenómeno se debe a mutaciones GOF en los factores de transcripción de *CDR1* y *CDR2*, *Tac1-Transcriptional Activator of CDR1* (*Tac1*) y mutaciones en el factor de transcripción de *MDR1*, *Mrr1-Multidrug Resistance Regulator 1* (*Mrr1*) (Coste y col. 2004; Coste y col. 2006; Coste y col. 2007; Morschhauser y col. 2007; Znaidi y col. 2007; Dunkel y col. 2008; Schubert y col. 2008). En *Tac1* de *C. albicans*, se han detectado 16 mutaciones tipo GOF, incluyendo dos deleciones en las posiciones 677 y de la 962 a la 969; la gran mayoría se encuentran en el extremo carboxilo terminal, posible dominio de activación de *Tac1*, pero se desconoce en la actualidad cómo estas mutaciones afectan a la transcripción de dicho gen. En cuanto a *Mrr1* se han hallado 14 mutaciones GOF que abarcan toda la región codificante (Sanglard 2011b). En *C. glabrata* la sobreexpresión de los genes *CDR1*, *CDR2* y *SNQ2* se han asociado principalmente a mutaciones en el factor de transcripción *PDR1* (*Pleiotropic Drug Resistance*) (Ferrari y col. 2011; Nagayoshi y col. 2017; Whaley y col. 2018) y en *C. parapsilosis* la sobreexpresión de

MDR1 se ha correlacionado con mutaciones GOF en *MRR1* (Asadzadeh y col. 2017; Berkow y col. 2015; Souza y col 2015).

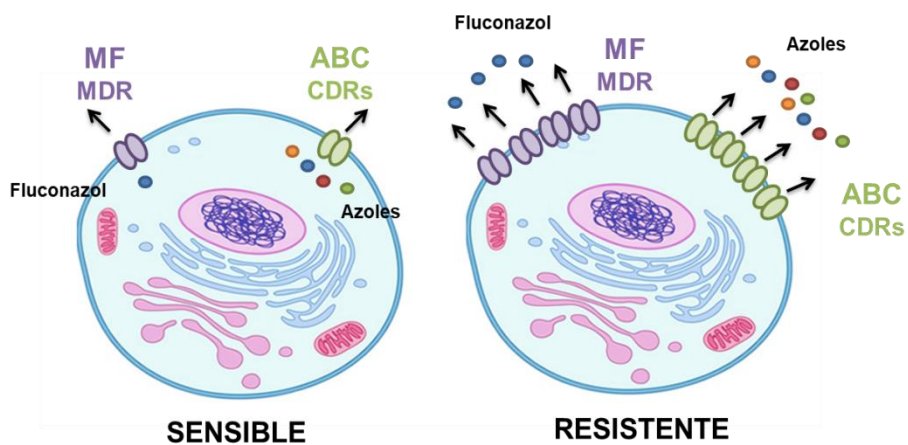


Figura 11. Esquema de la sobreexpresión de bombas.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS DE RESISTENCIA A AZOLES EN ESPECIES DE CANDIDA NO-ALBICANS

Patricia Navarro Rodríguez



INTERÉS, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS DE RESISTENCIA A AZOLES EN ESPECIES DE CANDIDA NO-ALBICANS

Patricia Navarro Rodríguez

3. INTERÉS, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En los últimos años los importantes avances en el campo de la medicina han permitido aumentar la supervivencia y prolongar el tiempo de vida de pacientes críticos. Como resultado de ello, muchos de estos enfermos son especialmente vulnerables a la adquisición de infecciones fúngicas, en muchos casos asociadas a una alta tasa de mortalidad, como sucede en el caso de la candidiasis invasora. Entre las causas del fracaso terapéutico, el aumento de cepas que han adquirido resistencia a los fármacos de uso clínico ha adquirido una gran, especialmente la resistencia a los azoles, frecuentemente usados en el tratamiento de la candidiasis invasora.

La resistencia a los azoles cobra una especial relevancia en *C. albicans* por ser el principal agente causal de micosis invasoras. El estudio de mecanismos de resistencia en *C. albicans* es motivo de una intensa investigación a nivel mundial que ha culminado con la identificación de numerosas alteraciones génicas que conllevan a la resistencia. En los últimos años estamos asistiendo a un aumento de infecciones producidas por otras especies de *Candida* tales como *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei* que presentan resistencia intrínseca y/o adquirida a los azoles. Todas ellas, junto con *C. albicans*, son responsables del 90 % de las micosis invasoras a nivel mundial. Aunque diversos estudios apuntan a que los mecanismos descrito en *C. albicans* son comunes a otras especies del género, pocos estudios han profundizado en el estudio de los mecanismos de resistencia en las especies de *Candida no-albicans*.

Debido a que la situación actual se va agravando a medida que va aumentando la frecuencia de aislamientos clínicos de *Candida* resistentes a los azoles, es esencial comprender mejor y dilucidar los mecanismos de dicha resistencia para intentar optimizar el tratamiento de las infecciones por *Candida*.

La **hipótesis** que ha motivado la realización de los estudios que se presentan en esta Tesis Doctoral, parte de que los mecanismos de resistencia a los azoles previamente descritos en *C. albicans*, actúan también en la resistencia de otras especies del género; aunque no con la misma relevancia.

El **objetivo principal** ha sido evaluar qué impacto tienen las mutaciones en el gen *ERG11*, así como su expresión génica, en la resistencia al voriconazol en las especies de *Candida* emergentes *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*. También, se ha evaluado la relación entre el grado de expresión de genes relacionados con bombas de eyección y el incremento de resistencia al voriconazol en dichas especies.

Objetivos concretos:

- Determinar la actividad *in vitro* de antifúngicos de interés clínico frente a especies relevantes de *Candida*.
- Establecer modelos murinos de infección sistémica por *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* para poder evaluar la eficacia terapéutica del voriconazol y correlacionar ésta con valores de CMI y presencia de mecanismos de resistencia.

- Identificar mutaciones en el gen *ERG11* en cepas de *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* con sensibilidad reducida al voriconazol.
- Estudiar la expresión de los genes *CDR1*, *CDR2*, *SNQ2* y *ERG11*, directamente implicados en la resistencia al voriconazol, de las especies *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*.
- Caracterizar fenotípicamente cepas clínicas de *C. tropicalis* sensibles y resistentes al voriconazol

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS DE RESISTENCIA A AZOLES EN ESPECIES DE CANDIDA NO-ALBICANS

Patricia Navarro Rodríguez



MATERIALES Y MÉTODOS



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS DE RESISTENCIA A AZOLES EN ESPECIES DE CANDIDA NO-ALBICANS

Patricia Navarro Rodríguez

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material biológico y cepas utilizadas

Se utilizaron un total de 41 cepas del género *Candida* de origen clínico, 18 de *C. glabrata*, 18 de *C. tropicalis* y 5 de *C. parapsilosis* (**Tabla 4**). Algunos de los aislados fueron facilitados por el Fungus Testing Laboratory (FTL) del Department of Pathology de la University of Texas Health Science Center de San Antonio (UTHSCSA), Estados Unidos y el JMI Laboratories de North Liberty, Iowa, Estados Unidos (JMI). Todas las cepas se encuentran conservadas en la colección de la Unitat de Microbiologia de Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de Reus (FMR), Universitat Rovira i Virgili. Las cepas se mantuvieron a temperatura ambiente en tubos de PDA agar inclinados cubiertos de una fina capa de parafina, en tacos de PDA agar de 5 mm³ sumergidos en agua destilada estéril y liofilizadas.

Tabla 4. Cepas utilizadas en la presente tesis doctoral.

Especie	Origen
<i>C. glabrata</i>	
FMR 11382	Clínico, Reus
UTHSC DI15-87	Clínico, USA
FMR 11379	Clínico, Reus
FMR 8502	Clínico, Reus
FMR 11383	Clínico, Reus
FMR 12282	Clínico, Reus
FMR 12281	Clínico, Reus
UTHSC DI15-90	Clínico, USA
JMI 801705	Clínico, USA
UTHSC DI15-91	Clínico, USA
UTHSC DI15-92	Clínico, USA
JMI 780445	Clínico, USA
JMI 766341	Clínico, USA
JMI787587	Clínico, USA
JMI 766356	Clínico, USA
JMI 815914	Clínico, USA
JMI 663371	Clínico, USA
JMI 030-10956	Clínico, USA
<i>C. tropicalis</i>	
FMR 10231*	Clínico, Reus
FMR 10240*	Clínico, Reus
FMR 13407*	Clínico, Reus
FMR 8895	Clínico, Reus
FMR 10239*	Clínico, Reus
FMR 10241*	Clínico, Reus
FMR 12743*	Clínico, Reus
FMR 14049	Clínico, Reus
FMR 14771	Clínico, Innsbruck
FMR 14600*	Clínico, USA
FMR 14603	Clínico, USA
FMR 14769	Clínico, Innsbruck
FMR 14773*	Clínico, Innsbruck
FMR 14772	Clínico, Innsbruck
FMR 14770*	Clínico, Innsbruck
FMR 14768*	Clínico, Innsbruck
FMR 14602*	Clínico, USA
FMR 8898*	Clínico, Reus

Especie	Origen
<i>C. parapsilosis</i>	
FMR 10240*	Clínico, Reus
FMR 17180*	Clínico, Madrid
FMR 17181*	Clínico, Reus
FMR 17182*	Clínico, Reus
ATCC 22019	

USA: United States of America. JMI: JMI Laboratories de North Liberty, Iowa, Estados Unidos.
UTHSC: Department of Pathology de la University of Texas Health Science Center de San Antonio
ATCC: American Type Culture Colletion. * Cepas utilizadas *in vivo*.

4.2. Medios de cultivo

PDA + Cloranfenicol (Potato Dextrose Agar)

Potato	400 g/L
Dextrose	40 g/L
Agar	30 g/L
Cloranfenicol (15 g/L)	10 mL/L

SM (Medio mínimo)

ZnSO ₄	0,05 g/L
MnCl ₂	0,05 g/L
FeSO ₄	0,03 g/L
MgSO ₄	0,2 g/L
KHPO ₄	0,4 g/L
KCl	0,2 g/L
NH ₄ NO ₃	1 g/L
Glucosa	10 g/L

YPG (Yeast peptone glucose)

Extracto de levadura	3 g/L
Proteasa peptone	10 g/L
Glucosa	20 g/L

Ajustar a pH 4.5 con H₂SO₄.

RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium)

Es un medio sintético con glutamina y sin bicarbonato sódico (Gibco, ICN, Oxoid, Sigma), tamponado con ácido morfolino propano sulfónico (MOPS) 0,164 M (ICN, Sigma), ajustado a pH $7 \pm 0,1$ y con 0,2 % de glucosa), se debe esterilizar por filtración.

4.3. Condiciones de cultivo

Las levaduras se incubaron entre 28 °C-30 °C durante 24-48 h dependiendo de la especie, en placas de PDA con cloranfenicol. *C. glabrata* se incubó a 30 °C durante 24 h, *C. parapsilosis* se incubó a 30 °C durante 48 h y *C. tropicalis* se incubó a 28 °C durante 24 h.

Para la conservación de las cepas tras el período de crecimiento, las placas se sellaron con Parafilm® y se mantuvieron a 4 °C realizándose resiembras mensuales en las mismas condiciones.

4.4. Inducción con voriconazol

Para los estudios de expresión génica y cuantificación de ergosterol, las cepas se incubaron en presencia de diferentes concentraciones de voriconazol con tiempos de exposición y condiciones de crecimiento específicos para cada especie (**Tabla 5**). A partir de un cultivo inicial en fase estacionaria en YPG con aproximadamente $2,5 \times 10^6 - 10^7$ células/mL, se inoculó $2,5 \times 10^8$ y 1×10^9 células/mL en YPG fresco y se adicionó voriconazol (Pfizer) (10-100 µg/mL) y se recogieron las células en la fase exponencial con la finalidad de conocer los niveles de expresión de los diferentes genes, tras la exposición al compuesto.

Tabla 5. Condiciones de inducción con voriconazol para cada una de las especies de *Candida*.

	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Preinóculo:			
Medio	YPG	YPG	YPG
Volumen	5 mL	5 mL	5 mL
Tiempo	16-18 h	8 h	12-14 h
Temperatura y rpm	30°C – 180 rpm	28°C – 180 rpm	30°C – 180 rpm
Inóculo:			
Medio	YPG	YPG	YPG
Volumen	15 mL	15 mL	15 mL
Tiempo	4 h	18 h	4 h
Concentración final del inóculo	$2,5 \times 10^7 - 1 \times 10^8$ células/mL	$2,5 \times 10^8 - 1 \times 10^9$ células/mL	$22,5 \times 10^7 - 1 \times 10^8$ células/mL
Temperatura y rpm	30°C – 180 rpm	28°C – 180 rpm	30°C – 180 rpm
Voriconazol			
Concentración	100 µg/mL	10 µg/mL	10 µg/mL
Tiempo de inducción	4 h	18 h	4 h

4.5. Estudios *in vitro*

4.5.1. Fármacos antifúngicos

Se ensayó la sensibilidad a un total de cuatro antifúngicos con el fin de determinar su concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a las especies de *Candida* evaluadas. En la **Tabla 6** se encuentran listados los antifúngicos utilizados con sus respectivas procedencias, purezas y disolventes.

Tabla 6. Antifúngicos utilizados en los ensayos de sensibilidad *in vitro*.

Antifúngico	Procedencia	Pureza	Disolvente
Fluconazol	Pfizer Inc., Madrid, España	82,4 %	Agua
Posaconazol	Schering-Plough Res.,Inst., NJ, EUA	98 %	DMSO
Voriconazol	Pfizer Inc., Madrid, España	100 %	DMSO
Itraconazol	Pfizer Inc., Madrid, España	100 %	DMSO

DMSO: Dimetilsulfóxido.

4.5.2. Método de microdilución en caldo M27-A3 (2008) y M27 cuarta edición (2016) (CLSI)

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los cuatro antifúngicos indicados en la **Tabla 6**, frente a las especies de *Candida* bajo estudio, se utilizó el método de microdilución en caldo estandarizado por el CLSI y se siguió el procedimiento descrito en el documento M27-A3 (Clinical and Laboratory Standards Institute 2008) y M27 cuarta edición (Clinical and Laboratory Standards Institute 2016).

Preparación de la solución madre y del gradiente de concentraciones de las microplacas de antifúngicos

La solución madre de cada antifúngico se preparó a una concentración diez veces superior (10X) a la concentración para antifúngicos solubles en agua, o cien veces mayor (100X) para antifúngicos insolubles en agua.

A continuación, se realizaron diluciones dobles seriadas, diluyendo cada antifúngico en agua destilada estéril o dimetilsulfóxido (DMSO). En la **Tabla 6** se encuentran listados los antifúngicos utilizados con sus respectivas procedencias, purezas y disolventes. A continuación se realizaron diluciones 1:5 en RPMI en el caso de antifúngicos solubles en agua, o 1:50 en DMSO para aquellos insolubles en agua (**Figura 12**). Se dispensaron 100 μ L de cada dilución resultante a una placa de microdilución de 96 pocillos y fondo cóncavo (**Figura 13 A**). Las concentraciones de antifúngico ensayadas fueron de 0,03 a 16 μ g/mL. Los bancos de diluciones se dispensaron en filas en la microplaca, reservando los últimos dos pocillos como control de crecimiento y control de esterilidad (**Figura 13 B**). Una vez finalizada la preparación de las microplacas se cubrieron con una lámina adhesiva para evitar la evaporación y se guardaron a -20 °C durante un máximo de seis meses.

Preparación de inóculos

Las cepas se cultivaron en placas de PDA y se incubaron durante 24-48 h a 28-30 °C. El día del ensayo los inóculos fueron preparados suspendiendo colonias en un tubo con agua destilada estéril. Con tal de obtener una suspensión de 1×10^6 - 5×10^6 células/mL que fue ajustada mediante el recuento con la cámara de Neubauer, posteriormente esta suspensión se diluyó 1:50 en agua y finalmente se realizó una dilución 1:20 en RPMI.

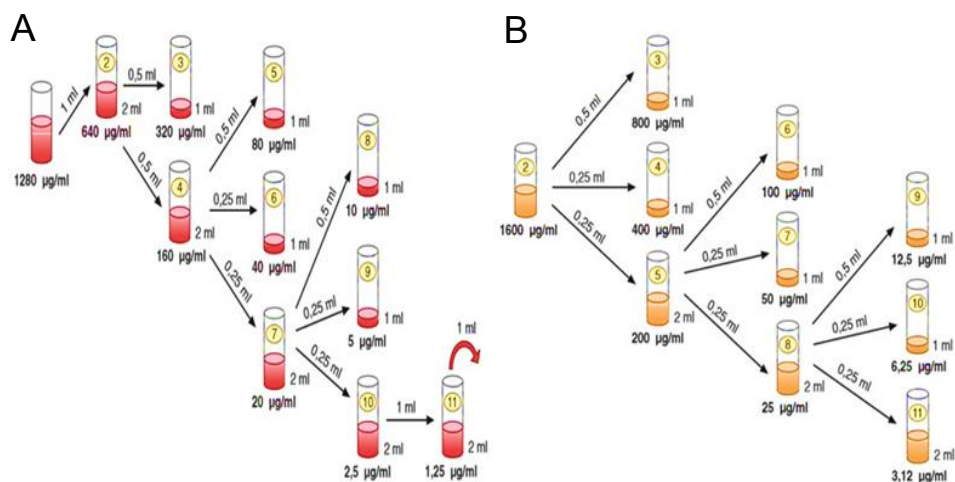


Figura 12. (A) Diluciones de antifúngicos solubles en agua, diluyente RPMI 1640, (B) Diluciones de antifúngicos insolubles en agua, diluyente DMSO.

Inoculación e incubación de las placas

Las microplacas se descongelaron a temperatura ambiente en el momento de inocularlas y se dispensaron 100 µL de inóculo final en cada pocillo, con excepción del correspondiente al control de esterilidad del medio. Las microplacas se incubaron a 35 °C durante 24-48. La concentración y la viabilidad de los inóculos se verificaron sembrando una concentración “conocida” del inóculo en placas de PDA (por duplicado). Además, siguiendo las recomendaciones de los documentos estandarizados, en cada ensayo se incluyó la cepa de control *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

Lectura e interpretación de los resultados

La lectura de las microplacas inoculadas se realizó con ayuda de un espejo invertido (**Figura 13 C**). Primero se realizó una lectura de las CMI de las cepas control de calidad, con el fin de verificar que los valores de sensibilidad obtenidos para todos los antifúngicos estaban dentro del rango previamente descrito por el CLSI. Para la lectura de la CMI de los azoles se utilizó como criterio de lectura la CMI-50 que es la concentración más baja de antifúngico que produce una reducción del 50 % del crecimiento de la levadura comparado con el control positivo, tal y como establece el documento M27-A3 y el M27 4ta edición (Institute 2008).

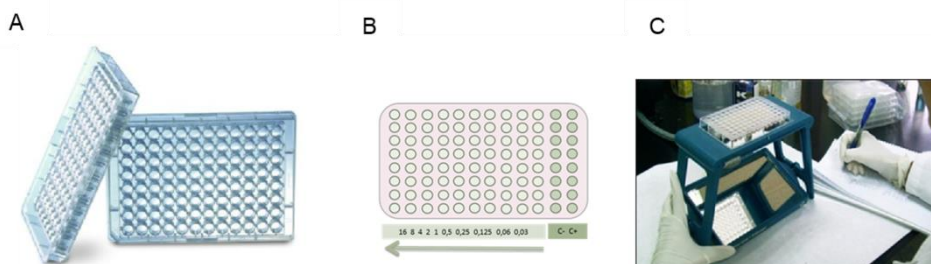


Figura 13. (A) Microplaca de 96 pocillos con pocillo de fondo cóncavo. (B) Distribución de la microplaca inoculada. (C) Espejo invertido para la lectura de los resultados.

4.6. Crecimiento en presencia de compuestos tóxicos que afectan a membrana o pared celular

4.6.1. Compuestos de interacción con pared y membrana

Para estudiar el efecto de compuestos que intervienen con la pared o con la membrana celular se utilizaron: dodecilsulfato sódico (SDS), calcofluor white (CFW) o congo red (CR) (Heilmann y col. 2013). Se prepararon soluciones tal como se indicada en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Compuestos químicos de interacción con pared y membrana celular.

Compuesto	Almacenamiento	Concentración
SDS	0,1 g/mL; a temperatura ambiente (RT)	0,0125 - 0,025 %
CFW	25 mg/mL en 80 % glicerol:0,5 % KOH; a -20 °C y oscuridad	25 - 100 µg/mL
CR	25 mg/mL en agua; a -20 °C y oscuridad	25 - 100 µg/mL

- Dodecilsulfato Sódico (SDS): es un compuesto orgánico sintético que compromete la integridad de la membrana celular.
- Calco Fluor White (CFW): es un colorante azul fluorescente que se une a la quitina, presente en las paredes celulares de hongos.
- Congo Red (CR): es un compuesto orgánico que se une a los polisacáridos presentes en la pared de la célula fúngica

Para ello una concentración determinada de cada uno de estos compuestos (4.6.1), fue añadida al medio SM y las placas fueron inoculadas con 10 µL conteniendo 10^4 / 10^5 / 10^6 células de *C. tropicalis* e incubadas a 28 °C durante 5 días.

4.7. Extracción de ergosterol

El protocolo utilizado está basado en el descrito por Breivik y Owades con ligeras modificaciones (Breivik y Owades 1957). Para llevar a cabo la extracción de esteroides de membrana una colonia fresca se inoculó en 5 mL de YPG y se incubó durante 8 h a 28 °C a 180 rpm. Luego 1 mL de cultivo ($2,5 \times 10^6$ - 1×10^7 células/mL) se transfirió a 15 mL de YPG (control) o YPG que contenía 10 µg/mL de voriconazol y se incubó a 28 °C durante 18 h con agitación a 180 rpm. Se recogieron las células por centrifugación a 2800g durante 5 min y se lavaron con agua destilada estéril. A continuación, se determinó el peso húmedo del sedimento celular y se resuspendió en 3 mL de solución de hidróxido de potasio alcohólico al 25 %¹ en tubos de vidrio de borosilicato y se mezclaron durante 1 min en agitador vortex. Posteriormente las muestras se incubaron a 80 °C durante 1 h en un baño de agua, se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se añadió 1 mL de agua destilada estéril y 3 mL de *n*-heptano y seguidamente se homogenizaron en vortex durante 3 min. Por último, la capa de *n*-heptano se transfirió a un tubo de vidrio de borosilicato limpio y se almacenó a -20 °C durante 12-14 h hasta su análisis.

¹ 25 g de KOH y 36 mL de agua destilada estéril, llevados a 100 mL con etanol al 100 %

4.8. Cuantificación de ergosterol

Los extractos de esteroides fueron cuantificados espectrofotométricamente entre 200 y 300 nm en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). Esto permitió cuantificar

ergosterol y de 24(28) dehidro-ergosterol (DHE), un esteroide que además sustituye funcionalmente y con precisión al ergosterol *in vivo* (Solanko y col. 2018). Como resultado de esta medición se obtuvo una curva característica de cuatro picos. El contenido de ergosterol se calculó como un porcentaje del peso húmedo de la célula utilizando las siguientes ecuaciones descritas previamente por (Arthington-Skaggs y col. 1999):

$$\% \text{ ergosterol} + \% 24 (28) \text{ DHE} = [(A_{281.5} / 290) \times F] / \text{ peso del sedimento}$$

$$\% 24 (28) \text{ DHE} = [(A_{230} / 518) \times F] / \text{ peso del sedimento}$$

$$\% \text{ ergosterol} = [\% \text{ ergosterol} + \% 24 (28) \text{ DHE}] - \% 24 (28) \text{ DHE.}$$

Dónde F es el factor de dilución en etanol y 290 y 518 son los valores de extinción molar (en porcentajes por centímetro) determinados para el ergosterol cristalino y 24 (28) DHE, respectivamente.

4.9. Estudios *in vivo*

4.9.1. Animales de experimentación

Se utilizaron ratones macho OF-1 (Charles River, Criffa S. A., Barcelona) de 30 gramos de peso. Todos los estudios realizados fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad Rovira i Virgili. Los animales se mantuvieron en condiciones estándar con acceso libre a la comida y a la bebida, controlando diariamente el progreso de la infección hasta el último día del experimento. Una vez transcurrido el tiempo experimental o cuando los animales cumplían los criterios de punto final, éstos fueron eutanasiados mediante inhalación de CO₂.

4.9.2. Inmunosupresión

La pauta de inmunosupresión utilizada se basó en la administración, dos días previos a la infección (día -2), de una dosis

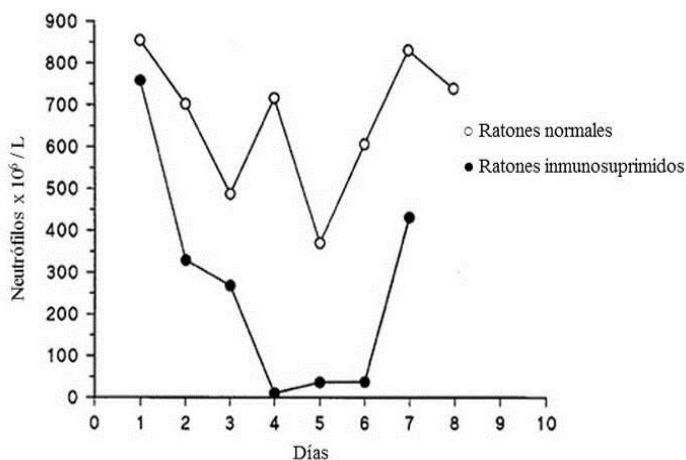


Figura 14. Recuento de neutrófilos en un modelo murino después de la administración de una dosis de ciclofosfamida de 200 mg/kg, en comparación con ratones no inmunosuprimidos.

única de 200 mg/kg de ciclofosfamida (Genoxal® Baxter, Halle/Westfalen, Alemania) intraperitonealmente (i.p.). Esta administración se repitió cada 5 días hasta finalizar los estudios experimentales (Ortoneda y col. 2004; Graybill y col. 1998). Con esta inmunosupresión se consigue reproducir un estado inmunológico de neutropenia con recuentos de neutrófilos $< 100/\mu\text{L}$ (**Figura 14**) (Denning y col. 1995).

4.9.3. Infección

Los inóculos utilizados para las infecciones realizadas por *Candida* spp. se prepararon igual que para los estudios *in vitro*, pero

utilizando solución salina fisiológica estéril en lugar de agua destilada estéril. Los inóculos también se ajustaron para conseguir la concentración deseada mediante la cámara de Neubauer, para cada especie de *Candida* se estableció un inóculo diferente: 1×10^4 UFC/mL de *C. tropicalis* y 4×10^6 UFC/mL de *C. parapsilosis*.

Una vez preparado el inóculo, el día 0 se llevó a cabo la infección de los animales mediante la administración intravenosa de 0,2 mL de la suspensión de levaduras a través de la vena lateral de la cola. La viabilidad de los inóculos fue comprobada mediante la realización de diluciones seriadas y siembra en PDA para el recuento de UFC/mL.

4.9.4. Tratamientos, dosis y vías de administración

Para los estudios de eficacia los ratones fueron divididos en dos grupos, el grupo control, el cual no recibió ningún tipo de tratamiento, y el grupo de tratamiento con el antifúngico. Todos los ratones recibieron diariamente.

En la **Tabla 8** se muestran los antifúngicos empleados en los tratamientos experimentales con su procedencia, el disolvente utilizado para su preparación, las vías de administración, las dosis y volúmenes administrados. Los tratamientos se iniciaron 24 h después de la infección (día +1) y se administraron diariamente durante 10 días.

Tabla 8. Antifúngicos empleados en los estudios *in vivo*, con sus correspondientes características y condiciones de uso.

Antifúngico	Procedencia	Disolvente	Dosis (mg/kg/día)	Vía de administración (Volumen mL)
Itraconazol	Sporanox® JANSSENCILAG Madrid, España		50	Oral (0,2)
Posaconazol	Noxafil® Shering- Plough, Madrid, España	Solución salina fisiológica	25 (2 veces/día)	Oral (0,1)
Voriconazol	Vfend® Pfizer, Ltd., Madrid, España		40	

4.9.5. Estudios de supervivencia

Para evaluar la eficacia de los tratamientos frente a infecciones con *C. tropicalis* se realizaron ensayos de supervivencia en animales infectados que reciben un determinado tratamiento antifúngico. Para ello se comparó la supervivencia entre animales infectados tratados y sin tratar (control) y se evaluó si el tratamiento prolongaba significativamente la supervivencia en el grupo de animales tratados. Para monitorizar la supervivencia y estado de los animales se supervisaron las siguientes condiciones:

- Pelaje: liso y brillante o pilo erección.
- Cambios de peso: la pérdida notoria de peso corporal es señal de sufrimiento.
- Cambios posturales: postura normal o encorvada.
- Secreciones.
- Convulsiones.

- Alteraciones en la locomoción: movimientos repentinos y rápidos, ataxia, entre otros.
- Comportamiento no provocado: vocalizaciones y automutilaciones.
- Respuesta a estímulos: agresividad, estado comatoso.

4.9.6. Estudios de carga fúngica en órganos

Se realizaron estudios de carga fúngica en el riñón (órgano diana) para las especies de *Candida* estudiadas. Dependiendo del estudio los animales destinados al estudio de la carga fúngica se sacrificaron 10 días después del tratamiento o cuando empezaron a morir los ratones del grupo control (entre el día 5-10 post infección). Fueron sacrificados mediante anoxia por CO₂. Los riñones fueron extraídos de forma aséptica, se pesaron y se homogenizaron mecánicamente en 1 mL de solución salina estéril. Se realizaron diluciones seriadas 1:10 de los homogenizados, se sembraron en placas de PDA y finalmente se incubaron a 28-30°C dependiendo de la especie, para calcular las UFC/g mediante la siguiente fórmula:

$$UFCg = \frac{UFC}{ml} \cdot (\text{peso de órgano} + mL \text{ utilizados para homogeneizar}) / \text{peso del órgano}$$

4.1. Diseño de cebadores

Los cebadores utilizados para las reacciones de amplificación y secuenciación se diseñaron con el programa Oligo 7 (Molecular Biology Insights, Inc., Colorado Springs, CO, EE. UU.). Se encuentran especificados en la **Tabla 9**. Se diseñaron optimizando su estabilidad interna y excluyendo la formación de horquillas y dímeros no deseados, así como diversos parámetros físicos y químicos (T_m , T_d , % G+C, % A+T). Los cebadores se sintetizaron en empresas comerciales (Macrogen o Eurofins genomics).

4.1.1. Oligonucleótidos sintéticos

Tabla 9. Cebadores específicos de *Candida* spp.

Especie	Gen	Cebador	Secuencia (5' – 3')	Uso ^a	Posición ATG	
<i>C. glabrata</i>	ERG11	erg11-f	ATGTCCACTGAAAACACT	Seq	+0	
		erg11-r	CTAGTACTTTTGTCTGG	Seq	+1602	
		erg11-f1	GCTATTCCAAACTTCCTAC	qPCR	+1177	
		erg11-r1	GAATGGCAAGTATGGAGAGG	qPCR	+1376	
	CDR1	cdr1-f	AAAGAAAGAACACTCTGCC	qPCR	+158	
		cdr1-r	GGGTCTGAGTTGCTAATGTTG	qPCR	+310	
	CDR2	cdr2-f	GATGCACACAGACAAGAATGA	qPCR	+2474	
		cdr2-r	CTACCACCTCTACTTCCACT	qPCR	+2605	
	SNQ2	snq2-f	GTGCTCTATATTCTGTCTTTTG	qPCR	+1666	
		snq2-r	TGAATGGAAAGTTGGCGATAGT	qPCR	+1819	
	RDN 5.8	rdn5.8-f	GGATCTCTGGTTCTCGCAT	qPCR	+3	
		rdn5.8-r	AATGTGCGTTCAAAGATTCGAT	qPCR	+82	
	<i>C. tropicalis</i>	ERG11	ERG11F	TACACTACGCCATTTCTCA	Seq	- 318
			ERG11R	AGTCACCACCCTTTTCTTTC	Seq	+1665
ERG11S1			TCCTGTTTTTGGTAAAGGTGT	Seq	+1011	
ERG11S2			ATGGTCTCTTTCCTGGTTTT	Seq	+1171	
ERG11R2			GTGATCTGTGTCGGTTGGT	qPCR/Seq	+2436	
ERG11R3		CTGGAACCTTATCACCGTTT	qPCR/Seq	+2127		
RDN 5.8		RDN5.8-F	AACTTCAACAACGGATCTCT	qPCR	+0	
		RDN5.8-R	GAGAAATGACGCTCAAACAG	qPCR	+113	
<i>C. parapsilosis</i>	ERG11	Erg11CP F1	AGATCATACGACTGAGTTTCC	Seq	-145	
		Erg11CP F2	ATGTTGGGTAGAGTAATGACG	Seq	+259	
		Erg11CP R1	ATCGGTAGTCAATGCGGTCT	Seq	+440	
		Erg11CP R2	AATGGCAAGTGTGGGAAAACA	Seq	+669	
		Erg11CP R3	ACGAGATAATCATCAACGAACA	Seq	+1654	
		Erg11CP F	TGTTTCTCCCTTGGTTGTGC	qPCR/Seq	+1149	
		Erg11CP R	TCTGCTGGGTGTTGAGGTAA	qPCR/Seq	+1513	
	CDR1	Cdr1CP F	CATCGACCGTTAGAGAAGCA	qPCR	+2849	
		Cdr1CP R	CTTGCCATGATCTGCCAATT	qPCR	+3140	
	ACT1	Act1CP F	TTCAGGTGATGGTGTCACTC	qPCR	+1063	
		Act1CP R	GACGGAACAAAGCTTCTGGA	qPCR	+1372	

^a Seq: secuenciación; qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real

4.2. Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos

4.2.1. Extracción de ADN de *Candida*

La extracción de ADN genómico se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Muller y col. con algunas modificaciones (Muller y col. 1998). Se partió de un cultivo de levadura crecida en PDA durante 24-48 h. Se recogió la masa fúngica de varias colonias con la ayuda de una espátula y se introdujo en un tubo de 2 mL al que se añadieron 0,3 g – 1g de bolas de cristal de 600 μm - 3 mm de diámetro (Sigma-Aldrich Quimica SL, Madrid, España) y 500 μl de tampón de lisis ¹. La muestra se sometió a lisis celular mecánica mediante agitación en FastPrep (FastPrep®-24 MP) casa comercial) durante tres ciclos de 1 min. Posteriormente se centrifugó 5 min a 12000g y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 2 mL al que añadiendo 275 μl de una solución 7 M de Acetato de Amonio pH 7.0 ². La mezcla se incubó 5 min a 65 °C y otros 5 min en hielo, y finalmente se añadieron 500 μl de cloroformo y se homogenizó con vortex. Tras centrifugar durante 5 min a 12000g, la fase superior se transfirió a un nuevo tubo de 2 mL y el DNA se precipitó añadiendo 1 mL de isopropanol e incubando en hielo durante 10 -20 min. Tras centrifugar a 12000g durante 5 min el sedimento obtenido se lavó dos veces con 1 mL de etanol al 70 % (v/v) y se eliminó el sobrenadante. Las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente y se resuspendieron en 50-75 μl de agua desionizada estéril. Por último, se trató cada muestra con 0,4 mg/mL de ribonucleasa A (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, EE. UU.), durante 30 min a 37 °C para eliminar la contaminación por ARN.

¹Tampón de lisis: 100 mM Tris pH 8.0; 50 mM EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético); 1 % SDS.

²7M Acetato de amonio pH 7.0: 27 g de Acetato de amonio, agua destilada (hasta 50mL).

4.2.2. Extracción total de ARN de levaduras

El ARN total se extrajo utilizando el método de fenol-cloroformo. Para ello se recolectaron $2,5 \times 10^7$ - 1×10^8 células de un cultivo crecido en la condición adecuada según el experimento mediante centrifugación durante 5 min a 8500g y se resuspendieron en 1 mL de Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, EE. UU). La muestra se sometió a lisis celular mecánica con bolas de cristal de 600 μm - 3 mm de diámetro (Sigma-Aldrich Quimica SL, Madrid, España) mediante 3 ciclos de agitación en FastPrep (FastPrep®-24 MP) Posteriormente se agregaron 0,2 mL de cloroformo y la muestra se centrifugó a 12000g durante 15 min. La fase superior se transfirió a un nuevo tubo de 2 mL al que se agregaron 500 μl de isopropanol. La mezcla se incubó durante 10 min en hielo y se sometió a centrifugación a 12000g durante 10 min. El sedimento obtenido se lavó con 1 mL de etanol frío al 70 % y se resuspendió en 25 μl de agua tratada con dietilpirocarbonato. Finalmente, el ARN se trató con DNasa I (4.5.2).

4.2.3. Extracción de ARN de órganos

Para los estudios de expresión *in vivo*, se extrajo ARN total de riñones de ratones usando el método fenol-cloroformo con algunas modificaciones. Para ello se pulverizaron entre 0,8 y 0,9 g de tejido en nitrógeno líquido con ayuda de un mortero. El polvo obtenido se

transfirió a un tubo de 2 mL y se resuspendió en 1 mL de Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, EE. UU). Posteriormente, se agregaron 0,2 mL de cloroformo y se centrifugó a 12.000g durante 10 min. La fase superior se transfirió a un nuevo tubo de 2 mL, se agregaron 500 µl de isopropanol y se centrifugaron a 12.000g durante 10 min. El sedimento se lavó con 1 mL de etanol frío al 70 % y se resuspendió en 25 µl de agua tratada con dietilpircarbonato. Finalmente, el ARN se trató con DNasa I (4.5.2).

4.3. Electroforesis de ácidos nucleicos

La separación e identificación de moléculas de ADN y ARN se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa (Agarose D1 LOW EEO, Pronadisa) disuelta en tampón TAE ¹. La concentración de agarosa varió en función del tamaño de los fragmentos que se querían separar, oscilando entre 0,7 y 1,5 % (p/v). Para visualizar los ácidos nucleicos por transiluminación con luz ultravioleta, se añadió el reactivo Red Safe (0,35 µg/mL). Las muestras fueron mezcladas con tampón de carga para geles de agarosa ² en proporción 4:1 (v/v). La electroforesis se realizó en cubetas horizontales con tampón TAE, a un voltaje constante de 1-4 V/cm. Para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN, se incluyó un marcador de tamaño molecular (Generuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific™), que contiene fragmentos desde 75 pb a 20 kb.

¹ Tampón TAE: 40 mM Tris-acetato y 1 mM EDTA pH 8,0,

² Tampón de carga para geles de agarosa: 0,25 % azul de bromofenol p/v; 0,25 % azul de xilencianol p/v y 40 % sacarosa p/v en 5x TAE.

4.4. Cuantificación de ácidos nucleicos

La concentración de muestras de ADN y de ARN se determinó en un espectrofotómetro Nanodrop® ND-1000, a 260 nm. En algunas ocasiones se comparó la intensidad de las bandas con cantidades conocidas del marcador de tamaño molecular.

4.5. Reacción en cadena de la polimerasa

4.5.1. Amplificación y secuenciación de fragmentos de ADN

La amplificación y secuenciación del gen *ERG11* a partir de ADN genómico de *Candida* spp. se realizó utilizando los cebadores diseñados en el software Oligo 7 (Molecular Biology Insights, Inc., Colorado Springs, CO, EE. UU.), especificados en la **Tabla 9**.

Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) convencionales se llevaron a cabo en 40 o 25 µl de mezclas de reacción que contenían según cada especie unas condiciones diferentes descritas en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Mezclas de reacción y *Taq* polimerasas utilizadas para la amplificación del gen *ERG11* en las distintas especies de *Candida*.

Especie	Mezcla de reacción	<i>Taq</i> polimerasa
<i>C. glabrata</i>	0,1 µg de ADNg, 1x tampón de PCR, 0,2 µM de cada cebador, 0,2 µM de dNTPs, 2,5 U de <i>Taq</i> polimerasa	<i>Taq</i> DNA polymerase Invitrogen
<i>C. tropicalis</i>	0,1 µg de ADNg, 0,2 µM de cada cebador y 1x de la mezcla de <i>Taq</i> polimerasa	Emerald Amp GT PCR
<i>C. parapsilosis</i>	0,05 µg de ADNg, 1x tampón de PCR , 0,2 µM de cada cebador, 0,6 µM de MgCl, 0,8 µM de dNTPs, 2.5 U de <i>Taq</i> polimerasa	<i>DNA polymerase</i> (BIOTAQ™)

Las muestras se amplificaron en un termociclador utilizando un programa térmico diferente según la especie (**Tabla 11**).

Los productos de la PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 %. La secuenciación se realizó en Macrogen Europe (Macrogen Inc. Ámsterdam, Países Bajos), el ensamblaje y la edición de secuencias se realizaron utilizando SeqMan v.7.0 (DNASTAR, Madison, WI).

Tabla 11. Programa utilizado para la amplificación del gen *ERG11* de cada una de las especies de *Candida*.

Especie	Programa de qPCR
<i>C. glabrata</i>	5 min a 95 ° C, 35 ciclos de 35 s a 95 ° C, 35 s a 59 ° C y 90 s a 72 ° C y elongamiento final de 7 min a 72 ° C.
<i>C. tropicalis</i>	60 s a 98 ° C, 30 ciclos de 10 s a 98 ° C, 30 s a 58 ° C y 120 s a 72 ° C, y elongamiento final de 7 min a 72 ° C.
<i>C. parapsilosis</i>	5 min a 95 ° C, 30 ciclos de 30 s a 95 ° C, 30 s a 60 ° C y 140 s a 72 ° C, y elongamiento final de 10 min a 72 ° C

4.5.2. Transcripción reversa del ARN, síntesis de ADN copia

Tratamiento con DNAsa para eliminar los restos de ADN

El ARN purificado se trató con DNAsa I (ThermoFisher), durante 30 min a 37 °C a 0,1 µg/µL de ARN y 0,1 U/µL de la enzima y 0,1 U/µL de tampón de DNAsa I. La acción de la DNAsa se detuvo incubándolo a 65 °C durante 10 min y añadiendo a la mezcla EDTA a una concentración final de 2.5 Mm, para prevenir la hidrólisis del ARN durante el calentamiento.

Síntesis de ADN copia

Para la síntesis de ADN copia (ADNc), el ARN tratado con DNAsa I se sometió a transcripción reversa usando el kit de retrotranscripción de iScript™ (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, EE. UU.), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

En un volumen final de 20 µL se mezcló 1 µg de ARN total con 0,1 uM de retrotranscriptasa (RT), 0,1 uM de tampón y agua libre de RNAsa hasta llegar a los 20 µL finales. Las condiciones para la retrotranscripción consistieron en 5 min a 25°C para el alineamiento, transcripción reversa 20 min a 46°C e inactivación de la RT durante un min a 95°C.

4.5.3. PCR a tiempo final para análisis de la expresión génica

Una vez sintetizado el ADNc mediante retrotranscripción, se llevaron a cabo PCRs a tiempo final utilizando 0,05 – 0,1 µL del ADNc como molde, por un lado, para analizar la integridad de dicho ADNc, amplificando los genes endógenos *RDN 5.8* y *ACT1* y por otro lado la amplificación de los genes de interés *ERG11*, *CDR1*, *CDR2*, *SNQ2*. Las muestras se visualizaron en geles de agarosa al 1,5 %.

4.5.4. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) para el análisis de la expresión génica

Para evaluar la expresión de los genes candidatos a resistencia a azoles se utilizó la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). Para ello se utilizó como molde el ADNc y se amplificaron producto de 100-200 pb con las parejas de oligonucleótidos apropiadas (**Tabla 9**). Para cada muestra se realizaron tres réplicas técnicas simultáneas y las reacciones se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos (Applied Biosystems, Waltham, EE. UU) en un equipo StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Waltham, EE. UU) Cada reacción contenía 7,5 µL de FastStart Universal SYBR Green Master (Roche Diagnostics SL, Sant Cugat del Valles, Barcelona, España) o Green™ Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) (TAKARA BIO INC, Nojihigashi, Kusatsu, Shiga, Japón), 6,9 µL de ADNc diluido 1:1 en agua desionizada estéril (1:1) y 300 nM de cada nucleótido en 15 µl de volumen final. Las condiciones de amplificación para cada especie se detallan en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Condiciones de la qPCR para cada una de las especies del estudio.

Nº ciclos	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>
1 x	94 °C - 5 min	94 °C - 5 min	94 °C - 5 min
30 x	94 °C - 30 s	94 °C - 30 s	94 °C - 30 s
	60 °C - 30 s	58 °C - 30 s	60°C - 30 s
	72 °C - 20 s	72 °C - 20 s	72°C - 20 s
	80 °C - 20 s	76 °C - 20 s	
1 x	Curva de fusión (<i>Melt curve</i>)	Curva de fusión (<i>Melt curve</i>)	Curva de fusión (<i>Melt curve</i>)
	SYBR Green Master (Roche)	SYBR Green Master (Roche)	Green™ Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus)

Para verificar la especificidad de los productos de PCR obtenidos se realizaron curvas de desnaturalización (*curvas de melting*) inmediatamente después de completar los ciclos PCR, utilizando las siguientes condiciones: 15 s a 95 °C, 15 s a 60 °C y 15 s a 95 °C.

Los niveles relativos de expresión se calcularon usando el método $\Delta\Delta C_t$ (Livak y Schmittgen 2001). Para ello los valores del ciclo umbral (C_t) de los transcritos se normalizaron con los valores de C_t de un gen endógeno (*RDN 5.8* o *ACT1*) aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-(C_t \text{ gen} - C_t \text{ RDN5.8} / \text{ACT1})}$$

4.6. Análisis *in silico*: búsqueda, análisis y edición de secuencias

La búsqueda de secuencias se realizó utilizando las bases de datos *GenBank* y *Candidagenome*. En el ensamblaje y la edición de secuencias obtenidas del gen *ERG11* se utilizó el programa SeqMan versión 7.0 (DNASTAR, Madison, WI). En los análisis comparativos de secuencias y los estudios de homología se realizaron alineamientos múltiples de secuencias utilizando el algoritmo ClustalW en MEGA Software versión 7 y Meg Align DNASTAR (Lasergene Software). Para ello se utilizaron las secuencias de referencia de *ERG11/Erg11* de las especies estudiadas indicadas en la **Tabla 13**.

La predicción de la estructura tridimensional (3D) de las proteínas Erg11 se elaboró a través del servidor SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>) utilizando como modelo las estructuras cristalinas de CYP51 de *S. cerevisiae* (5eah.1), y *C. albicans* (5v5z.1).

Tabla 13. Secuencias de *ERG11/Erg11* de referencia para cada una de las especies estudiadas.

Especie	Cepa	Gen / número de acceso	Base de datos
<i>C. glabrata</i>	CBS138	<i>ERG11</i> /CAGL0E04334g	<i>Candida Genome</i>
<i>C. tropicalis</i>	ATCC 750	<i>ERG11</i> / M23673	<i>GenBank</i>
<i>C. parapsilosis</i>	CDC317	<i>ERG11</i> /CPAR2_303740	<i>Candida Genome</i>

4.7. Análisis estadístico

Se utilizó el paquete de programa estadístico Graph Pad Prism versión 6.0 para Windows, para realizar los estudios estadísticos, los resultados obtenidos fueron analizados y comparados utilizando los siguientes métodos:

Método de Kaplan Meier

Es un estimador no paramétrico de la función de la supervivencia y permite calcular el tiempo medio de supervivencia (TMS) para un grupo de animales. Tiene en cuenta los animales que no sobreviven hasta el final del período de observación, que día han muerto y los animales que quedan vivos al final del estudio. Una vez calculados los TMS para cada grupo, se utiliza el Log-rank test para comparar los TMS de los diferentes grupos entre sí o respecto al grupo control y establecer que grupos son estadísticamente diferentes y cuáles no.

Test U de Mann-Whitney

Esta prueba no paramétrica permite comparar los datos obtenidos en los recuentos de colonias por gramo de órgano o los datos de expresión obtenidos en la qPCR. Ordena los datos de los dos grupos que se comparan y determina unos rangos, pero no compara las medias. No hace falta que los datos sigan una distribución normal y podemos trabajar con los datos originales o con los logaritmos ya que con ambos obtendremos los mismos resultados.

ANOVA de 1 factor

Es una técnica estadística que señala si dos variables (una independiente y otra dependiente) están relacionadas en base a si las medias de la variable dependiente son diferentes en las categorías o grupos de la variable independiente. Es decir, señala si las medias entre dos o más grupos son similares o diferentes.

- Prueba Tukey para múltiples comparaciones: equivale a utilizar el método de Student. Newman. Keuls con $r=J=n^0$ de medias. Por tanto, las comparaciones son referidas a una misma diferencia mínima. Es uno de los métodos con mayor aceptación, que fue utilizado para comparar los niveles de expresión obtenidos mediante qPCR.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS DE RESISTENCIA A AZOLES EN ESPECIES DE CANDIDA NO-ALBICANS

Patricia Navarro Rodríguez



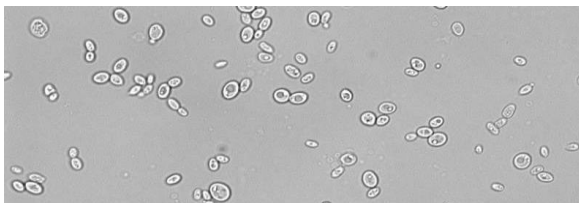
RESULTADOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS DE RESISTENCIA A AZOLES EN ESPECIES DE CANDIDA NO-ALBICANS

Patricia Navarro Rodríguez

ESTUDIO 1: Expresión de los genes que codifican las bombas de eyección *CDR1*, *CDR2* y *SNQ2* y *ERG11* aislados de *Candida* *glabrata* sensibles y resistentes a voriconazol



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS DE RESISTENCIA A AZOLES EN ESPECIES DE CANDIDA NO-ALBICANS

Patricia Navarro Rodríguez

5. Estudio 1: *Candida glabrata*

La candidiasis invasora causada por especies del género *Candida*, entre ellas *C. glabrata*, es difícil de tratar debido a la resistencia antifúngica que presenta esta especie, principalmente a los azoles. Con el objetivo de entender los mecanismos de resistencia a voriconazol (VRC) en *C. glabrata* se ha abordado un estudio de expresión de genes clave en cepas con sensibilidad conocida *in vitro* e *in vivo* a este fármaco. Para ello se analizó la expresión de *ERG11*, que codifica para una enzima que participa en la síntesis de ergosterol, y *CDR1*, *CDR2* y *SNQ2*, que codifican bombas de eyección en la resistencia a VRC. Dieciocho aislamientos clínicos de *C. glabrata* se expusieron *in vitro* a VRC y la expresión de los genes citados se cuantificó mediante qPCR en tiempo real. Además, el gen *ERG11* fue amplificado y secuenciado para detectar posibles mutaciones.

5.1. Sensibilidad antifúngica *in vitro*

La **Tabla 14** resume las CMI de dieciocho aislados de *C. glabrata* frente a VRC, posaconazol (PSC), fluconazol (FLC) e itraconazol (ITC). El 67 % de las cepas presentaron CMI de VRC más altas que el PCE (> 0,5 µg/mL) y además fueron resistentes a FLC. Tres cepas (17 %) mostraron una CMI de PSC más alta que el PCE establecido (> 1 µg/mL) mientras que la CMI de este fármaco fue igual al PCE en cinco aislados (28 %) y menor en diez cepas (56 %). En el caso del ITC, todas las cepas tenían CMI más bajas que el PCE establecido (> 2 µg/mL).

Teniendo en cuenta los puntos de corte clínicos (PCCs) para el FLC y los PCEs para PSC, ITC y VRC, se observó resistencia cruzada entre VRC y FLC, y entre VRC y PSC en diez cepas (56 %) y tres cepas (17 %), respectivamente. Además, tres cepas mostraron resistencia cruzada entre VRC, FLC y PSC (17 %).

Tabla 14. Sensibilidad frente a cuatro azoles y mutaciones en *ERG11* de dieciocho aislamientos de *C. glabrata*.

Cepas	CMI ($\mu\text{g/mL}$) ^a				Eficacia <i>in vivo</i> de VRC (Sanchis y col. 2016) ^b	Sustitución de nucleótidos en <i>ERG11</i>
	VRC	FLC	ITC	PSC		
FMR 11382	0,03	8	0,06	0,03	+	C678T, T768C, T834C, A1023G, T1275C
UTHSC DI15-87	0,03	16	0,06	0,5	+	A399G, T768C, A1023G, T1275C
FMR 11379	0,06	32	0,125	0,5	+	C678T, T768C, T834C, A1023G, T1275C
FMR 8502	0,125	16	0,06	0,5	+	Sin mutaciones
FMR 11383	0,125	32	0,5	0,25	+	C597T, T768C, A1023G, T1275C
FMR 12282	0,25	16	0,5	1	-	T768C, G927A, A1023G
FMR 12281	0,25	32	0,5	0,5	-	T768C, T834C, A1023G
UTHSC DI15-90	0,5	64	0,25	0,5	-	G927A, A1023G
JMI 801705	1	64	0,125	0,5	-	Sin mutaciones
UTHSC DI15-91	1	64	0,03	0,06	-	Sin mutaciones
UTHSC DI15-92	2	64	0,5	0,5	-	T768C, T834C, A1023G
JMI 780445	2	128	0,25	1	-	T768C, T834C, A1023G
JMI 766341	2	64	0,25	1	-	T768C, T834C, A1023G
JMI787587	4	64	1	1	-	C588T, T768C, C918T, A1023G
JMI 766356	4	128	1	2	-	T768C, T834C, A1023G
JMI 815914	4	128	0,5	1	-	T768C, T834C, A1023G
JMI 663371	8	128	1	4	-	T768C, G927A, A1023G
JMI 030-10956	8	128	1	2	-	A399G, T768C, A1023G, T1275C

^a Las CMIs frente a estos agentes antifúngicos se determinaron mediante el método de microdilución en caldo, de acuerdo con el documento M27-A3 4th edition (Institute 2016). La eficacia *in vivo* del VRC administrado a 40 mg/kg se determinó previamente en un modelo murino de infección por *C. glabrata* diseminada mediante el estudio de la reducción de la carga fúngica en riñón. ^b (+): eficacia de VRC; (-): sin eficacia de VRC.

5.2. *ERG11*, *CDR1*, *CDR2* y *SNQ2* no son inducibles por el voriconazol

Los niveles de transcripción de genes presumiblemente involucrados en la resistencia a VRC, como son los codificantes de bombas de eyección (*CDR1*, *CDR2* y *SNQ2*) y la diana del azol (*ERG11*), se cuantificaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). Esto se realizó tanto en condiciones basales como bajo exposición al fármaco, utilizando distintas concentraciones de VRC. Los perfiles de expresión de *ERG11*, *CDR1*, *CDR2* y *SNQ2* después de la exposición a VRC en concentraciones iguales a la mitad del valor de la CMI para cada cepa individual no revelaron un aumento significativo en comparación con los controles no expuestos (datos no mostrados). Tampoco la expresión varió significativamente en presencia de niveles más elevados de VRC. Cuando cuatro cepas resistentes a VRC (CMI ≥ 1 $\mu\text{g/mL}$) y una cepa susceptible a VRC (CMI = 0,03 $\mu\text{g/mL}$) fueron expuestas a una mayor concentración de VRC, 100 $\mu\text{g/mL}$ durante 4 h, los niveles de expresión de *ERG11*, *CDR1*, *CDR2* y *SNQ2* tampoco fueron significativamente diferentes de los valores en condiciones control ($p \geq 0,31$) (**Figura 15**).

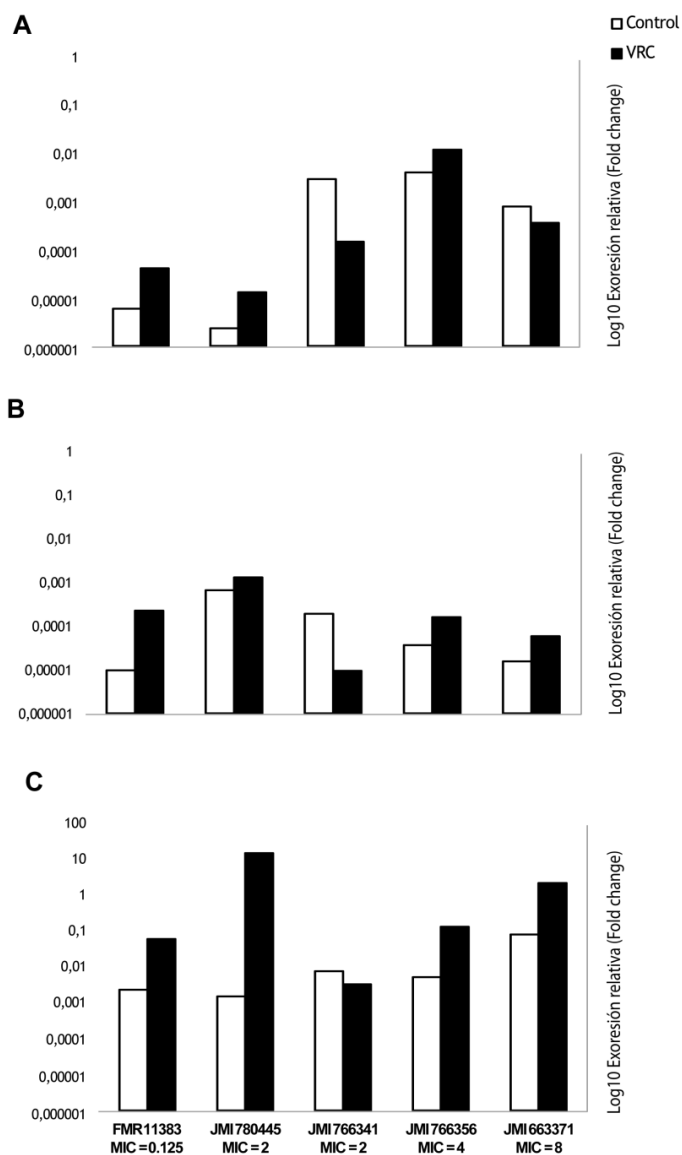


Figura 15. Perfil de expresión génica de *CDR1* (A), *CDR2* (B) y *ERG11* (C), de *C. glabrata* en presencia de VRC.

En cuatro cepas resistentes (JMI 780445, JMI 766356, JMI 766341 y JMI 663371) y una susceptible (FMR 11383) de *C. glabrata*, inducidas con 100 µg/mL de VRC durante 4 h y no inducidas (control). La expresión se determinó mediante PCR convencional y qPCR y los niveles de transcripción de cada muestra se normalizaron a *RDN 5.8* utilizando el método $2^{-\Delta Ct}$. Las CMIs de VRC se expresan en µg/mL.

5.1. Perfiles de expresión de los genes *CDR1*, *CDR2*, *SNQ2* y *ERG11* en cepas sensibles y resistentes a voriconazol

Los niveles de transcripción de los genes *ERG11*, *CDR1*, *CDR2* y *SNQ2* se determinaron mediante qPCR en dieciocho cepas de *C. glabrata* sin exposición a VRC. Los valores de Ct obtenidos se normalizaron con los del gen *RDN5.8* utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

ERG11 fue el gen más expresado, con niveles de expresión relativa de 10^{-2} a 10^4 veces respecto al gen endógeno, *RDN 5.8* (**Figura 16**). En el caso de *CDR1*, *CDR2* y *SNQ2* los niveles de expresión fueron inferiores a 10^{-3} respecto al gen endógeno. Sin embargo, no se observó correlación directa entre los niveles de expresión de estos genes y los valores de CMIs de los aislados, y queda en manifiesto como los aislados resistentes no presentan una mayor expresión que los aislados sensibles (**Figura 16**). A pesar de que el análisis estadístico mostró diferencias significativas entre algunas cepas, estas diferencias no mostraron ningún patrón, se observan niveles de expresión similares en cepas con CMIs muy diferentes, o cepas con CMIs bajas presentan niveles altos de expresión de uno o varios genes.

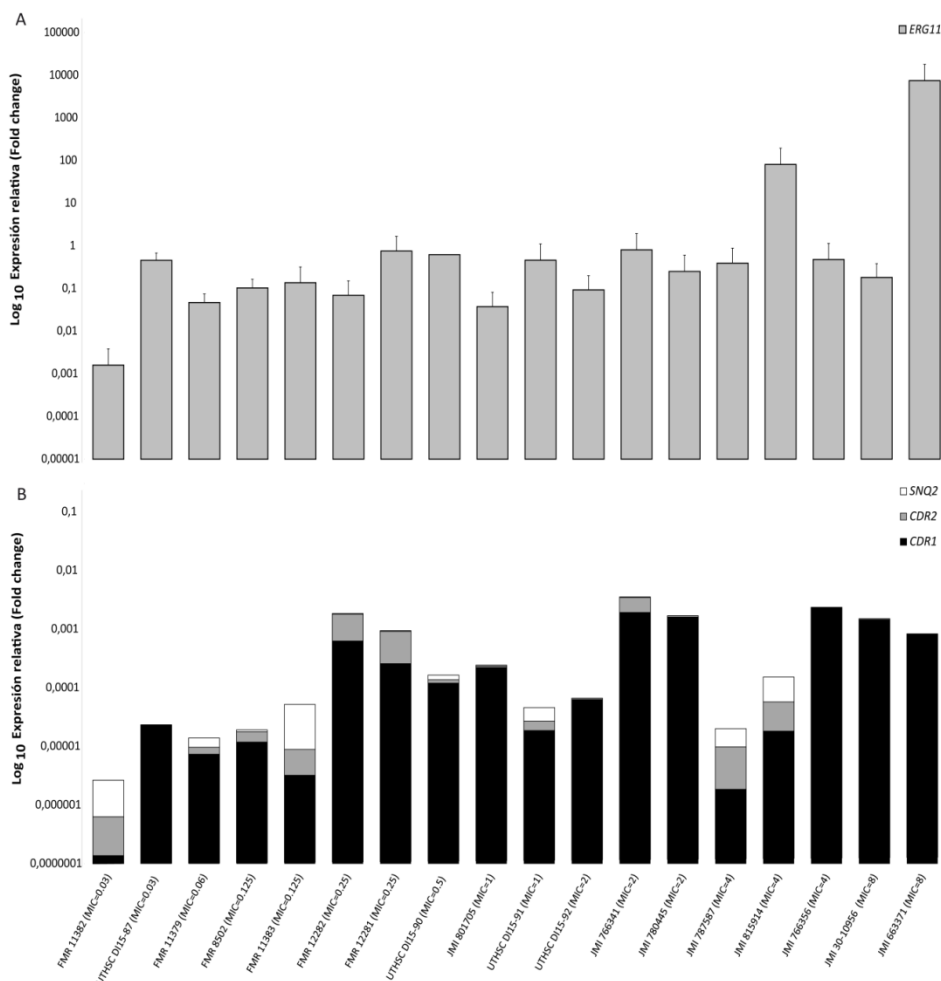


Figura 16. Perfiles de expresión de *ERG11* (A) y *CDR1*, *CDR2* y *SNQ2* (B) determinados por qPCR, en dieciocho cepas de *C. glabrata* cultivadas en condiciones de control. Los valores de transcripción de cada gen se normalizaron a los de *RDN 5.8* utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Las CMI frente a VRC se expresan en $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cada muestra fue analizada por triplicado y se utilizó el análisis estadístico ANOVA de un factor con la prueba de Tukey para múltiples comparaciones.

Considerando que el análisis individual de la expresión génica no mostró una correlación evidente con los valores de CMI de cada cepa, los resultados se analizaron agrupando las cepas en categorías, teniendo en cuenta la sensibilidad *in vitro* y la eficacia del VRC *in vivo* de nuestro estudio anterior (Sanchis y col. 2016). Para ello, las cepas

de *C. glabrata* fueron clasificadas en tres grupos: i) cepas que muestran un fenotipo de tipo sensible *in vitro* y eficacia *in vivo* después del tratamiento con VRC que se denominaron "SS" (n = 4), ii), cepas de fenotipo sensible *in vitro*, pero resistentes *in vivo* que se denominaron "SR" (n = 3), y iii) cepas con resistencia a VRC *in vitro* e *in vivo* que se denominaron "RR" (n = 10).

El grupo formado por cepas resistentes (RR) mostró una expresión significativamente mayor de *CDR1* ($p = 0,013$) y *ERG11* ($p = 0,0036$) en comparación con el grupo SS, formado por cepas sensibles. También se observó una tendencia de mayor expresión de *CDR2* y *SNQ2* en el grupo RR en comparación con el grupo SR, pero en este caso, no se observó una diferencia estadísticamente significativa. Los niveles de expresión génica del grupo SR, formados por cepas sensibles *in vitro* que mostraron resistencia *in vivo*, resultaron superiores que los del grupo SS, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas en ningún caso. La expresión de *ERG11*, *CDR1* y *CDR2* resultó más alta en las cepas reunidas en los grupos SR y RR, en comparación con el grupo SS, y este hecho sugiere una correlación positiva entre los niveles de transcripción y la resistencia al azol (**Figura 17**).

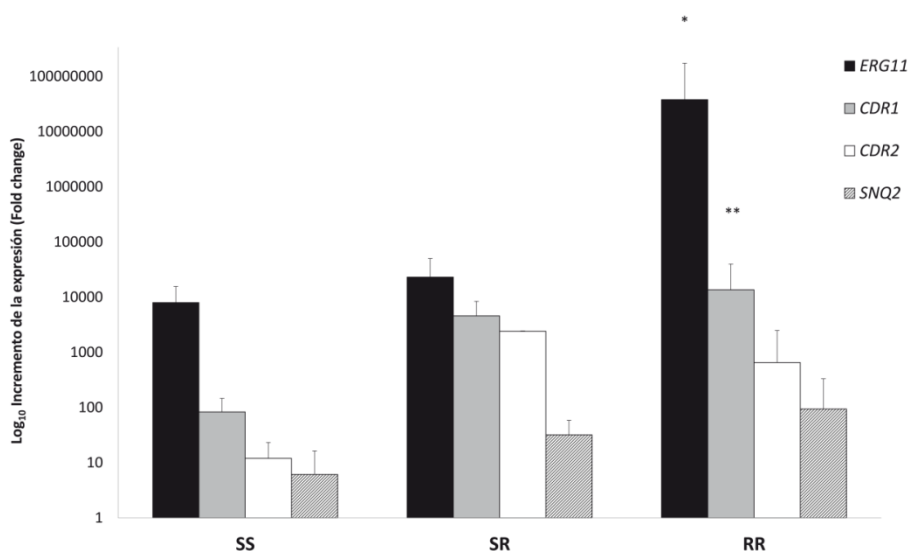


Figura 17. Expresión relativa de *ERG11*, *CDR1*, *CDR2* y *SNQ2* en diecisiete cepas de *C. glabrata* determinada por qPCR.

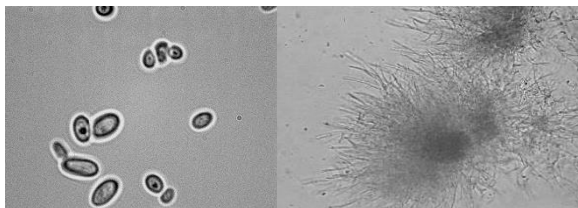
Los valores de Ct de cada gen se normalizaron con los del gen *RDN 5.8* y se expresaron respecto al nivel de expresión de la cepa susceptible FMR 11382 utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Las cepas se clasificaron en: SS, cepas sensibles *in vitro* e *in vivo* a VRC; SR, cepas sensibles solo *in vitro*; y RR, cepas resistentes *in vitro* e *in vivo*. Las barras de error muestran desviaciones estándar de tres experimentos. La expresión relativa se representa como \log_{10} y la comparación entre grupos se realizó mediante la prueba de Mann-Whitney. * $p < 0,05$.

5.2. Análisis de la secuencia de *ERG11*

Para identificar posibles mutaciones puntuales en el gen *ERG11* que den lugar a cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína 14- α -desmetilasa del lanosterol, se secuenció la región codificante del gen de 1.602 pb. El análisis de esta secuencia en dieciocho cepas de *C. glabrata* reveló mutaciones tanto en cepas resistentes (80 %) como sensibles (87,5 %) a VRC, sin embargo ninguna resultó en cambios de aminoácidos de la proteína Erg11 (**Tabla 14**). Se encontraron un total de 49 nucleótidos cambiados en diferentes posiciones en total, siendo

T768C y A1023G las más comunes entre las cepas estudiadas (**Tabla 14**), y dos de ellas se reportan por primera vez en este estudio (A399G y C597T).

ESTUDIO 2: Comparación *in vivo* e *in vitro* de los niveles de expresión de genes implicados en la resistencia a azoles en *Candida parapsilosis*



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS DE RESISTENCIA A AZOLES EN ESPECIES DE CANDIDA NO-ALBICANS

Patricia Navarro Rodríguez

6. Estudio 2: *Candida parapsilosis*

En los últimos años ha habido un aumento de aislados de *C. parapsilosis*, resistentes a azoles. Esta especie ha emergido como un patógeno emergente, siendo el segundo agente causal de candidiasis invasoras más prevalente, tras *C. albicans*. Tras determinar que el VRC no fue eficaz en un modelo murino de candidiasis sistémica por aislados de *C. parapsilosis* sensibles y resistentes a dicho antifúngico, se abordó un estudio de expresión génica analizando los *ERG11* y *CDR1* tras exposición a VRC *in vivo* e *in vitro*. Así como el estudio de mutaciones puntuales en *ERG11* que puedan conferir cambios estructurales en la proteína codificante 14- α -desmetilasa del lanosterol, diana de los azoles.

6.1. Sensibilidad antifúngica *in vitro*

Se llevó a cabo la determinación de CMI de VRC, ITC y PSC frente a 4 cepas clínicas de *C. parapsilosis*. Teniendo en cuenta los PCCs y PCEs establecidos (Espinel-Ingroff y col. 2014), dos cepas presentaron sensibilidad a VRC, una fue resistente y otra de las cepas ensayadas presentó sensibilidad intermedia. La única cepa resistente a VRC, mostró además una CMI superior al PCE establecido para PSC ($\geq 0,25 \mu\text{g/mL}$) mientras que el resto de cepas mostraron CMI inferiores al PCEs para ITC ($\geq 0,5 \mu\text{g/mL}$) y PSC ($\geq 0,25 \mu\text{g/mL}$) (**Tabla 15**).

Tabla 15. Resultados de la sensibilidad antifúngica *in vitro*. Mutaciones en *ERG11* y cambios de aminoácidos en Erg11.

Cepas	CMI ($\mu\text{g/mL}$)			Mutaciones en el gen <i>ERG11</i>	Substituciones de aminoácidos en Erg11p
	VRC	PSC	ITC		
FMR 10292	0,03	0,06	0,12	C602T, G1193T	S201F, R398I
FMR 17181	0,12	0,12	0,12	G1193T	R398I
FMR 17182	0,25	0,12	0,25	A1031C, T1051G, G1193T	K344T, V351L, R398I,
FMR 17180	1	0,25	0,25		

6.2. Eficacia en un modelo murino de candidiasis

La eficacia de VRC (40 mg/kg), PSC (25 mg/kg 2 veces al día) e ITC (50 mg/kg) frente a la infección sistémica por *C. parapsilosis* se determinó mediante la reducción de la carga fúngica en riñón tras el tratamiento de los ratones durante 10 días (**Figura 18**). El tratamiento con VRC redujo significativamente las UFCs en riñón en comparación con su control en la cepa con menor CMI (i.e., cepa FMR 10292 (CMI = 0,03 $\mu\text{g/mL}$)). Sin embargo, el VRC no fue efectivo en los aislados restantes, incluidos aquellos sensibles *in vitro*. El tratamiento con PSC fue efectivo en 3 de las cepas ensayadas, incluida la cepa que mostró una CMI de PSC más alta que el PCE (FMR 17180), aunque este azol no redujo significativamente las UFCs en comparación con el control, en ratones infectados con la cepa FMR 10292, que presenta la CMI de PSC más baja. Por último, el tratamiento con ITC únicamente fue efectivo contra aquellas cepas de menor CMI para este azol (FMR 10292 y FMR 17181).

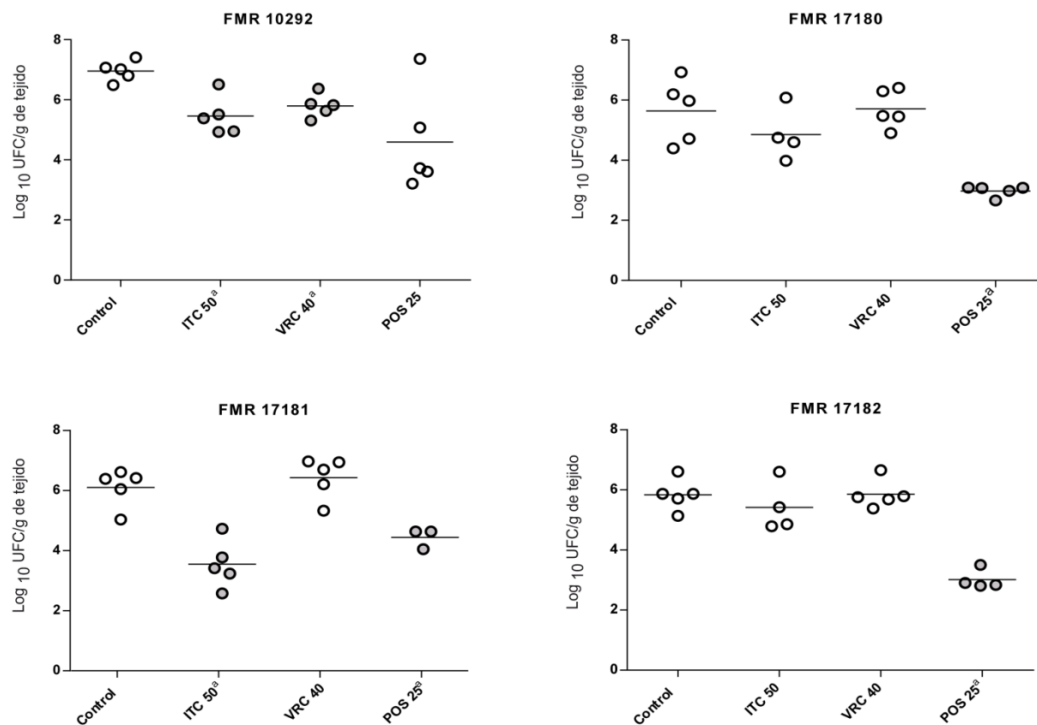


Figura 18. Carga fúngica en riñón de ratones inmunodeprimidos tras 11 días después de la infección con 4×10^6 UFC de *C. parapsilosis*. Control: los animales no recibieron tratamiento. VRC 40: voriconazol oral 40 mg/kg, POS 25 posaconazol oral 25 mg/kg dos veces al día (BID) o ITC 50: itraconazol oral 50 mg/kg. ^a $p < 0,05$ (color gris) en comparación con el grupo control.

6.3. Análisis de la secuencia nucleotídica de *ERG11* y las secuencias de aminoácidos deducidas

Para identificar posibles mutaciones puntuales en *ERG11* que den lugar a cambios de aminoácidos de la proteína codificada, secuenciamos los 1.569 pares de bases de la región codificante del gen. Se realizó una comparación del marco abierto de lectura del gen *ERG11* de las cepas de *C. parapsilosis* con la secuencia de referencia de *C. parapsilosis* CDC317 (CPAR2_303740) obtenida en la base de datos del genoma de *Candida* (<http://www.candidagenome.org/>). El análisis de las secuencias reveló la presencia de cuatro mutaciones (C602T, A1031C, T1051G y G1193T) en tres de las cepas estudiadas, que dieron lugar a las sustituciones de aminoácidos S201F, K344T, V351L y R398I (**Tabla 15**). La mutación G1193T se encontró en todas las cepas (**Figura 19**).

Un análisis comparativo de las secuencias proteicas deducidas de Erg11 de las cepas de *C. parapsilosis* y las ortólogas de *C. albicans* y *S. cerevisiae* reveló que los cambios de aminoácidos S201F, K344T, V351L y R398I en *ERG11* no afectaban a residuos de unión a azol (**Figura 19**). La homología entre Erg11 de *C. parapsilosis* y las ortólogas de *S. cerevisiae* y *C. albicans* fue 65 % y 75 % de identidad, respectivamente. Sin embargo, la cepa que mostró CMI's más altas para los tres compuestos azólicos probados (FMR 17180) no presenta cambios de aminoácidos en su secuencia proteica, lo cual apunta hacia una escasa relación entre polimorfismos de la proteína Erg11 y resistencia a azoles.

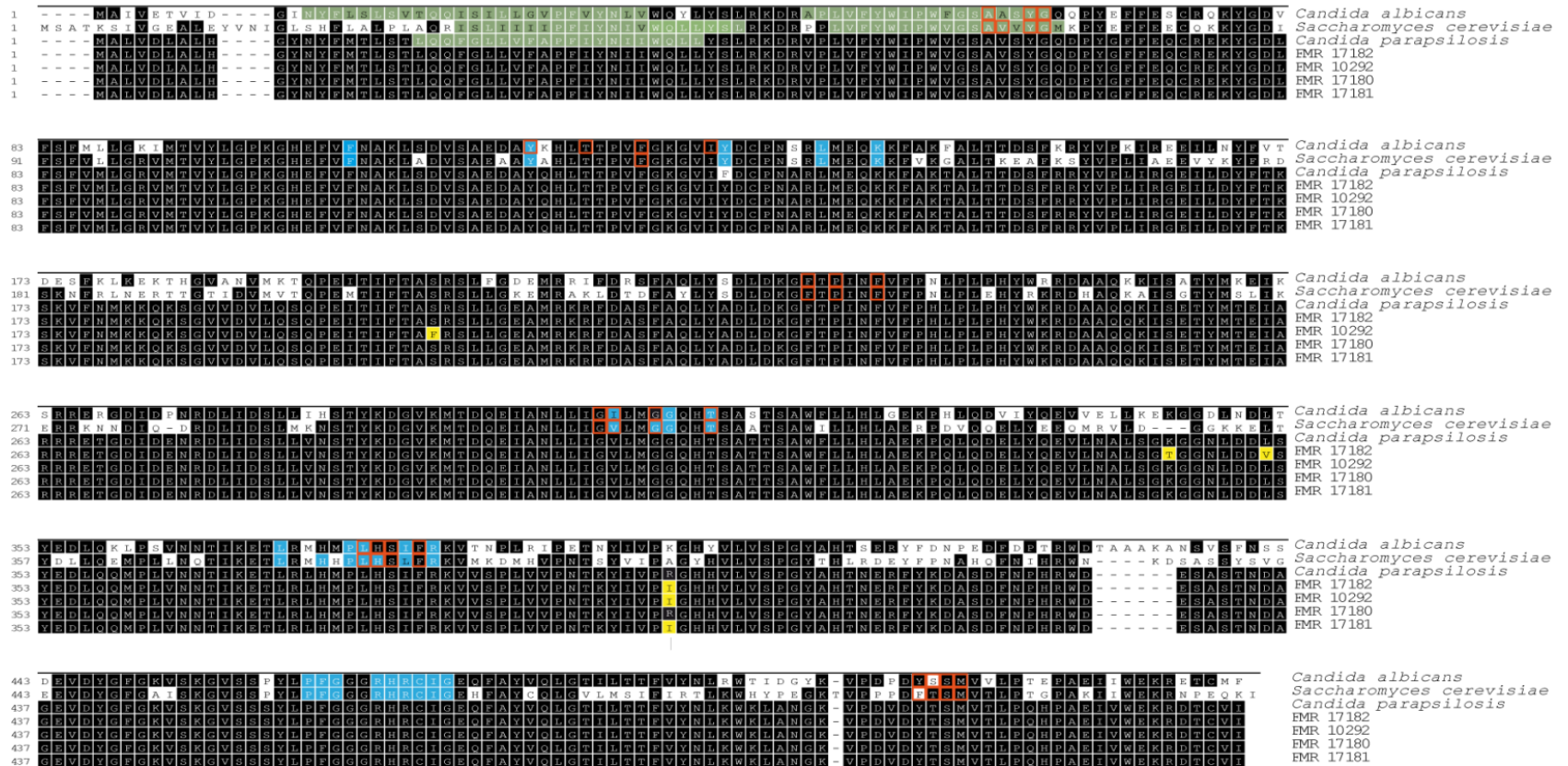


Figura 19. Alineamiento de las secuencias proteicas CYP51 de *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. parapsilosis*.

Los alineamientos se realizaron en el programa MEGALING. En negro se resaltan las regiones conservadas en todas las especies, En gris se resaltan los dominios transmembrana de *S. cerevisiae*, *C. albicans* y *C. parapsilosis*. En azul se resaltan los aminoácidos implicados en la unión al triazol. Los aminoácidos de unión al grupo hemose indican en recuadros naranjas. Los cambios de aminoácidos se resaltan en amarillo.

6.4. Expresión de *CDR1* y *ERG11* en condiciones *in vitro* e *in vivo*

El estudio de eficacia contra candidiasis causada por *C. parapsilosis* en un modelo murino, demostró que el VRC no fue eficaz en tres de las cepas analizadas (75 %), independientemente de la sensibilidad *in vitro* al azol. Con el fin de investigar si los genes putativamente implicados en la resistencia a azoles en *C. parapsilosis* se expresan de manera diferencial tras la exposición a VRC en condiciones *in vitro* e *in vivo*, se cuantificó la expresión de *CDR1* y *ERG11* en cultivos expuestos a 10 µg/µl de VRC y en órganos de ratones infectados sistémicamente con *C. parapsilosis* (4 cepas) y tratados durante 10 días con VRC (40 mg/kg). Los niveles de transcripción obtenidos tras la exposición *in vitro* e *in vivo* se normalizaron con el gen endógeno actina 1 (*ACT1*) utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

La expresión de *ERG11* y *CDR1* *in vitro* después de la exposición reveló que el gen *ERG11* es inducible por VRC en cepas sensibles y resistentes. Los niveles de expresión de *ERG11* fueron estadísticamente más altos después de la exposición al fármaco que en la condición control en todas las cepas. Además, no se encontraron diferencias en los niveles de transcripción del gen *ERG11* entre las cepas analizadas, independientemente de su sensibilidad a VRC, y los niveles de expresión de *CDR1* *in vitro* no se vieron inducidos tras la exposición y fueron más bajos que los de *ERG11* (**Figura 20 A**).

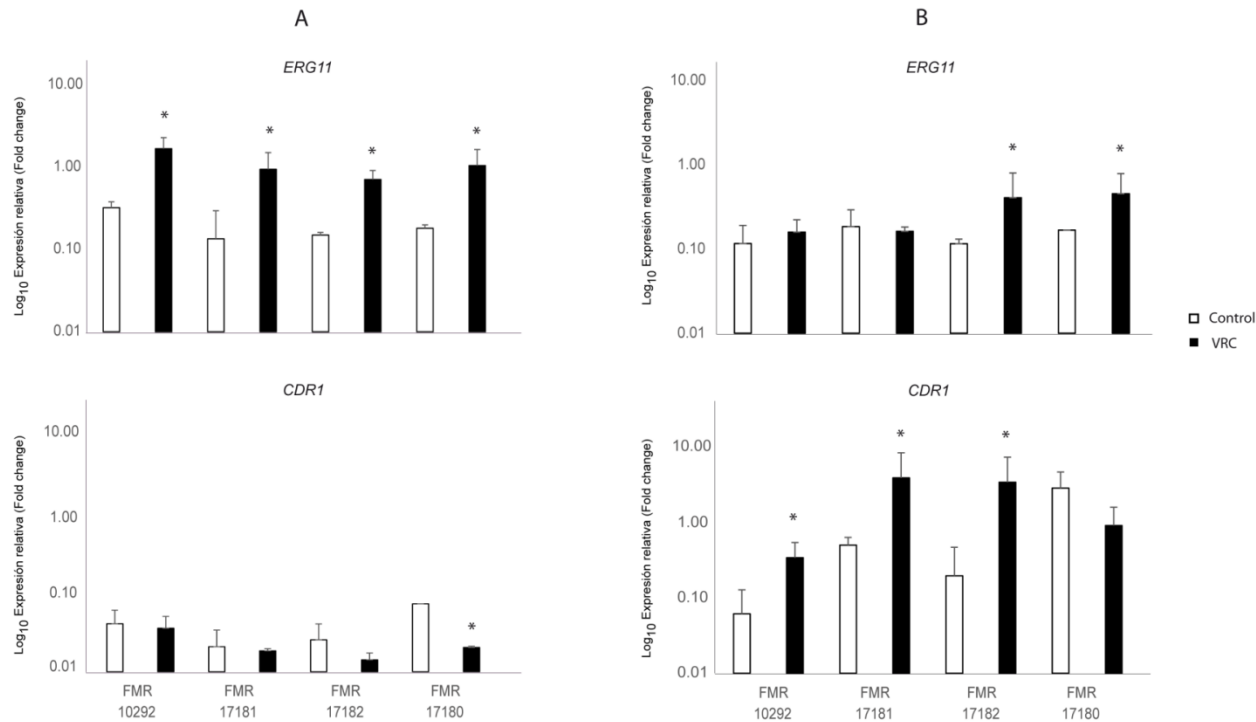


Figura 20. Expresión *in vitro* e *in vivo* de *ERG11* y *CDR1* en *C. parapsilosis*.

A. Perfiles de expresión génica *in vitro* de *CDR1* y *ERG11* en cuatro cepas de *C. parapsilosis* inducidas con 10 µg/mL de VRC durante 4 h (VRC) y no inducidas (control). La expresión se determinó mediante qPCR y los niveles de transcripción de cada muestra se normalizaron a *ACT1* utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. **B.** Perfiles de expresión génica de *CDR1* y *ERG11* en órganos de ratones infectados con las cuatro cepas del estudio, tratados con 40 mg/kg de VRC durante 10 días (VRC) y no tratados (control). La expresión se determinó mediante qPCR y los niveles de transcripción de cada muestra se normalizaron a *ACT1* utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Los patrones de expresión de *ERG11* y *CDR1* *in vivo* fueron notablemente diferentes a los observados *in vitro*. Se observa menor expresión de *ERG11* *in vivo* tanto en condiciones control como tras exposición a VRC. Por el contrario, los niveles de transcripción de *CDR1* durante la infección fueron más altos que los niveles *in vitro*. **(Figura 21 B).**

Las diferencias de expresión de *ERG11* en presencia de VRC *in vivo* en comparación con *in vitro* no resultaron estadísticamente significativas, a excepción de la cepa FMR 10292 cuya CMI a VRC fue la menor y el tratamiento con VRC fue eficaz ($p = 0.008$), donde se observa una represión significativa del gen tras el tratamiento con VRC. Además la sobreexpresión en presencia de VRC *in vivo* fue más moderada, detectándose solo en las cepas FMR17182 y FMR 17180 ($p = 0.029$) **(Figura 21 A).**

Los órganos infectados y tratados con VRC mostraron sobreexpresión de *CDR1* con respecto a los niveles *in vitro* ($p = 0.0286$) **(Figura 21 B)**. Además, el tratamiento de los ratones infectados activó la expresión de *CDR1* en tres cepas de *C. parapsilosis*. Solo la cepa resistente FMR 17180 no mostró sobreexpresión del gen *CDR1* en órganos tratados con VRC, pero los niveles de expresión de este gen fueron más elevados en los órganos infectados y no tratados **(Figura 21 B)**.

En general se observa activación de *CDR1* y una represión de *ERG11* durante la infección de ratón. Los órganos con mayor expresión de *ERG11* mostraron un aumento de 10^{-1} veces respecto al gen endógeno (*ACT1*) y 10 veces en *CDR1* **(Figura 21)**.

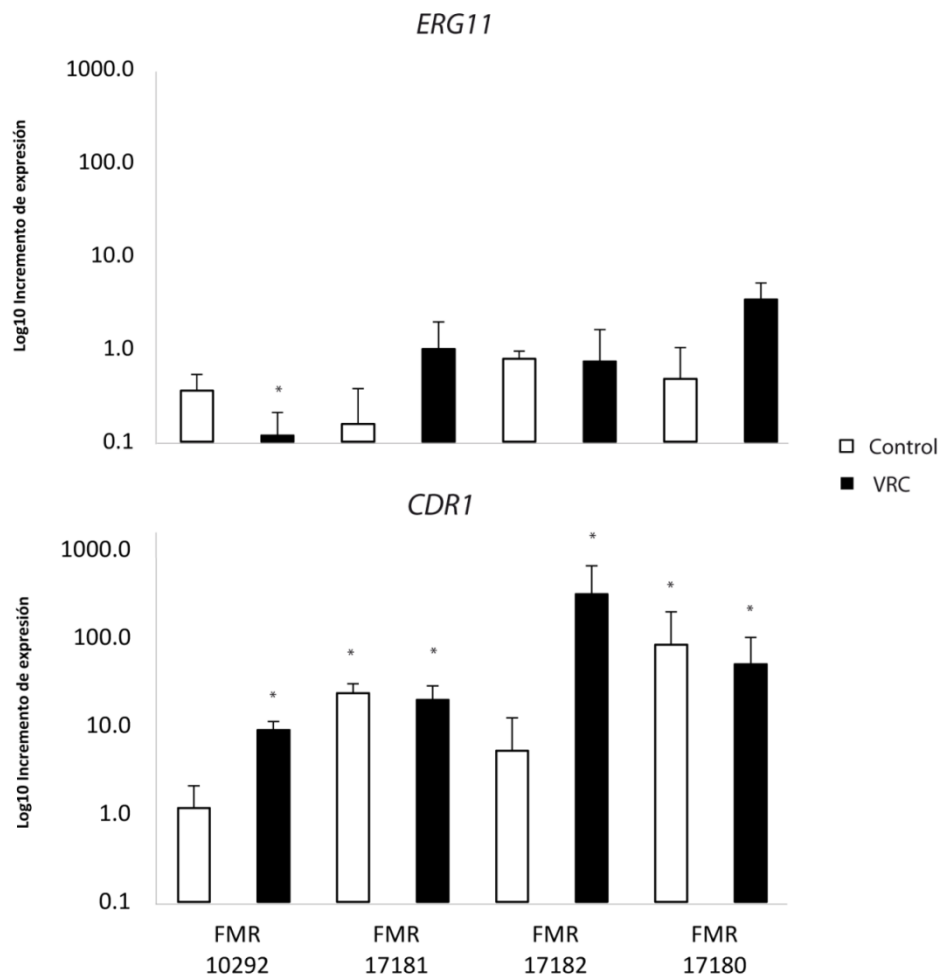
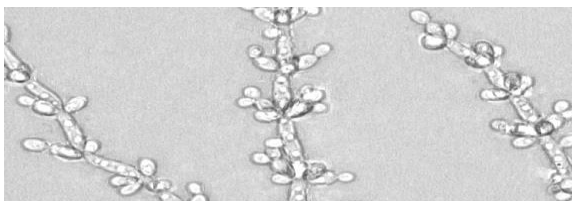


Figura 21. Incremento de la expresión relativa de *ERG11*, *CDR1* *in vivo* respecto *in vitro* determinada mediante qPCR.

Los niveles de transcripción en cada muestra se normalizaron a los de los genes *ACT1* y *B2m* y se expresaron en relación con los niveles normalizados de la condición *in vitro* utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. (*) $p < 0,05$ fue considerado significativo.

ESTUDIO 3: Variación en la expresión y polimorfismos del gen *ERG11* y el contenido de ergosterol en cepas de *Candida tropicalis* y su relación con la resistencia al voriconazol



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS DE RESISTENCIA A AZOLES EN ESPECIES DE CANDIDA NO-ALBICANS

Patricia Navarro Rodríguez

7. Estudio 3: *Candida tropicalis*

C. tropicalis se ha convertido en un patógeno emergente importante causante de candidiasis invasora en todo el mundo con altas tasas de mortalidad asociadas. Para estas infecciones, las equinocandinas se utilizan como tratamiento de primera línea, con el uso de triazoles como alternativas aceptables. Sin embargo, en los últimos años el número de aislamientos resistentes a azoles ha aumentado, convirtiéndose en un grave problema de salud pública. En el presente trabajo, se llevó a cabo la evaluación de los mecanismos de resistencia de dieciocho cepas clínicas de *C. tropicalis* que mostraron un amplio rango de CIMs de VRC. El estudio se centró en la identificación de mutaciones en la secuencia de *ERG11* y la evaluación de los niveles de expresión de dicho gen en condiciones control y tras exposición a VRC. Además, se realizó una caracterización fenotípica de las cepas mediante cuantificación de esteroides totales de membrana y la evaluación de su sensibilidad frente a SDS, un compuesto tóxico que interacciona con la pared celular y desestabiliza la membrana.

7.1. Sensibilidad antifúngica *in vitro*

Se determinaron las CIMs de VRC, ITC y PSC frente a dieciocho cepas de *C. tropicalis*. Según los PCC establecidos para VRC (Pfaller 2012; Orasch y col. 2014), cuatro cepas fueron sensibles ($\leq 0,12 \mu\text{g/mL}$), dos mostraron sensibilidad intermedia ($0,025\text{-}0,5 \mu\text{g/mL}$) y doce fueron resistentes ($\geq 1 \mu\text{g/mL}$). Además, dieciséis cepas mostraron CIMs superiores al PCE establecido para PSC ($\geq 0,25 \mu\text{g/mL}$) y 2 mostraron CIMs más bajas. Quince cepas

presentaron CMI's más altas para el PCE de ITC ($\geq 0,5 \mu\text{g/mL}$) y tres mostraron valores más bajos al PCE (**Tabla 16**).

El 90 % de las cepas con CMI's a VRC superiores al PCC establecido ($\geq 1 \mu\text{g/mL}$), mostraron CMI's más altas que el PCE establecido para ITC PSC. Teniendo en cuenta los PCCs y PCEs establecidos para *C. tropicalis*, once cepas presentan resistencia cruzada a PSC, VRC y ITC.

7.2. Sensibilidad a SDS

Para determinar posibles diferencias en pared y permeabilidad de membrana en las cepas bajo estudio, se cultivaron dieciocho aislamientos clínicos de *C. tropicalis* con un rango de CMI's para VRC de 0,06 a 16 $\mu\text{g/mL}$ en placas de YPD, SM y SM suplementado con 0,0125 y 0,025% de SDS.

En medio YPD, todas las cepas presentaron un crecimiento similar (**Figura 22**). Hubo diferencias en el crecimiento de las cepas en las placas SM suplementadas con SDS, aunque sin una correlación con los valores de CMI. Cabe señalar que las cepas que muestran sensibilidad intermedia o resistencia a VRC crecen mejor en SM suplementado con 0,0125 o 0,025 % de SDS que las cepas sensibles. Este hecho podría estar indicando diferencias en la permeabilidad de la membrana en cepas resistentes y sensibles.

Tabla 16. Resultados de la actividad *in vitro* y la eficacia *in vivo* de VRC.

Cepas	CMI (µg/mL) ^a			Eficacia <i>in vivo</i> de VRC 40 mg/kg p.o ^b .				
				Estudio de carga fúngica		Estudio de supervivencia		
	VRC	PSC	ITC	Día de sacrificio	Log ₁₀ UFC/g de riñones (Control)	Log ₁₀ UFC/g de riñones (VRC)	Mortalidad rango en días (Control)	Mortalidad rango en días (VRC)
FMR 10231	0,06	0,25	1	+5	10,62 ± 0,67	8,2 ± 0,75*	10-14 (13)	14-15 (15)*
FMR 10240	0,06	0,12	0,25	+5	9,7 ± 0,29	7,24 ± 0,64*	5-6 (6)	9 (indefinido)*
FMR 13407	0,06	0,06	0,25	+5	10,02 ± 0,64	7,73 ± 0,82*	4-8 (5)	8-9 (9)*
FMR 8895	0,12	0,12	>16					
FMR 10239	0,25	0,06	>16	+6	10,36 ± 0,72	7,9 ± 0,85*	6-9 (8)	9-14(14)*
FMR 10241	0,25	0,25	0,25	+6	10,11 ± 1,1	7,2 ± 1,53*	6-12 (9)	11-14 (13)*
FMR 12743	1	0,25	2	+5	10,64 ± 0,32	9,13 ± 1,21	3-7 (4)	5-11 (8)
FMR 14049	1	0,12	0,5					
FMR 14771	1	0,25	1					
FMR 14600	1	0,25	2	+5	12,07 ± 0,74	9,7 ± 0,81	4-10 (7)	5-15 (9,5)
FMR 14603	2	0,5	2					
FMR 14769	2	0,5	1					
FMR 14773	2	0,12	0,25	+5	9,8 ± 0,56	10,62 ± 0,72	5-14 (8)	7-13 (7)
FMR 14772	2	0,25	0,5					
FMR 14770	4	0,5	1	+4	8,5 ± 2,01	6,54 ± 1,27*	3-15 (9)	9-14 (9)
FMR 14768	4	0,5	0,5	+5	11,36 ± 0,62	10,50 ± 0,89	6-12 (8)	8-13 (10)
FMR 14602	16	0,25	8	+5	12,25 ± 0,85	9,34 ± 0,58*	5-14 (8,5)	8-15 (8)
FMR 8898	16	>16	16	+5	9,67 ± 0,62	9,22 ± 0,71	5-9 (8)	8-13 (10)

* Valor de p <0,05 ^a CMI: concentración inhibitoria mínima a itraconazol (ITC), posaconazol (PSC) y voriconazol (VRC) ^b Eficacia *in vivo* del VRC administrado por vía oral a 40 mg/kg durante 10 días después de la infección sistémica con 1 x10⁴ UFC/animal de *C. tropicalis*.

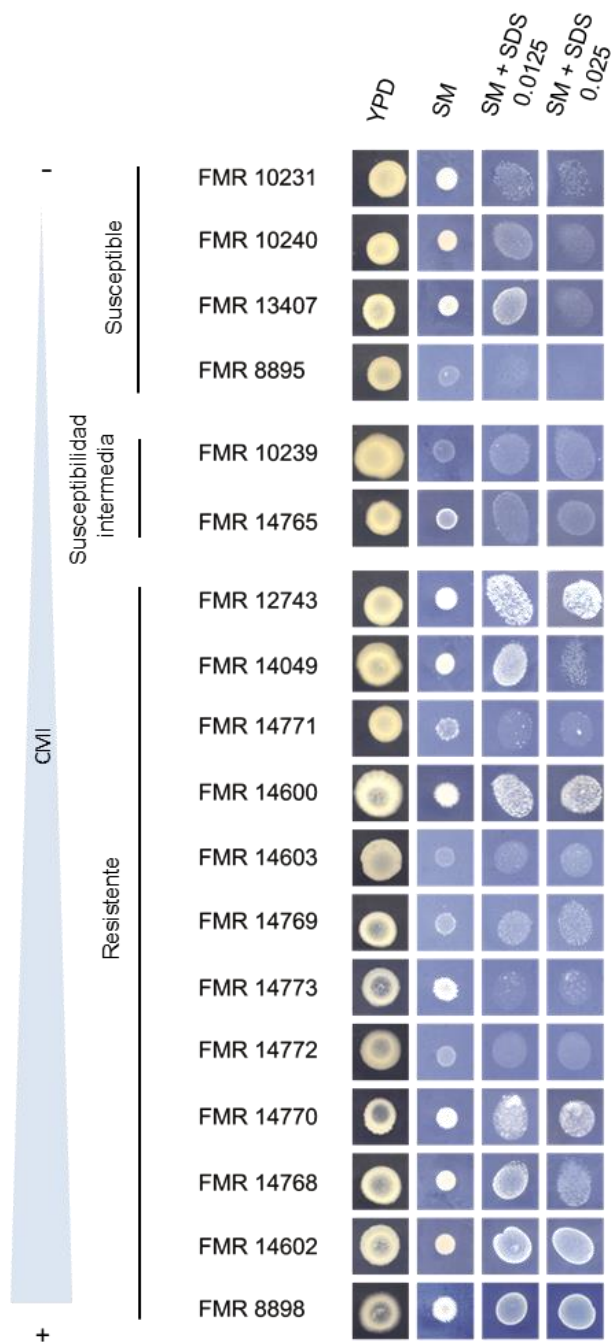


Figura 22. Crecimiento en YPD, en SM y en SM en presencia de 0,0125 y 0,025 % de SDS de *C. tropicalis*. Se inoculó una suspensión de 1×10^4 células.

7.3. Cuantificación del contenido de ergosterol

La cuantificación del contenido de ergosterol y dehidroergosterol (DHE), esterol que sustituye funcionalmente al ergosterol en la membrana celular de *C. tropicalis*, se llevó a cabo en diez aislados representativos. Para ello se seleccionaron cepas teniendo en cuenta los valores de distribución de CMI de VRC y la presencia de mutaciones puntuales en el gen *ERG11*. Se cuantificó el contenido de ergosterol y DHE total respecto al peso húmedo de cada cepa en condiciones de control y tras exposición a 10 µg/mL de VRC. El peso húmedo del sedimento celular fue menor tras la exposición al fármaco $0,7 \pm 0,20$ g que en condiciones control $1,21 \pm 0,17$ g. Dicha reducción del crecimiento/peso, fue mayor en aquellas cepas sensible (45 %) que en las resistentes (25%). En la condición control, es decir en ausencia de azol, el contenido de ergosterol fue similar en todas las cepas analizadas, independientemente de su sensibilidad a VRC (**Figura 23 A**). Nueve cepas mostraron una reducción del 100 % de ergosterol, correspondiente al pico a 281,5 nm. En cambio, las cepas resistentes FMR 8898 y FMR 14768 presentaron una reducción menor de ergosterol (80-85 %) tras la exposición al agente antifúngico. Es importante destacar que en algunos aislamientos resistentes que sufrieron una pérdida del 100 % de ergosterol después de la exposición a VRC, los niveles de DHE se mantuvieron más estables que en las cepas sensibles (compuesto intermedio que absorbe a 230 nm) (**Figura 23 B**).

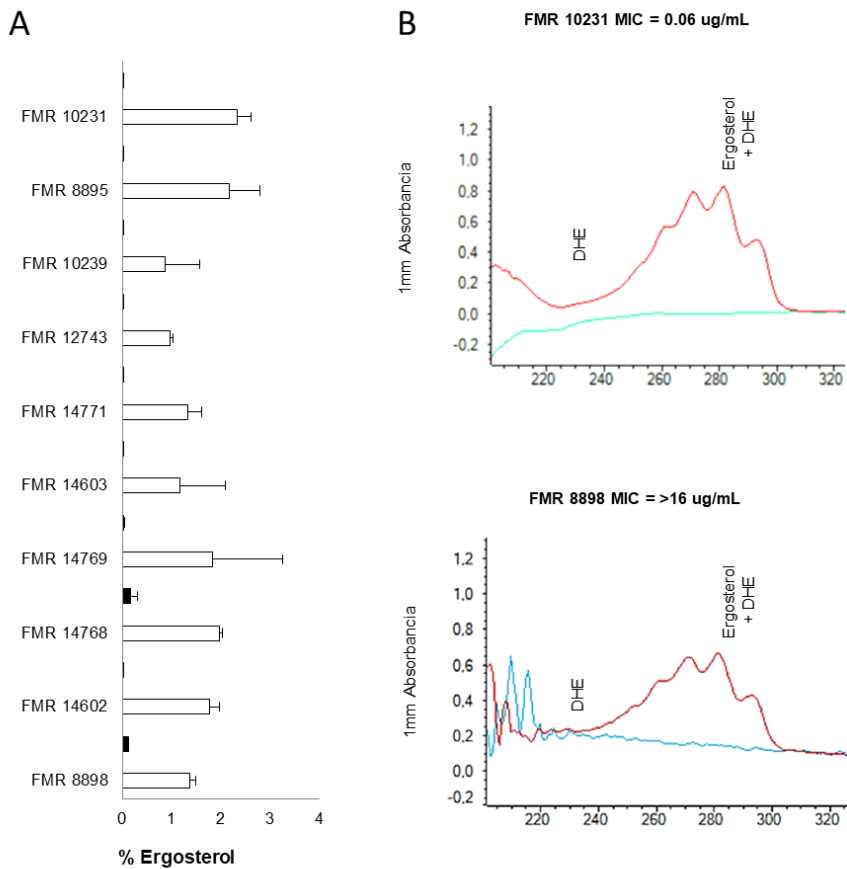


Figura 23. Contenido de ergosterol.

A. Porcentaje del nivel de ergosterol de cepas sensibles y resistentes a VRC en condiciones control y después de 18 h de tratamiento con 10 $\mu\text{g/mL}$ de VRC. Los datos son medias con error estándar de dos experimentos independientes. **B.** Perfiles espectrofotométricos con UV de esteroides de dos cepas representativas de *C. tropicalis*. Los aislamientos se cultivaron durante 18 h en YPG que contenía 0 (curva roja) y 10 $\mu\text{g/mL}$ de VRC (curvas verde y azul). Se determinaron los perfiles espectrales entre 230 y 300 nm.

Tabla 17. Contenido de DHE en diez aislados de *C. tropicalis*.

Cepa	% de DHE en la condición control	% de DHE en la condición VRC
FMR 10231	0,05 ± 0,06	0 ± 0
FMR 8895	0,09 ± 0	0 ± 0
FMR 10239	0,5 ± 0,59	0 ± 0
FMR 12743	0,06 ± 0,84	0 ± 0
FMR 14771	0,06 ± 0,05	0 ±
FMR 14603	0,7 ± 0,098	0,1 ± 0,13
FMR 14769	0 ± 0	0,5 ± 0,71
FMR 14768	0,07 ± 0,098	0,3 ± 0,4
FMR 14602	0,4 ± 0,07	0 ± 0
FMR 8898	0,2 ± 0,19	0,4 ± 0,56

El contenido medio de DHE de las células se expresa como un porcentaje del peso húmedo de las células. ± La desviación estándar de dos conjuntos de experimentos.

7.4. Eficacia del voriconazol en un modelo murino de candidiasis invasora

La eficacia del VRC se determinó mediante el estudio de la supervivencia de los ratones durante 15 días y la carga de hongos en los riñones de ratones infectados con 12 cepas seleccionadas de *C. tropicalis* (**Tabla 16**). El VRC mejoró significativamente la supervivencia de los ratones infectados con cualquiera de las cepas sensibles ($CMI \leq 0,12 \mu\text{g/mL}$) y también en aquellos infectados con cepas que presentaron sensibilidad intermedia ($CMI = 0,25 \mu\text{g/mL}$). Los ratones infectados con aquellas cepas que muestran CMIs más altas que el PCC no respondieron a la terapia en ningún caso. La reducción de la carga se logró en todos los ratones infectados con cepas que mostraron CMIs inferiores a PCC ($CMI \geq 1 \mu\text{g/mL}$). En cuanto a los ratones infectados con aislados resistentes el

tratamiento con VRC fue efectivo parcialmente reduciendo la carga fúngica en dos casos (FMR 14602 y FMR 14770), pero no se observó prolongación de la supervivencia.

7.5. Análisis de la secuencia nucleotídica de *ERG11* y las secuencias de aminoácidos deducidas

Para identificar posibles mutaciones puntuales en *ERG11* que dan lugar a cambios de aminoácidos de la proteína codificada, se secuenció la región de codificante del gen (1.584 pb). La comparación de las secuencias de *ERG11* de las dieciocho cepas de *C. tropicalis* en estudio con la correspondiente secuencia de referencia disponible en el GenBank (número de acceso M23673) reveló la presencia de mutaciones puntuales en dos aislados resistentes (FMR 14602, FMR 14603) y una delección en una cepa resistente (FMR 8898).

Las cepas resistentes a VRC FMR 14602 y FMR 14603 mostraron mutaciones puntuales en *ERG11* correspondientes a las sustituciones de aminoácidos D448G y D445V, respectivamente **Figura 24**. Se detectó una eliminación de un solo nucleótido en la posición 1.172 en *ERG11* de la cepa FMR 8898, resultando en un cambio del marco abierto de lectura que causó cambio de ocho aminoácidos y un codón STOP prematuro. En consecuencia, la secuencia proteica presenta un acortamiento de 126 aminoácidos ($\Delta 126aa$) en el extremo C-terminal (**Figura 25**).

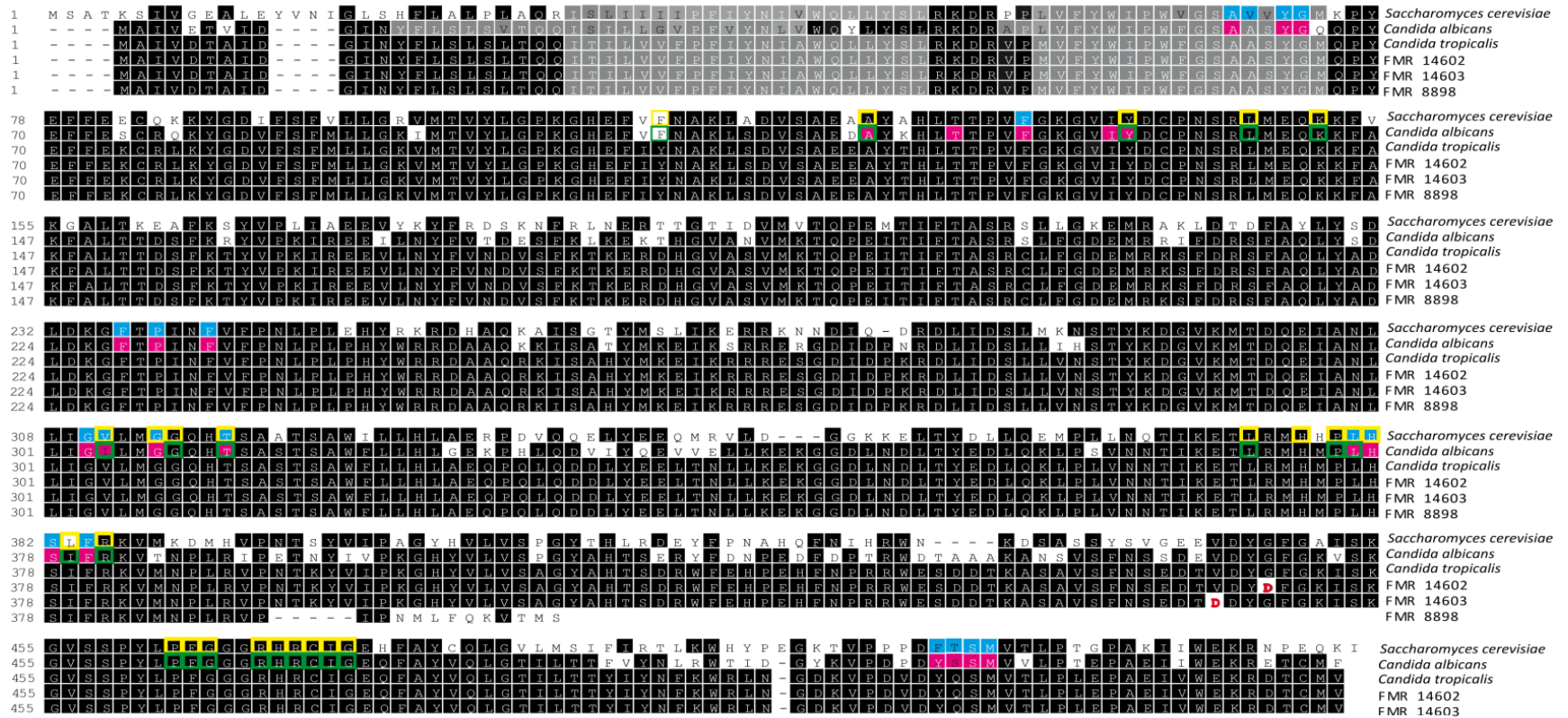


Figura 24. Alineamiento de las secuencias proteicas CYP51 de *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. tropicalis* y las cepas de *C. tropicalis* que presentan mutaciones puntuales en el gen *ERG11*.

Los alineamientos se realizaron utilizando el programa MEGALING. En negro se resaltan las regiones conservadas. En gris, se muestran los dominios transmembrana de *C. albicans* y *S. cerevisiae*. En azul se indican los aminoácidos involucrados en la unión al triazol de *S. cerevisiae* y en rosa de *C. albicans*. Los residuos de unión al grupo hemo en *S. cerevisiae* y *C. albicans* se resaltan en amarillo y verde, respectivamente. Las sustituciones de aminoácidos están marcadas en rojo.

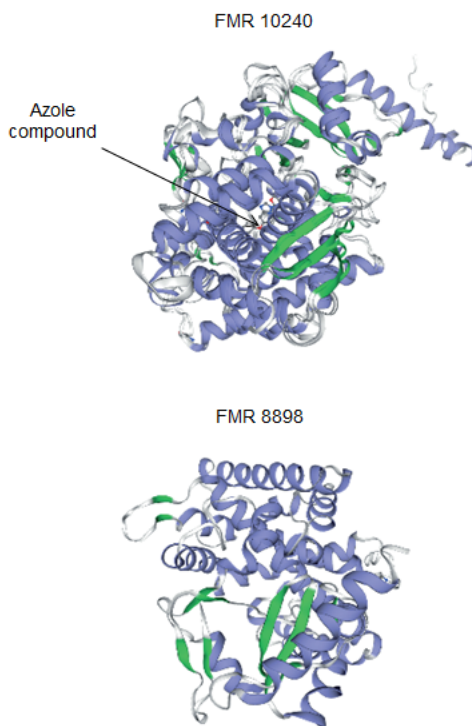


Figura 25. Comparación entre la secuencia Erg11p de la cepa de tipo susceptible, FMR 10240 y la cepa resistente que muestra la eliminación de 126 aminoácidos, FMR 8898. La estructura tridimensional de las proteínas se diseñó con el programa en línea SWISS-MODEL. En azul, se observa la α -hélices y en verde la β -láminas de la proteína deducida.

Las secuencias de proteínas deducidas de *C. tropicalis* se analizaron y los dominios conservados, sitios activos y residuos de unión al azol en *ERG11* fueron identificados mediante un análisis comparativo con las proteínas ortólogas de *C. albicans* (C5-006600cp_a) y *S. cerevisiae* (YHR007C). La proteína Erg11 de *C. tropicalis* mostró un porcentaje de identidad elevado con *C. albicans* (67 %) y *S. cerevisiae* 84 %, respectivamente.

Como se observa en la **Figura 24**, la ausencia de 126 aminoácidos en el gen *ERG11* en la FMR 8898 afecta a la region de

unión al grupo hemo, así como a la unión al compuesto azólico. Además, la estructura tridimensional de la proteína predicha de la cepa FMR 8898, mostró grandes diferencias con la cepa de tipo salvaje FMR 10240 (**Figura 25**). Todo ello apunta que estos cambios estructurales podrían comprometer la afinidad a azoles y podría estar directamente relacionado con el perfil de resistencia presentado por esta cepa. Las secuencias de nucleótidos completas del *ERG11* de FMR 8898, FMR 14602 y FMR 14603, y sus secuencias de aminoácidos deducidas se han depositado en la base de datos ENA (European Nucleotide Archive) con los números de acceso LR030273, LR030275 y LR030274, respectivamente.

7.6. El gen *ERG11* es inducible por voriconazol en cepas resistentes y sensibles

Para llevar a cabo los estudios de expresión, se evaluó la cinética de crecimiento de *C. tropicalis*, lo cual permitió determinar que su fase de crecimiento exponencial era entre 6-8 h (**Figura 26 A**). Por tanto, se estableció 8 h de crecimiento del preinóculo inicial. Los perfiles de expresión de *ERG11* tras 6 h de exposición a diferentes concentraciones de VRC, 1 µg/mL, 10 µg/mL o 100 µg/mL, no revelaron un aumento en los niveles de transcripción en comparación con los controles sin azol. Sin embargo, se detectó un aumento en la transcripción cuando las cepas se expusieron a las mismas concentraciones de fármaco durante 18 horas (**Figura 26 B**).

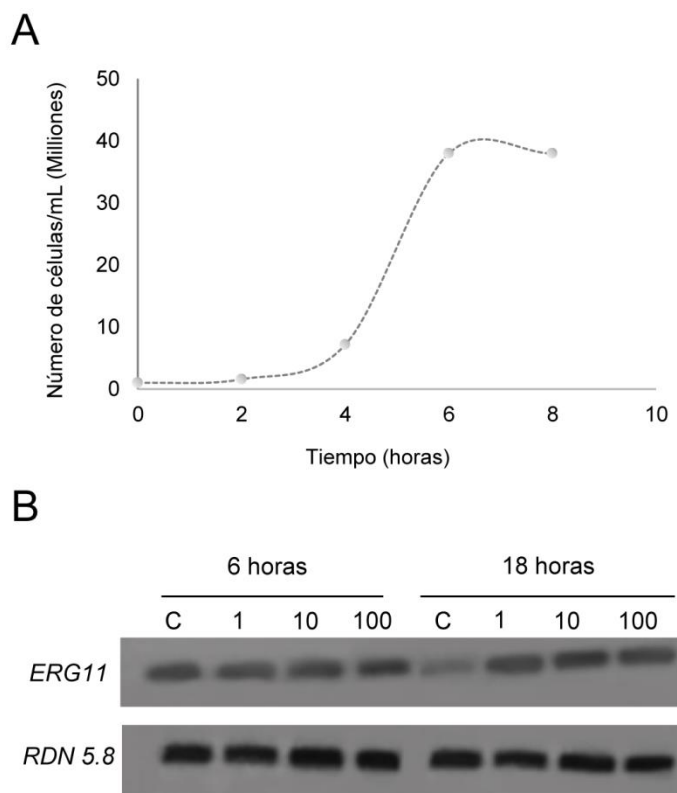


Figura 26. A. Curva de crecimiento de *C. tropicalis*. B. Expresión de *ERG11* y el gen de referencia RDN5.8 en condición control (C) y en presencia de 1, 10 o 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ durante 6 o 18 h de incubación, en la cepa FMR 14602 resistente de *C. tropicalis* determinada mediante PCR convencional.

La inducción con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de VRC durante 18 h se estableció como condición óptima para llevar a cabo estudios de expresión. Los niveles de transcripción del gen *ERG11* se cuantificaron mediante qPCR para identificar diferencias en la expresión génica entre condiciones basales y tras la exposición al fármaco (**Figura 27**). Los niveles de transcripción de *ERG11* después de la exposición a VRC fueron mayores que en la condición control en 16 de las 18 cepas estudiadas. Las cepas con mayor expresión de *ERG11* en condición

de control mostraron una expresión igual que el gen endógeno, *RDN 5.8* (**Figura 27**). Los valores de expresión más altos se observaron en una cepa resistente tras la exposición a VRC, siendo 10 veces mayor que la expresión del gen endógeno. Bajo la exposición al fármaco, en el resto de las cepas los valores de expresión fueron más bajos, presentaron unos valores 10^{-2} veces más respecto al gen endógeno o con una expresión igual que este, independientemente de su sensibilidad a VRC. El gen *ERG11* se sobreexpresó significativamente en el 95 % de las cepas después de la exposición a VRC (valor de $p < 0,05$).

Resultados

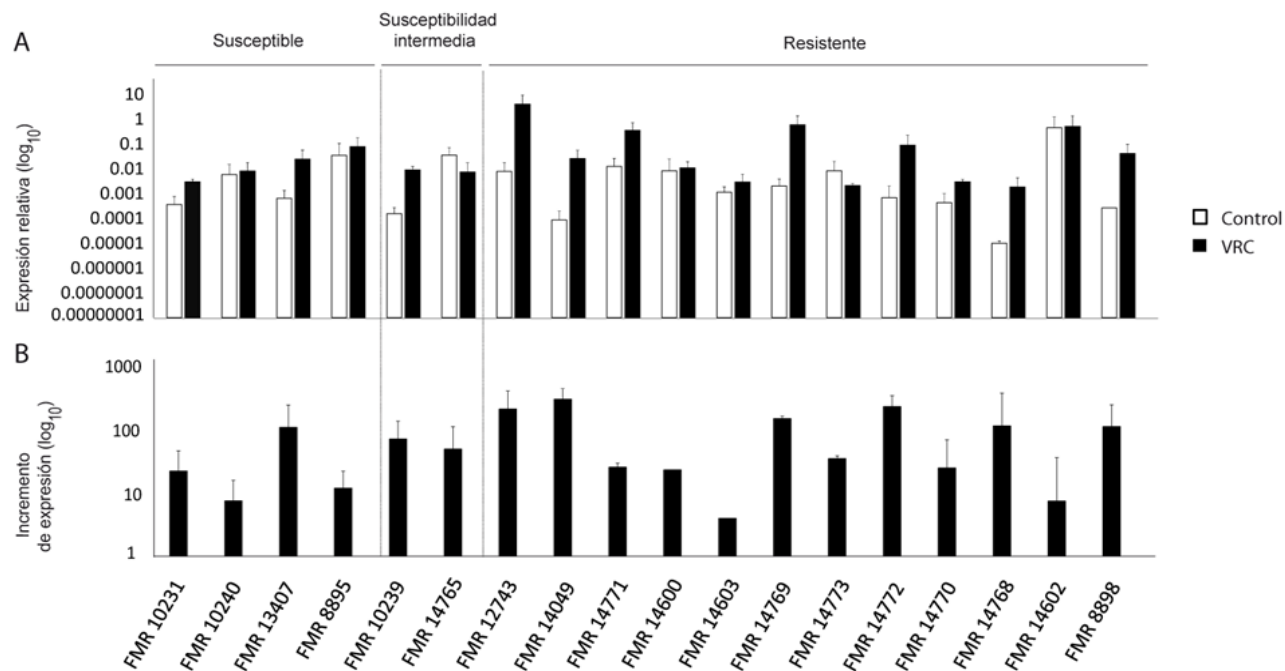


Figura 27. Niveles de expresión de *ERG11* de dieciocho aislados de *C. tropicalis* en presencia de VRC.

A. Expresión relativa del gen *ERG11* inducido con 10 µg/mL de VRC durante 18 horas y sin voriconazol en dieciocho cepas de *C. tropicalis* determinada por qPCR. Los niveles de transcripción de cada muestra se normalizaron con respecto al gen endógeno *RDN 5.8* utilizando el método 2^{-ΔΔCt}. **B.** Inducción de *ERG11* tras exposición a 10 µg/mL de VRC durante 18 h, en dieciocho cepas de *C. tropicalis* determinada mediante qPCR. Los niveles de transcripción en cada muestra se normalizaron con respecto al gen *RDN 5.8* y se expresan respecto al control sin antifúngico utilizando el método 2^{-ΔΔCt}.



DISCUSIÓN



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS DE RESISTENCIA A AZOLES EN ESPECIES DE CANDIDA NO-ALBICANS

Patricia Navarro Rodríguez

8. DISCUSIÓN

La candidiasis invasora continúa siendo un problema creciente de salud a nivel mundial, provocando una elevada morbilidad y mortalidad a pesar de los avances en el diagnóstico y el desarrollo de guías terapéuticas. Los azoles, concretamente FLC y VRC son los antifúngicos más comúnmente usados en la mayoría de infecciones producidas por *C. albicans*, la especie más relevante del género (Pfaller y col. 2014). Estos fármacos inhiben la 14- α -esterol desmetilasa del lanosterol, codificada por el gen *ERG11*, que es una enzima involucrada en la biosíntesis del ergosterol, indispensable para la correcta función de las membranas celulares fúngicas (Solanko y col. 2018).

Las causas de la elevada mortalidad en pacientes con candidiasis invasora son diversas. La inespecificidad de la sintomatología comporta un retraso en su diagnóstico y por tanto del inicio del tratamiento apropiado (Calandra y col. 2016). En este sentido, los hemocultivos son sólo positivos en el 50-70 % de casos de candidiasis invasora y las técnicas no basadas en cultivo i.e., inmunoensayo para la detección de β -D-glucano o mananos, técnicas moleculares como la detección por PCR o técnicas serológicas como la detección de anticuerpos, presentan una limitada sensibilidad. Además, las pruebas de sensibilidad a antifúngicos pueden demorarse varios días. Otra problemática, se debe al cambio en la epidemiología de esta infección. Si bien la especie mayormente involucrada en la candidiasis invasora es *C. albicans*, en los últimos años estamos asistiendo a un aumento de infecciones por *Candida* no-*albicans*, algunas de ellas intrínsecamente resistentes a los azoles (Oxman y col. 2010; Lortholary

y col. 2011; Fothergill y col. 2014), que reducen las opciones terapéuticas. A este escenario hay que añadir el aumento de especies de *Candida* que han adquirido mecanismos de resistencia a antifúngicos como consecuencia a la previa exposición clínica o ambiental a compuestos azólicos. El estudio de los mecanismos de resistencia a los antifúngicos en *Candida* ha recibido especial interés en los últimos años debido al aumento de cepas resistentes a los azoles, así como multiresistentes, aisladas en pacientes con candidiasis invasora. El uso generalizado de fármacos, especialmente azoles, para el tratamiento y profilaxis de la candidiasis invasora se postula como la principal causa del desarrollo de resistencias (Perlin y col. 2017) .

Los principales retos en el tratamiento de la candidiasis invasora a día de hoy, incluyen las relativamente pocas herramientas terapéuticas, el cambio en la epidemiología con especies emergentes y la resistencia a los fármacos, ya sea intrínseca o adquirida. La mayoría de estudios sobre los mecanismos que conducen a la adquisición de resistencia, se han centrado principalmente en *C. albicans* por ser la especie más frecuente, quedando en un segundo plano el estudio de otras especies. En la presente tesis hemos abordado el estudio los mecanismos de resistencia a VRC de las especies *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* y como éstos afectan a la susceptibilidad antifúngica y la eficacia de los tratamientos.

8.1. *Candida glabrata*

Candida glabrata muestra una sensibilidad disminuida intrínseca a los compuestos azólicos, además en comparación a otras especies como *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*, presenta una mayor frecuencia de adquisición de resistencia a dichos compuestos (Pfaller y col. 2006) incluido el isavuconazol, el más reciente de la familia de los triazoles (Fidel y col. 1999; Vermitsky y Edlind 2004; Oxman y col. 2010; Pfaller y col. 2014; Fidel y col. 1999; Lee y col. 2009), motivo por el que es una de las especies más frecuentes en pacientes que reciben tratamiento profiláctico con estos fármacos (Bennett y col. 2004; Imhof y col. 2004; Hachem y col. 2008). Esto hace que las candidiasis causadas por esta especie sean motivo de gran preocupación (Manzano-Gayosso y col. 2003; Chapeland-Leclerc y col. 2010; Hull y col. 2012; Pfaller y col. 2012; Cho y col. 2015). Además, el porcentaje de resistencia cruzada entre FLC y VRC es muy alto en *C. glabrata* (83 %), un hecho que también se ha observado en el presente estudio.

Si bien la resistencia a los azoles en especies del género *Candida* tales como *C. albicans* y *C. tropicalis* se ha relacionado directamente con la presencia de mutaciones en el gen *ERG11* (Lackner y col. 2014); en el caso de *C. glabrata* no parece ser el mecanismo predominante, ya que la mayoría de las cepas resistentes carecen de sustituciones aminoacídicas en Erg11 (Caban y col. 2016; Nabili y col. 2016; Silva y col. 2016). Tan sólo dos casos de sustitución de aminoácidos en Erg11 se han reportado (G236V y G315D), ambas responsables de conferir resistencia cruzada a FLC y VRC, en dos aislados de *C. glabrata* (Hull y col. 2012; Nabili y col. 2016). Nuestros resultados confirman la baja

frecuencia de mutaciones que comporten cambio de aminoácidos en *C. glabrata*.

Mediante secuenciación de *ERG11* de 18 cepas de *C. glabrata* representantes de la escala de CMI de VRC (de 0,03 µg/mL a 8 µg/mL) detectamos ausencia de mutaciones no sinónimas, es decir, ninguna cepa presentaba cambios de aminoácidos en su proteína Erg11. Los resultados, sin embargo, mostraron numerosas mutaciones puntuales sinónimas presentes en el 83 % de las cepas, independientemente de la CMI. En el caso de algunos aislados se detectaron hasta 6 sustituciones sinónimas. Si bien, el impacto de las mutaciones sinónimas ha sido siempre considerado como neutral, recientes estudios apuntan a que pueden tener un no menos apreciable impacto en la célula. Estos cambios pueden repercutir en la estructura, estabilidad y unión del ARN mensajero a proteínas, inclusive en su ratio de traducción alterando la dinámica celular (Agashe y col. 2016).

El papel de la sobreexpresión de *ERG11* en la resistencia a azoles ha sido poco estudiado en *C. glabrata*, y los escasos resultados publicados sugieren que no existe una correlación directa (Panackal y col. 2006; Lackner y col. 2014; Sanguinetti y col. 2015; Caban y col. 2016). Tan sólo se han reportado dos aislados clínicos de *C. glabrata* con sobreexpresión aumentada de *ERG11* (vanden Bossche y col. 1992; Redding y col. 2003), tras la exposición a FLC en un aislado que presentaba la duplicación del cromosoma el cual contiene *ERG11*, pero el fenotipo resistente se perdió con el traspaso a medios libres del referido azol (Marichal y col. 1999). Nuestros resultados no mostraron diferencias en la expresión de *ERG11* entre cepas con diferente sensibilidad a VRC, ni en condiciones de crecimiento estándar ni en

presencia del azol confirmando los resultados previamente publicados por otros autores. Sin embargo, la generación de aislados mutantes carentes de genes que codifican proteínas de la ruta de biosíntesis de ergosterol en *C. glabrata*, han permitido confirmar la capacidad de este patógeno de crecer con esteroides intermediarios, lo que implica la evasión del efecto tóxico del tratamiento con azoles. Además, *C. glabrata* es capaz de absorber los esteroides exógenos para así continuar la biosíntesis de esteroides de la membrana celular (Nakayama y col. 2000), tanto cuando la vía de biosíntesis del ergosterol está bloqueada como en condiciones normales. Este proceso se ha observado incluso en cepas que no presentan mutaciones (Tsai y col. 2004; Bard y col. 2005).

La resistencia a azoles en cepas clínicas de *C. glabrata* se ha relacionado principalmente con la presencia de mutaciones con ganancia de función (GOF) en el factor de transcripción Pdr1 (Vermitsky y col. 2004). Estas mutaciones dan como resultado la sobreexpresión de una amplia gama de genes, incluidos los transportadores ABC, aunque no se ha encontrado una correlación entre la localización de la mutación y la expresión génica alterada (Tsai y col. 2006; Ferrari y col. 2009; Caudle y col. 2011; Paul y col. 2014). En estudios recientes ha sido demostrado que los genes *RTA1* y *RSB1* activados por *PDR1*, están sobreexpresados en aislamientos clínicos de *C. glabrata* (Tsai y col. 2010; Caudle y col. 2011). Teniendo en cuenta que en *C. albicans* se ha demostrado que los genes *RTA2* y *RTA3* están implicados en la resistencia a los azoles (Jia y col. 2008; Whaley y col. 2016), es probable que también lo estén en la resistencia a azoles en *C. glabrata*. La adquisición de mutaciones de *PDR1* podría

también deberse a la alta incidencia de mutaciones en el gen de reparación de desajustes *MSH2* (Healey y col. 2016). Pero actualmente, solo tres de los transportadores ABC que son regulados transcripcionalmente por *PDR1*; *CDR1*, *PDH1 (CDR2)* y *SNQ2*, se han relacionado directamente con la resistencia a los azoles en *C. glabrata* (Miyazaki y col. 1998; Sanglard y col. 1999; Sanglard y col. 2001; Vermitsky y col. 2004; Sanguinetti y col. 2005; Torelli y col. 2008; Ferrari y col. 2009; Caudle y col. 2011; Vale-Silva y col. 2015; Farahyar y col. 2016; Whaley y col. 2018). Aunque su inhibición no provoca un aumento de la sensibilidad contra todos los azoles (Nagayoshi y col. 2017). La participación de *PDR1* en la resistencia podría involucrar otros mecanismos, no estudiados, además de la activación de las bombas de eyección. De hecho, la generación de cepas defectivas en *CDR1*, *PDH1 (CDR2)* y *SNQ2* confirió sensibilidad a FLC a una cepa inicialmente resistente, sin embargo la eliminación de *PDR1* otorgó un mayor aumento de la sensibilidad *in vitro* a dicho aislado (Whaley y col. 2018). También ha sido investigado el papel de otros genes en la resistencia a azoles de *C. glabrata*, tales como los transportadores ABC *YBT1* y *YOR*, ya que habían mostrado una expresión alterada en cepas con baja sensibilidad a FLC. Sin embargo, la contribución de dichos genes en la resistencia a los azoles parece ser menor que la de *CDR1* y *CDR2* (Paul y col. 2014). La resistencia a azoles en *C. glabrata* también se ha atribuido a la aparición de células que habrían perdido la función mitocondrial, y esto resultaría en una deficiencia respiratoria (Defontaine y col. 1999; Brun y col. 2003). Este fenotipo se ha observado en cepas de origen clínico, pero no es común (Bouchara y col. 2000; Ferrari y col. 2011). La resistencia por pérdida de función mitocondrial se ha atribuido a la sobreexpresión de los transportadores

ABC *CDR1*, *CDR2* y *SNQ2* (Sanglard y col. 2001; Ferrari y col. 2011). Además estas células muestran perfiles de esterol alterados con una cantidad desproporcionadamente alta de ergosterol y muy poca cantidad de intermediarios del mismo. Sin embargo, no se han detectado cambios en la secuencia de *ERG11* ni en su expresión (Brun y col. 2004).

En el presente estudio hemos podido demostrar que la sobreexpresión de los genes *ERG11*, *CDR1*, *CDR2* y *SNQ2* no se correlacionaba directamente con las CMI de VRC. Con la finalidad de establecer un nexo entre dicho perfil transcripcional y resistencia a VRC, integramos los datos moleculares y las CMI obtenidas en nuestros aislados con la eficacia del VRC en el tratamiento de la candidiasis por *C. glabrata* en modelos murinos. Teniendo en cuenta los PCE de VRC para *C. glabrata* agrupamos las cepas en sensibles y resistentes *in vitro* y según la eficacia obtenida en el modelo animal en sensible y resistentes *in vivo*. De ésta manera observamos que las cepas resistentes *in vitro* e *in vivo* (RR) presentaron una expresión significativamente mayor de *CDR1* y *ERG11* que las cepas con ambos fenotipos sensibles (SS) mientras que en el caso de *CDR2*, *SNQ2* observamos una tendencia de sobreexpresión en las cepas RR, aunque esta diferencia no es significativa. El grupo SR presente un patrón intermedio de expresión, en el que hay una expresión similar al grupo RR de *CDR1* y *CDR2*, pero el gen *ERG11* presenta niveles de expresión al grupo SS. De estas observaciones puede deducirse que los mecanismos que subyacen a la resistencia a los azoles en *C. glabrata*, pueden ser debidos a un complejo equilibrio entre la expresión de genes implicados en la síntesis de ergosterol y la de

genes relacionados con sistemas de detoxificación celular como son las bombas de eyección. Estos resultados ponen de manifiesto, que el fenómeno de resistencia a VRC en *C. glabrata* puede ser consecuencia de ligeros cambios en la expresión génica de genes relacionados con la resistencia a azoles en otras especies. Analizados individualmente en diseños *in vitro*, la expresión de estos genes no correlaciona con la adquisición de la resistencia a azoles, pero teniendo en cuenta la resistencia *in vivo*, podrían explicar la menor sensibilidad de las cepas. Esto demuestra la importancia de considerar todos los datos relacionados con la resistencia de los aislados para entender este fenómeno en *C. glabrata*, así como el diseño de ensayos futuros que vayan en esta dirección.

8.2. *Candida parapsilosis*

El tratamiento de las infecciones producidas por *C. parapsilosis* suele revestir complicaciones debido a la resistencia a los antifúngicos que a menudo presentan. La resistencia frente a FLC oscila entre el 2 y el 5 % (Chen y col. 2006; Chen y col. 2010; Marti-Carrizosa y col. 2014; Pfaller y col. 2015) y también se ha reportado una reducida sensibilidad a las equinocandinas, que son el tratamiento antifúngico de primera línea para la candidiasis invasora. Este último fenómeno se ha asociado con una mutación en la región *hotspot* 1 de la proteína Fks1p, donde una alanina reemplaza a una prolina en la posición 660 (Garcia-Effron y col. 2008; Perlin 2015). Por esta razón, en la actualidad las infecciones por *Candida* se tratan comúnmente con azoles. El uso extensivo de estos antifúngicos como profilaxis o tratamiento, específicamente el FLC, ha llevado a un aumento de aislados clínicos resistentes a este grupo de fármacos (Grossman y col. 2015).

Con el establecimiento de puntos de corte clínicos (PCCs) o de corte epidemiológico (PCEs) se ha avanzado notablemente en cuanto a la orientación al clínico en la elección del fármaco (Espinel-Ingroff y col. 2014; Fothergill y col. 2014). Específicamente en el caso de *C. parapsilosis*, se han establecido PCEs para ITC ($\geq 0,5 \mu\text{g/mL}$) y PSC ($0,25 \mu\text{g/mL}$), y PCCs en el caso del FLC y VRC ($\geq 8 \mu\text{g/mL}$ y $\geq 1 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) (Espinel-Ingroff y col. 2014; Fothergill y col. 2014). Al estar los PCCs basados en datos clínicos son más precisos que los PCEs. Sin embargo, nuestros resultados parecen contradecir esto, ya que el uso de VRC contra una candidiasis murina, causada por *C. parapsilosis* resultó en un fracaso terapéutico, incluso en aquellos

aislamientos sensibles a este agente antifúngico, mostrando poca correlación con el PCC establecido. Ante esta falta de correlación, estudiamos la presencia de mutaciones en *ERG11* así como en expresión de los genes *ERG11* y *CDR1* en condiciones *in vitro* e *in vivo*, con el fin de poder arrojar luz sobre las causas de esta resistencia en cepas en que el tratamiento con VRC de la infección diseminada no fue eficaz, a pesar de presentar sensibilidad *in vitro* a dicho antifúngico.

Se ha sugerido que el gen *ERG11* es el principal responsable de la resistencia a azoles en *C. parapsilosis* (Whaley y col. 2017). Se han encontrado varios SNPs en dicho gen, sin embargo solo, una única mutación de sentido erróneo (A395T), que corresponde a la sustitución Y132F, se ha asociado con resistencia a los azoles en *C. parapsilosis* (Silva y col. 2016). La misma sustitución también se había asociado previamente a resistencia en *C. albicans* y *C. tropicalis* (Forastiero y col. 2013; Jiang y col. 2013; Xiang y col. 2013; Flowers y col. 2015; Silva y col. 2016). Sin embargo, no se encontró esta mutación en ninguno de nuestros aislados. Otra mutación como por ejemplo la que confiere la sustitución R398I en Erg11p, ha sido encontrada en tres de nuestros aislados sensibles a VRC. La existencia de dicha mutación se había observado anteriormente en otros estudios, en aislamientos resistentes a FLC, asociada a la mutación Y132F, aunque también se ha detectado en cepas sensibles en ausencia de la mutación Y132F, por lo que la relación de la mutación R398I con la resistencia es dudosa (Berkow y col. 2015; Grossman y col. 2015; Choi y col. 2018). Lo mismo podemos decir de las otras tres mutaciones encontradas en el presente estudio S201F, K344T y V351L, ya que no

estarían vinculadas a la resistencia a VRC al estar presentes en cepas sensibles.

Diferentes estudios han asociado la sobreexpresión del gen *ERG11* con la existencia de cepas resistentes a los azoles de *C. parapsilosis* (Silva y col. 2011; Berkow y col. 2015; Souza y col. 2015; Branco y col. 2017). En nuestro estudio se demostró que dicho gen estaba sobreexpresado después de la exposición a VRC *in vitro* en todas las cepas analizadas. En un estudio anterior, en un esfuerzo por identificar mecanismos potenciales de resistencia a azoles en *C. parapsilosis*, se ensayaron diferentes cepas que habían desarrollado resistencia a FLC, VRC, PSC tras diversos pases seriados en cultivo líquido en presencia de dichos antifúngicos (Silva y col. 2011). Así se pudo comprobar que las cepas resistentes a FLC también lo eran a VRC y viceversa tras la exposición a estos antifúngicos, además poseían perfiles transcripcionales similares. Sin embargo, la cepa resistente a PSC no se tornó resistente a los otros azoles tras la exposición y tenía un perfil transcripcional distinto. Observaron que el gen *ERG11* no estaba sobreexpresado en los aislamientos resistentes a FLC y VRC, en cambio en el caso de la cepa resistente a PSC los genes *ERG11*, *ERG6* y *UPC2* se encontraban entre los genes sobreexpresados. El hecho de que *ERG11* no estuviera regulado al alza en los aislados resistentes a VRC y FLC podría ser debido a que no se verificó la sobreexpresión tras la exposición a los azoles. En el presente estudio se determinaron los niveles de expresión de *ERG11* y *CDR1* en cuatro aislados de *C. parapsilosis* tras la exposición *in vitro* e *in vivo* a VRC. Al analizar la expresión de *ERG11* en órganos infectados con *C. parapsilosis* y tratados con VRC se observó que ésta

fue mucho menor que cuando las cepas fueron expuestas a este antifúngico *in vitro*, donde se observó sobreexpresión en todos los aislados analizados tras la exposición, independientemente de la sensibilidad a este antifúngico. Esto nos lleva a pensar que *ERG11* está directamente relacionado con la resistencia *in vitro* a VRC, pero que, al producirse una exposición en el huésped, el rol de *ERG11* en la resistencia es limitado.

Varios trabajos que han estudiado las bombas de eyección de fármacos, han demostrado correlación entre la sobreexpresión del gen *MDR1* y la resistencia a FLC y VRC en *C. parapsilosis* (Silva y col. 2011; Branco y col. 2015; Grossman y col. 2015). Principalmente la sobreexpresión de *MDR1* se ha asociado a mutaciones GOF (G583R y K873N) en el gen regulador *MRR1*, sin embargo también se ha observado sobreexpresión de *MDR1* en aislamientos resistentes que no presentaban mutaciones en el gen promotor (Berkow y col. 2015). Los estudios del gen *MDR1* aportan conocimientos acerca del papeñ clave juega este gen en la resistencia a azoles en *C. parapsilosis*, en comparación con el papel probablemente poco relevante que ejerce en otras especies tales como *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. krusei* (Vandeputte y col. 2005; Guinea y col. 2006; Jiang y col. 2013). En cambio, el papel del gen *CDR1* en la resistencia de *C. parapsilosis* sigue siendo incierto. Souza y col, 2015 estudiaron nueve cepas resistentes a FLC procedentes de pacientes con candidemia y comprobaron que ninguno de los aislamientos sobreexpresaba el gen *MDR1* mientras que el gen *CDR1* se expresó entre 3,3 y 9,2 el valor de expresión de una cepa de referencia. Sin embargo, en otros estudios no se ha observado una relación tan directa entre el gen *CDR1* y la

resistencia a FLC. De hecho la delección del gen *CDR1* en tres cepas que lo sobreexpresaban solo causó disminución de una dilución en la CMI para dicho antifúngico (Berkow y col. 2015).

En nuestro estudio, el nivel de expresión de *CDR1* tanto en la exposición *in vitro* a VRC como en la condición control fue irrelevante. Concluimos que la expresión de este gen no puede explicar el perfil de resistencia de nuestras cepas, las cuales no respondieron al tratamiento con dicho antifúngico *in vivo*. En cambio, tras el análisis de la expresión de dicho gen en cepas expuestas *in vivo* a VRC, se observó que *CDR1* presentaba niveles de expresión mucho más altos en todos los casos, tanto en las cepas sensibles como en resistentes a VRC, al contrario de lo que sucedió en los niveles de transcripción de *ERG11*. Estos hechos sugieren que el gen *CDR1* juega un papel importante en la resistencia en condiciones *in vivo* mientras que *ERG11* estaría más involucrado en la resistencia *in vitro* de dicha levadura. La importancia de evaluar el resultado *in vivo* para comprender la resistencia se demostró en en nuestro estudio anterior en *C. glabrata* (Navarro-Rodriguez y col. 2019). En otro realizado en *C. albicans*, cuando se evaluó la expresión de *ERG11*, *CDR1* y *CDR2* tanto *in vitro* como *in vivo* tras la exposición a FLC, se observó una buena correlación en los perfiles de expresión de dichos genes en ambas condiciones. Además, este mismo estudio reveló que los niveles de transcripción de *CDR1* y *CDR2* se redujeron durante la exposición a FLC y unas horas después de la exposición estos aumentaron. Por el contrario, la expresión de *ERG11* aumentó durante la exposición y cayó en el período posterior a la exposición (Lepak y col. 2006). En congruencia con este hecho, nuestros resultados revelan

que *in vitro*, donde los niveles de transcripción se midieron inmediatamente después de la exposición a VRC el gen *ERG11* estaba significativamente sobreexpresado y el gen *CDR1* no. En cambio en la condición *in vivo*; donde los niveles séricos se encuentran alrededor de 4,7-8,2 mg/L (Sugar y Liu 2000; Fernandez-Silva y col. 2014) los niveles de transcripción de *CDR1* tras la exposición a VRC fueron más elevados y los de *ERG11* más bajos.

Este es el primer trabajo que evalúa el perfil de resistencia en un modelo murino de infección por *C. parapsilosis* y tiene en cuenta cómo el tratamiento con VRC afecta a los genes que están principalmente involucrados en resistencia azoles. Cabe destacar que, en nuestro estudio, las exposiciones a VRC realizadas *in vitro* e *in vivo* para el posterior análisis de expresión de los genes *ERG11* y *CDR1* fueron diferentes, tanto en la concentración del fármaco utilizado como en el tiempo de exposición. Estos resultados apuntan a que sería deseable realizar futuros estudios de eficacia de VRC en *C. parapsilosis* para poder entender y explicar mejor la baja correlación con los PCCs establecidos para *C. parapsilosis* y VRC, demostrada en el presente estudio. Para entender como actúan y son regulados estos mecanismos de resistencia en *Candida* spp, sería adecuado avanzar en esta línea de investigación ajustando los niveles de concentración y tiempo de la exposición del antifúngico *in vivo*.

8.3. *Candida tropicalis*

El número de aislamientos de *C. tropicalis* pan-azol resistentes (resistencia cruzada entre PSC, ITC y VRC) se ha incrementado recientemente en varios países (Yang y col. 2008; Alvarez-Perez y col. 2016), lo que supone un serio desafío. Sin embargo, en comparación con otras especies de *Candida*, prácticamente se desconocen los mecanismos de resistencia que actúan. Las regiones más afectadas por este patógeno son la región de Asia y el Pacífico, donde la resistencia a FLC en *C. tropicalis* llega a alcanzar el 83 % (Yang y col. 2004; Yang y col. 2008; Yoo y col. 2009).

El presente estudio tuvo como objetivo abordar la caracterización de cepas clínicas de *C. tropicalis*, mediante la secuenciación de *ERG11*, así como el análisis transcripcional de dicho gen y con la evaluación de alteraciones de la pared y/o la membrana celular, en un conjunto de cepas sensibles y resistentes a VRC. El 90 % de las cepas eran resistentes a VRC y además presentaron sensibilidad reducida a PSC e ITC. Este perfil de sensibilidad también se ha observado en otros estudios (Vandeputte y col. 2005; Yang y col. 2008; Xisto y col. 2017).

Diversos estudios proponen la sobreexpresión de *ERG11* así como de los genes clave que codifican las bombas de eyección como mecanismos principales que causan resistencia a los azoles en esta especie. Sin embargo, los trabajos publicados reportan resultados contradictorios y poco concluyentes. Uno de los primeros estudios que asociaron la sobreexpresión de las bombas de eyección con la resistencia a dichos compuestos en *C. tropicalis* utilizó una cepa de

referencia, que fue cultivada mediante pases sucesivos en medios que contenían diversas concentraciones de FLC para producir aislamientos con sensibilidad reducida a dicho antifúngico (Barchiesi y col. 2000). Tras la exposición, todos los cultivos obtenidos demostraron un aumento de la expresión tanto de *MDR1* como del gen *CDR1*. Pero dicha sobreexpresión disminuía en aislados que posteriormente se hacían crecer en medios libre de antifúngico. Sin embargo, en otro estudio cuando se examinó la expresión de *MDR1* y *CDR1* en 52 aislamientos clínicos de *C. tropicalis*, no se observó una diferencia significativa en la expresión entre los aislamientos sensibles y resistentes (Jiang y col. 2013). A pesar de la evidencia de una clara relación entre las bombas de eyección y la resistencia a los azoles en *C. albicans*, este mecanismo no está completamente claro en *C. tropicalis* (Prasad y Rawal 2014; Prasad y col. 2016). Fue demostrado en un estudio utilizando rodamina 6G, un fluorescente detectable que es transportado por las bombas de eyección, que estas no contribuyen a la resistencia al azol en *C. tropicalis* (Forastiero y col. 2013). Wang y col, 2015 analizando 35 cepas clínicas de hospitales coreanos, reportaron que la expresión tanto de *MDR1* como de *CDR1* es significativamente mayor entre las menos sensibles a FLC. Sin embargo, llama la atención el elevado grado de variabilidad en la expresión de ambos genes en el grupo control altamente sensible a FLC. Varios estudios sugieren que la sobreexpresión de *MDR1* se asocia principalmente a la formación de biopelículas tanto en *C. tropicalis* como en *C. albicans* (Bizerra y col. 2008; Gao y col. 2014; Kanoshiki y col. 2015; Chapman y col. 2017). Experimentos que demuestren directamente el papel potencial de las bombas de eyección aún no se han realizado en *C. tropicalis*, así como el estudio de genes

homólogos de *C. albicans* *MRR1* y *TAC1* en *C. tropicalis*. Pero en conjunto, los datos aquí discutidos sobre los estudios realizados de este mecanismo, sugieren una ligera correlación entre la sobreexpresión de las bombas de eyección y la resistencia a los azoles en *C. tropicalis*.

Trabajos recientes señalan un papel relevante de *ERG11* en la resistencia a azoles en *C. tropicalis*. La sobreexpresión de dicho gen y alteraciones en su estructura, como consecuencia de mutaciones, se han reportado en cepas resistentes (Vandeputte y col. 2005; Eddouzi y col. 2013; Jiang y col. 2013; Choi y col. 2016). Curiosamente, se ha visto que las mutaciones puntuales en *ERG11* también pueden alterar el patrón de expresión del gen. Si bien varias mutaciones se han relacionado con alteraciones estructurales en la proteína (Vandeputte y col. 2005; Eddouzi y col. 2013; Jiang y col. 2013; Tan y col. 2015; Choi y col. 2016; Silva y col. 2016; Xisto y col. 2017), otras como Y132F y S154F se han relacionado directamente con la sobreexpresión de *ERG11* (Xiao y col. 2004; Yang y col. 2008; Forastiero y col. 2013; Jin y col. 2018). Específicamente una de las sustituciones que ya se ha reportado y caracterizado bien en *C. albicans* y *C. parapsilosis* Y132F, también se ha encontrado en *C. tropicalis* y su implicación en la resistencia a los azoles ha sido demostrada en las tres especies (Silva y col. 2011; Forastiero y col. 2013; Jiang y col. 2013; Xiang y col. 2013; Flowers y col. 2015; Souza y col. 2015; Silva y col. 2016). Cabe destacar que, en nuestro estudio, las mutaciones sin sentido G448D y V445D, y la delección $\Delta 126aa$ en el extremo *C-terminal* de la enzima, se encontraron exclusivamente en cepas resistentes, y nunca antes se habían descrito. Sin embargo, no todas las cepas resistentes

mostraron mutaciones en el gen *ERG11*. La identificación y el estudio de aislados con mutaciones en *ERG11* que causan cambios en la conformación terciaria de la proteína son de especial interés. Particularmente, una cepa del presente estudio (FMR 8898), presentó una mutación puntual que suponía una mala traducción y un codón de terminación prematuro, que conllevó a la eliminación de 126 aminoácidos en la proteína. La comparación de la estructura predicha en 3D de proteínas Erg11 ortólogas de *C. albicans* y *S. cerevisiae*, evidenció que parte de los residuos de unión al azol estaban ausentes en el mutante. Por lo tanto, la unión del azol a Erg11 estaría impedida, lo que podría explicar el fenotipo hiperresistente de la cepa portadora de esta mutación. En un estudio que respalda la hipótesis que las mutaciones en *ERG11* juegan un importante papel en la resistencia a azoles en esta especie, se observó que una cepa de *C. tropicalis* aislada de una muestra de sangre de Túnez tenía mutaciones tanto en *ERG3* como en *ERG11*, y se observó individualmente que estas afectaban a la biosíntesis de ergosterol cuando se expresaban de forma heteróloga en *S. cerevisiae* (Eddouzi y col. 2013). La mutación de *ERG11* en este aislado consistía en una delección de 132 nucleótidos que resultó en una sustitución de la secuencia de aminoácidos D275V y la pérdida de 44 de ellos. Esta sustitución homocigótica de *C. tropicalis*, dio lugar a una alta resistencia a FLC.

También se ha estudiado el factor de transcripción de *ERG11*, el gen *UPC2* y se encontraron varios heterocigotos y mutaciones homocigotas. Sin embargo, muchas de estas mutaciones se han observado también en aislamientos sensibles a FLC que no muestran

sobreexpresión de *ERG11*, por lo que estudios para entender mejor el impacto de dichas mutaciones en la función reguladora de *ERG11* son necesarios (Choi y col. 2016).

A pesar de la importancia de *ERG11* en la mediación de la resistencia a los azoles en *C. tropicalis*, ya sea a través de mutaciones o por la sobreexpresión de dicho gen (Henry y col. 2000; Vandeputte y col. 2005; Forastiero y col. 2013; Jiang y col. 2013), pocos estudios han evaluado la expresión de *ERG11* durante la exposición al azol. En el trabajo mencionado anteriormente, (Jiang y col. 2013), se demostró que el nivel promedio de expresión de *ERG11* era más alto en las cepas resistentes que en las sensibles a FLC. Además, la expresión de dicho gen fue incluso mayor en un subconjunto de cepas resistentes a FLC que también presentaban sensibilidad reducida a ITC y VRC. Estos resultados fueron observados también recientemente en un estudio similar en que se analizaron 35 cepas de *C. tropicalis* de hospitales coreanos, nueve de los cuales eran resistentes a FLC (Choi y col. 2016). En el presente trabajo, los estudios de expresión revelaron que *ERG11* es un gen inducible por azoles como se determinó en un único estudio anteriormente (Henry y col. 2000). Aunque los niveles de transcripción de las cepas no se correlacionaron con las CMIs, en general, las cepas resistentes a VRC presentaron niveles de expresión más altos que las sensibles. Pero dicha sobreexpresión no se correlacionó con ninguna mutación puntual.

Debido a que ni las mutaciones ni la sobreexpresión de *ERG11* explican completamente los diferentes grados de resistencia a azoles de nuestras cepas, se intentó identificar posibles diferencias en la pared y la membrana celulares. Teniendo en cuenta que la toxicidad

de los azoles afecta a la biosíntesis de ergosterol, cuantificamos este esterol en diez aislados representativos de *C. tropicalis*. Como se esperaba, dicho compuesto disminuyó drásticamente después de la exposición a VRC. En estudios similares realizados en *C. albicans*, se observó también una reducción del ergosterol después de la exposición al azol, especialmente en cepas sensibles (Arthington-Skaggs y col. 1999; Alizadeh y col. 2017). También en *C. albicans*, la delección del gen *ERG11*, necesario para la síntesis de ergosterol, afectó el crecimiento filamentoso e invasivo del hongo y además impidió el alargamiento de las hifas, disminuyendo la virulencia del hongo, aunque la capacidad de supervivencia se mantuvo (Wu y col. 2017). También se ha observado que la edad determina la composición lipídica de la membrana celular en *C. glabrata*, las cepas más antiguas y resistentes presentan un nivel de ergosterol más bajo (Bouklas y col. 2017; Bhattacharya y Fries 2018) y sorprendentemente la células viejas de *C. glabrata* presentan una mayor transcripción de los transportadores ABC (Bhattacharya y col. 2018). Todos estos hechos demuestran que el agotamiento de ergosterol no conduce necesariamente a una condición desventajosa para la supervivencia de la levadura.

En el presente estudio, el ergosterol disminuyó drásticamente después de la exposición a VRC en cepas tanto sensibles como resistentes, con una menor disminución de ergosterol en dos cepas resistentes a VRC (FMR 14768 y FMR 8898). Nuestros resultados indican que existen cepas resistentes con pérdida total de ergosterol después de la exposición al azol, por lo que parece que el agotamiento del ergosterol no es determinante en el desarrollo de la sensibilidad al

azol en *C. tropicalis* y la adquisición de resistencia puede no atribuirse exclusivamente a la actividad *ERG11*. Del mismo modo, los estudios sobre la delección de *ERG11* aportan nuevos datos controvertidos, ya que la falta de dicho gen aumentó la resistencia a FLC y ITC en *C. glabrata* (Geber y col. 1995). Además, hemos detectado una menor disminución en la DHE, un esteroil intermedio, en algunas cepas resistentes, que podría desempeñar un papel sustitutivo, manteniendo la integridad y la funcionalidad de la membrana fúngica (Mukherjee y col. 1998). En un estudio previo, se observó que cuatro mutantes *erg* (*erg2*, *erg3*, *erg4* y *erg6*) de *S. cerevisiae* no contenían ergosterol en comparación al aislado salvaje, sin embargo, presentaban un fuerte pico de absorción para el DHE (Mukhopadhyay y col. 2002).

Para intentar mejorar la comprensión de los factores biológicos que causan la resistencia en *C. tropicalis* y teniendo en cuenta la influencia de las barreras celulares en la tolerancia a los compuestos tóxicos, realizamos estudios para la caracterización de la pared celular y la membrana de nuestros aislados a través de la determinación de sensibilidad a compuestos que afectan directamente a la pared y la membrana celular de los hongos, como son; Calco Fluor White (CFW), Congo Red (CR) y SDS (Heilmann y col. 2013). No se detectaron diferencias en el crecimiento de los aislados en presencia de CFW y CR (datos no mostrados). En cambio, el crecimiento de cepas sensibles y resistentes era diferente cuando los aislados se expusieron a SDS, un compuesto orgánico sintético que compromete la integridad de la membrana celular, observándose que los aislados resistentes en general crecen mejor (Tukmachev y col. 1979). Estos datos revelan diferencias en la membrana celular o la permeabilidad

de la pared celular que parecen correlacionarse con los patrones de sensibilidad a los azoles de nuestras cepas. Si bien la entrada del azol no está mediada por difusión pasiva, sino que se importa en la célula a través de una difusión facilitada (Mansfield y col. 2016), y en este sentido se ha observado que el grosor de la pared celular y la accesibilidad de la membrana celular pueden ser relevantes en la tolerancia al fármaco (Plaine y col. 2008; Walker y col. 2018). Se ha informado (Mukhopadhyay y col. 2002) que la resistencia en las levaduras está estrechamente relacionada con el estado de los lípidos de la membrana. La sensibilidad o resistencia a un fármaco parece venir dada por una interacción entre la difusión del fármaco al interior celular, las bombas de eyección y el entorno lipídico de la membrana. La hipersensibilidad a SDS revela la entrada facilitada de detergentes a las membranas mutantes (Richard y col. 2002) y esto plantea la cuestión de si existe una posible relación entre la entrada facilitada de detergentes a través de las membranas celulares, como el SDS, y un mejor acceso e importación de los antifúngicos. De acuerdo con esta hipótesis, en un estudio previo se observó que una cepa de *C. albicans* con ausencia de *ERG11* no podía crecer en un medio suplementado con SDS (Wu y col. 2018).

En resumen, en el presente estudio se observó que la sobreexpresión de *ERG11* fue mayor cuando las cepas se expusieron a VRC, aunque no se observó una correlación directa entre la expresión y los valores de CMI. Del mismo modo, las mutaciones puntuales no explican totalmente la resistencia al antifúngico, ya que las cepas que muestran mutaciones no sinónimas también sufren pérdida de ergosterol tras la exposición a VRC, por lo que es de

suponer que los cambios de aminoácidos no están afectando realmente a la afinidad con el azol. La resistencia natural a los antifúngicos se debe a múltiples mecanismos, entre ellos mecanismos menos estudiados, entre los cuales la respuesta transcripcional al estrés, la permeabilidad de la pared celular y la membrana pueden ser importantes. Nuestros resultados apuntan al hecho de que la membrana celular podría estar contribuyendo a la tolerancia tóxica del azol, por lo que más estudios en ese sentido serían útiles para demostrar dicha hipótesis.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS DE RESISTENCIA A AZOLES EN ESPECIES DE CANDIDA NO-ALBICANS

Patricia Navarro Rodríguez



CONCLUSIONES



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS DE RESISTENCIA A AZOLES EN ESPECIES DE CANDIDA NO-ALBICANS

Patricia Navarro Rodríguez

9. CONCLUSIONES

9.1. ESTUDIO 1: Expresión de los genes que codifican las bombas de eyección *CDR1*, *CDR2* y *SNQ2* y *ERG11* aislados de *Candida glabrata* sensibles y resistentes a voriconazol

1. La expresión de los genes *ERG11*, *CDR1*, *CDR2* y *SNQ2* en cepas de *C. glabrata* resistentes a voriconazol no se ve afectada tras la exposición a dicho antifúngico.

2. Los niveles de expresión de *ERG11*, *CDR1*, *CDR2* y *SNQ2* no se correlacionaron directamente con las CMI de voriconazol de los aislados estudiados.

3. La sobreexpresión de *ERG11*, *CDR1*, *CDR2* y *SNQ2* no es determinante de la resistencia *in vitro* a voriconazol, sin embargo, su mayor expresión tiene lugar únicamente en cepas que presentan resistencia al voriconazol en condiciones *in vitro* e *in vivo*.

4. Las mutaciones puntuales detectadas en *ERG11* no se relacionaron con sustituciones de aminoácidos, ni cambios estructurales de la proteína. Por lo que no se han detectado mutaciones específicas relacionadas con la resistencia a voriconazol.

9.2. ESTUDIO 2: Comparación *in vivo* e *in vitro* de los niveles de expresión de genes implicados en la resistencia a azoles en *Candida parapsilosis*

1. El tratamiento con voriconazol únicamente fue eficaz en los ratones infectados con un aislado clínico sensible a dicho antifúngico, de los cuatro ensayados, observándose una limitada correlación con el PCC establecido para *C. parapsilosis* y dicho antifúngico.

2. El posaconazol fue eficaz en el 75 % de los aislados ensayados excepto en ratones infectados con el aislado más sensible. El tratamiento con itraconazol fue eficaz únicamente en ratones infectados en un 25 %, de los casos, demostrándose una baja correlación con los PCEs establecidos.

3. El gen *ERG11* resultó ser inducible por el voriconazol en todas las cepas de *C. parapsilosis* al ser expuestas a dicho antifúngico *in vitro*, en cambio, no se logró inducir su expresión *in vivo*, apreciándose grandes diferencias en la expresión del gen entre ambas condiciones.

4. El gen *CDR1* no fue inducible por el voriconazol *in vitro* en ninguna de las cepas de *C. parapsilosis* analizada, en cambio, su expresión se indujo en el 75 % de los aislados tras el tratamiento con dicho fármaco *in vivo*.

5. La expresión del gen *CDR1* fue superior en los ensayos *in vivo* respecto a los estudios *in vitro*, por lo que puede ser responsable de la resistencia *in vivo*.

9.3. ESTUDIO 3: Variación en la expresión y polimorfismos del gen *ERG11* y el contenido de ergosterol en cepas de *Candida tropicalis* y su relación con la resistencia al voriconazol

1. La eficacia de voriconazol en nuestro modelo murino correlacionó con los PCCs establecidos para *C. tropicalis*.

2. Se hallaron dos sustituciones de aminoácidos (D448G y D445V), en Erg11 no descritas anteriormente en dos aislados resistentes a voriconazol, que podrían ser responsables de la resistencia a azoles observada en las cepas que las presentaban.

3. Se identificó una mutación en el gen *ERG11* en un aislado resistente causante de una delección de 126 aminoácidos en la proteína codificada, provocando una pérdida de residuos de unión a azoles en la proteína, lo cual sugiere que dicha mutación podría ser responsable de la sensibilidad reducida al voriconazol en este aislado.

4. El gen *ERG11* es inducible por voriconazol en el 95 % de los aislados de *C. tropicalis*, independientemente de su sensibilidad.

5. Los aislados de *C. tropicalis* con CMI's más altas al voriconazol presentan en general niveles de expresión de *ERG11* más altos que los aislados sensibles, sin observarse una correlación directa entre la expresión de dicho gen y la CMI's de voriconazol.

6. El contenido de ergosterol fue similar en todos los aislados estudiados, y tras la exposición a voriconazol se observó la depleción total de este esteroide en el 80 % de las cepas, sugiriendo que el

contenido de ergosterol tiene una escasa relación con resistencia a voriconazol en *C. tropicalis*.

7. Los aislados resistentes al voriconazol crecen mejor en presencia de SDS que los sensibles. Este hecho sugiere que las posibles diferencias en las paredes o membranas celulares de estos aislados estarían implicadas en su grado de sensibilidad a los azoles.



REFERENCIAS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS DE RESISTENCIA A AZOLES EN ESPECIES DE CANDIDA NO-ALBICANS

Patricia Navarro Rodríguez

10. REFERENCIAS

Agashe, D., M. Sane, K. Phalnikar, G. D. Diwan, A. Habibullah, N. C. Martinez-Gomez, V. Sahasrabudde, W. Polachek, J. Wang, L. M. Chubiz y C. J. Marx (2016). "Large-Effect Beneficial Synonymous Mutations Mediate Rapid and Parallel Adaptation in a Bacterium." Mol Biol Evol **33**(6): 1542-53.

Alexander, B. D., M. D. Johnson, C. D. Pfeiffer, C. Jimenez-Ortigosa, J. Catania, R. Booker, M. Castanheira, S. A. Messer, D. S. Perlin y M. A. Pfaller (2013). "Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations." Clin Infect Dis **56**(12): 1724-32.

Alizadeh, F., A. Khodavandi y S. Zalakian (2017). "Quantitation of ergosterol content and gene expression profile of *ERG11* gene in fluconazole-resistant *Candida albicans*." Curr Med Mycol **3**(1): 13-19.

Almirante, B., D. Rodriguez, B. J. Park, M. Cuenca-Estrella, A. M. Planes, M. Almela, J. Mensa, F. Sanchez, J. Ayats, M. Gimenez, P. Saballs, S. K. Fridkin, J. Morgan, J. L. Rodriguez-Tudela, D. W. Warnock y A. Pahissa (2005). "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 **43**(4): 1829-35.

Alvarez-Perez, S., M. E. Garcia, M. T. Cutuli, M. L. Fermin, M. A. Daza, T. Pelaez y J. L. Blanco (2016). "Acquired multi-azole resistance in *Candida tropicalis* during persistent urinary tract infection in a dog." Med Mycol Case Rep **11**: 9-12.

Antinori, S., L. Milazzo, S. Sollima, M. Galli y M. Corbellino (2016). "Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review." Eur J Intern Med **34**: 21-28.

Arendrup, M. C. y T. F. Patterson (2017). "Multidrug-Resistant *Candida*: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment." J Infect Dis **216**(suppl_3): S445-S451.

Arthington-Skaggs, B. A., H. Jradi, T. Desai y C. J. Morrison (1999). "Quantitation of ergosterol content: novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida albicans*." J Clin Microbiol **37**(10): 3332-7.

Azanza, J. R., B. Sadada y J. Reis (2015). "Liposomal formulations of amphotericin B: differences according to the scientific evidence." Rev Esp Quimioter **28**(6): 275-81.

Barchiesi, F., D. Calabrese, D. Sanglard, L. Falconi Di Francesco, F. Caselli, D. Giannini, A. Giacometti, S. Gavaudan y G. Scalise (2000). "Experimental induction of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* ATCC 750." Antimicrob Agents Chemother **44**(6): 1578-84.

Barchiesi, F., E. Spreghini, S. Tomassetti, D. Giannini y G. Scalise (2007). "Caspofungin in combination with amphotericin B against *Candida parapsilosis*." Antimicrob Agents Chemother **51**(3): 941-5.

Bard, M., A. M. Sturm, C. A. Pierson, S. Brown, K. M. Rogers, S. Nabinger, J. Eckstein, R. Barbuch, N. D. Lees, S. A. Howell y K. C. Hazen (2005). "Sterol uptake in *Candida glabrata*: rescue of sterol auxotrophic strains." Diagn Microbiol Infect Dis **52**(4): 285-93.

Bastidas, R. J. y J. Heitman (2009). "Trimorphic stepping stones pave the way to fungal virulence." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(2): 351-2.

Belet, N., E. Ciftci, E. Ince, N. Dalgic, S. Oncel, H. Guriz, A. Yagmurlu, H. Dindar y U. Dogru (2006). "Caspofungin treatment in two infants with persistent fungaemia due to *Candida lipolytica*." Scand J Infect Dis **38**(6-7): 559-62.

Ben-Ami, R. (2018). "Treatment of Invasive Candidiasis: A Narrative Review." J Fungi (Basel) **4**(3).

Bennett, J. E., K. Izumikawa y K. A. Marr (2004). "Mechanism of increased fluconazole resistance in *Candida glabrata* during prophylaxis." Antimicrob Agents Chemother **48**(5): 1773-7.

Berkhout, C. M. (1923). "De schimmelgeslachten Monilia, Oidium, Oospora en Torula." Thesis. Utrecht.

Berkow, E. L., K. Manigaba, J. E. Parker, K. S. Barker, S. L. Kelly y P. D. Rogers (2015). "Multidrug Transporters and Alterations in Sterol Biosynthesis Contribute to Azole Antifungal Resistance in *Candida parapsilosis*." Antimicrob Agents Chemother **59**(10): 5942-50.

Bhattacharya, S. y B. C. Fries (2018). "Enhanced Efflux Pump Activity in Old *Candida glabrata* Cells." Antimicrob Agents Chemother **62**(3).

Bizerra, F. C., C. V. Nakamura, C. de Poersch, T. I. Estivalet Svidzinski, R. M. Borsato Quesada, S. Goldenberg, M. A. Krieger y S. F. Yamada-Ogatta (2008). "Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance." FEMS Yeast Res **8**(3): 442-50.

Blinkhorn, R. J., D. Adelstein y P. J. Spagnuolo (1989). "Emergence of a new opportunistic pathogen, *Candida lusitanae*." J Clin Microbiol **27**(2): 236-40.

Bouchara, J. P., R. Zouhair, S. Le Boudouil, G. Renier, R. Filmon, D. Chabasse, J. N. Hallet y A. Defontaine (2000). "*In-vivo* selection of an azole-resistant petite mutant of *Candida glabrata*." J Med Microbiol **49**(11): 977-84.

Bouklas, T., L. Alonso-Crisostomo, T. Szekely, Jr., E. Diago-Navarro, E. P. Orner, K. Smith, M. A. Munshi, M. Del Poeta, G. Balazsi y B. C. Fries (2017). "Generational distribution of a *Candida glabrata* population: Resilient old cells prevail, while younger cells dominate in the vulnerable host." PLoS Pathog **13**(5): e1006355.

Bouza, E. y P. Muñoz (2008). "Epidemiology of candidemia in intensive care units." Int J Antimicrob Agents **32 Suppl 2**: S87-91.

Brammer, K. W., P. R. Farrow y J. K. Faulkner (1990). "Pharmacokinetics and tissue penetration of fluconazole in humans." Rev Infect Dis **12 Suppl 3**: S318-26.

Branco, J., M. Ola, R. M. Silva, E. Fonseca, N. C. Gomes, C. Martins-Cruz, A. P. Silva, A. Silva-Dias, C. Pina-Vaz, C. Erraught, L. Brennan, A. G. Rodrigues, G. Butler y I.

M. Miranda (2017). "Impact of *ERG3* mutations and expression of ergosterol genes controlled by UPC2 and NDT80 in *Candida parapsilosis* azole resistance." Clin Microbiol Infect **23**(8): 575 e1-575 e8.

Branco, J., A. P. Silva, R. M. Silva, A. Silva-Dias, C. Pina-Vaz, G. Butler, A. G. Rodrigues y I. M. Miranda (2015). "Fluconazole and Voriconazole Resistance in *Candida parapsilosis* Is Conferred by Gain-of-Function Mutations in *MRR1* Transcription Factor Gene." Antimicrob Agents Chemother **59**(10): 6629-33.

Breivik, O. y J. Owades (1957). "Spectrophotometric semi-microdetermination of ergosterol in yeast." J. Agric. Food Chem **5**(5): 360–363.

Brun, S., C. Aubry, O. Lima, R. Filmon, T. Berges, D. Chabasse y J. P. Bouchara (2003). "Relationships between respiration and susceptibility to azole antifungals in *Candida glabrata*." Antimicrob Agents Chemother **47**(3): 847-53.

Brun, S., T. Berges, P. Poupard, C. Vauzelle-Moreau, G. Renier, D. Chabasse y J. P. Bouchara (2004). "Mechanisms of azole resistance in petite mutants of *Candida glabrata*." Antimicrob Agents Chemother **48**(5): 1788-96.

Butler, G., M. D. Rasmussen, M. F. Lin, M. A. Santos, S. Sakthikumar, C. A. Munro, E. Rheinbay, M. Grabherr, A. Forche, J. L. Reedy, I. Agrafioti, M. B. Arnaud, S. Bates, A. J. Brown, S. Brunke, M. C. Costanzo, D. A. Fitzpatrick, P. W. de Groot, D. Harris, L. L. Hoyer, B. Hube, F. M. Klis, C. Kodira, N. Lennard, M. E. Logue, R. Martin, A. M. Neiman, E. Nikolaou, M. A. Quail, J. Quinn, M. C. Santos, F. F. Schmitzberger, G. Sherlock, P. Shah, K. A. Silverstein, M. S. Skrzypek, D. Soll, R. Staggs, I. Stansfield, M. P. Stumpf, P. E. Sudbery, T. Srikantha, Q. Zeng, J. Berman, M. Berriman, J. Heitman, N. A. Gow, M. C. Lorenz, B. W. Birren, M. Kellis y C. A. Cuomo (2009). "Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes." Nature **459**(7247): 657-62.

Caban, M., D. Strapagiel, J. Dziadek, M. Korycka-Machala y A. Grzelak (2016). "Principles of a new protocol for prediction of azole resistance in *Candida albicans* infections on the basis of *ERG11* polymorphisms." Curr Microbiol **73**(2): 172-82.

- Calandra, T., J. A. Roberts, M. Antonelli, M. Bassetti y J. L. Vincent (2016) "Diagnosis and management of invasive candidiasis in the ICU: an updated approach to an old enemy." Crit Care **20**(1): 125.
- Cano, M. V., J. F. Perz, A. S. Craig, M. Liu, G. M. Lyon, M. E. Brandt, T. J. Lott, B. A. Lasker, F. F. Barrett, M. M. McNeil, W. Schaffner y R. A. Hajjeh (2005). "Candidemia in pediatric outpatients receiving home total parenteral nutrition." Med Mycol **43**(3): 219-25.
- Carrillo-Muñoz, A., G. Giusiano, A. Arechavala, C. Tur-Tur, E. Eraso, N. Jauregizar, G. Quindós y R. Negroni (2015). "La utilidad clínica de los derivados triazólicos en el tratamiento de las infecciones fúngicas." Revista Española de Quimioterapia **28**(4): 169-182.
- Castanheira, M., S. A. Messer, P. R. Rhomberg, R. R. Dietrich, R. N. Jones y M. A. Pfaller (2014). "Isavuconazole and nine comparator antifungal susceptibility profiles for common and uncommon *Candida* species collected in 2012: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiological cutoff values." Mycopathologia **178**(1-2): 1-9.
- Caudle, K. E., K. S. Barker, N. P. Wiederhold, L. Xu, R. Homayouni y P. D. Rogers (2011). "Genomewide expression profile analysis of the *Candida glabrata* Pdr1 regulon." Eukaryot Cell **10**(3): 373-83.
- Clancy, C. J. y M. H. Nguyen (2017). "Emergence of *Candida auris*: An International Call to Arms." Clin Infect Dis **64**(2): 141-143.
- Cleary, J. D. (2009). "Echinocandins: pharmacokinetic and therapeutic issues." Curr Med Res Opin **25**(7): 1741-50.
- Cleveland, A. A., L. H. Harrison, M. M. Farley, R. Hollick, B. Stein, T. M. Chiller, S. R. Lockhart y B. J. Park (2015). "Declining incidence of candidemia and the shifting epidemiology of *Candida* resistance in two US metropolitan areas, 2008-2013: results from population-based surveillance." PLoS One **10**(3): e0120452.

Coste, A., A. Selmecki, A. Forche, D. Diogo, M. E. Bougnoux, C. d'Enfert, J. Berman y D. Sanglard (2007). "Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates." Eukaryot Cell **6**(10): 1889-904.

Coste, A., V. Turner, F. Ischer, J. Morschhauser, A. Forche, A. Selmecki, J. Berman, J. Bille y D. Sanglard (2006). "A mutation in Tac1p, a transcription factor regulating *CDR1* and *CDR2*, is coupled with loss of *heterozygosity* at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans*." Genetics **172**(4): 2139-56.

Coste, A. T., M. Karababa, F. Ischer, J. Bille y D. Sanglard (2004). "*TAC1*, transcriptional activator of *CDR* genes, is a new transcription factor involved in the regulation of *Candida albicans* ABC transporters *CDR1* and *CDR2*." Eukaryot Cell **3**(6): 1639-52.

Cuenca-Estrella, M., C. B. Moore, F. Barchiesi, J. Bille, E. Chryssanthou, D. W. Denning, J. P. Donnelly, F. Dromer, B. Dupont, J. H. Rex, M. D. Richardson, B. Sancak, P. E. Verweij y J. L. Rodriguez-Tudela (2003). "Multicenter evaluation of the reproducibility of the proposed antifungal susceptibility testing method for fermentative yeasts of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EUCAST)." Clin Microbiol Infect **9**(6): 467-74.

Chakrabarti, A., S. S. Chatterjee, K. L. Rao, M. M. Zameer, M. R. Shivaprakash, S. Singhi, R. Singh y S. C. Varma (2009). "Recent experience with fungaemia: change in species distribution and azole resistance." Scand J Infect Dis **41**(4): 275-84.

Chapeland-Leclerc, F., C. Hennequin, N. Papon, T. Noel, A. Girard, G. Socie, P. Ribaud y C. Lacroix (2010). "Acquisition of flucytosine, azole, and caspofungin resistance in *Candida glabrata* bloodstream isolates serially obtained from a hematopoietic stem cell transplant recipient." Antimicrob Agents Chemother **54**(3): 1360-2.

Chapman, B., M. Slavin, D. Marriott, C. Halliday, S. Kidd, I. Arthur, N. Bak, C. H. Heath, K. Kennedy, C. O. Morrissey, T. C. Sorrell, S. van Hal, C. Keighley, E. Goeman, N. Underwood, K. Hajkovicz, A. Hofmeyr, M. Leung, N. Macesic, J. Botes, C. Blyth, L. Cooley, C. R. George, P. Kalukottege, A. Kesson, B. McMullan, R. Baird,

J. Robson, T. M. Korman, S. Pendle, K. Weeks, E. Liu, E. Cheong, S. Chen, Australian y G. New Zealand Mycoses Interest (2017). "Changing epidemiology of candidaemia in Australia." J Antimicrob Chemother **72**(4): 1103-1108.

Chaturvedi, V., R. Ramani, D. Andes, D. J. Diekema, M. A. Pfaller, M. A. Ghannoum, C. Knapp, S. R. Lockhart, L. Ostrosky-Zeichner, T. J. Walsh, K. Marchillo, S. Messer, A. R. Welshenbaugh, C. Bastulli, N. Iqbal, V. L. Paetznick, J. Rodriguez y T. Sein (2011). "Multilaboratory testing of two-drug combinations of antifungals against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida parapsilosis*." Antimicrob Agents Chemother **55**(4): 1543-8.

Chau, A. S., C. A. Mendrick, F. J. Sabatelli, D. Loebenberg y P. M. McNicholas (2004). "Application of real-time quantitative PCR to molecular analysis of *Candida albicans* strains exhibiting reduced susceptibility to azoles." Antimicrob Agents Chemother **48**(6): 2124-31.

Chen, K. H., C. T. Chang, C. C. Yu, J. Y. Huang, C. W. Yang y C. C. Hung (2006). "*Candida parapsilosis* peritonitis has more complications than other *Candida* peritonitis in peritoneal dialysis patients." Ren Fail **28**(3): 241-6.

Chen, S. C., M. A. Slavin y T. C. Sorrell (2011). "Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: a comparison." Drugs **71**(1): 11-41.

Chen, Y. C., Y. H. Lin, K. W. Chen, J. Lii, H. J. Teng y S. Y. Li (2010). "Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis* sensu stricto, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in Taiwan." Diagn Microbiol Infect Dis **68**(3): 284-92.

Cho, E. J., J. H. Shin, S. H. Kim, H. K. Kim, J. S. Park, H. Sung, M. N. Kim y H. J. Im (2015). "Emergence of multiple resistance profiles involving azoles, echinocandins and amphotericin B in *Candida glabrata* isolates from a neutropenia patient with prolonged fungaemia." J Antimicrob Chemother **70**(4): 1268-70.

Choi, M. J., E. J. Won, J. H. Shin, S. H. Kim, W. G. Lee, M. N. Kim, K. Lee, M. G. Shin, S. P. Suh, D. W. Ryang y Y. J. Im (2016). "Resistance Mechanisms and Clinical Features of Fluconazole-Nonsusceptible *Candida tropicalis* Isolates Compared with

Fluconazole-Less-Susceptible Isolates." Antimicrob Agents Chemother **60**(6): 3653-61.

Choi, Y. J., Y. J. Kim, D. Yong, J. H. Byun, T. S. Kim, Y. S. Chang, M. J. Choi, S. A. Byeon, E. J. Won, S. H. Kim, M. G. Shin y J. H. Shin (2018). "Fluconazole-Resistant *Candida parapsilosis* Bloodstream Isolates with Y132F Mutation in *ERG11* Gene, South Korea." Emerg Infect Dis **24**(9): 1768-1770.

Chowdhary, A., C. Sharma y J. F. Meis (2017). "Candida auris: A rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally." PLoS Pathog **13**(5): e1006290.

Danby, C. S., D. Boikov, R. Rautemaa-Richardson y J. D. Sobel (2012). "Effect of pH on *in vitro* susceptibility of *Candida glabrata* and *Candida albicans* to 11 antifungal agents and implications for clinical use." Antimicrob Agents Chemother **56**(3): 1403-6.

De Hoog, G. S., J. Guarro, J. Gené y M. J. Figueras (2001). Atlas of Clinical Fungi.

Defontaine, A., J. P. Bouchara, P. Declerk, C. Planchenault, D. Chabasse y J. N. Hallet (1999). "In-vitro resistance to azoles associated with mitochondrial DNA deficiency in *Candida glabrata*." J Med Microbiol **48**(7): 663-70.

Denning, D. W. (2003). "Echinocandin antifungal drugs." Lancet **362**(9390): 1142-51.

Denning, D. W., L. Hall, M. Jackson y S. Hollis (1995). "Efficacy of D0870 compared with those of itraconazole and amphotericin B in two murine models of invasive aspergillosis." Antimicrob Agents Chemother **39**(8): 1809-14.

Diekema, D. J., S. A. Messer, A. B. Brueggemann, S. L. Coffman, G. V. Doern, L. A. Herwaldt y M. A. Pfaller (2002). "Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study." J Clin Microbiol **40**(4): 1298-302.

Diezmann, S., C. J. Cox, G. Schonian, R. J. Vilgalys y T. G. Mitchell (2004). "Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related taxa: a multigenic analysis." J Clin Microbiol **42**(12): 5624-35.

Dignani, M., J. Solomkin y E. Anaisse (1998). Candida. Elsevier Inc.

Dismukes, W. E. (2000). "Introduction to antifungal drugs." Clin Infect Dis **30**(4): 653-7.

Dudiuk, C., S. Gamarra, C. Jimenez-Ortigosa, F. Leonardelli, D. Macedo, D. S. Perlin y G. Garcia-Effron (2015). "Quick Detection of *FKS1* Mutations Responsible for Clinical Echinocandin Resistance in *Candida albicans*." J Clin Microbiol **53**(7): 2037-41.

Dudiuk, C., S. Gamarra, F. Leonardelli, C. Jimenez-Ortigosa, R. G. Vitale, J. Afeltra, D. S. Perlin y G. Garcia-Effron (2014). "Set of classical PCRs for detection of mutations in *Candida glabrata FKS* genes linked with echinocandin resistance." J Clin Microbiol **52**(7): 2609-14.

Dudiuk, C., D. Macedo, F. Leonardelli, L. Theill, M. S. Cabeza, S. Gamarra y G. Garcia-Effron (2017). "Molecular Confirmation of the Relationship between *Candida guilliermondii* Fks1p Naturally Occurring Amino Acid Substitutions and Its Intrinsic Reduced Echinocandin Susceptibility." Antimicrob Agents Chemother **61**(5).

Dunkel, N., J. Blass, P. D. Rogers y J. Morschhauser (2008). "Mutations in the multi-drug resistance regulator *MRR1*, followed by loss of heterozygosity, are the main cause of *MDR1* overexpression in fluconazole-resistant *Candida albicans* strains." Mol Microbiol **69**(4): 827-40.

Dunkel, N., T. T. Liu, K. S. Barker, R. Homayouni, J. Morschhauser y P. D. Rogers (2008). "A gain-of-function mutation in the transcription factor *Upc2p* causes upregulation of ergosterol biosynthesis genes and increased fluconazole resistance in a clinical *Candida albicans* isolate." Eukaryot Cell **7**(7): 1180-90.

Eddouzi, J., J. E. Parker, L. A. Vale-Silva, A. Coste, F. Ischer, S. Kelly, M. Manai y D. Sanglard (2013). "Molecular mechanisms of drug resistance in clinical *Candida*

species isolated from Tunisian hospitals." Antimicrob Agents Chemother **57**(7): 3182-93.

Espinel-Ingroff, A., M. A. Pfaller, B. Bustamante, E. Canton, A. Fothergill, J. Fuller, G. M. Gonzalez, C. Lass-Flörl, S. R. Lockhart, E. Martin-Mazuelos, J. F. Meis, M. S. Melhem, L. Ostrosky-Zeichner, T. Pelaez, M. W. Szeszs, G. St-Germain, L. X. Bonfietti, J. Guarro y J. Turnidge (2014). "Multilaboratory study of epidemiological cutoff values for detection of resistance in eight *Candida* species to fluconazole, posaconazole, and voriconazole." Antimicrob Agents Chemother **58**(4): 2006-12.

Espinel-Ingroff, A. y J. Turnidge (2016). "The role of epidemiological cutoff values (ECVs/ECOFFs) in antifungal susceptibility testing and interpretation for uncommon yeasts and moulds." Rev Iberoam Micol **33**(2): 63-75.

Farahyar, S., F. Zaini, P. Kordbacheh, S. Rezaie, M. Falahati, M. Safara, R. Raofian, K. Hatami, M. Mohebbi y M. Heidari (2016). "Expression of efflux pumps and fatty acid activator one genes in azole resistant *Candida glabrata* isolated from immunocompromised patients." Acta Med Iran **54**(7): 458-64.

Favre, B., M. Didmon y N. S. Ryder (1999). "Multiple amino acid substitutions in lanosterol 14 α -demethylase contribute to azole resistance in *Candida albicans*." Microbiology **145** (Pt 10): 2715-25.

Fernandez-Silva, F., J. Capilla, E. Mayayo y J. Guarro (2014). "Modest efficacy of voriconazole against murine infections by *Sporothrix schenckii* and lack of efficacy against *Sporothrix brasiliensis*." Mycoses **57**(2): 121-4.

Ferrari, S., F. Ischer, D. Calabrese, B. Posteraro, M. Sanguinetti, G. Fadda, B. Rohde, C. Bauser, O. Bader y D. Sanglard (2009). "Gain of function mutations in *CgPDR1* of *Candida glabrata* not only mediate antifungal resistance but also enhance virulence." PLoS Pathog **5**(1): e1000268.

Ferrari, S., M. Sanguinetti, R. Torelli, B. Posteraro y D. Sanglard (2011). "Contribution of *CgPDR1*-regulated genes in enhanced virulence of azole-resistant *Candida glabrata*." PLoS One **6**(3): e17589.

- Fidel, P. L., Jr., J. A. Vazquez y J. D. Sobel (1999). "*Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*." Clin Microbiol Rev **12**(1): 80-96.
- Fling, M. E., J. Kopf, A. Tamarkin, J. A. Gorman, H. A. Smith y Y. Koltin (1991). "Analysis of a *Candida albicans* gene that encodes a novel mechanism for resistance to benomyl and methotrexate." Mol Gen Genet **227**(2): 318-29.
- Flowers, S. A., K. S. Barker, E. L. Berkow, G. Toner, S. G. Chadwick, S. E. Gyax, J. Morschhauser y P. D. Rogers (2012). "Gain-of-function mutations in *UPC2* are a frequent cause of *ERG11* upregulation in azole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*." Eukaryot Cell **11**(10): 1289-99.
- Flowers, S. A., B. Colon, S. G. Whaley, M. A. Schuler y P. D. Rogers (2015). "Contribution of clinically derived mutations in *ERG11* to azole resistance in *Candida albicans*." Antimicrob Agents Chemother **59**(1): 450-60.
- Forastiero, A., A. C. Mesa-Arango, A. Alastruey-Izquierdo, L. Alcazar-Fuoli, L. Bernal-Martinez, T. Pelaez, J. F. Lopez, J. O. Grimalt, A. Gomez-Lopez, I. Cuesta, O. Zaragoza y E. Mellado (2013). "*Candida tropicalis* antifungal cross-resistance is related to different azole target (Erg11p) modifications." Antimicrob Agents Chemother **57**(10): 4769-81.
- Fothergill, A. W., D. A. Sutton, D. I. McCarthy y N. P. Wiederhold (2014). "Impact of new antifungal breakpoints on antifungal resistance in *Candida* species." J Clin Microbiol **52**(3): 994-7.
- Foxman, B., R. Muraglia, J. P. Dietz, J. D. Sobel y J. Wagner (2013). "Prevalence of recurrent vulvovaginal candidiasis in 5 European countries and the United States: results from an internet panel survey." J Low Genit Tract Dis **17**(3): 340-5.
- Franz, R., S. L. Kelly, D. C. Lamb, D. E. Kelly, M. Ruhnke y J. Morschhauser (1998). "Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains." Antimicrob Agents Chemother **42**(12): 3065-72.

Gao, Y., H. Li, S. Liu, X. Zhang y S. Sun (2014). "Synergistic effect of fluconazole and doxycycline against *Candida albicans* biofilms resulting from calcium fluctuation and downregulation of fluconazole-inducible efflux pump gene overexpression." J Med Microbiol **63**(Pt 7): 956-61.

Garcia-Effron, G., S. K. Katiyar, S. Park, T. D. Edlind y D. S. Perlin (2008). "A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in Fks1p in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility." Antimicrob Agents Chemother **52**(7): 2305-12.

Garcia-Effron, G., D. P. Kontoyiannis, R. E. Lewis y D. S. Perlin (2008). "Caspofungin-resistant *Candida tropicalis* strains causing breakthrough fungemia in patients at high risk for hematologic malignancies." Antimicrob Agents Chemother **52**(11): 4181-3.

Garcia-Effron, G., S. Lee, S. Park, J. D. Cleary y D. S. Perlin (2009). "Effect of *Candida glabrata* FKS1 and FKS2 mutations on echinocandin sensitivity and kinetics of 1,3-beta-D-glucan synthase: implication for the existing susceptibility breakpoint." Antimicrob Agents Chemother **53**(9): 3690-9.

Garcia-Ruiz, J. C., L. Lopez-Soria, I. Olazabal, E. Amutio, I. Arrieta-Aguirre, V. Velasco-Benito, J. Ponton y M. D. Moragues (2013). "Invasive infections caused by *Saprochaete capitata* in patients with haematological malignancies: report of five cases and review of the antifungal therapy." Rev Iberoam Micol **30**(4): 248-55.

Geber, A., C. A. Hitchcock, J. E. Swartz, F. S. Pullen, K. E. Marsden, K. J. Kwon-Chung y J. E. Bennett (1995). "Deletion of the *Candida glabrata* ERG3 and ERG11 genes: effect on cell viability, cell growth, sterol composition, and antifungal susceptibility." Antimicrob Agents Chemother **39**(12): 2708-17.

Georgopapadakou, N. H. y T. J. Walsh (1996). "Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies." Antimicrob Agents Chemother **40**(2): 279-91.

Gray, K. C., D. S. Palacios, I. Dailey, M. M. Endo, B. E. Uno, B. C. Wilcock y M. D. Burke (2012). "Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(7): 2234-9.

Graybill, J. R., R. Bocanegra, L. K. Najvar, D. Loebenberg y M. F. Luther (1998). "Granulocyte colony-stimulating factor and azole antifungal therapy in murine aspergillosis: role of immune suppression." Antimicrob Agents Chemother **42**(10): 2467-73.

Grossman, N. T., C. D. Pham, A. A. Cleveland y S. R. Lockhart (2015). "Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida parapsilosis* isolates from a U.S. surveillance system." Antimicrob Agents Chemother **59**(2): 1030-7.

Guinea, J., M. Sanchez-Somolinos, O. Cuevas, T. Pelaez y E. Bouza (2006). "Fluconazole resistance mechanisms in *Candida krusei*: the contribution of efflux-pumps." Med Mycol **44**(6): 575-8.

Hachem, R., H. Hanna, D. Kontoyiannis, Y. Jiang y I. Raad (2008). "The changing epidemiology of invasive candidiasis: *Candida glabrata* and *Candida krusei* as the leading causes of candidemia in hematologic malignancy." Cancer **112**(11): 2493-9.

Healey, K. R., C. Jimenez Ortigosa, E. Shor y D. S. Perlin (2016). "Genetic Drivers of Multidrug Resistance in *Candida glabrata*." Front Microbiol **7**: 1995.

Healey, K. R., Y. Zhao, W. B. Perez, S. R. Lockhart, J. D. Sobel, D. Farmakiotis, D. P. Kontoyiannis, D. Sanglard, S. J. Taj-Aldeen, B. D. Alexander, C. Jimenez-Ortigosa, E. Shor y D. S. Perlin (2016). "Prevalent mutator genotype identified in fungal pathogen *Candida glabrata* promotes multi-drug resistance." Nat Commun **7**: 11128.

Heilmann, C. J., A. G. Sorgo, S. Mohammadi, G. J. Sosinska, C. G. de Koster, S. Brul, L. J. de Koning y F. M. Klis (2013). "Surface stress induces a conserved cell wall stress response in the pathogenic fungus *Candida albicans*." Eukaryot Cell **12**(2): 254-64.

Henry, K. W., J. T. Nickels y T. D. Edlind (2000). "Upregulation of *ERG* genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors." Antimicrob Agents Chemother **44**(10): 2693-700.

Holzheimer, R. G. y H. Dralle (2002). "Management of mycoses in surgical patients - review of the literature." Eur J Med Res **7**(5): 200-26.

Hoot, S. J., A. R. Smith, R. P. Brown y T. C. White (2011). "An A643V amino acid substitution in Upc2p contributes to azole resistance in well-characterized clinical isolates of *Candida albicans*." Antimicrob Agents Chemother **55**(2): 940-2.

Hull, C. M., J. E. Parker, O. Bader, M. Weig, U. Gross, A. G. Warrilow, D. E. Kelly y S. L. Kelly (2012). "Facultative sterol uptake in an ergosterol-deficient clinical isolate of *Candida glabrata* harboring a missense mutation in *ERG11* and exhibiting cross-resistance to azoles and amphotericin B." Antimicrob Agents Chemother **56**(8): 4223-32.

Imhof, A., S. A. Balajee, D. N. Fredricks, J. A. Englund y K. A. Marr (2004). "Breakthrough fungal infections in stem cell transplant recipients receiving voriconazole." Clin Infect Dis **39**(5): 743-6.

Jia, X. M., Z. P. Ma, Y. Jia, P. H. Gao, J. D. Zhang, Y. Wang, Y. G. Xu, L. Wang, Y. Y. Cao, Y. B. Cao, L. X. Zhang y Y. Y. Jiang (2008). "*RTA2*, a novel gene involved in azole resistance in *Candida albicans*." Biochem Biophys Res Commun **373**(4): 631-6.

Jiang, C., D. Dong, B. Yu, G. Cai, X. Wang, Y. Ji y Y. Peng (2013). "Mechanisms of azole resistance in 52 clinical isolates of *Candida tropicalis* in China." J Antimicrob Chemother **68**(4): 778-85.

Jin, L., Z. Cao, Q. Wang, Y. Wang, X. Wang, H. Chen y H. Wang (2018). "*MDR1* overexpression combined with *ERG11* mutations induce high-level fluconazole resistance in *Candida tropicalis* clinical isolates." BMC Infect Dis **18**(1): 162.

Kadir, T., R. Pisiriciler, S. Akyuz, A. Yarat, N. Emekli y A. Ipbuker (2002). "Mycological and cytological examination of oral candidal carriage in diabetic patients and non-diabetic control subjects: thorough analysis of local aetiologic and systemic factors." J Oral Rehabil **29**(5): 452-7.

Kekeya, H., Y. Miyazaki, H. Miyazaki, K. Nyswaner, B. Grimberg y J. E. Bennett (2000). "Genetic analysis of azole resistance in the Darlington strain of *Candida albicans*." Antimicrob Agents Chemother **44**(11): 2985-90.

Kanoshiki, R. L., S. B. de Paula, J. P. Santos, A. T. Morey, N. B. Souza, L. M. Yamauchi, B. P. Dias Filho y S. F. Yamada-Ogatta (2015). "Effects of fluconazole treatment of mice infected with fluconazole-susceptible and -resistant *Candida tropicalis* on fungal cell surface hydrophobicity, adhesion and biofilm formation." Indian J Med Microbiol **33 Suppl**: 97-101.

Karababa, M., A. T. Coste, B. Rognon, J. Bille y D. Sanglard (2004). "Comparison of gene expression profiles of *Candida albicans* azole-resistant clinical isolates and laboratory strains exposed to drugs inducing multidrug transporters." Antimicrob Agents Chemother **48**(8): 3064-79.

Katiyar, S. y T. Edlind (2015). Echinocandins: Resistance mechanisms. In A. T. Coste, and P. Vandeputte (Eds), Antifungal. From genomics to resistance and the development of novel agents (1st ed., pp. 55-70). Norfolk, UK: Caister Academic Press,

Katiyar, S. K., A. Alastruey-Izquierdo, K. R. Healey, M. E. Johnson, D. S. Perlin y T. D. Edlind (2012). "Fks1 and Fks2 are functionally redundant but differentially regulated in *Candida glabrata*: implications for echinocandin resistance." Antimicrob Agents Chemother **56**(12): 6304-9.

Kelly, S. L., D. C. Lamb y D. E. Kelly (1999). "Y132H substitution in *Candida albicans* sterol 14alpha-demethylase confers fluconazole resistance by preventing binding to haem." FEMS Microbiol Lett **180**(2): 171-5.

Kelly, S. L., D. C. Lamb, D. E. Kelly, N. J. Manning, J. Loeffler, H. Hebart, U. Schumacher y H. Einsele (1997). "Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol delta5,6-desaturation." FEBS Lett **400**(1): 80-2.

Kelly, S. L., D. C. Lamb, J. Loeffler, H. Einsele y D. E. Kelly (1999). "The G464S amino acid substitution in *Candida albicans* sterol 14alpha-demethylase causes fluconazole resistance in the clinic through reduced affinity." Biochem Biophys Res Commun **262**(1): 174-9.

Khan, Z. U., S. Ahmad, I. Al-Obaid, N. A. Al-Sweih, L. Joseph y D. Farhat (2008). "Emergence of resistance to amphotericin B and triazoles in *Candida glabrata* vaginal isolates in a case of recurrent vaginitis." J Chemother **20**(4): 488-91.

Kofteridis, D. P., E. Mantadakis, A. D. Karatzanis, C. A. Bourolias, G. Papazoglou, G. A. Velegrakis y G. Samonis (2008). "Non-*Candida albicans* *Candida mediastinitis* of odontogenic origin in a diabetic patient." Med Mycol **46**(4): 345-8.

Kullberg, B. J. y M. C. Arendrup (2015). "Invasive Candidiasis." N Engl J Med **373**(15): 1445-56.

Kurtzman, C., J. W. Fell and T. Beekhout (2011). *The yeast: A taxonomic study*. Elsevier.

Kurtzman, C. P. y C. J. Robnett (1997). "Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene." J Clin Microbiol **35**(5): 1216-23.

Kusch, H., K. Biswas, S. Schwanfelder, S. Engelmann, P. D. Rogers, M. Hecker y J. Morschhauser (2004). "A proteomic approach to understanding the development of multidrug-resistant *Candida albicans* strains." Mol Genet Genomics **271**(5): 554-65.

Lackner, M., A. Martin-Vicente y C. Lass-Flörl (2014). "Multidrug- and cross-resistant *Candida*: The looming threat." Curr Fungal Infect Rep **9**(1): 23-26.

Lackner, M., M. Tscherner, M. Schaller, K. Kuchler, C. Mair, B. Sartori, F. Istel, M. C. Arendrup y C. Lass-Flörl (2014). "Positions and numbers of *FKS* mutations in *Candida albicans* selectively influence *in vitro* and *in vivo* susceptibilities to echinocandin treatment." Antimicrob Agents Chemother **58**(7): 3626-35.

Lamb, D. C., D. E. Kelly, W. H. Schunck, A. Z. Shyadehi, M. Akhtar, D. J. Lowe, B. C. Baldwin y S. L. Kelly (1997). "The mutation T315A in *Candida albicans* sterol 14alpha-demethylase causes reduced enzyme activity and fluconazole resistance through reduced affinity." J Biol Chem **272**(9): 5682-8.

Laniado-Laborin, R. y M. N. Cabrales-Vargas (2009). "Amphotericin B: side effects and toxicity." Rev Iberoam Micol **26**(4): 223-7.

Lass-Flori, C. (2009). "The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe." Mycoses **52**(3): 197-205.

Lass-Flori, C. y M. Cuenca-Estrella (2017). "Changes in the epidemiological landscape of invasive mould infections and disease." J Antimicrob Chemother **72**(suppl_1): i5-i11.

Lattif, A. y K. Swindell (2010). History of Antifungals. Antifungal therapy: 1-10.

Lee, I., N. O. Fishman, T. E. Zaoutis, K. H. Morales, M. G. Weiner, M. Synnestvedt, I. Nachamkin y E. Lautenbach (2009). "Risk factors for fluconazole-resistant *Candida glabrata* bloodstream infections." Arch Intern Med **169**(4): 379-83.

Lepak, A., J. Nett, L. Lincoln, K. Marchillo y D. Andes (2006). "Time course of microbiologic outcome and gene expression in *Candida albicans* during and following *in vitro* and *in vivo* exposure to fluconazole." Antimicrob Agents Chemother **50**(4): 1311-9.

Leroy, O., J. P. Gangneux, P. Montravers, J. P. Mira, F. Gouin, J. P. Sollet, J. Carlet, J. Reynes, M. Rosenheim, B. Regnier y O. Lortholary (2009). "Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006)." Crit Care Med **37**(5): 1612-8.

Leung, A. Y., C. S. Chim, P. L. Ho, V. C. Cheng, K. Y. Yuen, A. K. Lie, W. Y. Au, R. Liang y Y. L. Kwong (2002). "*Candida tropicalis* fungaemia in adult patients with haematological malignancies: clinical features and risk factors." J Hosp Infect **50**(4): 316-9.

Levin, A. S., S. F. Costa, N. S. Mussi, M. Basso, S. I. Sinto, C. Machado, D. C. Geiger, M. C. Villares, A. Z. Schreiber, A. A. Barone y M. L. Branchini (1998). "*Candida parapsilosis* fungemia associated with implantable and semi-implantable central

venous catheters and the hands of healthcare workers." Diagn Microbiol Infect Dis **30**(4): 243-9.

Li, L., S. Redding y A. Dongari-Bagtzoglou (2007). "*Candida glabrata*: an emerging oral opportunistic pathogen." J Dent Res **86**(3): 204-15.

Livak, K. y T. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **408**(4): 402-8.

Lockhart, S. R., K. A. Etienne, S. Vallabhaneni, J. Farooqi, A. Chowdhary, N. P. Govender, A. L. Colombo, B. Calvo, C. A. Cuomo, C. A. Desjardins, E. L. Berkow, M. Castanheira, R. E. Magobo, K. Jabeen, R. J. Asghar, J. F. Meis, B. Jackson, T. Chiller y A. P. Litvintseva (2017). "Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant *Candida auris* on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses." Clin Infect Dis **64**(2): 134-140.

Lockhart, S. R., S. Joly, K. Vargas, J. Swails-Wenger, L. Enger y D. R. Soll (1999). "Natural defenses against *Candida* colonization breakdown in the oral cavities of the elderly." J Dent Res **78**(4): 857-68.

Lortholary, O., M. Desnos-Ollivier, K. Sitbon, A. Fontanet, S. Bretagne y F. Dromer (2011). "Recent exposure to caspofungin or fluconazole influences the epidemiology of candidemia: a prospective multicenter study involving 2,441 patients." Antimicrob Agents Chemother **55**(2): 532-8.

Lue, N. F. (2010). "Plasticity of telomere maintenance mechanisms in yeast." Trends Biochem Sci **35**(1): 8-17.

Lyon, G. M., S. Karatela, S. Sunay y Y. Adiri (2010). "Antifungal susceptibility testing of *Candida* isolates from the *Candida* surveillance study." J Clin Microbiol **48**(4): 1270-5.

Mackinnon, J. E. y R. C. Artagaveytia-Allende (1945). "The So-Called Genus *Candida* Berkhout, 1923." J Bacteriol **49**(4): 317-34.

Magill, S. S., J. R. Edwards, W. Bamberg, Z. G. Beldavs, G. Dumyati, M. A. Kainer, R. Lynfield, M. Maloney, L. McAllister-Hollod, J. Nadle, S. M. Ray, D. L. Thompson, L. E. Wilson y S. K. Fridkin (2014). "Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections." N Engl J Med **370**(13): 1198-208.

Mansfield, B. E., H. N. Oltean, B. G. Oliver, S. J. Hoot, S. E. Leyde, L. Hedstrom y T. C. White (2016). "Azole drugs are imported by facilitated diffusion in *Candida albicans* and other pathogenic fungi." PLoS Pathog **6**(9): e1001126.

Manzano-Gayosso, P., F. Hernandez-Hernandez, L. J. Mendez-Tovar, J. Gonzalez-Monroy y R. Lopez-Martinez (2003). "Fungal peritonitis in 15 patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD)." Mycoses **46**(9-10): 425-9.

Marichal, P., L. Koymans, S. Willemsens, D. Bellens, P. Verhasselt, W. Luyten, M. Borgers, F. C. S. Ramaekers, F. C. Odds y H. Vanden Bossche (1999). "Contribution of mutations in the cytochrome P450 14alpha-demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*." Microbiology **145 (Pt 10)**: 2701-2713.

Martel, C. M., J. E. Parker, O. Bader, M. Weig, U. Gross, A. G. Warrilow, D. E. Kelly y S. L. Kelly (2010). "A clinical isolate of *Candida albicans* with mutations in *ERG11* (encoding sterol 14alpha-demethylase) and *ERG5* (encoding C22 desaturase) is cross resistant to azoles and amphotericin B." Antimicrob Agents Chemother **54**(9): 3578-83.

Marti-Carrizosa, M., F. Sanchez-Reus, F. March y P. Coll (2014). "Fungemia in a Spanish hospital: the role of *Candida parapsilosis* over a 15-year period." Scand J Infect Dis **46**(6): 454-61.

Mayayo, E., J. Landeyro, A. Stchigel, A. Gazzoni y J. Capilla (2010). "Infiltración perineural por células fúngicas. Presentación de un caso y revisión de la literatura." Revista Iberoamericana de Micología **27**(2): 94-97.

Mayer, F. L., D. Wilson y B. Hube (2013). "*Candida albicans* pathogenicity mechanisms." Virulence **4**(2): 119-28.

McCarthy, M. W. y T. J. Walsh (2017). "Molecular diagnosis of invasive mycoses of the central nervous system." Expert Rev Mol Diagn **17**(2): 129-139.

McCarty, T. P. y P. G. Pappas (2016). "Invasive Candidiasis." Infect Dis Clin North Am **30**(1): 103-24.

Miyazaki, H., Y. Miyazaki, A. Geber, T. Parkinson, C. Hitchcock, D. J. Falconer, D. J. Ward, K. Marsden y J. E. Bennett (1998). "Fluconazole resistance associated with drug efflux and increased transcription of a drug transporter gene, *PDH1*, in *Candida glabrata*." Antimicrob Agents Chemother **42**(7): 1695-701.

Miyazaki, Y., A. Geber, H. Miyazaki, D. Falconer, T. Parkinson, C. Hitchcock, B. Grimberg, K. Nyswaner y J. E. Bennett (1999). "Cloning, sequencing, expression and allelic sequence diversity of *ERG3* (C-5 sterol desaturase gene) in *Candida albicans*." Gene **236**(1): 43-51.

Moran, G., D. Coleman y D. Sullivan (2012). An Introduction to the Medically Important *Candida* Species. In R.A. Calderone and C.J. Clancy (Eds), Candida and candidiasis (2nd ed., pp. 11-25) Washington DC, USA: ASM Press.

Morio, F., C. Loge, B. Besse, C. Hennequin y P. Le Pape (2010). "Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature." Diagn Microbiol Infect Dis **66**(4): 373-84.

Morio, F., F. Pagniez, M. Besse, F. Gay-andrieu, M. Miegerville y P. Le Pape (2013). "Deciphering azole resistance mechanisms with a focus on transcription factor-encoding genes *TAC1*, *MRR1* and *UPC2* in a set of fluconazole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*." Int J Antimicrob Agents **42**(5): 410-5.

Morschhauser, J. (2010). "Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi." Fungal Genet Biol **47**(2): 94-106.

Morschhauser, J., K. S. Barker, T. T. Liu, B. W. J. Bla, R. Homayouni y P. D. Rogers (2007). "The transcription factor Mrr1p controls expression of the *MDR1* efflux pump and mediates multidrug resistance in *Candida albicans*." PLoS Pathog **3**(11): e164.

Mukherjee, S., X. Zha, I. Tabas y F. R. Maxfield (1998). "Cholesterol distribution in living cells: fluorescence imaging using dehydroergosterol as a fluorescent cholesterol analog." Biophys J **75**(4): 1915-25.

Mukhopadhyay, K., A. Kohli y R. Prasad (2002). "Drug susceptibilities of yeast cells are affected by membrane lipid composition." Antimicrob Agents Chemother **46**(12): 3695-705.

Muller, F. M., K. E. Werner, M. Kasai, A. Francesconi, S. J. Chanock y T. J. Walsh (1998). "Rapid extraction of genomic DNA from medically important yeasts and filamentous fungi by high-speed cell disruption." J Clin Microbiol **36**(6): 1625-9.

Nabili, M., A. Abdollahi Gohar, H. Badali, R. Mohammadi y M. Moazeni (2016). "Amino acid substitutions in Erg11p of azole-resistant *Candida glabrata*: Possible effective substitutions and homology modelling." J Glob Antimicrob Resist **5**: 42-46.

Nagayoshi, Y., T. Miyazaki, S. Shimamura, H. Nakayama, A. Minematsu, S. Yamauchi, T. Takazono, S. Nakamura, K. Yanagihara, S. Kohno, H. Mukae y K. Izumikawa (2017). "Unexpected effects of azole transporter inhibitors on antifungal susceptibility in *Candida glabrata* and other pathogenic *Candida* species." PLoS One **12**(7): e0180990.

Nakayama, H., M. Izuta, N. Nakayama, M. Arisawa y Y. Aoki (2000). "Depletion of the squalene synthase (*ERG9*) gene does not impair growth of *Candida glabrata* in mice." Antimicrob Agents Chemother **44**(9): 2411-8.

Navarro-Rodriguez, P., A. Martin-Vicente, L. Lopez-Fernandez, J. Guarro y J. Capilla (2019). "Expression of *ERG11* and efflux pump genes *CDR1*, *CDR2* and *SNQ2* in voriconazole susceptible and resistant *Candida glabrata* strains." Med Mycol.

Nosek, J., Z. Holesova, P. Kosa, A. Gacser y L. Tomaska (2009). "Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*." Curr Genet **55**(5): 497-509.

Odds, F. C., A. J. Brown y N. A. Gow (2003). "Antifungal agents: mechanisms of action." Trends Microbiol **11**(6): 272-9.

Orasch, C., O. Marchetti, J. Garbino, J. Schrenzel, S. Zimmerli, K. Muhlethaler, G. Pfyffer, C. Ruef, J. Fehr, R. Zbinden, T. Calandra, J. Bille y Funginos (2014). "Candida species distribution and antifungal susceptibility testing according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and new vs. old Clinical and Laboratory Standards Institute clinical breakpoints: a 6-year prospective candidaemia survey from the fungal infection network of Switzerland." Clin Microbiol Infect **20**(7): 698-705.

Ortoneda, M., J. Capilla, F. J. Pastor, C. Serena y J. Guarro (2004). "Interaction of granulocyte colony-stimulating factor and high doses of liposomal amphotericin B in the treatment of systemic murine scedosporiosis." Diagn Microbiol Infect Dis **50**(4): 247-51.

Oxman, D. A., J. K. Chow, G. Frendl, S. Hadley, S. HersHKovitz, P. Ireland, L. A. McDermott, K. Tsai, F. M. Marty, D. P. Kontoyiannis y Y. Golan (2010). "Candidaemia associated with decreased *in vitro* fluconazole susceptibility: is *Candida* speciation predictive of the susceptibility pattern?" J Antimicrob Chemother **65**(7): 1460-5.

Panackal, A. A., J. L. Gribskov, J. F. Staab, K. A. Kirby, M. Rinaldi y K. A. Marr (2006). "Clinical significance of azole antifungal drug cross-resistance in *Candida glabrata*." J Clin Microbiol **44**(5): 1740-3.

Papp, C., K. Kocsis, R. Toth, L. Bodai, J. R. Willis, E. Ksiezopolska, N. E. Lozoya-Perez, C. Vagvolgyi, H. Mora Montes, T. Gabaldon, J. D. Nosanchuk y A. Gacser (2018). "Echinocandin-Induced Microevolution of *Candida parapsilosis* Influences Virulence and Abiotic Stress Tolerance." mSphere **3**(6).

Pappas, P. G. (2006). "Invasive candidiasis." Infect Dis Clin North Am **20**(3): 485-506.

Pappas, P. G., C. A. Kauffman, D. R. Andes, C. J. Clancy, K. A. Marr, L. Ostrosky-Zeichner, A. C. Reboli, M. G. Schuster, J. A. Vazquez, T. J. Walsh, T. E. Zaoutis y J. D. Sobel (2016). "Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America." Clin Infect Dis **62**(4): e1-50.

Pappas, P. G., M. S. Lionakis, M. C. Arendrup, L. Ostrosky-Zeichner y B. J. Kullberg (2018). "Invasive candidiasis." Nat Rev Dis Primers **4**: 18026.

Pappas, P. G., J. H. Rex, J. Lee, R. J. Hamill, R. A. Larsen, W. Powderly, C. A. Kauffman, N. Hyslop, J. E. Mangino, S. Chapman, H. W. Horowitz, J. E. Edwards y W. E. Dismukes (2003). "A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients." Clin Infect Dis **37**(5): 634-43.

Park, S., R. Kelly, J. N. Kahn, J. Robles, M. J. Hsu, E. Register, W. Li, V. Vyas, H. Fan, G. Abruzzo, A. Flattery, C. Gill, G. Chrebet, S. A. Parent, M. Kurtz, H. Teppler, C. M. Douglas y D. S. Perlin (2005). "Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp. isolates." Antimicrob Agents Chemother **49**(8): 3264-73.

Patil, S., R. S. Rao, B. Majumdar y S. Anil (2015). "Clinical Appearance of Oral *Candida* Infection and Therapeutic Strategies." Front Microbiol **6**: 1391.

Paul, S., T. B. Bair y W. S. Moye-Rowley (2014). "Identification of genomic binding sites for *Candida glabrata* Pdr1 transcription factor in wild-type and rho0 cells." Antimicrob Agents Chemother **58**(11): 6904-12.

Peman, J. y M. Salavert (2012). "[General epidemiology of invasive fungal disease]." Enferm Infecc Microbiol Clin **30**(2): 90-8.

Perea, S., J. L. Lopez-Ribot, W. R. Kirkpatrick, R. K. McAtee, R. A. Santillan, M. Martinez, D. Calabrese, D. Sanglard y T. F. Patterson (2001). "Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients." Antimicrob Agents Chemother **45**(10): 2676-84.

Perlin, D. S. (2009). "Antifungal drug resistance: do molecular methods provide a way forward?" Curr Opin Infect Dis **22**(6): 568-73.

Perlin, D. S. (2015). "Mechanisms of echinocandin antifungal drug resistance." Ann N Y Acad Sci **1354**: 1-11.

Perlin, D. S., R. Rautemaa-Richardson y A. Alastruey-Izquierdo (2017). "The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management." Lancet Infect Dis **17**(12): e383-e392.

Pfaller, M., D. Neofytos, D. Diekema, N. Azie, H. U. Meier-Kriesche, S. P. Quan y D. Horn (2012). "Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance(R)) registry, 2004-2008." Diagn Microbiol Infect Dis **74**(4): 323-31.

Pfaller, M. A. (2012). "Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment." Am J Med **125**(1 Suppl): S3-13.

Pfaller, M. A. y D. J. Diekema (2004). "Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*." Clin Microbiol Infect **10 Suppl 1**: 11-23.

Pfaller, M. A. y D. J. Diekema (2007). "Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem." Clin Microbiol Rev **20**(1): 133-63.

Pfaller, M. A. y D. J. Diekema (2012). "Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012." J Clin Microbiol **50**(9): 2846-56.

Pfaller, M. A., D. J. Diekema, J. H. Rex, A. Espinel-Ingroff, E. M. Johnson, D. Andes, V. Chaturvedi, M. A. Ghannoum, F. C. Odds, M. G. Rinaldi, D. J. Sheehan, P. Troke, T. J. Walsh y D. W. Warnock (2006). "Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against voriconazole: analysis and proposal for interpretive breakpoints." J Clin Microbiol **44**(3): 819-26.

Pfaller, M. A., R. N. Jones y M. Castanheira (2014). "Regional data analysis of *Candida non-albicans* strains collected in United States medical sites over a 6-year period, 2006-2011." Mycoses **57**(10): 602-11.

Pfaller, M. A., P. R. Rhomberg, S. A. Messer, R. N. Jones y M. Castanheira (2015). "Isavuconazole, micafungin, and 8 comparator antifungal agents' susceptibility profiles for common and uncommon opportunistic fungi collected in 2013: temporal

analysis of antifungal drug resistance using CLSI species-specific clinical breakpoints and proposed epidemiological cutoff values." Diagn Microbiol Infect Dis **82**(4): 303-13.

Plaine, A., L. Walker, G. Da Costa, H. M. Mora-Montes, A. McKinnon, N. A. Gow, C. Gaillardin, C. A. Munro y M. L. Richard (2008). "Functional analysis of *Candida albicans* GPI-anchored proteins: roles in cell wall integrity and caspofungin sensitivity." Fungal Genet Biol **45**(10): 1404-14.

Prasad, R., P. De Wergifosse, A. Goffeau y E. Balzi (1995). "Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, *CDR1*, conferring multiple resistance to drugs and antifungals." Curr Genet **27**(4): 320-9.

Prasad, R., N. A. Gaur, M. Gaur y S. S. Komath (2006). "Efflux pumps in drug resistance of *Candida*." Infect Disord Drug Targets **6**(2): 69-83.

Prasad, R. y M. K. Rawal (2014). "Efflux pump proteins in antifungal resistance." Front Pharmacol **5**: 202.

Prasad, R., A. H. Shah y M. K. Rawal (2016). "Antifungals: Mechanism of Action and Drug Resistance." Adv Exp Med Biol **892**: 327-349.

Quindós, G. (2014). "Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face." Rev Iberoam Micol **31**(1): 42-8.

Quindós, G., E. Canton, A. Espinel-Ingroff, J. L. López Ribot, J. Pemán García, E. Martín y M. Cuenca-Estrella (2015). Resistencia a los fármacos antifúngicos. In G. Quindós (Ed.), Micología clínica (1st ed., pp. 265-289) Barcelona, España: Elsevier.

Rajendran, R., L. Sherry, A. Deshpande, E. M. Johnson, M. F. Hanson, C. Williams, C. A. Munro, B. L. Jones y G. Ramage (2016). "A prospective surveillance study of candidaemia: Epidemiology, risk factors, antifungal treatment and outcome in hospitalized patients." Front Microbiol **7**: 915.

Reales-Calderon, J. A., G. Molero, C. Gil y J. L. Martinez (2016). "The fungal resistome: a risk and an opportunity for the development of novel antifungal therapies." Future Med Chem **8**(12): 1503-20.

Redding, S. W., W. R. Kirkpatrick, S. Saville, B. J. Coco, W. White, A. Fothergill, M. Rinaldi, T. Eng, T. F. Patterson y J. Lopez-Ribot (2003). "Multiple patterns of resistance to fluconazole in *Candida glabrata* isolates from a patient with oropharyngeal candidiasis receiving head and neck radiation." J Clin Microbiol **41**(2): 619-22.

Rex, J. H. y M. A. Pfaller (2002). "Has antifungal susceptibility testing come of age?" Clin Infect Dis **35**(8): 982-9.

Richard, M., P. De Groot, O. Courtin, D. Poulain, F. Klis y C. Gaillardin (2002). "GPI7 affects cell-wall protein anchorage in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*." Microbiology **148**(Pt 7): 2125-33.

Richardson, M. y C. Lass-Flörl (2008). "Changing epidemiology of systemic fungal infections." Clin Microbiol Infect **14 Suppl 4**: 5-24.

Rogers, P. D. y K. S. Barker (2012). Multidrug resistance transcriptional regulatory networks in *Candida*. In R Calderone, and C.J. Clancy (Eds) Candida y Candidiasis. (2nd edition ed., pp. 403-416). Washington DC: ASM Press.

Ruping, M. J., J. J. Vehreschild y O. A. Cornely (2008). "Patients at high risk of invasive fungal infections: when and how to treat." Drugs **68**(14): 1941-62.

Samaranayake, L. P. (1997). "*Candida krusei* infections and fluconazole therapy." Hong Kong Med J **3**(3): 312-314.

Sanchis, M., J. Capilla, M. Castanheira, A. Martin-Vicente, D. A. Sutton, A. W. Fothergill, N. P. Wiederhold y J. Guarro (2016). "Voriconazole minimum inhibitory concentrations are predictive of treatment outcome in experimental murine infections by *Candida glabrata*." Int J Antimicrob Agents **47**(4): 286-8.

Sanglard, D. (2011b). "Diagnosis of Antifungal Drug Resistance Mechanisms in Fungal Pathogens: Transcriptional Gene Regulation." Current Fungal Infection Reports **5**(3): 157-167.

Sanglard, D., F. Ischer y J. Bille (2001). "Role of ATP-binding-cassette transporter genes in high-frequency acquisition of resistance to azole antifungals in *Candida glabrata*." Antimicrob Agents Chemother **45**(4): 1174-83.

Sanglard, D., F. Ischer, D. Calabrese, P. A. Majcherczyk y J. Bille (1999). "The ATP binding cassette transporter gene *CgCDR1* from *Candida glabrata* is involved in the resistance of clinical isolates to azole antifungal agents." Antimicrob Agents Chemother **43**(11): 2753-65.

Sanglard, D., F. Ischer, L. Koymans y J. Bille (1998). "Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14alpha-demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents." Antimicrob Agents Chemother **42**(2): 241-53.

Sanglard, D., F. Ischer, M. Monod y J. Bille (1997). "Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of *CDR2*, a new multidrug ABC transporter gene." Microbiology **143** (Pt 2): 405-16.

Sanguinetti, M., B. Posteraro, B. Fiori, S. Ranno, R. Torelli y G. Fadda (2005). "Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance." Antimicrob Agents Chemother **49**(2): 668-79.

Sanguinetti, M., B. Posteraro, B. Fiori, S. Ranno, R. Torelli y G. Fadda (2005). "Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance." Antimicrob Agents Chemother **49**(2): 668-679.

Sanguinetti, M., B. Posteraro y C. Lass-Flörl (2015). "Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact." Mycoses **58**: 2-13.

Sasse, C., N. Dunkel, T. Schafer, S. Schneider, F. Dierolf, K. Ohlsen y J. Morschhauser (2012). "The stepwise acquisition of fluconazole resistance mutations causes a gradual loss of fitness in *Candida albicans*." Mol Microbiol **86**(3): 539-56.

Schauer, F. y R. Hanschke (1999). "[Taxonomy and ecology of the genus *Candida*]." Mycoses **42 Suppl 1**: 12-21.

Schubert, S., P. D. Rogers y J. Morschhauser (2008). "Gain-of-function mutations in the transcription factor *MRR1* are responsible for overexpression of the *MDR1* efflux pump in fluconazole-resistant *Candida dubliniensis* strains." Antimicrob Agents Chemother **52**(12): 4274-80.

Selmecki, A., A. Forche y J. Berman (2006). "Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*." Science **313**(5785): 367-70.

Seman, B. G., J. L. Moore, A. K. Scherer, B. A. Blair, S. Manandhar, J. M. Jones y R. T. Wheeler (2018). "Yeast and Filaments Have Specialized, Independent Activities in a Zebrafish Model of *Candida albicans* Infection." Infect Immun **86**(10).

Silva, A. P., I. M. Miranda, A. Guida, J. Synnott, R. Rocha, R. Silva, A. Amorim, C. Pina-Vaz, G. Butler y A. G. Rodrigues (2011). "Transcriptional profiling of azole-resistant *Candida parapsilosis* strains." Antimicrob Agents Chemother **55**(7): 3546-56.

Silva, D. B., L. M. Rodrigues, A. A. Almeida, K. M. Oliveira y A. B. Grisolia (2016). "Novel point mutations in the *ERG11* gene in clinical isolates of azole resistant *Candida* species." Mem Inst Oswaldo Cruz **111**(3): 192-9.

Sobel, J. D. (2016). "Recurrent vulvovaginal candidiasis." Am J Obstet Gynecol **214**(1): 15-21.

Sobel, J. D., S. Faro, R. W. Force, B. Foxman, W. J. Ledger, P. R. Nyirjesy, B. D. Reed y P. R. Summers (1998). "Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations." Am J Obstet Gynecol **178**(2): 203-11.

- Solanko, L. M., D. P. Sullivan, Y. Y. Sere, M. Szomek, A. Lunding, K. A. Solanko, A. Pizovic, L. D. Stanchev, T. G. Pomorski, A. K. Menon y D. Wustner (2018). "Ergosterol is mainly located in the cytoplasmic leaflet of the yeast plasma membrane." Traffic **19**(3): 198-214.
- Souza, A. C., B. B. Fuchs, H. M. Pinhati, R. A. Siqueira, F. Hagen, J. F. Meis, E. Mylonakis y A. L. Colombo (2015). "*Candida parapsilosis* Resistance to Fluconazole: Molecular Mechanisms and *In Vivo* Impact in Infected *Galleria mellonella* Larvae." Antimicrob Agents Chemother **59**(10): 6581-7.
- Strollo, S., M. S. Lionakis, J. Adjemian, C. A. Steiner y D. R. Prevots (2016). "Epidemiology of Hospitalizations Associated with Invasive Candidiasis, United States, 2002-2012(1)." Emerg Infect Dis **23**(1): 7-13.
- Sucher, A. J., E. B. Chahine y H. E. Balcer (2009). "Echinocandins: the newest class of antifungals." Ann Pharmacother **43**(10): 1647-57.
- Sudbery, P., N. Gow y J. Berman (2004). "The distinct morphogenic states of *Candida albicans*." Trends Microbiol **12**(7): 317-24.
- Sugar, A. M. y X. P. Liu (2000). "Effect of grapefruit juice on serum voriconazole concentrations in the mouse." Med Mycol **38**(3): 209-12.
- Tan, J., J. Zhang, W. Chen, Y. Sun, Z. Wan, R. Li y W. Liu (2015). "The A395T mutation in *ERG11* gene confers fluconazole resistance in *Candida tropicalis* causing candidemia." Mycopathologia **179**(3-4): 213-8.
- Theuretzbacher, U., F. Ihle y H. Derendorf (2006). "Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of voriconazole." Clin Pharmacokinet **45**(7): 649-63.
- Torelli, R., B. Posteraro, S. Ferrari, M. La Sorda, G. Fadda, D. Sanglard y M. Sanguinetti (2008). "The ATP-binding cassette transporter-encoding gene *CgSNQ2* is contributing to the *CgPDR1*-dependent azole resistance of *Candida glabrata*." Mol Microbiol **68**(1): 186-201.

Trofa, D., A. Gacser y J. D. Nosanchuk (2008). "*Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen." Clin Microbiol Rev **21**(4): 606-25.

Tsai, H. F., M. Bard, K. Izumikawa, A. A. Krol, A. M. Sturm, N. T. Culbertson, C. A. Pierson y J. E. Bennett (2004). "*Candida glabrata* erg1 mutant with increased sensitivity to azoles and to low oxygen tension." Antimicrob Agents Chemother **48**(7): 2483-9.

Tsai, H. F., A. A. Krol, K. E. Sarti y J. E. Bennett (2006). "*Candida glabrata* PDR1, a transcriptional regulator of a pleiotropic drug resistance network, mediates azole resistance in clinical isolates and petite mutants." Antimicrob Agents Chemother **50**(4): 1384-92.

Tsai, H. F., L. R. Sammons, X. Zhang, S. D. Suffis, Q. Su, T. G. Myers, K. A. Marr y J. E. Bennett (2010). "Microarray and molecular analyses of the azole resistance mechanism in *Candida glabrata* oropharyngeal isolates." Antimicrob Agents Chemother **54**(8): 3308-17.

Tukmachev, V. A., L. V. Nedospasova, B. Zaslavskii y S. V. Rogozhin (1979). "[Effect of sodium dodecyl sulfate on biological membranes]." Biofizika **24**(1): 55-60.

Ture, Z. y E. Alp (2018). "Infection control measures to prevent hospital transmission of *candida*." Hosp Pract (1995) **46**(5): 253-257.

Vale-Silva, L. y D. Sanglard (2015). "Tipping the balance both ways: drug resistance and virulence in *Candida glabrata*." FEMS Yeast Res **15**(4): 1-8.

Vale-Silva, L. A. (2015). Molecular mechanisms of resistance of *Candida* spp. to membrane targets antifungals. In A. T. Coste and P. Vandeputte (Eds.), Antifungals. From genomics to resistance and the development of novel agents (1ST ed., pp 1-25). Norfolk, UK: Caister Academic Press Antifungals.

Valgus, J. M. (2003). "What's New in Antifungals?" Curr Infect Dis Rep **5**(1): 16-21.

- van Asbeck, E., K. V. Clemons, M. Martinez, A. J. Tong y D. A. Stevens (2008). "Significant differences in drug susceptibility among species in the *Candida parapsilosis* group." Diagn Microbiol Infect Dis **62**(1): 106-9.
- vanden Bossche, H., P. Marichal, F. C. Odds, L. Le Jeune y M. C. Coene (1992). "Characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate." Antimicrob Agents Chemother **36**(12): 2602-10.
- Vandeputte, P., G. Larcher, T. Berges, G. Renier, D. Chabasse y J. P. Bouchara (2005). "Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*." Antimicrob Agents Chemother **49**(11): 4608-15.
- Vermitsky, J. P. y T. D. Edlind (2004). "Azole resistance in *Candida glabrata*: coordinate upregulation of multidrug transporters and evidence for a Pdr1-like transcription factor." Antimicrob Agents Chemother **48**(10): 3773-81.
- Vik, A. y J. Rine (2001). "Upc2p and Ecm22p, dual regulators of sterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol **21**(19): 6395-405.
- Viscoli, C., C. Girmenia, A. Marinus, L. Collette, P. Martino, B. Vandercam, C. Doyen, B. Lebeau, D. Spence, V. Krcmery, B. De Pauw y F. Meunier (1999). "Candidemia in cancer patients: a prospective, multicenter surveillance study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC)." Clin Infect Dis **28**(5): 1071-9.
- Wachtler, B., D. Wilson y B. Hube (2011). "*Candida albicans* adhesion to and invasion and damage of vaginal epithelial cells: stage-specific inhibition by clotrimazole and bifonazole." Antimicrob Agents Chemother **55**(9): 4436-9.
- Walker, L., P. Sood, M. D. Lenardon, G. Milne, J. Olson, G. Jensen, J. Wolf, A. Casadevall, J. Adler-Moore y N. A. R. Gow (2018). "The Viscoelastic Properties of the Fungal Cell Wall Allow Traffic of AmBisome as Intact Liposome Vesicles." MBio **9**(1).
- Walsh, T. J., A. Katragkou, T. Chen, C. M. Salvatore y E. Roilides (2019). "Invasive Candidiasis in Infants and Children: Recent Advances in Epidemiology, Diagnosis, and Treatment." J Fungi (Basel) **5**(1).

Walsh, T. J. y W. G. Merz (1986). "Pathologic features in the human alimentary tract associated with invasiveness of *Candida tropicalis*." Am J Clin Pathol **85**(4): 498-502.

Whaley, S. G., E. L. Berkow, J. M. Rybak, A. T. Nishimoto, K. S. Barker y P. D. Rogers (2017). "Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-*albicans* *Candida* Species." Front Microbiol **7**: 2173.

Whaley, S. G., S. Tsao, S. Weber, Q. Zhang, K. S. Barker, M. Raymond y P. D. Rogers (2016). "The *RTA3* gene, encoding a putative lipid translocase, influences the susceptibility of *Candida albicans* to fluconazole." Antimicrob Agents Chemother **60**(10): 6060-6.

Whaley, S. G., Q. Zhang, K. E. Caudle y P. D. Rogers (2018). "Relative Contribution of the ABC Transporters Cdr1, Pdh1, and Snq2 to Azole Resistance in *Candida glabrata*." Antimicrob Agents Chemother **62**(10).

White, T. C. (1997). "Increased mRNA levels of *ERG16*, *CDR*, and *MDR1* correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus." Antimicrob Agents Chemother **41**(7): 1482-7.

White, T. C. (1997). "The presence of an R467K amino acid substitution and loss of allelic variation correlate with an azole-resistant lanosterol 14alpha demethylase in *Candida albicans*." Antimicrob Agents Chemother **41**(7): 1488-94.

White, T. C., S. Holleman, F. Dy, L. F. Mirels y D. A. Stevens (2002). "Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*." Antimicrob Agents Chemother **46**(6): 1704-13.

Williams, D. W., T. Kuriyama, S. Silva, S. Malic y M. A. Lewis (2011). "*Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention." Periodontol 2000 **55**(1): 250-65.

Wingard, J. R. (1995). "Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients." Clin Infect Dis **20**(1): 115-25.

Wingard, J. R. y H. Leather (2004). "A new era of antifungal therapy." Biol Blood Marrow Transplant **10**(2): 73-90.

Wisplinghoff, H., T. Bischoff, S. M. Tallent, H. Seifert, R. P. Wenzel y M. B. Edmond (2004). "Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study." Clin Infect Dis **39**(3): 309-17.

Wu, J. Y., H. Guo, H. M. Wang, G. H. Yi, L. M. Zhou, X. W. He, Y. Zhang y J. Xu (2017). "Multilocus sequence analyses reveal extensive diversity and multiple origins of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* from tropical China." Sci Rep **7**: 42537.

Wu, Y., M. Wu, Y. Wang, Y. Chen, J. Gao y C. Ying (2018). "ERG11 couples oxidative stress adaptation, hyphal elongation and virulence in *Candida albicans*." FEMS Yeast Res **18**(7).

Xiang, M. J., J. Y. Liu, P. H. Ni, S. Wang, C. Shi, B. Wei, Y. X. Ni y H. L. Ge (2013). "Erg11 mutations associated with azole resistance in clinical isolates of *Candida albicans*." FEMS Yeast Res **13**(4): 386-93.

Xiao, L., V. Madison, A. S. Chau, D. Loebenberg, R. E. Palermo y P. M. McNicholas (2004). "Three-dimensional models of wild-type and mutated forms of cytochrome P450 14 alpha-sterol demethylases from *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* provide insights into posaconazole binding." Antimicrob Agents Chemother **48**(2): 568-74.

Xisto, M. I., R. D. Caramalho, D. A. Rocha, A. Ferreira-Pereira, B. Sartori, E. Barreto-Bergter, M. L. Junqueira, C. Lass-Flörl y M. Lackner (2017). "Pan-azole-resistant *Candida tropicalis* carrying homozygous erg11 mutations at position K143R: a new emerging superbug?" J Antimicrob Chemother **72**(4): 988-992.

Yaman, G., I. Akyar y S. Can (2012). "Evaluation of the MALDI TOF-MS method for identification of *Candida* strains isolated from blood cultures." Diagn Microbiol Infect Dis **73**(1): 65-7.

Yang, H., J. Tong, C. W. Lee, S. Ha, S. H. Eom y Y. J. Im (2014). "Structural mechanism of ergosterol regulation by fungal sterol transcription factor Upc2." Nat Commun **6**: 6129.

Yang, H., J. Tong, C. W. Lee, S. Ha, S. H. Eom y Y. J. Im (2015). "Structural mechanism of ergosterol regulation by fungal sterol transcription factor Upc2." Nat Commun **6**: 6129.

Yang, Y. L., Y. A. Ho, H. H. Cheng, M. Ho y H. J. Lo (2004). "Susceptibilities of *Candida* species to amphotericin B and fluconazole: the emergence of fluconazole resistance in *Candida tropicalis*." Infect Control Hosp Epidemiol **25**(1): 60-4.

Yang, Y. L., A. H. Wang, C. W. Wang, W. T. Cheng, S. Y. Li, H. J. Lo y T. Hospitals (2008). "Susceptibilities to amphotericin B and fluconazole of *Candida* species in Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance of Yeasts 2006." Diagn Microbiol Infect Dis **61**(2): 175-80.

Yoo, J. I., C. W. Choi, K. M. Lee, Y. K. Kim, T. U. Kim, E. C. Kim, S. I. Joo, S. H. Yun, Y. S. Lee y B. S. Kim (2009). "National surveillance of antifungal susceptibility of *Candida* species in South Korean hospitals." Med Mycol **47**(5): 554-8.

Zhang, L., M. Xiao, M. R. Watts, H. Wang, X. Fan, F. Kong y Y. C. Xu (2015). "Development of fluconazole resistance in a series of *Candida parapsilosis* isolates from a persistent candidemia patient with prolonged antifungal therapy." BMC Infect Dis **15**: 340.

Znaidi, S., X. De Deken, S. Weber, T. Rigby, A. Nantel y M. Raymond (2007). "The zinc cluster transcription factor Tac1p regulates *PDR16* expression in *Candida albicans*." Mol Microbiol **66**(2): 440-52.



ANEXOS



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS DE RESISTENCIA A AZOLES EN ESPECIES DE CANDIDA NO-ALBICANS

Patricia Navarro Rodríguez

11. ANEXOS

11.1.Publicación derivada de la presente tesis doctoral:

**Expression of *ERG11* and efflux pump genes *CDR1*,
CDR2 and *SNQ2* in voriconazole susceptible and
resistant *Candida glabrata* strains.**

Navarro-Rodríguez P, Martín-Vicente A, López-Fernández L, Guarro J
and Capilla J

Medical Mycology. 2019

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS DE RESISTENCIA A AZOLES EN ESPECIES DE CANDIDA NO-ALBICANS

Patricia Navarro Rodríguez



Original Article

Expression of *ERG11* and efflux pump genes *CDR1*, *CDR2* and *SNQ2* in voriconazole susceptible and resistant *Candida glabrata* strains

Patricia Navarro-Rodríguez [‡], Adela Martín-Vicente ^{‡,†},
Loida López-Fernández [‡], Josep Guarro [‡] and Javier Capilla ^{*}

Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, and Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, Spain

*To whom correspondence should be addressed. Javier Capilla, PhD, Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain. Tel: 0034-977-759381; Fax: 0034-977-759322; E-mail: javier.capilla@urv.cat

[†]Present address: Department of Clinical Pharmacy and Translational Science, University of Tennessee Health Science Center, Memphis, TN, USA.

[‡]First and second authors contributed equally and share the first author position.

Received 22 November 2018; Revised 1 February 2019; Accepted 5 February 2019; Editorial Decision 3 February 2019

Abstract

Candida glabrata causes difficult to treat invasive candidiasis due to its antifungal resistance, mainly to azoles. The aim of the present work was to study the role of the genes *ERG11*, *CDR1*, *CDR2*, and *SNQ2* on the resistance to voriconazole (VRC) in a set of *C. glabrata* strains with known *in vitro* and *in vivo* susceptibility to this drug. Eighteen clinical isolates of *C. glabrata* were exposed *in vitro* to VRC, and the expression of the cited genes was quantified by real time quantitative polymerase chain reaction (q-PCR). In addition, the *ERG11* gene was amplified and sequenced to detect possible mutations. Ten synonymous mutations were found in 15 strains, two of them being reported for the first time; however, no amino acid changes were detected. *ERG11* and *CDR1* were the most expressed genes in all the strains tested, while the expression of *CDR2* and *SNQ2* was modest. Our results show that gene expression does not directly correlate with the VRC MIC. In addition, the expression profiles of *ERG11* and efflux pump genes did not change consistently after exposure to VRC. Although individual analysis did not result in a clear correlation between MIC and gene expression, we did observe an increase in *ERG11* and *CDR1* expression in resistant strains. It is of interest that considering both *in vitro* and *in vivo* results, the slight increase in such gene expression correlates with the observed resistance to VRC.

Key words: *C. glabrata*; voriconazole; *ERG11*; efflux pumps, azole resistance, gene expression.

Introduction

Although *Candida albicans* is the most common human fungal pathogen, an increasing number of bloodstream infections by non-*albicans* *Candida* species have been reported in recent years.¹ Within them, *Candida glabrata* has an important clinical impact due to its multidrug resistance to antifungal agents. The incidence of infections by *C. glabrata* shows differential geographical distribution, being the third most common cause of candidemia in southern Europe, but the second in northern Europe and the United States, where it is responsible for an increasing

number of systemic infections that affect around 10–20% of patients with candidemia, producing high mortality rates.^{2–4} Currently, treatment guidelines recommend echinocandins as the first-line treatment for invasive candidiasis (IC), while fluconazole (FLC) or voriconazole (VRC) are alternative therapies in immunosuppressed patients,⁵ and FLC being commonly used in the initial treatment of neutropenic patients. The increasing number of FLC-resistant² *C. glabrata* strains, ranging from 5% to 20% depending on the geographical area^{6,7} and the cross-resistance to other azoles such as VRC, has alarmingly increased

and thus reducing the already limited therapeutic options.^{8,9} The molecular mechanisms involved in resistance to azole compounds, especially FLC, are well known in *C. albicans*^{7,10–12} but remains uncertain in *C. glabrata*. Different reports suggest that *C. glabrata* isolates with low susceptibility to azoles, especially to FLC, overexpress the ATP-binding cassette (ABC) transporters *CDR1* and *CDR2*^{12–15} under control of the transcription factor *PDR1*; however, no firm conclusions have been reached.^{16–18} Other factors, as for example overexpression of *ERG11*, which encodes the target of azoles, have been shown to contribute to FLC resistance in *C. albicans* and *S. cerevisiae*,^{19,20} while in *C. krusei* it seems responsible for itraconazole (ITC) resistance.²¹ Additionally, mutations in *ERG11* seem to play an important role in azole resistance in other *Candida* spp. such as *C. albicans* and *C. tropicalis* and many mutations have been described,²² but mutations in *ERG11* do not seem to affect azole resistance in *C. glabrata*.^{23,24}

Previously, using a murine model of systemic infection, we tested the efficacy of VRC against 27 *C. glabrata* strains with different *in vitro* susceptibility and found correlating minimal inhibitory concentration (MIC) values with the *in vivo* outcome after VRC therapy.²⁵ The aim of the present study was to investigate the relationship between both *in vitro* and *in vivo* resistance to VRC in *C. glabrata* by studying the expression of *ERG11*, *CDR1*, *CDR2*, and *SNQ2*, as well as the presence of mutations in *ERG11* in those strains that previously showed *in vivo* resistance to VRC-based therapy in our animal model.

Methods

Strains

Table 1 shows all 18 clinical strains of *C. glabrata* included in this study. Strains were selected based on their different *in vitro* and *in vivo* susceptibility to VRC obtained from a previous study carried out by our group.²⁵

Culture conditions

C. glabrata strains were grown on PDA plates for 48 h at 30°C. To determine the expression of *ERG11*, *CDR1*, *CDR2*, and *SNQ2* genes, a single colony from each strain was inoculated into 3 ml of yeast Peptone Glucose (YPG) medium, and incubated with agitation (150 rpm) for 16 h at 30°C. Then, 2.5×10^6 cells were inoculated into 15 ml of YPG with or without VRC and incubated for 4 h at 30°C and 150 rpm. VRC was added to the fungal cultures at a final concentration corresponding to half of the MIC value for each strain at time zero, 1 h or 2.5 h post-inoculation, or 1 h after inoculation at a final concentration of 100 µg/ml of VRC,^{13,26,27} whereby cells were exposed to VRC during 1.5 h, 3 h or 4 h.

In vitro susceptibility testing to azoles

The activity of FLC (Pfizer Inc., Madrid, Spain), posaconazole (PSC) (Schering-Plough Res. Inst., Kenilworth, NJ, USA), ITC (Janssen Pharmaceutical, Madrid, Spain) and VRC (Royal Pharm, Hangzhou, China) was assayed *in vitro* against 18 strains of *C. glabrata*, by triplicate, using the broth microdilution methodology according to the document M27 4th ed. of the CLSI.²⁸ Clinical breakpoints (CBPs) for FLC were used to categorize the strains into susceptible dose-dependent (SDD), when MICs ≤ 32 µg/ml, and resistant, when MICs ≥ 64 µg/ml.²⁹ Although Fothergill et al.³⁰ proposed new CBPs for VRC and FLC in *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, and *C. parapsilosis*, CBPs for VRC, PSC, and ITC have not been established yet in *C. glabrata*. For this reason, the epidemiological cutoff values (ECVs) were used to categorize strains as non-wild type (MIC of VRC > 0.5 µg/ml, MIC of PSC > 1 µg/ml or MIC of ITC > 2 µg/ml) or wild-type (when lower MIC values were obtained).³¹

In addition, and in order to better correlate gene expression experiments with therapy outcome, we categorized our *C. glabrata* strains into three groups, taking into account the *in vitro* results obtained in the present work and the *in vivo* data from our previous study.²⁵ The strains showing a wild-type phenotype *in vitro* and *in vivo* efficacy was achieved after treatment were named “SS” ($n = 4$); those strains that were wild type *in vitro* but resistant *in vivo* were named “SR” ($n = 3$); and, finally, the strains that showed resistance to VRC *in vitro* as well as in the murine model were grouped as “RR” ($n = 10$).

DNA and RNA isolation

Total gDNA from *C. glabrata* was extracted as previously described³² and treated with 0.4 mg/ml of ribonuclease A (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA) for 30 min at 37°C to eliminate RNA contamination.

Total RNA was extracted using the phenol-chloroform method previously described³³ with some modifications. Briefly, 1×10^8 cells collected by 5 min of centrifugation at 8500 g were resuspended in 1 ml of Trizol reagent (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) and subjected to mechanical cell lysis with 600 µm and 3 mm diameter glass beads for 1 min (Sigma-Aldrich Quimica SL, Madrid, Spain) followed by 2 min ice cooling. The disruption cycle was repeated three times. Subsequently, 0.2 ml of chloroform was added and the samples centrifuged at 12000 g for 15 min. The upper phase was transferred to a new 2-ml tube and 500 µl of isopropanol was added and centrifuged at 12000 g for 10 min. The pellet was washed in 1 ml of ice-cold 70% ethanol and resuspended in 25 µl of diethylpyrocarbonate treated water. Finally, RNA was treated with DNase I (Thermo Fisher Scientific, USA). The purity and integrity of gDNA and RNA were determined by running in RedSafe-stained agarose gels and by spectrophotometric analysis (NanodropTM 2000, Thermo Fisher Scientific, USA).

Table 1. Antifungal susceptibilities to four azoles and *ERG11* mutations among eighteen *C. glabrata* isolates.

Strains	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^a				<i>In vivo</i> efficacy of VRC ^{25,b}	<i>ERG11</i> nucleotide substitutions	GeneBank accession number
	VRC	FLC	ITC	PSC			
FMR 11382	0.03	8	0.06	0.03	+	C678T, T768C, T834C, A1023G, T1275C	MK458525
UTHSC DI15-87	0.03	16	0.06	0.5	+	A399G, T768C, A1023G, T1275C	MK458526
FMR 11379	0.06	32	0.125	0.5	+	C678T, T768C, T834C, A1023G, T1275C	MK458527
FMR 8502	0.125	16	0.06	0.5	+	No mutation	
FMR 11383	0.125	32	0.5	0.25	+	C597T, T768C, A1023G, T1275C	MK458528
FMR 12282	0.25	16	0.5	1	-	T768C, G927A, A1023G	MK458529
FMR 12281	0.25	32	0.5	0.5	-	T768C, T834C, A1023G	MK458530
UTHSC DI15-90	0.5	64	0.25	0.5	-	G927A, A1023G	MK458531
JMI 801705	1	64	0.125	0.5	-	No mutation	
UTHSC DI15-91	1	64	0.03	0.06	-	No mutation	
UTHSC DI15-92	2	64	0.5	0.5	-	T768C, T834C, A1023G	MK458532
JMI 780445	2	128	0.25	1	-	T768C, T834C, A1023G	MK458533
JMI 766341	2	64	0.25	1	-	T768C, T834C, A1023G	MK458534
JMI787587	4	64	1	1	-	C588T, T768C, C918T, A1023G	MK458535
JMI 766356	4	128	1	2	-	T768C, T834C, A1023G	MK458536
JMI 815914	4	128	0.5	1	-	T768C, T834C, A1023G	MK458537
JMI 663371	8	128	1	4	-	T768C, G927A, A1023G	MK458538
JMI 030-10956	8	128	1	2	-	A399G, T768C, A1023G, T1275C	MK458539

The MICs of these antifungal agents were determined by the broth microdilution method, in accordance with the document M27 4th ed.²⁸ *In vivo* efficacy of VRC administered at 40 mg/kg was previously determined in a murine model of disseminated *C. glabrata* infection by reduction on fungal burden

^aFLC, fluconazole; ITC, itraconazole; PSC, posaconazole; VRC, voriconazole.

^b(+): efficacy of VRC; (-): no efficacy of VRC.

Sequencing of *ERG11*

The *ERG11* gene from *C. glabrata* was amplified and sequenced using the oligonucleotides *erg11-f* and *erg11-r*³⁴ (Table 2). Conventional PCRs were carried out in 25 μl reaction mixture containing 1 \times PCR buffer, 0.2 μM of each primer, 0.2 μM of dNTPs, 2.5 U of *Taq* polymerase and 0.1 μg of fungal gDNA. Samples were amplified on a thermal cycler using the following parameters: 5 min at 95°C, 35 cycles of 35 s at 95°C, 35 s at 59°C, and 90 s at 72°C, followed by final elongation of 7 min at 72°C. The PCR products were visualized by electrophoresis on RedSafe-stained 1% agarose gel and sequenced at Macrogen Europe (Macrogen Inc. Amsterdam, The Netherlands). The obtained sequences were assembled using SeqMan v.7.0.0 (DNASTAR, Madison, WI, USA) and aligned to the reference *ERG11* gene from *C. glabrata* (XM.445876) using MEGA software version 6.³⁵

Quantitative real-time PCR for expression analyses

For expression analyses, single-strand cDNA was synthesized from 1 μg of total RNA using the iScriptTM cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA) according

to the manufacturer's instructions. The *ERG11*, *CDR1*, *CDR2*, *SNQ2*, and the housekeeping gene 5.8S ribosomal RNA (*RDN5.8*)²⁶ were amplified from cDNA using specific primers (Table 2). Final PCR was performed as follows: 98°C for 60 s, 30 cycles of 10 s at 98°C, 30 s at 60°C, and 30 s at 72°C, followed by a final elongation of 7 min at 72°C. The PCR products were visualized by electrophoresis on Red-Safe stained 1.5% agarose gel. Quantitative real-time PCR was performed in triplicate using FastStart Universal SYBR Green Master (Roche Diagnostics SL, Sant Cugat del Valles, Barcelona, Spain) in 15 μl PCR reaction on StepOnePlusTM Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). The thermal cycling conditions were: 94°C for 5 min, followed by 45 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 60°C, 30 s at 72°C, and finally 20 s at 80°C. A melting curve analysis was carried out immediately after PCR completion to check the specificity of the amplification using the following conditions: 15 s at 95°C, 15 s at 60°C, and 15 s at 95°C. Cycle threshold (Ct) values of *ERG11*, *CDR1*, *CDR2*, and *SNQ2* transcripts were normalized to the Ct corresponding to the housekeeping *RDN5.8*²⁶ and the relative expression was determined using the $2^{-\Delta\text{Ct}}$ and the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ methods.³⁶

Table 2. Oligonucleotides used in this study. Positions are referred to the start codon, (+) downstream of ATG.

Gene	Primer	Sequence (5' – 3')	Use ^a	Position from ATG
<i>ERG11</i>	erg11-f	ATGTCCACTGAAAACACT	Seq	+0
	erg11-r	CTAGTACTTTTGTCTGG	Seq	+1602
	erg11-f1	GCTATTCCAAACACTTCTCTAC	RT- qPCR	+1177
	erg11-r1	GAATGGCAAAGTATGGAGAGG	RT- qPCR	+1376
<i>CDR1</i>	cdr1-f	AAAGAAAGAACACACTCTGCC	RT- qPCR	+158
	cdr1-r	GGGTCTGAGTTGCTAATGTTG	RT- qPCR	+310
<i>CDR2</i>	cdr2-f	GATGCACACAGACAAGAATGA	RT- qPCR	+2474
	cdr2-r	CTACCACCTCTACTTCCACT	RT- qPCR	+2605
<i>SNQ2</i>	snq2-f	GTGTCCTATATTCTGTCTTTTG	RT- qPCR	+1666
	snq2-r	TGAATGGAAAAGTTGGCGATAGT	RT- qPCR	+1819
<i>RDN5.8</i>	rdn5.8-f	GGATCTCTTGGTTCTCGCAT	RT- qPCR	+3
	rdn5.8-r	AATGTGCGTTCAAAGATTCGAT	RT- qPCR	+82

^aSeq indicates sequencing and RT-qPCR indicates real time qPCR.

Statistical analyses

Gene expression of each gene and strain was compared using one-way ANOVA with Tukey's test for multiple comparisons. The Mann-Whitney test was used to compare the relative gene expression values of each gene with and without induction with VRC, and between the SS ($n = 4$), SR ($n = 3$), and RR ($n = 10$) groups. All statistical analyses used GraphPad Prism 6.0 for Windows. P values of $\leq .05$ were considered statistically significant.

Nucleotide sequence accession numbers

The *ERG11* sequences containing synonymous mutations have been deposited in the GenBank database and are available under the accession numbers showed in Table 1.

Results

In vitro antifungal susceptibility

Table 1 summarizes the MICs of VRC, PSC, FLC, and ITC against *C. glabrata*. All strains with MICs of VRC higher than the ECV were resistant to FLC. Three strains (17%) had a MIC of PSC higher than the established ECV, while the MIC of this drug was equal to the ECV in 5 (28%) and lower in 10 (56%) strains. In the case of ITC, all the strains had MICs lower than the established ECV. Considering clinical breakpoints (CBP) for FLC and ECV values for PSC, ITC, and VRC, cross-resistance between VRC and FLC, and between VRC and PSC was observed in ten strains (56%) and three strains (17%), respectively. In addition, three strains showed cross-resistance between VRC, FLC, and PSC (17%).

Sequence analysis of *ERG11*

To identify possible point mutations in *ERG11* that give rise to amino acid changes of the encoded protein product, we

sequenced the 1602 bp of its coding region. Analysis of the *ERG11* ORF sequences from the 18 *C. glabrata* strains revealed silent mutations in both resistant (80%) and susceptible (87.5%) strains, but no amino acid substitutions were found. A total of 49 nucleotide changes in different positions were found, being T768C and A1023G the commonest among the studied strains (Table 1), and two of them, to our knowledge, being reported for the first time (A399G and C597T).

ERG11 and the efflux pumps genes (*CDR1*, *CDR2* and *SNQ2*) are not inducible by VRC

Transcript levels of genes presumably involved in drug resistance (efflux pumps) and the azole target (*ERG11*) were quantified by quantitative real time PCR (RT-qPCR) in order to identify differences in gene expression in basal conditions and upon drug exposure. The expression profiles of *ERG11*, *CDR1*, *CDR2*, and *SNQ2* after exposure to VRC at concentrations equal to half of the MIC value for each individual strain revealed no significant increase compared to non exposed controls (data not shown). When four VRC-resistant strains ($MIC \geq 1 \mu\text{g/ml}$) and one VRC-susceptible strain ($MIC = 0.03 \mu\text{g/ml}$) were exposed to higher concentration of VRC, that is, $100 \mu\text{g/ml}$ for 4 h, the expression levels of *ERG11*, *CDR1*, *CDR2*, and *SNQ2* genes were not significantly different to those measured under control conditions ($P \geq .309$) (Fig. 1).

Expression profiles of *CDR1*, *CDR2*, *SNQ2* and *ERG11* genes on VRC resistant and susceptible strains

The transcription levels of *ERG11*, *CDR1*, *CDR2*, and *SNQ2* were determined by RT-qPCR on all eighteen *C. glabrata* strains without VRC exposure. *ERG11* was the most expressed gene reaching 10^4 time fold increase with respect to the housekeeping (Fig. 2A). The strains with higher expression of *CDR1* showed a 10^{-3} time fold increase respect to the housekeeping followed

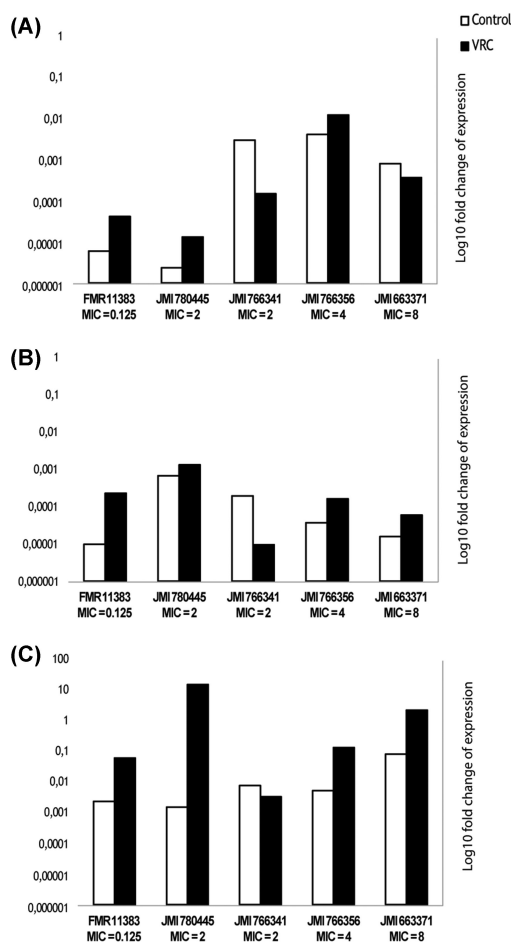


Figure 1. Gene expression profiles of *CDR1* (A), *CDR2* (B), and *ERG11* (C) on four resistant (JMI 780445, JMI 766356, JMI 766341, and JMI 663371) and one susceptible (FMR 11383) *C. glabrata* strains, induced with 100 µg/ml of VRC for 4 h and not induced (control). Expression was determined by conventional PCR and RT-qPCR and transcript levels of each sample were normalized to *RDN5.8* using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Mann-Whitney test was used to compare gene expression with and without induction. $P < .05$ was considered significant. Results are expressed as \log_{10} fold changes. VRC MICs are expressed in µg/ml.

by *CDR2* (an increase of 10^{-5}) and *SNQ2* (an increase of 10^{-6}). However, no significant upregulation pattern across an increasing MIC scale was observed (Fig. 2B).

Statistical analyses showed no differences between the gene expression of all the studied strains, including those that were resistant to two or three azoles.

Considering that the individual analysis of the gene expression did not show a clear correlation with the obtained MIC values, we grouped the strains based on the *in vitro* susceptibility and the *in vivo* outcome after VRC treatment. The group formed

by resistant strains (RR) showed a significant higher expression of *CDR1* ($P = .013$) and *ERG11* ($P = .0036$) in comparison to the SS group, formed by susceptible strains. A tendency of higher *CDR2* and *SNQ2* expression was also observed for the RR group when compared to the SS, but in these cases, no statistical significance was observed.

When the gene expression levels of the SR group, formed by *in vitro* susceptible strains that displayed *in vivo* resistance, were compared to the SS, we observed that all four genes showed an increase in gene expression, although differences were not statistically significant.

The expression of *ERG11*, *CDR1*, and *CDR2* increased in strains gathered in the groups SR and RR, when compared independently to the SS group, suggesting a positive correlation between their transcription levels and azole resistance (Fig. 3).

Discussion

In recent decades the frequency of systemic infections caused by *C. glabrata* has increased significantly, mainly due to the use of immunosuppressive therapies together with broad-spectrum antibiotic treatment.^{37,38} *C. glabrata* is a haploid yeast, generally with intrinsically low susceptibility to azoles, and upon exposure to these antifungals it can acquire resistance more frequently and rapidly than the diploid yeast *C. albicans*.^{16,39} A previous study evaluated the correlation between the VRC MIC and the outcome of invasive candidiasis (IC) in six phase III clinical trials, demonstrating that this drug is less effective against *C. glabrata* (55% of treatment success) than against other species of the genus (72 to 92% of success against *C. albicans*, *C. parapsilosis*, and *C. tropicalis*).⁴⁰ In addition, the percentage of cross-resistance between FLC and VRC has been reported as very high in the case of *C. glabrata* (83%), a fact that was also observed in the present study.

Although *ERG11* mutations have been significantly linked to azole resistance in *C. albicans* and *C. tropicalis*,⁴¹ most of the documented azole-resistant *C. glabrata* strains lack amino acid substitutions on the Erg11 protein.^{24,42,43} Only two cases of amino acid substitutions within Erg11, G236V and G315D, have been reported in two isolates of *C. glabrata*, conferring cross-resistance to FLC and VRC.^{23,34} However, this correlation between mutations and resistance does not seem sufficiently supported since many of these studies analyzed a limited number of strains or have focused solely on the analysis of the resistant ones. Particularly in our case, despite a high ratio of punctual mutations found within our strains, none resulted in amino acid changes, which supports the hypothesis that other factors may be involved in resistance to azoles in *C. glabrata*.

The role of *ERG11* up-regulation in azole resistance in *C. glabrata* has been little studied, and the results published suggest that there is no correlation with resistance.^{41,42,44,45} Other

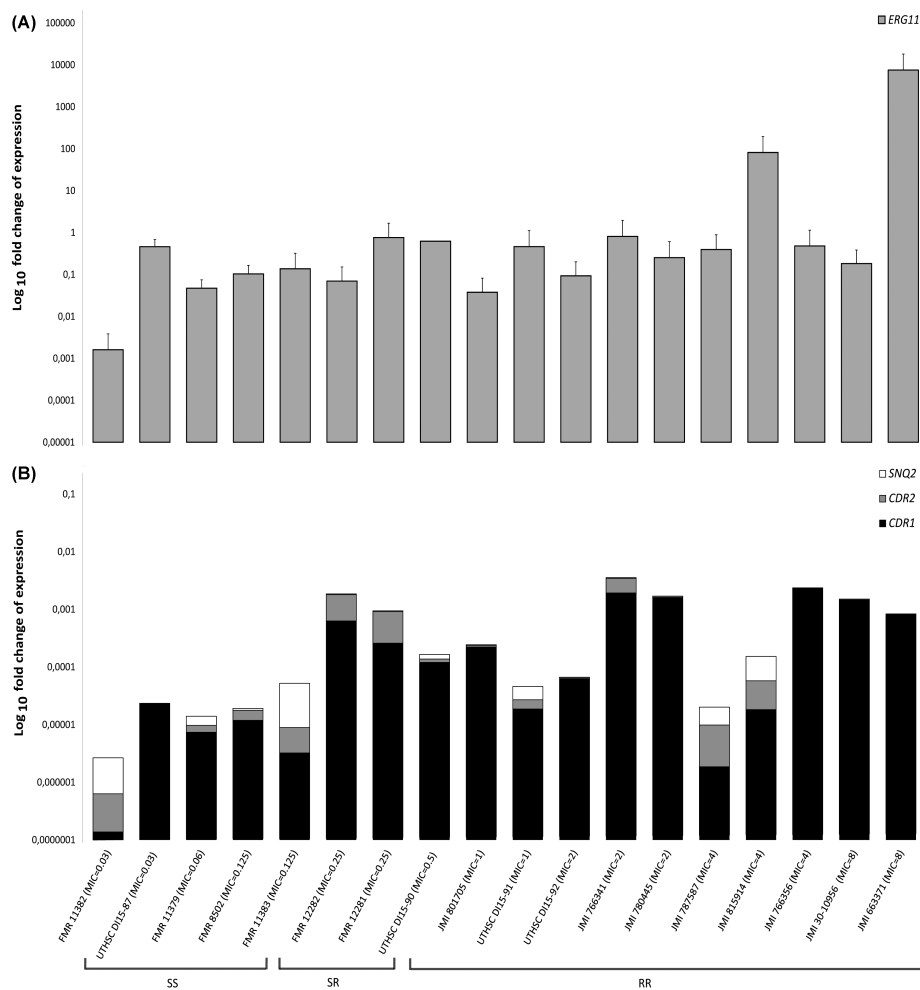


Figure 2. Expression profiles of *ERG11* (A) and *CDR1*, *CDR2*, and *SNQ2* (B) on 18 *C. glabrata* strains grown under control conditions determined by RT-qPCR. Transcription values of each gene were normalized to those of *RDN5.8* using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. VRC MICs are expressed in $\mu\text{g/ml}$. Each sample was analysed in technical and biological triplicate. Statistics were computed by one-way ANOVA with Tukey's test for multiple comparisons and no significant differences were observed.

mechanisms include the ABC-transporter *CDR1*, and in a lower manner *CDR2* and *SNQ2*, which seem important in the development of multi-azole resistance in *C. glabrata*,^{7,13,18,46} although their inhibition does not cause increase susceptibility against all azoles.⁴⁷

In the present study, we have not observed a straightforward correlation between up-regulation of the azole target *ERG11*, efflux pumps, and resistance to VRC. Consequently, other molecular factors must be influencing the *in vitro* and *in vivo* resistant phenotypes of the studied strains. The role of other genes in azole resistance of *C. glabrata* has been investigated as for example the ABC transporters *YBT1* and *YOR1*,⁴⁸ which showed altered

expression in strains with low susceptibility to FLC, however the contribution of such genes in resistance to azoles seems lower than *CDR1* and *CDR2*. Recent studies have demonstrated that the expression of ABC-transporters is regulated transcriptionally by *PDR1* and mutations in this transcription factor result in high level expression of a broad range of genes, including the ABC-transporters.^{16,17,49} Particularly, it has been shown that two genes activated by mutations in the transcriptional regulator *PDR1*, *RTA1* and *RSB1*, are upregulated in clinical isolates of *C. glabrata*.^{17,50} In *C. albicans* the *RTA2* and *RTA3* genes have been implicated in azole resistance,^{51,52} and Whaley et al.¹⁸ suggest that they could also contribute to azole

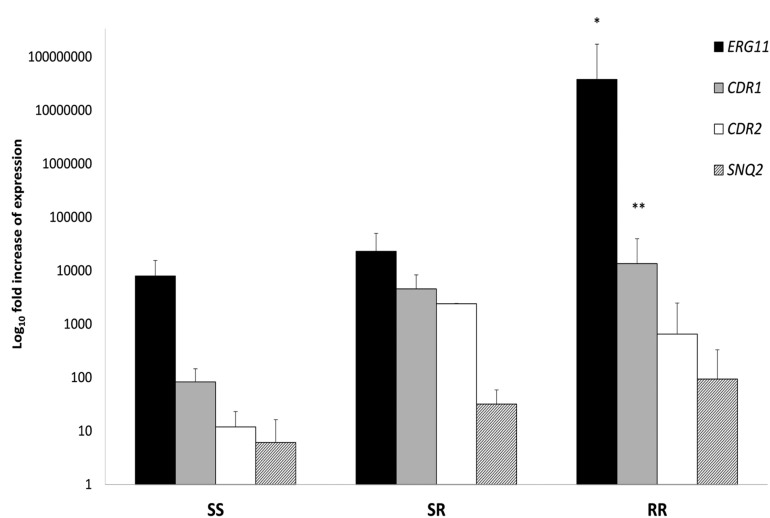


Figure 3. Relative expression of *ERG11*, *CDR1*, *CDR2* and *SNQ2* in seventeen *C. glabrata* strains determined by RT-qPCR. Transcription levels in each sample were normalized to those of *RDN5.8* gene and expressed relative to the normalized level of the susceptible strain FMR 11382 using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Strains were classified into three groups according to their *in vitro* and *in vivo* response to VRC. Average relative expression is represented as \log_{10} fold changes and was compared between groups using Mann-Whitney test (GraphPad v6). SS, VRC susceptible *in vitro* and *in vivo* strains ($n = 4$); SR, VRC susceptible only *in vitro* strains ($n = 3$); RR, resistant *in vitro* and *in vivo* strains ($n = 10$). Error bars show standard deviations of three experiments. * $P < .05$ in comparison to the \log_{10} fold increase of expression of the *ERG11* of strains belonging to the SS group. ** $P < 0.05$ in comparison to the \log_{10} fold increase of expression of the *CDR1* of strains belonging to the SS group.

resistance of *C. glabrata*. Nevertheless, the participation of *PDR1* in drug resistance seems to compromise other mechanism besides efflux pumps, since the deletion of three genes that encoded the efflux pumps *CDR1*, *PDH1* and *SNQ2* conferred susceptibility to FLC in a resistant strain but the deletion of *PDR1* awarded a higher increase in *in vitro* susceptibility.¹⁸ Unlike this fact, in the present study the expression levels of the *CDR1*, *CDR2*, and *SNQ2* genes did not correlate directly with the MIC values.

In addition, it has also been shown that stress response under azole toxicity plays a role on fungal defence, and survival by inducing changes in mitochondrial dynamics.^{53,54} Specifically, in *C. glabrata*, mitochondrial genome loss triggers changes in efflux pumps expression which has been recently related with increased drug resistance.⁵⁵

Our work has served to determine the expression pattern of susceptible and resistant strains that display a broad range of MICs to VRC, to better establish reliable correlation among susceptibility and gene expression. Mostly, our results provide evidence of no significant overexpression of any of the candidate genes to confer resistance (*ERG11*, *CDR1*, *CDR2*, and *SNQ2*) in VRC-resistant *C. glabrata* strains before and after exposure to VRC, which is in line with a previous study on FLC-resistant strains reported by Sanguinetti et al.¹³ It is important to highlight that the transcriptional analyses showed constitutive expression of efflux pumps in *C. glabrata*, but no upregulation after

exposure to VRC. Consequently, resistance to VRC is not acquired through transcriptional stimulation of such efflux pumps under toxic conditions.

Contrary to our expectations, some VRC susceptible strains showed high expression levels of the efflux pumps and *ERG11*, similar to those observed in the resistant ones. This paradoxical result was also reported by Szweida et al.,⁵⁶ and it might be explained by the fact that all susceptible strains have relatively high MIC values of FLC compared to FMR 11382, which displayed the lowest MICs for all the triazoles and also the lowest levels of *CDR1* and *ERG11* expression. Similar results were found for *ERG11*, in which no upregulation was detected during azole treatment, displaying similar transcript levels among strains and whose expression levels did not correlate with the MICs.

However, it should be noted that, when grouping the strains by their *in vitro* and *in vivo* phenotype, the RR group showed a higher expression of *ERG11* than the strains in the SS or SR groups, indicating that efflux pumps and *ERG11* may be involved in resistance to azoles. The same pattern was observed in *CDR1*, *CDR2*, and *SNQ2*, although in a more subtle way.

The present work extends prior studies, being the first to analyze molecular mechanisms of VRC-resistance in a significant large number of *C. glabrata* strains with known *in vitro* and *in vivo* susceptibility to this drug. Our findings suggest that there is no straightforward relationship between activation of candidate genes for resistance to azole and *in vitro* susceptibility but a

tendency when *in vivo* outcome and cross-resistance were taken into account.

All this is indicative of the great complexity of the specific mechanisms underlying the azole response, which can vary for the *in vitro* to *in vivo* settings being essential to carry out more comprehensive studies on potentially new mechanisms of resistance and their regulation.

Funding

Internal funding supported the study.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

- Quindos G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis: a changing face. *Rev Iberoam Micol*. 2014; 31: 42–48.
- Angoulvant A, Guitard J, Hennequin C. Old and new pathogenic *Nakaseomyces* species: epidemiology, biology, identification, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Yeast Res*. 2015; 16: f0v114.
- Klingspor L, Tortorano AM, Peman J et al. Invasive *Candida* infections in surgical patients in intensive care units: a prospective, multicentre survey initiated by the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) (2006–2008). *Clin Microbiol Infect*. 2015; 21: 87 e81–87.
- 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.
- 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: e1–50.
- Kim S, Shin J, Kim E et al. The relationship between antifungal usage and antifungal susceptibility in clinical isolates of *Candida*: a multicenter Korean study. *Med Mycol*. 2009; 47: 296–304.
- Vale-Silva L, Sanglard D. Tipping the balance both ways: drug resistance and virulence in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res*. 2015; 15: 1–8.
- Pfaller MA, Diekema DJ. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. *J Clin Microbiol*. 2012; 50: 2846–2856.
- Pfaller MA, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. Antifungal susceptibilities of *Candida*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus* from the Asia and Western Pacific region: data from the SENTRY antifungal surveillance program (2010–2012). *J Antibiot (Tokyo)*. 2015; 68: 556–561.
- Prasad R, Rawal MK. Efflux pump proteins in antifungal resistance. *Front Pharmacol*. 2014; 5: 202.
- Sanglard D, Kuchler K, Ischer F, Pagani JL, Monod M, Bille J. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39: 2378–2386.
- Rex JH, Rinaldi MG, Pfaller MA. Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39: 1–8.
- Sanguinetti M, Posteraro B, Fiori B, Ranno S, Torelli R, Fadda G. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49: 668–679.
- Sanglard D, Ischer F, Bille J. Role of ATP-binding-cassette transporter genes in high-frequency acquisition of resistance to azole antifungals in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45: 1174–1183.
- Jensen RH, Astvad KM, Silva LV et al. Stepwise emergence of azole, echinocandin and amphotericin B multidrug resistance *in vivo* in *Candida albicans* orchestrated by multiple genetic alterations. *J Antimicrob Chemother*. 2015; 70: 2551–2555.
- Vermitsky JP, Edlind TD. Azole resistance in *Candida glabrata*: coordinate up-regulation of multidrug transporters and evidence for a Pdr1-like transcription factor. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48: 3773–3781.
- Caudle KE, Barker KS, Wiederhold NP, Xu L, Homayouni R, Rogers PD. Genome-wide expression profile analysis of the *Candida glabrata* Pdr1 regulon. *Eukaryot Cell*. 2011; 10: 373–383.
- Whaley SG, Zhang Q, Caudle KE, Rogers PD. Relative contribution of the ABC transporters Cdr1, Pdh1, and Snq2 to azole resistance in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018; 62: e01070–01018.
- Dunkel N, Liu TT, Barker KS, Homayouni R, Morschhauser J, Rogers PD. A gain-of-function mutation in the transcription factor Upe2p causes upregulation of ergosterol biosynthesis genes and increased fluconazole resistance in a clinical *Candida albicans* isolate. *Eukaryot Cell*. 2008; 7: 1180–1190.
- Kontoyiannis DP, Sagar N, Hirschi KD. Overexpression of Erg11p by the regulatable GAL1 promoter confers fluconazole resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 43: 2798–2800.
- He X, Zhao M, Chen J et al. Overexpression of both *ERG11* and *ABC2* genes might be responsible for itraconazole resistance in clinical isolates of *Candida krusei*. *PLoS One*. 2015; 10: 1–13.
- Lackner M, Tscherner M, Schaller M et al. Positions and numbers of *FKS* mutations in *Candida albicans* selectively influence *in vitro* and *in vivo* susceptibilities to echinocandin treatment. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58: 3626–3635.
- Nabili M, Abdollahi Gohar A, Badali H, Mohammadi R, Moazeni M. Amino acid substitutions in Erg11p of azole-resistant *Candida glabrata*: Possible effective substitutions and homology modelling. *J Glob Antimicrob Resist*. 2016; 5: 42–46.
- Silva DB, Rodrigues LM, Almeida AA, Oliveira KM, Grisolia AB. Novel point mutations in the *ERG11* gene in clinical isolates of azole resistant *Candida* species. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016; 111: 192–199.
- Sanchis M, Capilla J, Castanheira M et al. Voriconazole minimum inhibitory concentrations are predictive of treatment outcome in experimental murine infections by *Candida glabrata*. *Int J Antimicrob Agents*. 2016; 47: 286–288.
- Li QQ, Skinner J, Bennett JE. Evaluation of reference genes for real-time quantitative PCR studies in *Candida glabrata* following azole treatment. *BMC Mol Biol*. 2012; 13: 22.
- Eddouzi J, Parker JE, Vale-Silva LA et al. Molecular mechanisms of drug resistance in clinical *Candida* species isolated from Tunisian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57: 3182–3193.
- CLSI. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Fourth Edition*. CLSI document M27 4th edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016.
- CLSI. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth Informational Supplement*. CLSI document M27- S4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
- Fothergill AW, Sutton DA, McCarthy DI, Wiederhold NP. Impact of new antifungal breakpoints on antifungal resistance in *Candida* species. *J Clin Microbiol*. 2014; 52: 994–997.
- 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. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58: 2006–2012.
- Muller FM, Werner KE, Kasai M, Francesconi A, Chanock SJ, Walsh TJ. Rapid extraction of genomic DNA from medically important yeasts and filamentous fungi by high-speed cell disruption. *J Clin Microbiol*. 1998; 36: 1625–1629.
- Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc*. 2006; 1: 581–585.
- Hull CM, Parker JE, Bader O et al. Facultative sterol uptake in an ergosterol-deficient clinical isolate of *Candida glabrata* harboring a missense mutation in *ERG11* and exhibiting cross-resistance to azoles and amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56: 4223–4232.

35. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013; 30: 2725–2729.
36. Livak K, Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 408: 402–408.
37. Rodrigues CF, Silva S, Henriques M. *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014; 33: 673–688.
38. Rajendran R, Sherry L, Deshpande A et al. A prospective surveillance study of candidaemia: Epidemiology, risk factors, antifungal treatment and outcome in hospitalized patients. *Front Microbiol.* 2016; 7: 915.
39. Fidel PL, Jr., Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev.* 1999; 12: 80–96.
40. Pfaller MA, Diekema DJ, Rex JH et al. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against voriconazole: analysis and proposal for interpretive breakpoints. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 819–826.
41. Lackner M, Martin-Vicente A, Lass-Flörl C. Multidrug- and cross-resistant *Candida*: The looming threat. *Curr Fungal Infect Rep.* 2014; 9: 23–26.
42. Caban M, Strapagiel D, Dziadek J, Korycka-Machala M, Grzelak A. Principles of a new protocol for prediction of azole resistance in *Candida albicans* infections on the basis of *ERG11* polymorphisms. *Curr Microbiol.* 2016; 73: 172–182.
43. Tan J, Zhang J, Chen W et al. The A395T mutation in *ERG11* gene confers fluconazole resistance in *Candida tropicalis* causing candidemia. *Mycopathologia.* 2015; 179: 213–218.
44. Sanguinetti M, Posteraro B, Lass-Flörl C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses.* 2015; 58: 2–13.
45. Panackal AA, Gribskov JL, Staab JF, Kirby KA, Rinaldi M, Marr KA. Clinical significance of azole antifungal drug cross-resistance in *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 1740–1743.
46. Farahyar S, Zaini F, Kordbacheh P et al. Expression of efflux pumps and fatty acid activator one genes in azole resistant *Candida glabrata* isolated from immunocompromised patients. *Acta Med Iran.* 2016; 54: 458–464.
47. Nagayoshi Y, Miyazaki T, Shimamura S et al. Unexpected effects of azole transporter inhibitors on antifungal susceptibility in *Candida glabrata* and other pathogenic *Candida* species. *PLoS One.* 2017; 12: e0180990.
48. Paul S, Bair TB, Moye-Rowley WS. Identification of genomic binding sites for *Candida glabrata* Pdr1 transcription factor in wild-type and rho0 cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58: 6904–6912.
49. Ferrari S, Ischer F, Calabrese D et al. Gain of function mutations in *CgPDR1* of *Candida glabrata* not only mediate antifungal resistance but also enhance virulence. *PLoS Pathog.* 2009; 5: e1000268.
50. Tsai HF, Sammons LR, Zhang X et al. Microarray and molecular analyses of the azole resistance mechanism in *Candida glabrata* oropharyngeal isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54: 3308–3317.
51. Jia XM, Ma ZP, Jia Y et al. *RTA2*, a novel gene involved in azole resistance in *Candida albicans*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 373: 631–636.
52. Whaley SG, Tsao S, Weber S et al. The *RTA3* gene, encoding a putative lipid translocase, influences the susceptibility of *Candida albicans* to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60: 6060–6066.
53. Ferrari S, Sanguinetti M, De Bernardis F et al. Loss of mitochondrial functions associated with azole resistance in *Candida glabrata* results in enhanced virulence in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55: 1852–1860.
54. Calderone R, Li D, Traven A. System-level impact of mitochondria on fungal virulence: to metabolism and beyond. *FEMS Yeast Res.* 2015; 15: fov027.
55. Verma S, Shakya VPS, Idnurm A. Exploring and exploiting the connection between mitochondria and the virulence of human pathogenic fungi. *Virulence.* 2018; 9: 426–446.
56. Szveda P, Gucwa K, Romanowska E et al. Mechanisms of azole resistance among clinical isolates of *Candida glabrata* in Poland. *J Med Microbiol.* 2015; 64: 610–619.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS DE RESISTENCIA A AZOLES EN ESPECIES DE CANDIDA NO-ALBICANS

Patricia Navarro Rodríguez