

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



**Estudio de susceptibilidad y mecanismos de resistencia a  
antifúngicos en *Candida albicans* de aislados clínicos  
chilenos**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de  
Magíster en Bioquímica área de Especialización en Bioquímica  
Clínica por:**

***MARISOL AMÉRICA FUENTES SÁNCHEZ***

**Director de Tesis:    Dra. Cecilia Tapia Paredes  
                                 Dra. Daniela Seelenfreund Hirsch**

**Santiago - CHILE**

**Julio 2014**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

**MARISOL AMÉRICA FUENTES SÁNCHEZ**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización Bioquímica Clínica, en el examen público rendido el día \_\_\_\_\_

**Director de Tesis:**

**Dra. Cecilia Tapia P.** \_\_\_\_\_

**Co-director de Tesis:**

**Dra. Daniela Seelenfreund H.** \_\_\_\_\_

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dra. Inés Contreras O.** \_\_\_\_\_

**Dr. Carlos Santiviago C.** \_\_\_\_\_

**Dr. Germán Hermosilla D.** \_\_\_\_\_

Dedicada a Dios, mi familia, amigos  
y a todos aquellos que caminan conmigo.

*Un científico es un hombre tan endeble y humano como cualquiera;  
sin embargo, la búsqueda científica puede ennoblecerle,  
incluso en contra de su voluntad.*

Isaac Asimov (1920 - 1992)  
Escritor y Bioquímico soviético, nacionalizado estadounidense.

## **AGRADECIMIENTOS**

En las siguientes líneas deseo dar las gracias a todos a quienes de alguna manera han colaborado en la realización de este trabajo, tanto con sus aportes científicos como humanos.

En primer lugar, quisiera agradecer a Dios por brindarme las energías para seguir siempre adelante.

A la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología – CONICYT, entidad que gracias a la beca para estudios de Magister en Chile financió los estudios de postgrado que me llevaron a la realización de este trabajo y la Universidad de Chile por el beneficio de “Programa de ayudas para Estadías Cortas de Investigación”, el cual permitió hacer parte de este trabajo en el extranjero.

También quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. Cecilia Tapia, por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo de investigación y por haberme permitido aprender sobre la micología y a la Dra. Daniela Seelenfreund, por su incondicional apoyo y colaboración en el trabajo realizado, le agradezco por su increíble calidad humana lo cual facilitó en gran medida la finalización de esta investigación.

A la Dra. Ana Alastruey-Izquierdo, Dra. Emilia Mellado y al laboratorio de Micología del Instituto de Salud Carlos III (Madrid, España) por su apoyo e inmensa ayuda durante mi estadía en España.

Al Dr. Germán Hermosilla (UCH), Bq. Joaquín Paillamanque (PUCV), a los integrantes del laboratorio de la Dra. Romero (Hospital Clínico de la Universidad de Chile), del Dr. Vidal (ICBM, Facultad de Medicina) y del Dr. Kogan (Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas) por el apoyo instrumental y de reactivos brindado durante este trabajo.

A mis compañeros Valeria, José, Claudio y Mary Anne por su apoyo técnico y su amabilidad; fueron las personas que brindaron esa cuota de diversión a la ardua tarea de investigación.

Y finalmente, pero no menos importantes, quisiera agradecer profundamente a mi familia y mis amigos, quienes siempre estuvieron conmigo dándome ánimos y tranquilidad durante este trabajo, a todos ellos... ¡¡Muchísimas Gracias!!...

## **LUGAR DE REALIZACIÓN**

Este trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Micología Médica del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y en el Laboratorio de Micología del Centro Nacional de Microbiología perteneciente al Instituto de Salud Carlos III (Madrid, España).

## **FINANCIAMIENTO**

Este trabajo contó con los siguientes financiamientos:

- Beca CONICYT para estudios de Magíster en Chile (Convocatoria 2012)
- Proyecto Fondecyt de Iniciación 11110160
- Fondos aportados por la Vicerrectoría de Asuntos Académicos de la Universidad de Chile de acuerdo al concurso de “Ayudas para Estadías Cortas de Investigación para Tesistas de Doctorado y Magíster de la Universidad de Chile” (Convocatoria 2013 – 2014)

La presente tesis de Magíster en Bioquímica ha dado origen a las siguientes actividades de difusión:

**a) Presentaciones en congreso:**

**Fuentes M.,** Amaro J., Alburquenque C., Falconer M., Tapia C. “Cambios en el patrón de susceptibilidad de especies de *Candida* en un hospital en Chile durante el período 2007 y 2011”. XVI Congreso Panamericano de Infectología y XXX Congreso Chileno de Infectología, 28 mayo - 1° junio, 2013, Santiago, Chile.

**Fuentes M.,** Hermosilla G., Seelenfreud D., Alburquenque C., Falconer M., Amaro J., Tapia C. “Characterization of azole resistance mechanisms in Chilean isolates of *Candida albicans*”. XII ASM Conference on *Candida* and Candidiasis, 26 - 30 marzo, 2014, New Orleans, Luisiana, EE.UU.

**b) Publicaciones:**

Alburquenque C., Beltrán S., Olivares R., Falconer M., Amaro J., **Fuentes M.,** Tapia C. “Distribución de especies y perfil de susceptibilidad de aislados de *Candida* spp.: la importancia de vigilar también las cepas de la comunidad”. Rev Chilena Infectol 2013; 30(3):244-251.

**Fuentes M.,** Hermosilla G., Amaro J., Alburquenque C., Falconer M., Tapia C. “Caracterización de los mecanismos de resistencia a azoles en cepas clínicas de *Candida albicans*”. Rev Chilena Infectol 2014 (En impresión)

**Fuentes M.,** Hermosilla G., Seelenfreund D., Amaro J., Alburquenque C., Falconer M., Tapia C. “Changes in susceptibility of *Candida albicans* clinical isolates to azoles and echinocandins and detection of resistance mechanism in a Chilean hospital” (Manuscrito en preparación)

## ABREVIATURAS

<b>A260:</b>	Absorbancia a 260 nm
<b>A280:</b>	Absorbancia a 280 nm
<b>ABC:</b>	<i>ATP Binding cassette</i>
<b>ADN:</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc:</b>	ADN complementario
<b>ANI:</b>	Anidulafungina
<b>ARN:</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNr:</b>	ARN ribosomal
<b>CAS:</b>	Caspofungina
<b>CCCP:</b>	Carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona
<b>CIM:</b>	Concentración inhibitoria mínima
<b>CLSI:</b>	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
<b>Ct:</b>	Ciclo umbral ( <i>Cycle threshold</i> )
<b>dNTPs:</b>	Dinucleótidos trifosfatos
<b>ECV:</b>	Punto de corte epidemiológico ( <i>Epidemiological cut-off value</i> )
<b>EDTA:</b>	Ácido Etilendiaminotetraacético
<b>EUCAST:</b>	<i>European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing</i>
<b>FLU:</b>	Fluconazol
<b>HS1:</b>	Región <i>hot spot</i> 1
<b>HS1:</b>	Región <i>hot spot</i> 2
<b>Kb:</b>	Kilobases
<b>OD<sub>600</sub>:</b>	Densidad óptica a 600 nm
<b>pb:</b>	Pares de bases



<b>PCR:</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>q-PCR:</b>	PCR cuantitativo
<b>R6-G:</b>	Rodamina 6-G
<b>RT-PCR:</b>	PCR con transcriptasa inversa
<b>RQ:</b>	Cuantificación relativa ( <i>Relative Quantification</i> )
<b>Tm:</b>	Temperatura de fusión ( <i>Melting temperature</i> )
<b>VOR:</b>	Voriconazol
<b>WT:</b>	Silvestre ( <i>Wild Type</i> )

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	xv
<b>ABSTRACT</b>	xvii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
1. Infecciones fúngicas (IFs)	1
2. <i>Candida</i> spp.	1
3. Infecciones fúngicas por <i>Candida</i> spp.	2
4. Tratamientos antifúngicos para IFs por <i>Candida</i> spp.	4
5. Resistencia de <i>Candida</i> a antifúngicos	7
6. Mecanismos de resistencia a antifúngicos en <i>Candida</i> spp.	10
<b>II. HIPÓTESIS</b>	13
<b>III. OBJETIVOS</b>	13
1. Objetivo general	13
2. Objetivos específicos	13
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	14
1. Reactivos y soluciones	14
2. Cepas utilizadas en este trabajo	15
3. Programas para análisis	15
4. Extracción de ADN genómico de <i>C. albicans</i>	16
5. Amplificación del gen <i>ERG11</i> por PCR	16
6. Amplificación del gen <i>FKSI</i> por PCR	17
7. Purificación de productos de PCR y secuenciación	18
8. Extracción de ARN de <i>C. albicans</i>	19
9. Tratamiento con DNAsa I	20

10. PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR)	21
11. Cuantificación transcripcional de genes mediante PCR cuantitativo (q-PCR)	21
12. Ensayo de acumulación de rodamina 6-G	23
13. Análisis estadístico	23
<b>V. RESULTADOS</b>	24
1. Identificación de cepas y ensayos de susceptibilidad	24
2. Secuenciación de los genes <i>ERG11</i> y <i>FKS1</i>	27
3. Extracción de ARN y RT-PCR	34
4. Estandarización de q-PCR	35
5. Cuantificación transcripcional de los genes <i>ERG11</i> y <i>FKS1</i> por q-PCR	38
6. Cuantificación transcripcional de bombas de eflujo por q-PCR	40
7. Ensayos de acumulación de rodamina 6-G	46
<b>VI. DISCUSIÓN</b>	51
<b>VII. CONCLUSIÓN</b>	57
<b>VIII. REFERENCIAS</b>	58
<b>IX. ANEXOS</b>	65
Anexo 1: Carta de aprobación del Comité de Ética de la Clínica Dávila	65
Anexo 2: Medios de cultivos y soluciones	66
Anexo 3: Caracterización de ARN extraído de <i>C. albicans</i>	67
Anexo 4: Curva estándar de rodamina 6-G	68
Anexo 5: Secuenciación del gen <i>TAC1</i>	69

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Puntos de corte clínicos para <i>C. albicans</i> según normas CLSI y EUCAST	9
<b>Tabla 2.</b> Puntos de corte epidemiológicos (ECVs) establecidos para <i>Candida</i> spp.	9
<b>Tabla 3.</b> Porcentaje de aislados de <i>C. albicans</i> resistentes y no-WT en el año 2007 y 2011 en un hospital de Chile	12
<b>Tabla 4.</b> Partidores usados para la amplificación de los genes <i>ERG11</i> y <i>FKS1</i>	17
<b>Tabla 5.</b> Partidores utilizados para la secuenciación de los genes <i>ERG11</i> y <i>FKS1</i>	18
<b>Tabla 6.</b> Partidores utilizados para la cuantificación transcripcional de los genes <i>ERG11</i> , <i>FKS1</i> , <i>CDR1</i> , <i>CDR2</i> y <i>MDR1</i>	22
<b>Tabla 7.</b> Caracterización de cepas de <i>C. albicans</i> utilizadas para evaluar los mecanismos de resistencia a azoles	25
<b>Tabla 8.</b> Caracterización de cepas de <i>C. albicans</i> utilizadas para evaluar los mecanismos de resistencia a equinocandinas	26
<b>Tabla 9.</b> Mutaciones sinónimas y no sinónimas encontradas en el gen <i>ERG11</i>	31
<b>Tabla 10.</b> Mutaciones sinónimas y no sinónimas encontradas en la región HS1 del gen <i>FKS1</i>	33
<b>Tabla 11.</b> Mutaciones no sinónimas encontradas en el factor de transcripción <i>TAC1</i>	43
<b>Tabla 12.</b> Mecanismos de resistencia a azoles y a equinocandinas en cepas de <i>C. albicans</i> encontradas en este trabajo	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Heterogeneidad de la morfología de <i>Candida</i> spp.	2
<b>Figura 2.</b> Mecanismos de acción de las principales familias de antifúngicos de uso clínico	5
<b>Figura 3.</b> Esquema de partidores utilizados para la secuenciación de los genes <i>ERG11</i> y <i>FKSI</i>	19
<b>Figura 4.</b> Identificación de <i>Candida</i> spp. por el método de CHROagar <i>Candida</i>	24
<b>Figura 5.</b> Caracterización de la extracción de ADN genómico de <i>C. albicans</i>	27
<b>Figura 6.</b> Amplificación de los genes <i>ERG11</i> y <i>FKSI</i> mediante PCR	28
<b>Figura 7.</b> Mutaciones sinónimas y no sinónimas encontradas en el gen <i>ERG11</i>	30
<b>Figura 8.</b> Mutaciones sinónimas y no sinónimas encontradas en el gen <i>FKSI</i>	32
<b>Figura 9.</b> Caracterización de la extracción de ARN total de <i>C. albicans</i>	34
<b>Figura 10.</b> Especificidad de los partidores utilizados para cuantificar la transcripción de los genes <i>ERG11</i> , <i>FKSI</i> , <i>CDR1</i> , <i>CDR2</i> , <i>MDR1</i> y <i>ACT1</i>	36
<b>Figura 11.</b> Validación de los ensayos de cuantificación transcripcional para los genes <i>ERG11</i> , <i>FKSI</i> , <i>CDR1</i> , <i>CDR2</i> y <i>MDR1</i>	37
<b>Figura 12.</b> Expresión relativa del gen <i>ERG11</i> en cepas de <i>C. albicans</i> resistentes y susceptibles a azoles	38
<b>Figura 13.</b> Expresión relativa del gen <i>FKSI</i> en cepas de <i>C. albicans</i> resistentes y susceptibles a equinocandinas	39
<b>Figura 14.</b> Expresión relativa del gen <i>CDR1</i> en cepas de <i>C. albicans</i> resistentes y susceptibles a azoles	41

<b>Figura 15.</b> Expresión relativa del gen <i>CDR2</i> en cepas de <i>C. albicans</i> resistentes y susceptibles a azoles	42
<b>Figura 16.</b> Expresión relativa del gen <i>MDR1</i> en cepas de <i>C. albicans</i> resistentes y susceptibles a azoles	42
<b>Figura 17.</b> Expresión relativa del gen <i>CDR1</i> en cepas de <i>C. albicans</i> resistentes y susceptibles a equinocandinas	45
<b>Figura 18.</b> Expresión relativa del gen <i>CDR2</i> en cepas de <i>C. albicans</i> resistentes y susceptibles a equinocandinas	45
<b>Figura 19.</b> Expresión relativa del gen <i>MDR1</i> en cepas de <i>C. albicans</i> resistentes y susceptibles a equinocandinas	46
<b>Figura 20.</b> Acumulación de R6-G en cepas de <i>C. albicans</i> resistentes y susceptibles a azoles	47
<b>Figura 21.</b> Acumulación de R6-G en presencia del inhibidor de bombas de eflujo CCCP	48
<b>Figura 22.</b> Acumulación de R6-G en cepas de <i>C. albicans</i> resistentes y susceptibles a equinocandinas	49

## RESUMEN

Las infecciones fúngicas o micosis son infecciones producidas por hongos oportunistas y/o patógenos que pueden ser superficiales o sistémicas. El agente etiológico más importante a nivel mundial de estas infecciones es *Candida albicans*, una levadura comensal que coloniza entre un 30-60% de los humanos; sin embargo, frente a cambios en las condiciones locales o en la inmunidad del hospedero es capaz de causar una infección.

Los antifúngicos son agentes naturales o sintéticos que eliminan y/o inhiben la proliferación de hongos. Sus principales mecanismos de acción son la inhibición de la formación de la pared celular y la disrupción de la membrana celular. Se han estudiado varios mecanismos de resistencia a antifúngicos en *C. albicans*. Los principales apuntan a mutaciones y sobreexpresión de los genes *ERG11* (azoles) y *FKSI* (equinocandinas) y/o a la sobreexpresión de las bombas de eflujo CDR1, CDR2 y MDR1; sin embargo, su contribución real a la generación de resistencia no está del todo dilucidada.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar los mecanismos de resistencia a azoles y equinocandinas en cepas clínicas chilenas, estableciendo los mecanismos de resistencia más prevalentes. Se estudiaron 10 cepas de aislados chilenos resistentes a azoles y 10 cepas resistentes a equinocandinas de *C. albicans* de origen clínico, buscando mecanismos de resistencia mediante el análisis de genes candidatos por técnicas de secuenciación, q-PCR y además mediante ensayos de funcionalidad de bombas de eflujo.

Se encontró que en las cepas resistentes, tanto a azoles como a equinocandinas, no existe un mecanismo de resistencia único. Sin embargo, el mecanismo de resistencia más prevalente a azoles fue la sobreexpresión de bombas de eflujo, encontrándose en el 60% de las cepas ensayadas. Por otra parte, en las cepas resistentes a equinocandinas el mecanismo predominante fueron mutaciones en el gen *FKSI*, principalmente en la región HS1, encontrándose mutaciones de interés en un 20% del total de cepas resistentes estudiadas.

Estos resultados entregan información importante acerca de los mecanismos predominantes para dos familias de antifúngicos en aislados clínicos chilenos de *C. albicans*. Es necesario un estudio multicéntrico con un mayor número de cepas para conocer con más detalle la realidad nacional de la resistencia a agentes antifúngicos en *C. albicans*.



## SUMMARY

### **A STUDY OF THE SUSCEPTIBILITY AND ANTIFUNGAL RESISTANCE MECHANISMS OF CHILEAN CLINICAL ISOLATE OF *Candida albicans***

Fungal infections or mycoses are infections caused by opportunistic and/or pathogenic fungi that may be superficial or systemic. The most important etiologic agent globally of these infections is *Candida albicans*, a commensal yeast that colonizes 30-60% of humans. Changes in local conditions or host immunity can produce a switch from a harmless colonizing commensal to causing a pathogen infection.

Antifungal agents are natural or synthetic agents that eliminate and/or inhibit the growth of fungi; their main mechanism of action is the inhibition of cell wall formation and disruption of the cell membrane. Several mechanisms of antifungal resistance of *C. albicans* have been studied. The most common are mutations and overexpression of the *ERG11* and *FKS1* genes, involved in resistance to azoles and echinocandins, respectively, and/or the overexpression of efflux pumps CDR1, CDR2 and MDR1. However the real contribution of each resistance mechanism in Chilean clinical isolates has not been elucidated.

The aim of this work was to characterize the resistance mechanisms to azoles and echinocandins in Chilean clinical isolates, in order to establish the most prevalent resistance mechanism. We studied 10 strains of *C. albicans* resistant to azoles and 10 strains resistant to echinocandins, and evaluated their resistance mechanisms using sequencing, q-PCR and functional assays of efflux pumps.

We found that several resistance mechanisms are present in the azole and echinocandin resistant strains. However, the most prevalent mechanism of azole resistance was the overexpression of an efflux pump, present in 60% of the tested strains. Resistance to echinocandins can be ascribed predominantly to mutations in the *FKS1* gene, mainly in the HS1 region. Mutations of interest were found in 20% of the resistant strains tested.

These results provide important information about the predominant resistance mechanisms against two families of antifungals in Chilean strains of *C. albicans*. A multicenter study, with a greater number of isolates, will be necessary to know the national status of antifungal resistance in *C. albicans*.

# I. INTRODUCCIÓN

## 1. Infecciones fúngicas (IFs)

Las infecciones fúngicas (IFs) o también llamadas micosis, son el conjunto de infecciones producidas por especies de hongos patógenos u oportunistas en el hombre, las cuales pueden ser superficiales afectando la piel, pelo, uñas y/o mucosa, o profundas afectando órganos internos (Lass-Florl, 2009; Ruping *et al.*, 2008). Se ha descrito que entre los factores que predisponen a sufrir una IF se encuentran aquellos inmunológicos como una disfunción del sistema inmune y otros factores como una quimioterapia prolongada, terapia antibiótica y algunos procedimientos médicos invasivos (Silva *et al.*, 2011).

Desde los años '80 las IFs han cobrado cada vez mayor importancia tanto por su relevancia a nivel de salud pública como por su impacto económico. Algunos reportes muestran que anualmente en EE.UU. los costos asociados a IFs son de aproximadamente \$2600 millones de dólares y esta cifra estaría en aumento (Muñoz *et al.*, 2010; Wilson *et al.*, 2002).

Las micosis pueden ser causadas tanto por levaduras como por hongos filamentosos. El número de especies que pueden causar IFs aumenta cada año; sin embargo, los microorganismos fúngicos más comunes causantes de infección a nivel mundial pertenecen al género *Candida* (72,8 casos/millón de hab. cada año), *Cryptococcus* (65,5 casos/millón de hab. cada año) y *Aspergillus* (12,4 casos/millón de hab. cada año) (Pfaller & Diekema, 2007).

## 2. *Candida* spp.

*Candida* spp. es un grupo heterogéneo de microorganismos fúngicos que presentan una morfología de levadura unicelular de 3 a 5  $\mu\text{m}$  y que se asocian ecológicamente a seres vivos de sangre caliente con temperaturas óptimas de crecimiento de 37°C.

Este hongo puede presentarse con distintas morfologías: forma de levadura, denominada blastoconidia, o formas filamentosas denominadas pseudohifas e hifas (Fig. 1). La forma de blastoconidia se ha caracterizado como la forma comensal de *Candida*, mientras que las formas filamentosas se han asociado a procesos de patogénesis (Kim & Sudbery, 2011; Sudbery, 2011).



**Figura 1. Heterogeneidad de la morfología de *Candida* spp.**

Imágenes microscópicas que muestran las diferentes morfologías en el crecimiento de *Candida albicans*. La barra representa 5  $\mu\text{m}$  (Tomado de Sudbery, 2011).

En general, *Candida* coloniza de manera comensal entre un 30-60% de los humanos, pudiendo ser aislada desde el tracto gastrointestinal (50-70%), mucosa oral (30-50%), mucosa vaginal (5-30%) y/o piel (4-7%) en muchos individuos sanos; sin embargo, bajo ciertas condiciones como cambios de temperatura, pH y/o alteraciones en la inmunidad del hospedero, es capaz de causar una infección (Kim & Sudbery, 2011; Lim *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2002).

### **3. Infecciones fúngicas por *Candida* spp.**

*Candida* spp. es una levadura comensal que puede desarrollar una infección en el organismo hospedero. Algunos factores reportados que predisponen la patogénesis por cepas del género *Candida* son la inmunosupresión, terapia antibiótica prolongada y/o corticoides, cáncer, quimioterapia prolongada y procedimientos quirúrgicos invasivos (Cortés *et al.*, 2011). La principal fuente de infección por *Candida* spp. es endógena, es decir, previa colonización de piel y/o mucosas del propio individuo, aunque también

puede transmitirse a través de material contaminado usado en algunos procedimientos clínicos, como catéteres y sondas (Cortés *et al.*, 2011; Peman & Salavert, 2012).

La candidiasis o infección por *Candida* spp. es una patología con una mortalidad descrita que varía desde un 35 a un 75% para la infección sistémica (Silva *et al.*, 2002). Esta variación depende, entre otros factores, de las características del grupo y el país en que se realizó el estudio. En Chile la mortalidad descrita es de un 33% (Silva *et al.*, 2002; Tobar *et al.*, 2011) muy similar a la mortalidad global en Latinoamérica que sería cercana al 30% (Rodero *et al.*, 2005; Santolaya *et al.*, 2013). Se ha descrito que las infecciones por *Candida* tienen una incidencia global de 0,37 casos por cada 1000 pacientes-día (Nucci *et al.*, 2010). *Candida* spp. constituye el 75% de las infecciones fúngicas intrahospitalarias (Peman & Salavert, 2012). Además, se ha descrito que estas infecciones corresponden a la cuarta causa de infecciones nosocomiales o intrahospitalarias en las Unidades de Cuidado Intensivo (UCIs) y la tercera del total de infecciones nosocomiales (Bicmen *et al.*, 2012; Cortés *et al.*, 2011). Si bien se han descrito más de 200 especies distintas de *Candida*, la especie de *Candida* patógena en humanos más común es *Candida albicans*, representando en Chile el 44,6% de las IFs causadas por levaduras (Lim *et al.*, 2012; Miceli *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2002).

La manifestación patológica más común de *Candida* es la candidiasis vaginal, la cual afecta a aproximadamente el 75% de las mujeres por lo menos una vez durante su edad fértil (Kim & Sudbery, 2011; Moyes & Naglik, 2011; Tobar *et al.*, 2011). Otras candidiasis superficiales son las orales, cutáneas, cutánea interdigital y onicomicosis (Tobar *et al.*, 2011). La candidiasis sistémica es una de las IFs de mayor cuidado por su alta mortalidad, que supera el 46% (Lim *et al.*, 2012; Peman & Salavert, 2012). Lamentablemente, esta infección presenta signos y síntomas muy inespecíficos, como fiebre y taquicardia asociado a una baja sensibilidad del hemocultivo, por lo que su diagnóstico a veces puede ser muy complicado (Tobar *et al.*, 2011).

Se ha descrito que el 95-97% de todos los casos de candidiasis son causadas por sólo 5 especies de *Candida*, que son *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei* (Peman & Salavert, 2012). Cada una de estas especies exhibe un perfil de susceptibilidad a antifúngicos diferente, presentando algunas de ellas resistencia natural a los antifúngicos o una mayor predisposición a adquirir resistencia (Silva *et al.*, 2011). En base a lo expuesto, es fundamental hacer un diagnóstico temprano de la infección identificando la cepa responsable con el fin de brindar un tratamiento precoz que reduzca la mortalidad (Cortés *et al.*, 2011).

Es importante señalar que antes de instaurar cualquier tratamiento antifúngico empírico frente a estas IFs se debe conocer la realidad epidemiológica local de *Candida*, identificando las especies más frecuentes y su susceptibilidad a los antifúngicos (Peman & Salavert, 2012). Diversos trabajos publicados en el último tiempo han destacado que la epidemiología de las infecciones por *Candida* y su susceptibilidad a antifúngicos han ido cambiando (Bicmen *et al.*, 2012; Rodloff *et al.*, 2011). Por ejemplo, se ha descrito un aumento de las especies no-*albicans* en candidiasis invasora y un aumento en las concentraciones inhibitorias mínimas (CIMs) de algunas especies a los antifúngicos de uso clínico, como por ejemplo *C. glabrata* (Pfaller & Diekema, 2007).

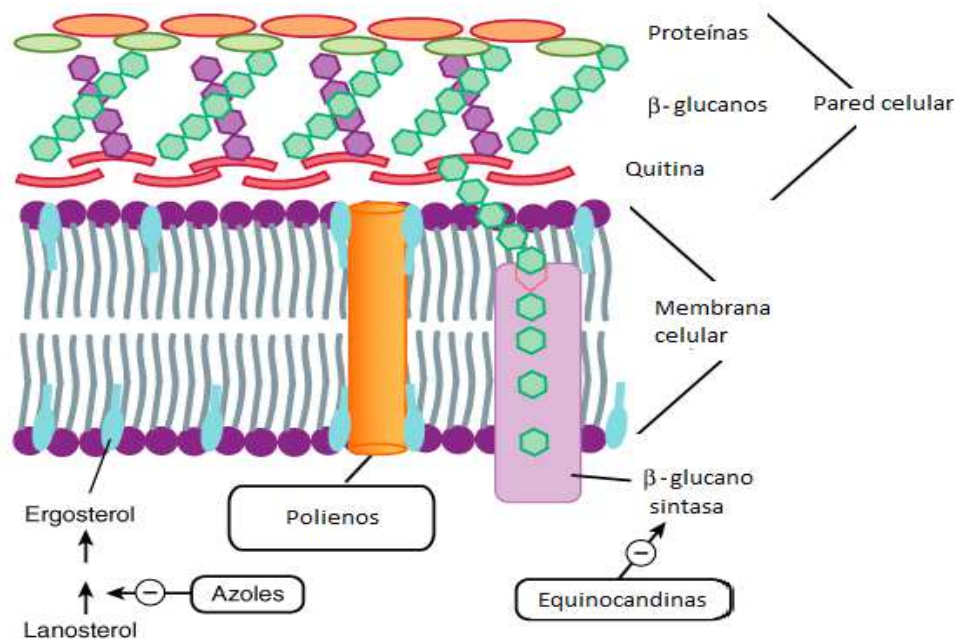
#### **4. Tratamientos antifúngicos para IFs por *Candida***

Los antifúngicos o antimicóticos son compuestos naturales o sintéticos que pueden producir modificaciones en estructuras básicas de la célula fúngica inhibiendo el desarrollo y alterando su viabilidad. En el caso de *Candida*, un adecuado tratamiento antifúngico debe considerar una eficiente cobertura para la especie de *Candida* identificada y un perfil de seguridad adecuado para el tipo de paciente tratado, dado que los antifúngicos presentan variados efectos adversos (Tobar *et al.*, 2011).

A diferencia de los antimicrobianos dirigidos a blancos bacterianos, los agentes antifúngicos son escasos debido a que muchos potenciales blancos terapéuticos son compartidos con la célula mamífera. Actualmente existen diversas familias de

antifúngicos disponibles en el mercado cuyas diferencias radican en su estructura química y sus mecanismos de acción (Fig. 2). Los principales mecanismos de acción de los agentes antifúngicos son:

- a) Disrupción de la membrana celular (azoles y polienos).
- b) Inhibición de la formación de la pared celular (equinocandinas) (Katzung *et al.*, 2009).



**Figura 2. Mecanismos de acción de las principales familias de antifúngicos de uso clínico.**

Las equinocandinas inhiben la enzima  $\beta$ -glucano sintasa. Los azoles inhiben la vía de síntesis de ergosterol y los polienos interrumpen la membrana celular uniéndose al ergosterol (Tomado de Katzung *et al.*, 2009).

Las familias de antifúngicos más utilizados para tratar candidiasis hoy en día son:

- a) **Polienos:** Son antifúngicos de amplio espectro usado durante muchos años para infecciones sistémicas por vía parenteral, aunque algunos de ellos pueden ser suministrados por vía tópica. Su modo de acción es unirse de manera permanente al ergosterol de la membrana fúngica, lo que genera una perturbación en la función de la membrana y una alteración de su permeabilidad teniendo un efecto fungicida. El polieno más utilizado es anfotericina B (Odds *et al.*, 2003).
- b) **Azoles:** Son antifúngicos de amplio espectro que inhiben la enzima 14 $\alpha$ -lanosterol desmetilasa, la cual cataliza la remoción oxidativa del grupo 14  $\alpha$ -metil del lanosterol, importante intermediario de la biosíntesis del ergosterol. Al inhibir la vía de biosíntesis de ergosterol se altera la fluidez de la membrana fúngica y se acumulan intermediarios 14  $\alpha$ -metilados; los cuales son tóxicos para el hongo y tienen efecto fungistático. El azol más utilizado en Chile es fluconazol (Odds *et al.*, 2003).
- c) **Equinocandinas:** Son hexapéptidos cíclicos con propiedades antifúngicas. Su mecanismo de acción es inhibir de manera no competitiva el complejo  $\beta$  1-3 glucano sintasa, responsable de la síntesis del  $\beta$  1-3 glucano de la pared celular. Esta disminución del glucano en la pared produce fragilidad en la célula fúngica y un efecto fungistático. Las equinocandinas más usadas en Chile son caspofungina y anidulafungina (Diomedi, 2004; Odds *et al.*, 2003; Ponton, 2008).

En Chile, el tratamiento antifúngico de primera línea indicado para los casos de candidiasis superficial y sistémica es fluconazol. En casos de resistencia se recomienda el uso de equinocandinas o anfotericina B, éste último recomendado sólo en infecciones severas debido a presentar una mayor toxicidad (Ajenjo *et al.*, 2010; Diomedi, 2004; Pappas *et al.*, 2009).



## 5. Resistencia de *Candida* a antifúngicos

En los últimos años, debido a un aumento de pacientes de riesgo, se ha producido un incremento en infecciones por levaduras del género *Candida*. Por otra parte, con el uso de nuevos agentes antifúngicos, se ha observado un aumento en la resistencia a algunos de estos agentes (Cortés *et al.*, 2011). Algunas especies de *Candida* tienden a ser más resistentes a los antifúngicos. Por ejemplo *C. glabrata* puede presentar resistencia a fluconazol y equinocandinas (Silva *et al.*, 2011).

La resistencia a los antifúngicos se ha definido como la capacidad de un hongo patógeno de reproducirse en presencia de un determinado agente antifúngico. Las resistencias se clasifican en (Loeffler & Stevens, 2003):

- a) Resistencia intrínseca o innata: Todas las cepas de una misma especie presentan resistencia. Ej. *C. krusei* es intrínsecamente resistente a fluconazol.
- b) Resistencia primaria: Algunas cepas de una especie normalmente sensible pueden presentar resistencia sin haber tenido contacto previo con el antifúngico.
- c) Resistencia secundaria o adquirida: Cepas previamente sensibles adquieren resistencia tras tener contacto con un agente antifúngico.

Es posible medir la susceptibilidad o resistencia de un hongo a un antifúngico a través de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM). Sin embargo, una limitación importante de la CIM es que no predice de manera efectiva el desarrollo clínico de la terapia antifúngica, porque la infección es el resultado de una compleja interacción entre el patógeno y el hospedero (Anderson, 2005). En la actualidad, existen distintos métodos para medir la CIM, entre los que encontramos los de microdilución en caldo, difusión en agar (disco de antifúngicos y/o E-test) y algunos tests comerciales automatizados (Ej. Vitek<sup>®</sup>). El método de referencia o *gold standard* es el método de microdilución en caldo. Existen dos estándares disponibles, la norma americana CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (CLSI, 2008) y la norma europea EUCAST (*European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing*) (EUCAST *et al.*, 2003) los cuales fijan

los puntos de corte clínicos utilizados para *Candida* spp. (Tabla 1). Además, recientemente se han propuesto nuevos puntos de corte llamados Puntos de corte epidemiológicos o ECVs (*Epidemiological cut-off value*) para distintas especies de *Candida* (Tabla 2). Los ECVs son los puntos de corte establecidos para diferenciar entre *Candida* spp. silvestre o *wild-type* (WT) y las no silvestre. Las cepas no silvestre, o que se encuentran sobre el ECV, se han definido previamente como aquellas cepas que han adquirido algún tipo de mecanismo de resistencia (Pfaller, 2012).

Es importante hacer la distinción entre los puntos de corte clínicos y ECVs. Los puntos de corte clínico se establecen en base a estudios de la respuesta clínica del paciente (éxito o fracaso) e incorporan la farmacocinética y farmacodinamia del agente antifúngico. En cambio, los ECVs derivan de estudios de distribución de las CIMs en una determinada especie y permiten separar la población con y sin mecanismos de resistencia, independiente del posible éxito terapéutico en su tratamiento. Los puntos de corte clínicos y epidemiológicos han sido muy útiles para guiar la terapia antifúngica según la especie *Candida* y permiten detectar una emergente resistencia a los distintos antifúngicos (Pfaller, 2012; Pfaller *et al.*, 2012).

**Tabla 1. Puntos de corte clínicos para *C. albicans* según normas CLSI (CLSI, 2008) y EUCAST (EUCAST *et al.*, 2003)**

<b>Puntos de corte clínicos CLSI para <i>C. albicans</i> (µg/mL)</b>			
<b>Agente antifúngico</b>	<b>S</b>	<b>I</b>	<b>R</b>
Fluconazol	< 2	4	> 8
Voriconazol	≤ 0,12	0,25 – 0,5	≥ 1
Caspofungina	≤ 0,25	0,5	≥ 1
Anidulafungina	≤ 0,25	0,5	≥ 1
Anfotericina B	*	*	*

<b>Puntos de corte clínicos EUCAST para <i>C. albicans</i> (µg/mL)</b>			
<b>Agente antifúngico</b>	<b>S</b>	<b>I</b>	<b>R</b>
Fluconazol	≤ 2	2 – 4	> 4
Voriconazol	≤ 0,12		> 0,12
Caspofungina	*	*	*
Anidulafungina	≤ 0,03		> 0,03
Anfotericina B	≤ 1		> 1

S: Sensible, I: Intermedio y R: Resistente. \* No se han establecido puntos de corte.

**Tabla 2. Puntos de corte epidemiológicos (ECVs) establecidos para *Candida* spp. (Pfaller, 2012; Pfaller *et al.*, 2012)**

<b>Puntos de corte epidemiológicos para <i>Candida</i> spp. (µg/mL)</b>					
<b>Especie</b>	<b>Fluconazol</b>	<b>Voriconazol</b>	<b>Caspofungina</b>	<b>Anidulafungina</b>	<b>Anfotericina B</b>
<i>C. albicans</i>	0,5	0,03	0,125	0,125	2
<i>C. tropicalis</i>	2	0,125	0,125	0,125	2
<i>C. parapsilosis</i>	2	0,125	1	4	2
<i>C. lusitaniae</i>	2	0,06	0,5	2	4
<i>C. glabrata</i>	32	1	0,125	0,25	2
<i>C. krusei</i>	128	1	0,25	0,125	4

## 6. Mecanismos de resistencia a antifúngicos en *Candida* spp.

Se han estudiado varios mecanismos de resistencia a antifúngicos en *Candida* spp. Los principales son mutaciones puntuales y sobreexpresión del gen *ERG11*, el cual codifica la enzima 14 $\alpha$ -lanosterol desmetilasa y que generaría una resistencia específica para azoles (Morschhauser, 2002; Sanglard *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2000). Otras mutaciones estudiadas son las presentes en el gen *FKSI*, gen que codifica la enzima  $\beta$ -(1,3)-glucano sintasa, las cuales se asociarían a una resistencia a equinocandinas (Douglas *et al.*, 1997). No se ha encontrado una mutación única implicada en cada resistencia, pues hasta el momento sólo se han identificado sitios en el ADN donde la frecuencia de mutaciones es mayor, sitios llamados puntos calientes o sitios *hot spot* (Katiyar *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2004; Marichal *et al.*, 1999).

Otros mecanismos estudiados en *C. albicans* han sido la sobreexpresión de las bombas de eflujo CDR1, CDR2 y MDR1 (Akins, 2005; Morschhauser, 2002; Pfaller, 2012; White *et al.*, 2002). CDR1 y CDR2 (*Candida Drug Resistance*) son transportadores del tipo ABC (*ATP-Binding Casette*), que corresponden a bombas de eflujo que usan ATP para traslocar pequeñas moléculas al exterior de la célula y que se encuentran reguladas por el factor de transcripción TAC1 (Coste *et al.*, 2007; Morio *et al.*, 2013; Znaidi *et al.*, 2007). En cambio, la proteína MDR1 (*Multiple Drug Resistance*) es una bomba del tipo MFS (*Major Facilitator Superfamily*) bomba de eflujo que utiliza un gradiente de protones (H<sup>+</sup>) para traslocar moléculas. Este transportador se encuentra regulado por el factor de transcripción MRR1 (Morio *et al.*, 2013). Ambos mecanismos podrían estar involucrados en la resistencia tanto de azoles como de otros antifúngicos, ya que la sobreexpresión de estas bombas no permitiría la acumulación necesaria del agente a nivel intracelular para tener el efecto de antifúngico deseado (Akins, 2005; Prasad *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2012).

Actualmente, si bien se han descrito diversos mecanismos de resistencia para *Candida*, no se sabe con certeza cuál es el aporte real de cada uno de ellos a nivel poblacional. Algunos trabajos describen una naturaleza multifactorial de la resistencia a azoles,

predominando la sobreexpresión de bombas de eflujo por sobre las mutaciones en *ERG11* (Park & Perlin, 2005; Perea *et al.*, 2011). En cambio, para la resistencia a equinocandinas sólo se han estudiado mutaciones en el gen *FKSI* (Katiyar *et al.*, 2012).

En general, los estudios de vigilancia de *Candida* en Chile no incluyen cepas de la comunidad local. Por esta razón, en nuestro laboratorio el año 2012 se analizó la distribución de especies y el perfil de susceptibilidad a antifúngicos de cepas de *Candida* aisladas de muestras clínicas, tanto de pacientes hospitalizados como de consulta ambulatoria obtenidas en un hospital de Santiago (Clínica Dávila). Los resultados obtenidos muestran que la susceptibilidad en la especie *C. albicans* a los antifúngicos de mayor uso en nuestro país ha sufrido cambios entre los años 2007 y 2011. En el 2011 hubo un aumento en el porcentaje de cepas sobre el ECV para los antifúngicos fluconazol, voriconazol y anidulafungina. También se observó que más del 80% de las cepas se encuentran sobre el ECV para el antifúngico caspofungina (Tabla 3). Esto es muy preocupante considerando que el uso de caspofungina es relativamente nuevo, no superando los 10 años de prescripción en Chile cuando se realizó este estudio (Bidart, 2004).

**Tabla 3. Porcentaje de aislados de *C. albicans* resistentes y no-WT en el año 2007 y 2011 en un hospital de Chile.**

	Fluconazol		Voriconazol		Caspofungina		Anidulafungina		Anfotericina B		n
	CLSI R	Sobre ECV	CLSI R	Sobre ECV	CLSI R	Sobre ECV	CLSI R	Sobre ECV	CLSI R	Sobre ECV	
<b>2007</b>	13,6% (11)	18,5% (15)	7,4% (6)	24,7% (20)	13,6% (11)	100% (81)	1,2% (1)	1,2% (1)	*	0	81
<b>2011</b>	4,8% (9)	23,3% (44)	3,2% (6)	27,5% (52)	18,5% (35)	83,1% (157)	1,06% (2)	2,6% (5)	*	0	189

CLSI R: Cepas sobre el punto de corte clínico establecido en la norma CLSI. Sobre ECV: Cepas sobre el punto de corte epidemiológico (ECV). n: número de cepas analizadas \*No se han establecido puntos de corte

De acuerdo al estudio realizado en Clínica Dávila, se encontró un aumento en la proporción de cepas aisladas sobre los ECVs en los últimos años, lo que por definición indicaría un mayor desarrollo de mecanismos de resistencia a azoles y equinocandinas. En vista de estos antecedentes, este trabajo plantea caracterizar la existencia de los diferentes mecanismos de resistencia a los antifúngicos fluconazol, voriconazol, caspofungina y anidulafungina en cepas clínicas locales de *C. albicans* y relacionarlos con el resultado del antifungigrama con el fin de entregar una interpretación a nivel bioquímico/molecular a los ensayos de susceptibilidad.

## II. HIPÓTESIS

“Las cepas clínicas de *C. albicans* aisladas de un hospital local que son resistentes a azoles o a equinocandinas, presentan mutaciones y sobreexpresión transcripcional en los genes *ERG11* (azoles) y *FKS1* (equinocandinas) en comparación a las cepas susceptibles, además de una sobreexpresión de las bombas de eflujo CDR1, CDR2 y MDR1, siendo éste el mecanismo de resistencia predominante”.

## III. OBJETIVOS

### 1. Objetivo General

Determinar la presencia de mutaciones en los genes *ERG11* y *FKS1*, y la transcripción de los genes *ERG11*, *FKS1*, *CDR1*, *CDR2* y *MDR1* en cepas de *C. albicans* aisladas de muestras clínicas locales resistentes y sensibles a los antifúngicos fluconazol, voriconazol, caspofungina y anidulafungina.

### 2. Objetivos Específicos

1. Detectar la presencia de mutaciones puntuales en los genes *ERG11* y *FKS1* en cepas resistentes y sensibles de *C. albicans* y determinar su relación con la resistencia a los antifúngicos.
2. Evaluar los niveles de transcripción de los genes *ERG11* y *FKS1* en cepas resistentes y sensibles de *C. albicans* de origen clínico y determinar su relación con la resistencia a los antifúngicos.
3. Evaluar los niveles de transcripción de las bombas de eflujo CDR1, CDR2 y MDR1 en cepas resistentes y sensibles de *C. albicans* de origen clínico y determinar su relación con la resistencia a los antifúngicos.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Reactivos y soluciones

**Applied Biosystem (Foster City, California, EE.UU.):** AmpliTaq DNA polymerase con tampón de PCR 10x, dATP, dCTP, dTTP, dGTP, MgCl<sub>2</sub> 15 mM, sistema de detección para q-PCR Fast SYBR Green Master Mix.

**Becton Dickinson (Le Pont de Claix, Francia):** Agar Sabouraud.

**Biomerieux (Marcy l'Etoile, Francia):** CHROMagar Candida.

**Fermentas (Frederick, Maryland, EE.UU.):** DNAasaI con tampón de reacción 10x, estándar de ADN 1 Kb.

**GE Life Sciences (Buckinghamshire, Inglaterra):** Estándar de ADN fago λ, sistema enzimático de purificación de ADN ExoProStar.

**Gibco BRL (Paisley, Escocia):** Peptona.

**Merck (Darmstadt, Alemania):** Caspofungina, EDTA, etanol, sacarosa, DMSO.

**New England BioLabs (Beverly, Massachusetts, EE.UU.):** Estándar de ADN de 1Kb.

**Pfizer (New York, NY, EE.UU.):** Anidulafungina, fluconazol, voriconazol.

**Promega (Madison, Wisconsin, EE.UU.):** Sistema de transcripción reversa ImpromII Reverse Transcription System, estándar de ADN 1 Kb, estándar de ADN Lamda/HindIII, enzima inhibidora de RNAsas RNasin 30 UI/μL.

**Qiagen (Hilden, Alemania):** Sistema comercial de extracción RNeasy Mini Kit.

**Roche (Mannheim, Alemania):** Sistema comercial de extracción High Pure PCR Template Preparation kit, proteinasa K 20 mg/mL.

**Sigma - Aldrich (Stenheim, Alemania):** Agarosa, extracto de levadura, glucosa, isopropanol, liticasa, rodamina 6-G, CCCP.



## 2. Cepas utilizadas en este trabajo

Para estudiar los mecanismos de resistencia se utilizaron cepas de *Candida* aisladas de muestras clínicas identificadas como *C. albicans* mediante el método fenotípico de CHROMagar Candida. Se realizó pruebas de susceptibilidad antifúngica a fluconazol, voriconazol, caspofungina y anidulafungina según norma americana CLSI (CLSI, 2008). Para el estudio de resistencia a azoles se utilizaron 10 cepas resistentes y 20 cepas susceptibles (10 cepas Sensible Dosis Dependiente (SDD) y 10 cepas sensibles). Para el estudio de mecanismo de resistencia a equinocandinas, se utilizaron 10 cepas resistentes y 20 cepas susceptibles (10 cepas de resistencia intermedia y 10 cepas sensibles). Como cepa control se utilizó una cepa de referencia de *C. albicans* ATCC SC5314 la cual es sensible a todos los antifúngicos estudiados, según se comprobó en nuestro laboratorio. Las cepas utilizadas fueron aportadas por la Clínica Dávila y su uso cuenta con la aprobación del Comité de ética de la institución (Anexo 1).

## 3. Programas para análisis

Todos los partidores utilizados en este trabajo fueron diseñados en nuestro laboratorio usando las secuencias de la cepa *C. albicans* ATCC SC5314. El diseño de los partidores para la amplificación y secuenciación de los genes *ERG11* y *FKS1* se realizó con el programa **Primers 3** disponible gratuitamente en <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>. El programa utilizado para la depuración de las secuencias obtenidas a partir de la secuenciación fue **SeqMan** (Madison, Wisconsin, EE.UU.) y para los alineamientos de las secuencias se utilizó el programa **Mega 6.0**, descargado gratuitamente desde <http://www.megasoftware.net/>. El diseño de los partidores para la cuantificación de los genes por q-PCR fue realizado con el programa **Primer Express 3.0.1** (Applied Biosystem, Foster City, California, EE.UU.). Finalmente, el análisis de datos y la representación gráfica de éstos se realizó mediante el programa **Graph Prisma 5.0**.

#### **4. Extracción de ADN genómico de *C. albicans***

La extracción de ADN genómico se realizó usando el sistema comercial High Pure PCR Template Preparation Kit. Se sembró 1 colonia de *C. albicans* en 5 mL de medio YPD y se incubó a 37°C durante 16 h con agitación. Luego, se sembró 0,5 mL de este cultivo en 50 mL de medio YPD y se incubó nuevamente a 37°C con agitación hasta alcanzar la fase exponencial (OD<sub>600</sub> 0,5 a las aproximadamente 4 h de incubación).

Se transfirió 1 mL de cultivo a un tubo Eppendorf y se centrifugó a 3000 x g durante 10 min. El sedimento obtenido se resuspendió en 280 µL de EDTA 50 mM y 15 µL de liticasa (20 mg/mL) y se incubó a 37°C durante 2 h con el fin de romper enzimáticamente la pared fúngica. Luego, se agregó 200 µL de tampón de unión (*Binding Buffer*) y 40 µL de proteinasa K y se incubó a 70°C durante 10 min. Se agregaron 100 µL de isopropanol y se agregó la solución a una columna proporcionada en el sistema comercial, centrifugando a 8000 x g durante 1 min.

Se descartó el líquido y se lavó el material retenido en la columna con 500 µL de tampón de lavado y se centrifugó a 8000 x g durante 1 min, luego se repitió el lavado con 500 µL de tampón de lavado y se centrifugó a 8000 x g durante 1 min. Posteriormente, se secó la columna centrifugando a 10000 x g durante 10 seg. Se insertó la columna en un tubo de recolección de 1,5 mL, se agregaron 200 µL de tampón de elución y finalmente se centrifugó a 8000 x g durante 1 min recogiendo una solución transparente que contiene el ADN genómico. Las muestras de ADN se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8% a 70V durante 1 h. El ADN se almacenó a -80°C hasta su posterior uso.

#### **5. Amplificación del gen *ERG11* por PCR**

Se amplificó el gen completo de *ERG11* (Gene ID: 3641571) mediante PCR con los partidores CaERG11\_1 y CaERG11\_2 (Tabla 4, Fig. 3a). Cada reacción de PCR contenía tampón de PCR 1x, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTP 0,2 mM, polimerasa AmpliTaq

0,05 U/ $\mu$ L, partidores 0,5  $\mu$ M y 25 ng de templado de ADN genómico. Se completó el volumen a 50  $\mu$ L con agua bidestilada estéril. La amplificación se realizó usando un programa con desnaturación inicial a 95°C durante 2 min y 40 ciclos de desnaturación a 95°C durante 30 seg, apareamiento a 50°C durante 30 seg y extensión a 72°C durante 1 min. Se realizó una extensión final a 72°C durante 5 min.

## 6. Amplificación del gen *FKSI* por PCR

Para evaluar la presencia de mutaciones en el gen *FKSI* (Gene ID: 3636794), se amplificaron las regiones HS1 y HS2 en una sola reacción de PCR con los partidores CaFKS1\_1 y CaFKS1\_2 de modo de obtener un amplicón de 2548 pb (Tabla 4, Fig. 3b). De acuerdo a la bibliografía, estas regiones contienen el mayor número de mutaciones relacionadas con la generación de resistencia a equinocandinas (Balashov *et al.*, 2006; Desnos-Ollivier *et al.*, 2008).

Cada reacción de PCR contiene tampón de PCR 1x, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTP 0,2 mM, polimerasa AmpliTaq 0,05 U/ $\mu$ L, partidores 0,5  $\mu$ M y 25 ng de templado de ADN genómico. Se completó el volumen a 50  $\mu$ L con agua bidestilada estéril. La amplificación se realizó usando un programa con desnaturación inicial a 95°C durante 2 min y 40 ciclos de desnaturación a 95°C durante 30 seg, apareamiento a 55°C durante 30 seg y extensión a 72°C durante 1 min. Se completó la reacción con una extensión final a 72°C durante 5 min.

**Tabla 4. Partidores usados para la amplificación de los genes *ERG11* y *FKSI*.**

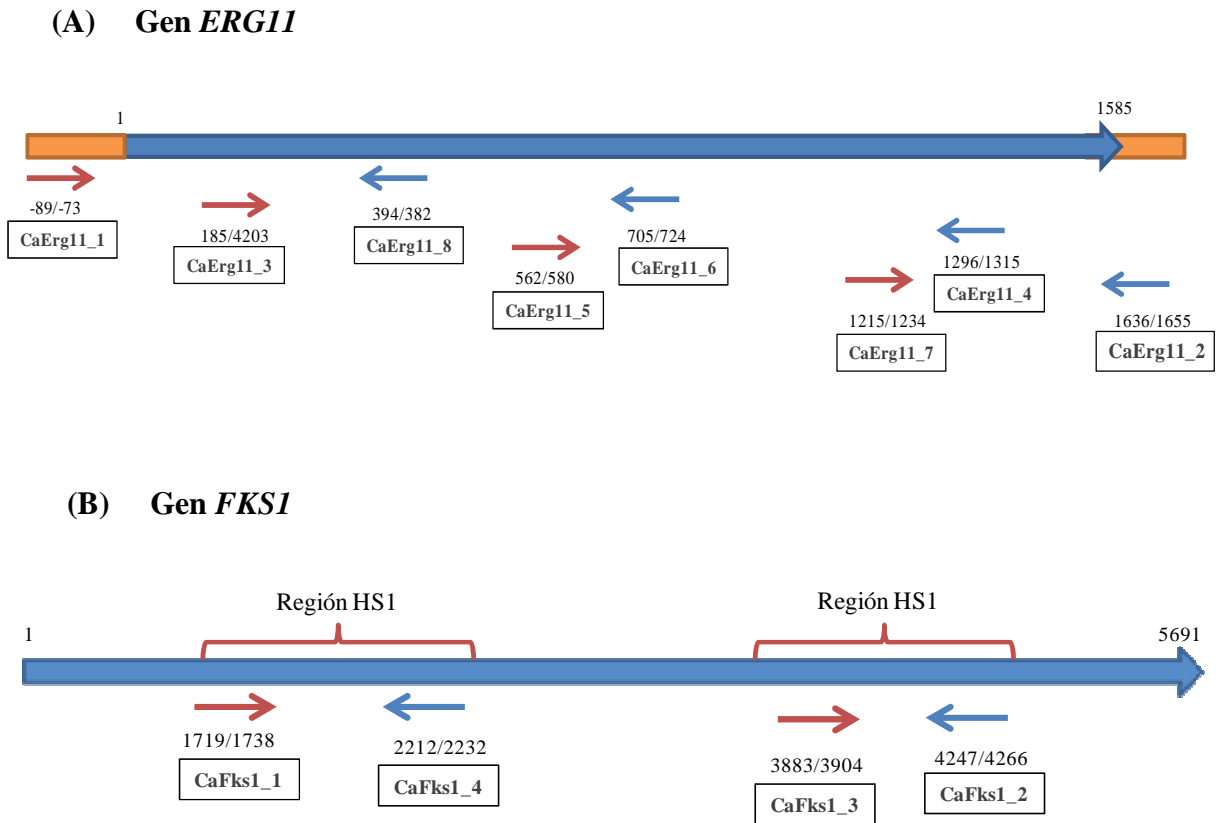
Gen	Nombre	5' → 3'	Secuencia	Tamaño producto	Tm partidores
<i>ERG11</i>	CaERG11_1	Sentido	GAAAGGGAATTCAATCG	1745 pb	50°C
	CaERG11_2	Antisentido	TGTTAATCCAACCTAAGTAAC		
<i>FKSI</i>	CaFKS1_1	Sentido	CTTCATATGGTCAACAACC	2548 pb	55°C
	CaFKS1_2	Antisentido	ATGAAACAGAATTAGCTTTG		

## 7. Purificación de productos de PCR y secuenciación

Los productos de PCR se purificaron usando el sistema enzimático ExoProStar. Se mezclaron 40  $\mu$ L de producto PCR y 16  $\mu$ L de mezcla enzimática ExoProStar y se incubó en el termociclador a 37°C durante 15 min y luego a 80°C durante 15 min para inactivar la enzima. Las muestras se secuenciaron en un equipo ABI 3730xl (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.) en la Unidad de Genómica del Instituto de Salud Carlos III (Madrid, España) utilizando los partidores diseñados en nuestro laboratorio con el programa Primers 3 (Tabla 5, Fig. 3). Una vez secuenciadas las muestras, se depuraron las secuencias usando el programa Seqman y se alinearon usando Clustal W con el programa Mega 6.0.

**Tabla 5. Partidores utilizados para la secuenciación de los genes *ERG11* y *FKS1*.**

Gen	Nombre	5' $\rightarrow$ 3'	Secuencia
<i>ERG11</i>	CaERG11_1	Sentido	GAAAGGGAATTCAATCG
	CaERG11_2	Antisentido	TGTTAATCCAATAAGTAAC
	CaERG11_3	Sentido	CTTCATATGGTCAACAACC
	CaERG11_4	Antisentido	ATGAAACAGAATTAGCTTTG
	CaERG11_5	Sentido	GTTATGAAAACACTCAACCAG
	CaERG11_6	Antisentido	GAGGTAAAGGTAAATTAGGG
	CaERG11_7	Sentido	TCCAGGTTATGCTCATACTA
	CaERG11_8	Antisentido	TACCGAAAACACTGGAGTAGT
<i>FKS1</i>	CaFKS1_1	Sentido	CATTGCTGTGGCCACTTTAG
	CaFKS1_2	Antisentido	GGTCAAATCAGTGAAAACCG
	CaFKS1_3	Sentido	TACTATGGTCATCCAGGTTTCC
	CaFKS1_4	Antisentido	GATTTCCATTTCCGTGGTAGC



**Figura 3. Esquema de partidores utilizados para la secuenciación de los genes *ERG11* y *FKS1*.**

(A) Esquema de partidores utilizados para la secuenciación del gen *ERG11* de *C. albicans* (GenID: 3641571) (B) Esquema de partidores utilizados para la secuenciación del gen *FKS1* de *C. albicans* (GenID: 3636794)

## 8. Extracción de ARN de *C. albicans*

La extracción de ARN de las cepas se realizó usando el sistema comercial RNeasy Mini Kit. Se sembró una colonia en 5 mL de medio YPD y se incubó a 37°C durante 16 h. Se sembró 0,5 mL de este inóculo en 50 mL de medio YPD y se incubó a 37°C con agitación constante durante 4 h, período en que el cultivo alcanza la fase de crecimiento exponencial y las levaduras presentan la mayor actividad metabólica. Se centrifugaron 20 mL de cultivo a 1000 x g durante 10 min, se agregaron 600 µL de perlas de vidrio

(0,5 mm) y 600  $\mu$ L de tampón de lisis RLT. Se agitó en vortex durante 1 min y luego se enfrió en hielo durante 1 min. Se repitió 20 veces este ciclo a fin de asegurar el rompimiento mecánico de la pared fúngica de las levaduras. Se esperó la decantación de las perlas y se transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorf de 1,5 mL y se centrifugó a 10000 x g durante 2 min. Se transfirió el sobrenadante a un segundo tubo de 1,5 mL y se agregó 600  $\mu$ L de etanol 70% y se mezcló por inversión. Se transfirió la solución a la columna suministrada en el sistema comercial y se centrifugó a 8000 x g durante 15 seg. Se eliminó el líquido y se agregó 700  $\mu$ L de solución de lavado RW1 y se centrifugó a 8000 x g durante 15 seg. Se agregaron 500  $\mu$ L de tampón de lavado RPE y se centrifugó a 8000 x g durante 2 min. Se descartó el líquido y se centrifugó a 10000 x g durante 1 min para secar la columna. Se transfirió la columna a un tubo de recolección de 1,5 mL y se agregó 40  $\mu$ L de agua libre de nucleasas estéril y se centrifugó a 8000 x g durante 1 min. La solución translúcida obtenida contiene el ARN total de las levaduras.

Las muestras se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% a 70V durante 1,5 h para evaluar la integridad del ARN. Para cuantificar el ARN y evaluar su pureza (A260/A280) se utilizó el equipo Nanodrop 2000 (Thermo, Wilmington, Delaware, EE.UU.). El ARN se almacenó a -80°C hasta su posterior uso.

## **9. Tratamiento con DNasa I**

Para evitar la contaminación del ARN extraído con ADN genómico, las muestras de ARN se trataron con DNasa I. En un tubo se mezclaron 2  $\mu$ g de ARN, 2  $\mu$ L de DNasa I (1 U/  $\mu$ L) y 1,5  $\mu$ L de tampón 1x. Se completó el volumen a 15  $\mu$ L con agua libre de nucleasas. Se incubó a 37°C durante 30 min. Luego se agregó 1,5  $\mu$ L de EDTA 25 mM y se incubó a 65°C durante 10 min para inactivar la enzima.

## 10. PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR)

La reacción de retrotranscripción se realizó usando el sistema ImPromII Reverse Transcription System de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En tubos de 0,2 mL se mezcló 7,5 µL (1 µg) de ARN previamente tratado con DNAasa I y 1 µL de partidores *Random primers* (500 µg/mL). Se calentó a 70°C durante 5 min e inmediatamente se incubó en hielo para evitar la degradación del ARN.

De manera independiente se preparó la mezcla de reacción que contiene 2 µL de agua libre de nucleasas, 4 µL de tampón de reacción 5x, 3 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1 µL de dNTP 10mM, 0,5 µL de RNasin y 1 µL de enzima Transcriptasa inversa por reacción. Se agregó el ARN con los partidores a la mezcla de reacción y se incubó a 25°C durante 5 min y luego a 42°C durante 1 h. Finalmente, se inactivó la enzima con una incubación a 70°C durante 15 min.

## 11. Cuantificación transcripcional de genes mediante PCR cuantitativo (q-PCR)

Los análisis de PCR en tiempo real se llevaron a cabo en un equipo Step One (Applied Biosystem, Foster City, California, EE.UU.) con el sistema Fast SYBR Green Master Mix. Para evaluar la expresión a nivel transcripcional de los genes *ERG11*, *FKS1*, *CDR1*, *CDR2* y *MDR1* se utilizó como gen de referencia *ACT1*.

La especificidad de los productos de las reacciones de q-PCR fue evaluada mediante el análisis de las curvas de disociación. Se estimó la eficiencia de cada pareja de partidores utilizando la pendiente de la regresión lineal de una curva estándar con diluciones seriadas de ADNc a partir de una concentración de 10 ng/µL. La eficiencia se calculó utilizando la fórmula:

$$E = \left( 10^{\frac{-1}{\text{pendiente}}} - 1 \right) \times 100\%$$

La validación de cada pareja de partidores se realizó graficando  $\Delta Ct$ : Ct gen interés (ciclo umbral del gen de interés) – Ct gen endógeno (ciclo umbral de *ACT1*) vs Log [ADNc] para cada dilución seriada de ADNc utilizado. Los partidores que presentaron pendiente < 0,1 fueron considerados válidos.

Cada reacción de cuantificación por q-PCR contiene Fast SYBR Green Mix 1x, partidores a una concentración final de 0,5  $\mu$ M (Tabla 6), 2  $\mu$ L de ADNc, completando el volumen a 20  $\mu$ L con agua bidestilada estéril. El programa de amplificación utilizado fue una desnaturalización inicial a 95°C durante 20 seg y 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 2 seg, apareamiento a 55°C durante 30 seg y extensión a 60°C durante 30 seg con colección de datos. A cada reacción se le agregó su respectiva curva de disociación. Se evaluó la transcripción de los genes utilizando el método de  $\Delta\Delta CT$ , usando como gen endógeno el gen de *ACT1* y como cepa de referencia *C. albicans* ATCC SC5314.

**Tabla 6. Partidores utilizados para la cuantificación transcripcional de los genes *ERG11*, *FKS1*, *CDR1*, *CDR2* y *MDR1*.**

Gen	Nombre	5' → 3'	Secuencia partidores 5' → 3'	Tamaño producto	Tm
<i>ERG11</i>	ERG11-for	Sentido	TACTGCTGCTGCCAAAGCTA	144 pb	55°C
	ERG11-rev	Antisentido	GCAAATTGTTCCCAATACA		
<i>FKS1</i>	FKS1-for	Sentido	TGGATTTTTCATTGCTGTGG	191 pb	55°C
	FKS1-rev	Antisentido	TGGCAAGGAAAACCAAAAAC		
<i>CDR1</i>	CDR1-for	Sentido	GAAAGAGAACCATTACCAGG	288 pb	53°C
	CDR1-rev	Antisentido	AGGAATCGACGGATCAC		
<i>CDR2</i>	CDR2-for	Sentido	GAATTTGCCGCTAGATTAAGAA	150 pb	54°C
	CDR2-rev	Antisentido	ACCACGCACAAAATCGTTAC		
<i>MDR1</i>	MDR1-for	Sentido	CAAATTCCCACTGCTTTGGT	148pb	56°C
	MDR2-rev	Antisentido	CGGCTAACCCAACTGGTAAA		
<i>ACT1</i>	ACT1-for	Sentido	CCAGCTTTCTACGTTTCC	209pb	53°C
	ACT1-rev	Antisentido	CTGTAACCACGTTTCAGAC		



## 12. Ensayo de acumulación de rodamina 6-G

El ensayo de acumulación de rodamina 6-G usado en este trabajo fue una adaptación del estudio previos descrito en Ahmad *et al.*, 2012. Se sembró una colonia en 5 mL de medio YPD y se incubó a 37°C durante 16 h, luego se traspasó 0,5 mL de este inóculo a 50 mL de medio YPD y se incubó a 37°C con agitación constante durante 4 h. Se centrifugaron 10 mL de cultivo a 5000 x g durante 5 min y se lavó el sedimento obtenido dos veces con tampón PBS con el fin de lavar las células y eliminar todo resto de medio YPD. Se resuspendió el sedimento en 5 mL de medio YPD y 5 µL de solución madre de rodamina 6-G 10 mM. Se incubó a 37°C con agitación durante 1 h, se centrifugó 1 mL a 9000 x g y se lavó con tampón PBS dos veces, resuspendiendo el sedimento en 700 µL de tampón PBS. Se contaron las células en una cámara de Neubauer y se midió la absorbancia a 527 nm en el equipo Synergy Mx (Biotek, Winooski, Vermont, EE.UU.). La cuantificación de rodamina 6-G se realizó usando una curva estándar previamente definida (Anexo 3).

Se realizó un ensayo adicional de acumulación de rodamina 6-G para aquellas cepas que mostraron baja acumulación del reactivo con el fin de evaluar si esta baja acumulación del reactivo es debido al funcionamiento de bombas de eflujo. Este ensayo se realizó incubando las levaduras en medio YPD con el inhibidor de bombas de eflujo CCCP (carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona) a una concentración final de 100 µg/mL durante 4 h. Luego, se siguió con la incubación con R6-G y su medición siguiendo el protocolo descrito en esta sección.

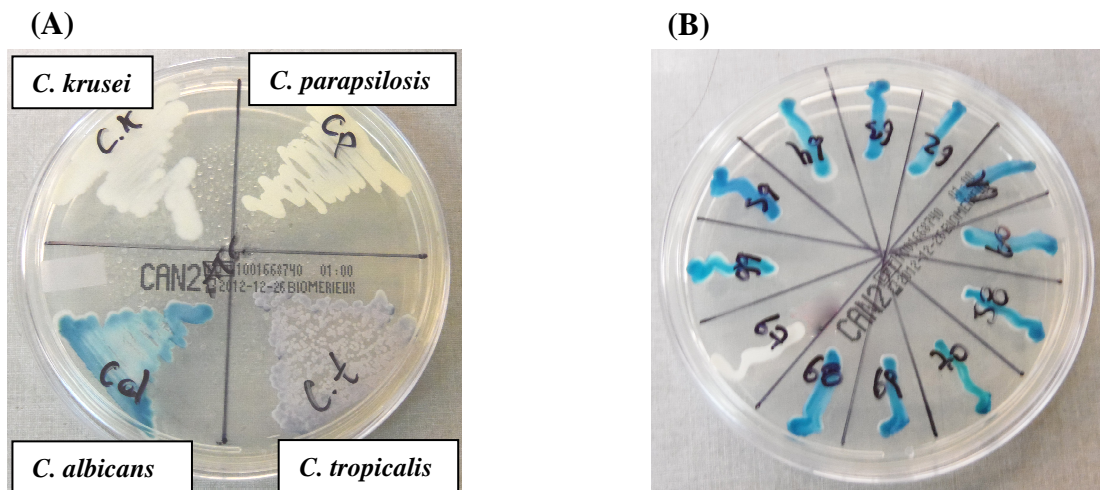
## 13. Métodos estadísticos

Los resultados se expresaron como promedios  $\pm$  desviación estándar. Los gráficos y el análisis estadístico de los datos se realizaron usando el test *t* de Student mediante el software GraphPad Prism 5.0. Se consideró como significancia estadística un valor  $p < 0,5$ .

## V. RESULTADOS

### 1. Identificación de cepas y ensayos de susceptibilidad

Con el fin de hacer una selección de las cepas de *Candida* utilizadas en este estudio, se realizó una identificación de diversos aislados clínicos de *Candida* spp. y se seleccionaron aquellas cepas clínicas identificadas como *C. albicans* según el método de CHROMagar Candida (Fig. 4). Se les sometió a estas cepas a un ensayo de susceptibilidad a fluconazol (FLU), voriconazol (VOR), caspofungina (CAS) y anidulafungina (ANI) de acuerdo a la norma americana CLSI. Las cepas seleccionadas para este estudio se indican en las Tablas 7 y 8.



**Figura 4. Identificación de *Candida* spp. por el método de CHROagar Candida.**

(A) Identificación de diversas especies de *Candida*: Verde: *C. albicans*. Blanco opaco: *C. krusei*. Blanco brillante: *C. parapsilosis*. Azul-lila: *C. tropicalis*. (B) Identificación de muestras clínicas de *Candida* aisladas de Clínica Dávila. Las colonias verdes corresponden a los aislados de *C. albicans* seleccionados para este trabajo.

**Tabla 7. Caracterización de cepas de *C. albicans* utilizadas para evaluar los mecanismos de resistencia a azoles.**

<b>ID</b>	<b>Susc.<sup>a</sup></b>	<b>Origen</b>	<b>Servicio</b>	<b>CIM FLU<sup>b</sup></b>	<b>CIM VOR<sup>b</sup></b>
1A	R	Flujo vaginal	Ambulatorio	> 64	> 16
2A	R	Flujo vaginal	Ambulatorio	> 64	> 16
3A	R	Muestra respiratoria	Hospitalizado	> 64	> 16
4A	R	Flujo vaginal	Ambulatorio	64	16
5A	R	Flujo vaginal	Ambulatorio	64	16
6A	R	Orina	Hospitalizado	64	16
7A	R	Flujo vaginal	Ambulatorio	64	16
8A	R	Muestra respiratoria	Ambulatorio	64	16
9A	R	Flujo vaginal	Ambulatorio	64	16
10A	R	Flujo vaginal	Ambulatorio	64	16
11A	SDD	Flujo vaginal	Ambulatorio	4	0,25
12A	SDD	Muestra respiratoria	Ambulatorio	4	0,25
13A	SDD	Flujo vaginal	Ambulatorio	2	0,25
14A	SDD	Flujo vaginal	Ambulatorio	4	0,25
15A	SDD	Flujo vaginal	Ambulatorio	4	0,5
16A	SDD	Orina	Hospitalizado	4	0,5
17A	SDD	Orina	Hospitalizado	4	0,5
18A	SDD	Flujo vaginal	Ambulatorio	4	0,25
19A	SDD	Flujo vaginal	Ambulatorio	4	0,5
20A	SDD	Flujo vaginal	Ambulatorio	4	0,25
21A	S	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,25	0,03
22A	S	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,5	0,03
23A	S	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,25	0,03
24A	S	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,5	0,03
25A	S	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,25	0,03
26A	S	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,25	0,125
27A	S	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,5	0,06
28A	S	Flujo vaginal	Ambulatorio	1	0,06
29A	S	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,25	0,03
30A	S	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,25	0,03

FLU: Fluconazol, VOR: Voriconazol.

<sup>a</sup>Susc.: Susceptibilidad, R: Resistente (CIM FLU  $\geq 8$ ; CIM VOR  $\geq 1$ ), SDD: Sensible Dosis Dependiente (CIM FLU = 4; CIM VOR [0,25-0,5]), S: Sensible (CIM FLU  $\leq 2$ ; CIM VOR  $\leq 0,12$ ).

<sup>b</sup>Las CIMs indicadas se encuentran en  $\mu\text{g/mL}$ .

**Tabla 8. Caracterización de cepas de *C. albicans* utilizadas para evaluar los mecanismos de resistencia a equinocandinas.**

ID	Susc. <sup>a</sup>	Origen	Servicio	CIM ANI <sup>b</sup>	CIM CAS <sup>b</sup>
1E	R	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,125	2
2E	R	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,25	2
3E	R	Muestra respiratoria	Hospitalizado	0,03	2
4E	R	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,5	2
5E	R	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,125	2
6E	R	Flujo vaginal	Ambulatorio	1	1
7E	R	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,03	1
8E	R	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,03	1
9E	R	Muestra respiratoria	Hospitalizado	0,25	1
10E	R	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,25	1
11E	I	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,03	1
12E	I	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,06	0,5
13E	I	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,03	0,5
14E	I	Muestra respiratoria	Hospitalizado	0,03	0,5
15E	I	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,03	0,5
16E	I	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,03	0,5
17E	I	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,03	0,5
18E	I	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,03	0,5
19E	I	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,03	0,5
20E	I	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,03	0,5
21E	S	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,03	0,25
22E	S	Orina	Hospitalizado	0,03	0,25
23E	S	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,03	0,25
24E	S	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,03	0,25
25E	S	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,03	0,25
26E	S	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,03	0,25
27E	S	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,03	0,25
28E	S	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,03	0,25
29E	S	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,03	0,25
30E	S	Flujo vaginal	Ambulatorio	0,03	0,25

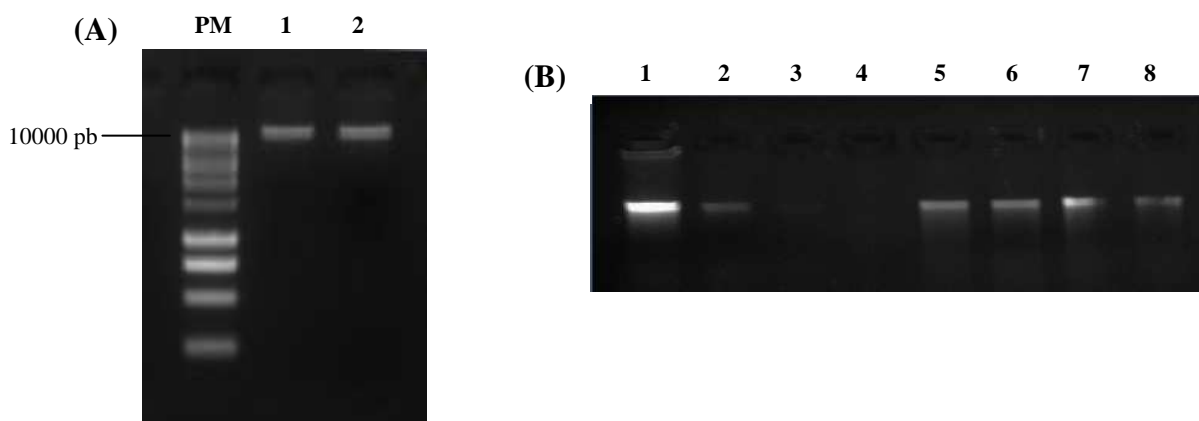
ANI: Anidulafungina, CAS: Caspofungina.

<sup>a</sup>Susc.: Susceptibilidad, R: Resistente (CIM  $\geq$  1), I: Resistencia Intermedia (CIM = 0,5), S: Sensible CIM  $\leq$  0,25).

<sup>b</sup>Las CIMs indicadas se encuentran en  $\mu\text{g/mL}$ .

## 2. Secuenciación de los genes *ERG11* y *FKS1*

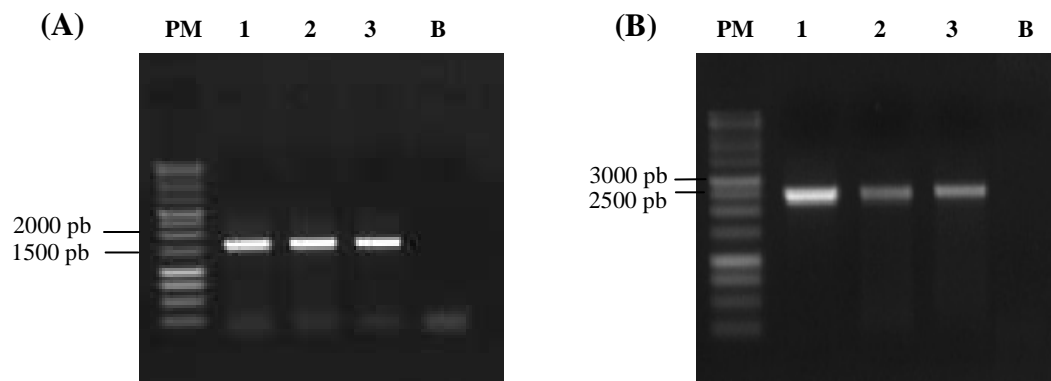
El primer objetivo consistió en la secuenciación de los genes *ERG11* y *FKS1*. Para ello, se realizó la extracción de ADN genómico de las cepas de *C. albicans* seleccionadas mediante la adaptación de un sistema comercial. Para comprobar si la adaptación de este sistema comercial resulta adecuada para la extracción de ácidos nucleicos desde levaduras, se caracterizó el ADN obtenido mediante electroforesis en geles de agarosa para estimar su peso molecular y realizar una cuantificación relativa. Los resultados obtenidos muestran una extracción de ADN genómico de alto peso molecular que migró como una banda única y definida, sin degradación aparente (Fig. 5a). La cuantificación relativa de la extracciones realizadas mostraron concentraciones mayores a 40 ng/μL en todas las cepas (Fig. 5b). Se concluye que la adaptación de este sistema comercial realizada en nuestro laboratorio resulta eficiente para la extracción de ADN desde *C. albicans*. Con la obtención de ADN genómico de alto peso molecular de todas las cepas seleccionadas se procedió a la amplificación de los genes *ERG11* y *FKS1*.



**Figura 5. Caracterización de la extracción de ADN genómico de *C. albicans*.**

(A) Evaluación de peso molecular. Carril PM: PM 1Kb (Biolabs). Carriles 1-2: ADN genómico de muestras 1A y 2A. (B) Cuantificación relativa. Carril 1-4: Diluciones del patrón de fago  $\lambda$  de 50, 10, 2 y 0,4 ng/μL. Carriles 5-8: ADN genómico en dilución 1:4 de muestras 1A al 4A, respectivamente. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% a 70V durante 1 h.

Para el análisis de las secuencias de los genes *ERG11* y *FKSI* se realizó la amplificación de éstos mediante PCR utilizando como templado el ADN genómico previamente aislado, usando los partidores diseñados en nuestro laboratorio. Debido al gran tamaño del gen *FKSI*, sólo se amplificó la región HS1 y HS2 comprendida entre la posición 1719 y 4266 del gen. Los productos obtenidos fueron purificados y analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8%, encontrándose amplicones de los tamaños esperados, correspondientes a 1700 pb para el gen *ERG11* y 2500 pb para *FKSI* (Fig. 6).



**Figura 6. Amplificación de los genes *ERG11* y *FKSI* mediante PCR.**

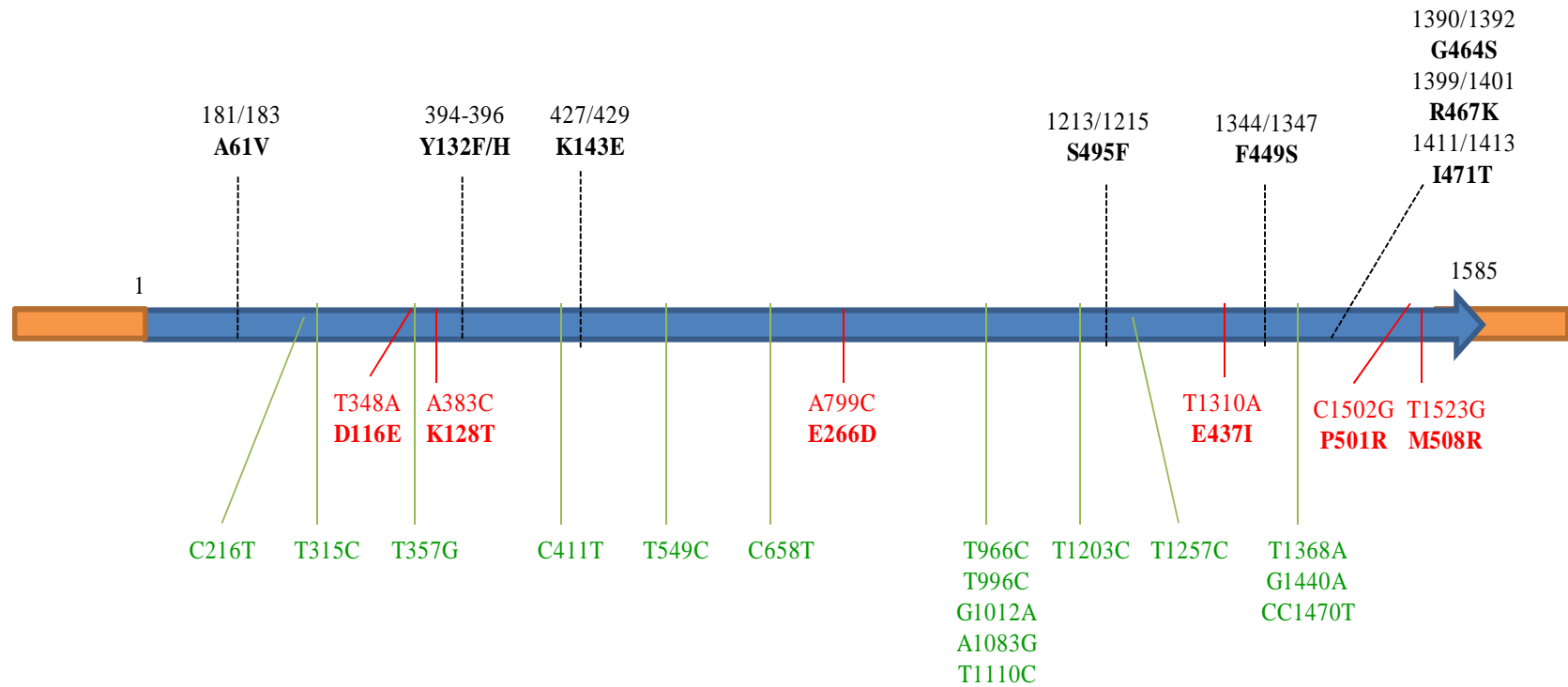
(A) Amplificación del gen *ERG11*. PM: Marcador de peso molecular 1Kb (Promega). Carriles 1-3: Productos de PCR obtenidos desde cepas 1A, 2A y 3A. Carril B: Blanco de PCR (B) Amplificación de la región HS1 y HS2 del gen *FKSI*. Carril PM: Marcador de peso molecular 1Kb (Promega). Carriles 1-3: Productos de PCR obtenidos desde cepas 1E, 2E y 3E. Carril B: Blanco de PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% a 70V durante 1 h.

Los productos de PCR obtenidos para los genes *ERG11* y *FKSI* se secuenciaron usando las estrategias de amplificación mostradas en la Fig. 3. Las secuencias obtenidas fueron depuradas usando el programa Seqman y se realizó un alineamiento con el programa Mega 6.0, comparándolas con la secuencia correspondiente a *C. albicans* ATCC SC5314.

Los resultados mostraron que en el gen *ERG11* se encontraron un total de 24 mutaciones (Fig. 7, Tabla 9), de las cuales 6 generaron sustitución en el aminoácido correspondiente; sin embargo, ninguna de estas sustituciones resultaron exclusivas de las cepas resistentes a azoles, sino que se distribuyeron en ambos grupos.

Los resultados obtenidos de la secuenciación de las regiones HS1 y HS2 del gen *FKS1* mostraron 4 mutaciones en la región HS1 y ninguna en el HS2 (Fig. 8, Tabla 10). Dos mutaciones encontradas generan sustituciones aminoacídicas, las cuales se encontraron exclusivamente en dos cepas resistentes a caspofungina y anidulafungina.

En resumen, se concluye que la secuenciación del gen *ERG11* no mostró mutaciones exclusivas en las cepas resistentes a azoles, mientras que la secuenciación del gen *FKS1*, específicamente la región HS1, mostró dos mutaciones no sinónimas exclusivas de cepas que presentan resistencia a caspofungina y anidulafungina.



**Figura 7. Mutaciones sinónimas y no sinónimas encontradas en el gen *ERG11*.**

Esquema del gen *ERG11* de *C. albicans* (GenID: 3641571). En la parte superior se muestran los codones con las mutaciones y las sustituciones correspondientes más frecuentes que generan resistencia a azoles según la bibliografía (negro) (Morio *et al.*, 2010). En la parte inferior se muestran las mutaciones sinónimas (verde) y no sinónimas (rojo) encontradas en este trabajo.



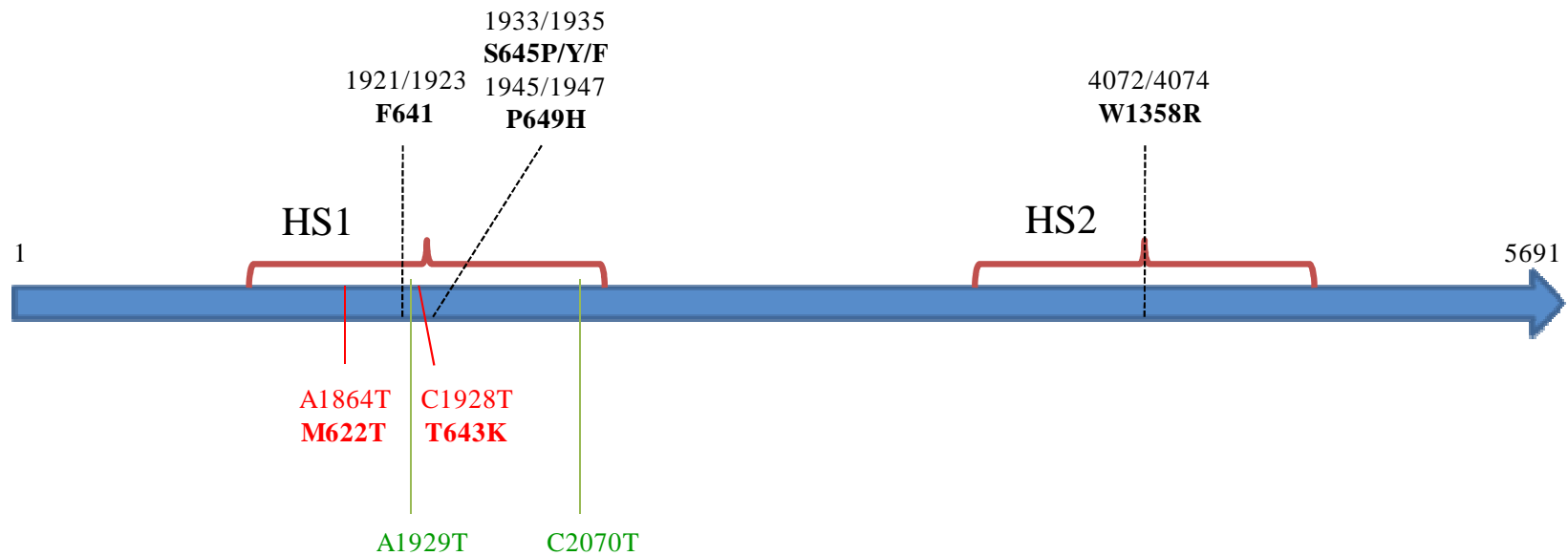
**Tabla 9. Mutaciones sinónimas y no sinónimas encontradas en el gen *ERG11*<sup>a,b</sup>.**

<b>Id. cepa</b>	<b>Susc.</b>	C216T	T315C	T348A	A357G	A383C	C411T	T549C	C658T	A799C	T966C	T996C	G1012A	G1020A	A1083G	T1110C	T1203C	T1257C	T1302C	T1310A	T1368A	G1440A	C1470T	C1502G	T1523G
1A	R		•/-	•	•	•/-			•							•								•/-	
2A	R		•	•	•		•		•		•		•		•		•				•				
3A	R		•	•	•		•		•		•		•		•		•				•				
4A	R		•	•			•		•		•		•		•		•				•				
5A	R	•				•			•							•									•
6A	R																								
7A	R		•				•		•	•			-/•												
8A	R																			•/-					
9A	R		•/-					•/-	•/-			•	•		•		•	•							•
10A	R		•/-	•		•			•					•/-		•									•
11A	SDD	•	•					•	•	•			•				•	•	•			•			•
12A	SDD		•	•	•		•		•												•				
13A	SDD		•/-			•	•/-		•/-						•	•					•			•	•
14A	SDD			•		•									•					•	•				
15A	SDD														•/-										
16A	SDD		•	•/-		•/-	•				•				•/-		•								
17A	SDD	•/-	•	•									•		•		•								
18A	SDD				•						•				•		•								
19A	SDD				•		•				•		•								•/-				
20A	SDD		•	•/-			•		•/-																
21A	S			•/-					•		•														
22A	S		•/-	•		•			•				-/•												•
23A	S		•				•		•						•		•								•
24A	S		•	•					•																•
25A	S																								
26A	S	•																							
27A	S		•	•/-		•/-																			
28A	S																								
29A	S		•/-																						•
30A	S			•																					

Susc.: Susceptibilidad, R: Resistente, SDD: Sensible Dosis Dependiente, S: Sensible. En celeste se muestran las cepas resistentes a azoles.

<sup>a</sup>Se utiliza la simbología “•” para indicar homocigosidad y “-/•” para heterocigosidad.

<sup>b</sup>Las mutaciones marcadas en negro originan sustitución en aminoácido.



**Figura 8. Mutaciones sinónimas y no sinónimas encontradas en el gen *FKS1*.**

Esquema para el gen *FKS1* de *C. albicans* (GenID: 3636794) En la parte superior se muestran los codones con las mutaciones y las sustituciones correspondientes más frecuentes que generan resistencia a equinocandinas según la bibliografía (Balashov *et al.*, 2006 y Desnos-Ollivier *et al.*, 2008). En la parte inferior se muestran las mutaciones sinónimas (verde) y no sinónimas (rojo) encontradas en este trabajo.

**Tabla 10. Mutaciones sinónimas y no sinónimas encontradas en la región HS1 del gen *FKSI*<sup>a,b</sup>.**

<b>Id. cepa</b>	<b>Susc.</b>	<b>A1864T</b>	<b>C1928A</b>	<b>A1929T</b>	<b>C2070T</b>
1 E	R				
2 E	R				
3 E	R				
4 E	R				
5 E	R				
6 E	R				
7 E	R				•
8 E	R				
9 E	R		-/•		
10 E	R	•			•
11 E	I			-/•	-/•
12 E	I				
13 E	I			-/•	
14 E	I				
15 E	I				
16 E	I			-/•	
17 E	I				
18 E	I			-/•	
19 E	I				
20 E	I				•
21 E	S				
22 E	S				
23 E	S				
24 E	S				
25 E	S				
26 E	S				
27 E	S				
28 E	S				
29 E	S				
30 E	S				

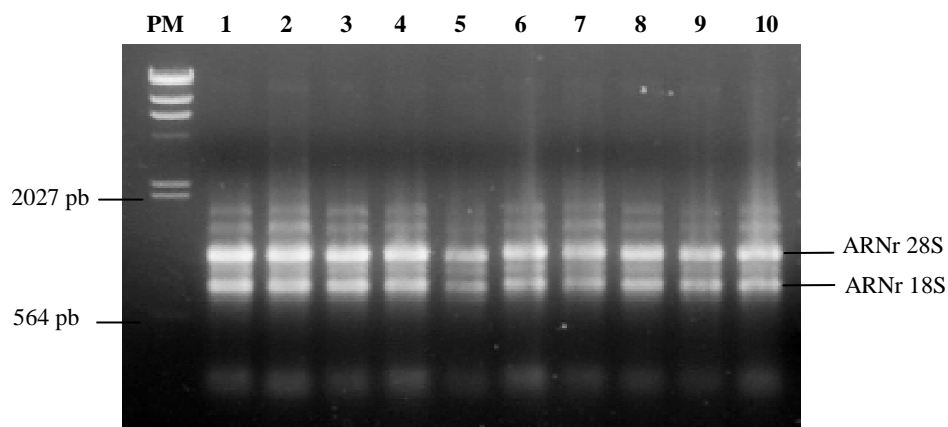
Susc.: Susceptibilidad, R: Resistente, SDD: Sensible Dosis Dependiente, S: Sensible. En celeste se muestran las cepas resistentes a equinocandinas.

<sup>a</sup>Se utiliza la simbología “•” para indicar homocigosidad y “-/•” para heterocigosidad.

<sup>b</sup>Las mutaciones marcadas en negro originan sustitución en aminoácido.

### 3. Extracción ARN y RT-PCR

El segundo objetivo de este trabajo consistió en evaluar la expresión de los genes que codifican las proteínas blanco de los antifúngicos estudiados y que podrían estar involucrados en el desarrollo de resistencia. Para ello, se realizó la extracción de ARN mediante un sistema comercial y se evaluó la integridad del ARN total mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. Se observó la presencia de las bandas de ARN ribosomal 28S y 18S que indica integridad del ARN en todas las muestras extraídas (Fig. 9).



**Figura 9. Caracterización de la extracción de ARN total de *C. albicans*.**

PM: Marcador de peso molecular Lambda/HindIII. Carril 1-10: ARN de *C. albicans*, muestras extraídas desde cepas 1A a 10A, respectivamente. Electroforesis en gel de agarosa al 1% a 70V durante 1,5 h.

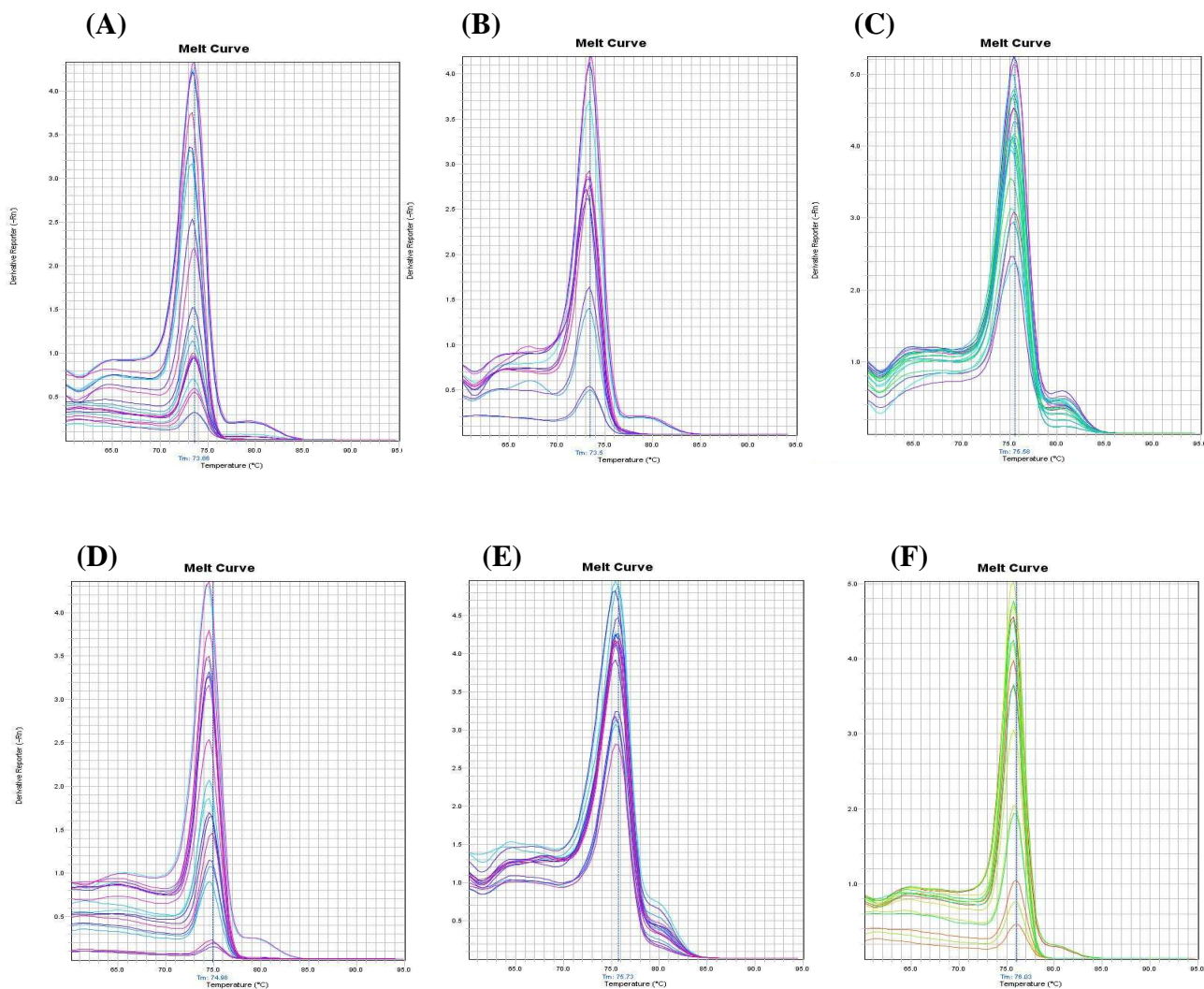
En general, todas las muestras presentaron una razón  $A_{260}/A_{280} \geq 2$ , lo que indica ausencia de proteínas. La razón  $A_{260}/A_{230}$  presentó valores entre 2 y 2,2, lo que indica la ausencia de contaminantes como sales o carbohidratos. Las concentraciones de ARN fueron  $\geq 0,16 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ , por lo tanto el ARN obtenido presenta calidad y cantidad suficientes para las reacciones de síntesis de ADNc posteriores (Anexo 3).

Las muestras fueron tratadas con DNasa I para eliminar el posible ADN genómico remanente y luego se realizó la retrotranscripción de la muestras de ARN según el protocolo descrito en la sección IV.7.

#### **4. Estandarización de q-PCR**

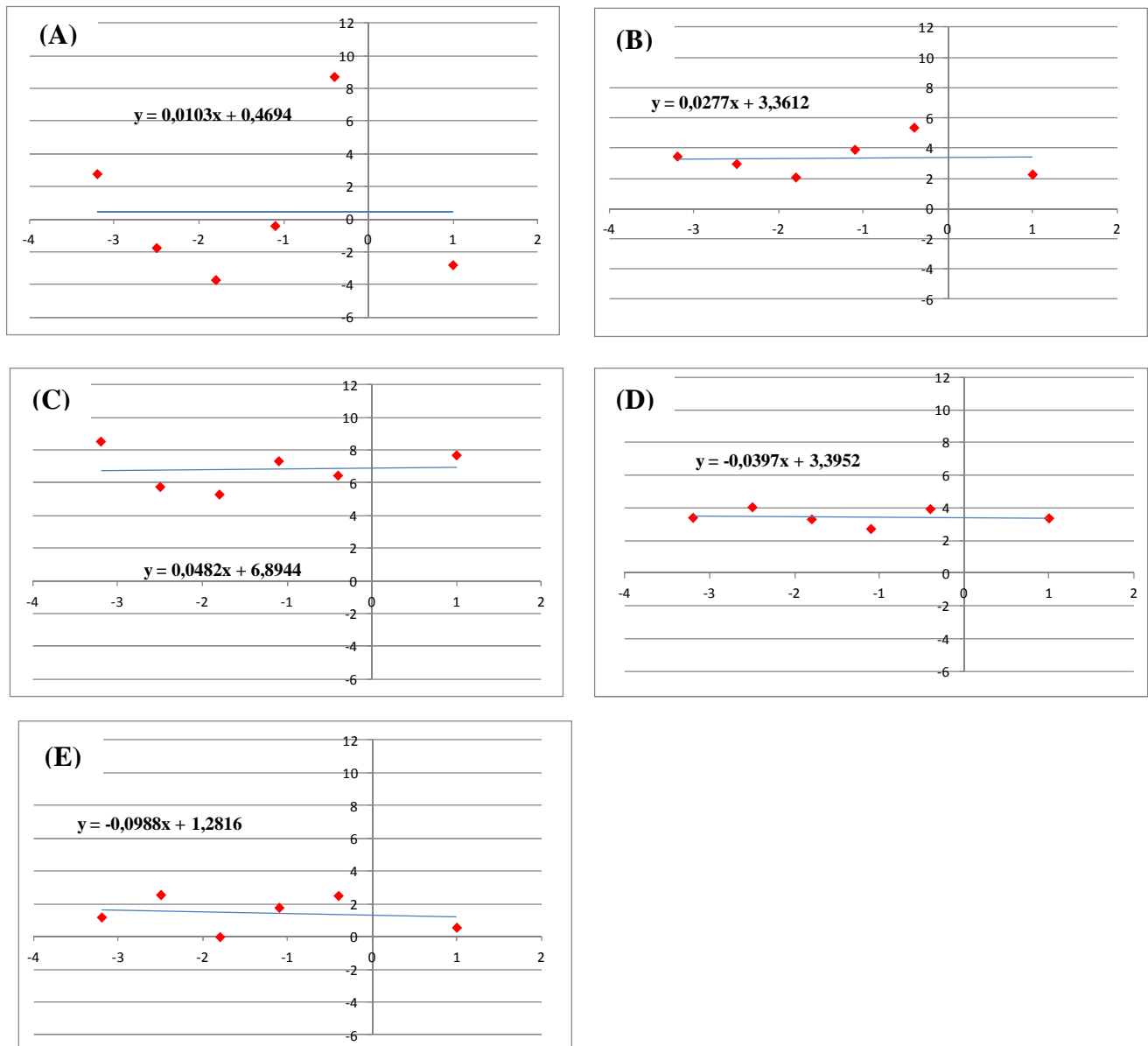
Con el fin de estandarizar la metodología de cuantificación de los genes mediante q-PCR, se estableció la especificidad de cada pareja de partidores. Para ello, se analizaron las curvas de disociación donde se observó un único pico de fluorescencia para cada pareja, correspondiente a un solo producto de PCR con una temperatura de fusión ( $T_m$ ) definida (Fig. 10). Luego, se optimizaron las reacciones de q-PCR, concentración de partidores y temperatura de apareamiento, hasta obtener eficiencias entre 90 y 110%. Finalmente, los ensayos de interés fueron validados para ser usados con el gen de referencia endógeno *ACT1* de acuerdo a las especificaciones del proveedor (Fig. 11).

De acuerdo a los resultados obtenidos de la estandarización, cada uno los ensayos de cuantificación, diseñados en este trabajo, resultan válidos para el análisis de las muestras de interés.



**Figura 10. Especificidad de los partidores utilizados para cuantificar la transcripción de los genes *ERG11*, *FKS1*, *CDR1*, *CDR2*, *MDR1* y *ACT1*.**

En la figura se muestran las curvas de disociación de los productos de PCR con su respectivo Tm para cada parejas de partidores usados en la cuantificación de los genes **(A)** *ERG11*, **(B)** *FKS1*, **(C)** *CDR1*, **(D)** *CDR2*, **(E)** *MDR1* y **(F)** *ACT1*.

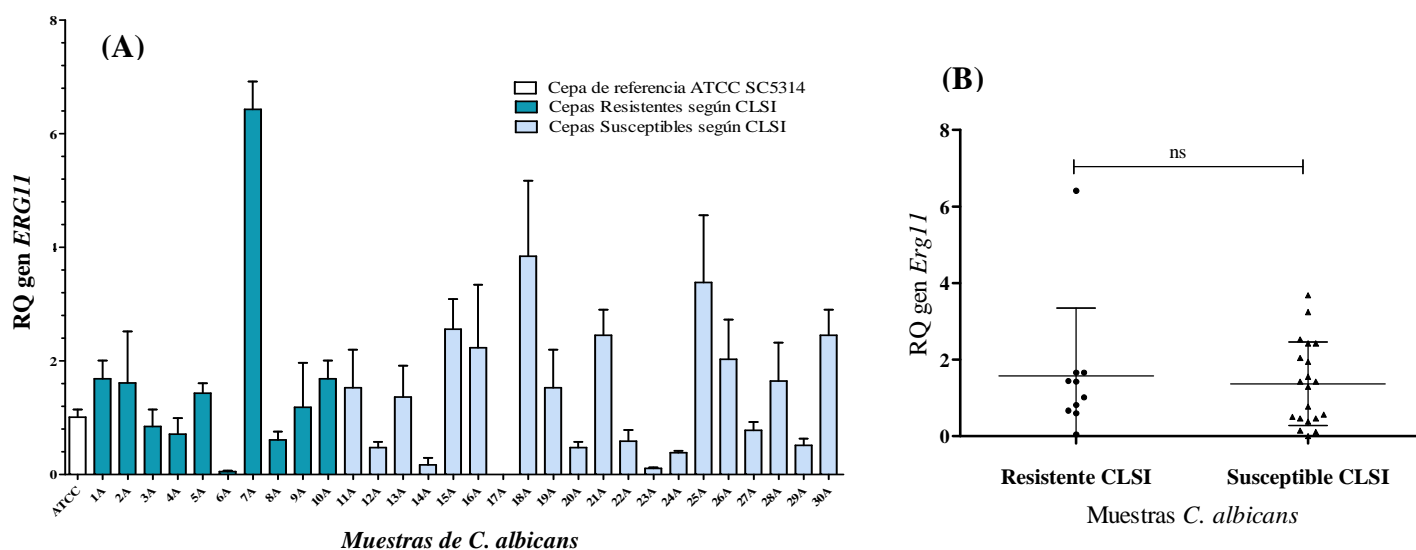


**Figura 11. Validación de los ensayos de cuantificación transcripcional de los genes *ERG11*, *FKS1*, *CDR1*, *CDR2* y *MDR1*.**

En la figura se muestran las curvas de validación de los ensayos diseñados para la evaluar la transcripción de los genes (A) *ERG11*, (B) *FKS1*, (C) *CDR1*, (D) *CDR2* y (E) *MDR1*. \*La pendiente  $< 0,1$  considera el experimento como válido.

## 5. Cuantificación transcripcional de los genes *ERG11* y *FKS1* por q-PCR

Una vez validadas las condiciones de q-PCR para cuantificar la expresión relativa (RQ) de los genes de interés, se evaluó la expresión del gen *ERG11*, el gen que codifica la proteína blanco de los azoles. Se determinó que sólo una de las cepas resistente (7A) presentó un nivel de transcripción mayor respecto a las cepas susceptibles ( $> 6$  veces respecto del control) (Fig. 12a). En general, el gen *ERG11* en las cepas resistentes a azoles presentó un promedio de expresión de  $1,6 \pm 0,6$  veces respecto a la cepa de referencia ATCC, mientras que en las cepas susceptibles la expresión relativa fue de  $1,4 \pm 0,2$  veces (Fig. 12b). Por lo tanto, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la cantidad de transcritos de *ERG11* entre los grupos resistente y susceptible a fluconazol y voriconazol ( $p:0,6985$ ), lo que sugiere que el desarrollo de la resistencia a azoles no estaría relacionado directamente con un aumento transcripcional de este gen.

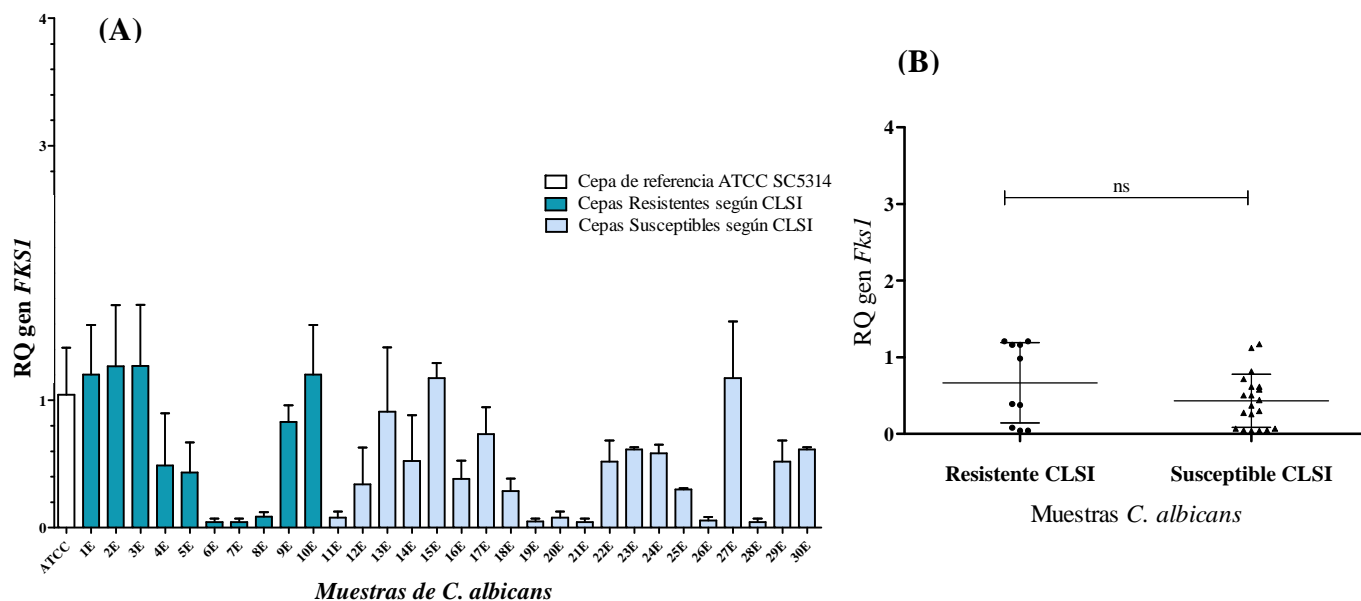


**Figura 12. Expresión relativa del gen *ERG11* en cepas de *C. albicans* resistentes y susceptibles a azoles.**

(A) Expresión relativa (RQ) de *ERG11* en cepas resistentes (barras azules) y susceptibles (barras celestes) a azoles. Cepa de referencia ATCC SC5314 (barra blanca) ( $n=3$ ). (B) Comparación de medias mediante el gráfico de distribución de la expresión relativa de *ERG11* en el grupo de cepas resistente y susceptible a azoles. ns: no hay diferencia estadísticamente significativa.



También se evaluó la transcripción relativa del gen *FKSI* que codifica la proteína blanco de los antifúngicos de la familia de las equinocandinas. Se determinó que en todas las cepas analizadas la expresión relativa del gen *FKSI* fue  $\leq 1,2$  veces respecto a la cepa control ATCC SC5314 (Fig. 13a). Se realizó un análisis general de las cepas por grupo, encontrándose que la expresión relativa promedio en el grupo de cepas resistentes fue de  $0,6 \pm 0,2$  y en el grupo susceptible fue de  $0,43 \pm 0,08$  veces respecto al control (Fig. 13b). De acuerdo a estos resultados, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la expresión a nivel transcripcional del gen *FKSI* entre los grupos resistente y susceptible a equinocandinas ( $p:0,1513$ ). Se concluye que el desarrollo de la resistencia a estos antifúngicos no estaría relacionado con un aumento en la expresión de este gen.



**Figura 13. Expresión relativa del gen *FKSI* en cepas de *C. albicans* resistentes y susceptibles a equinocandinas.**

(A) Expresión relativa (RQ) de *FKSI* en cepas resistentes (barras azules) y susceptibles (barras celestes) a equinocandinas. Cepa de referencia ATCC SC5314 (barra blanca) (n=3). (B) Comparación de medias mediante el gráfico de distribución de la expresión relativa de *FKSI* en el grupo de cepas resistente y susceptible a equinocandinas. ns: no hay diferencia estadísticamente significativa.

## 6. Cuantificación transcripcional de bombas de eflujo por q-PCR

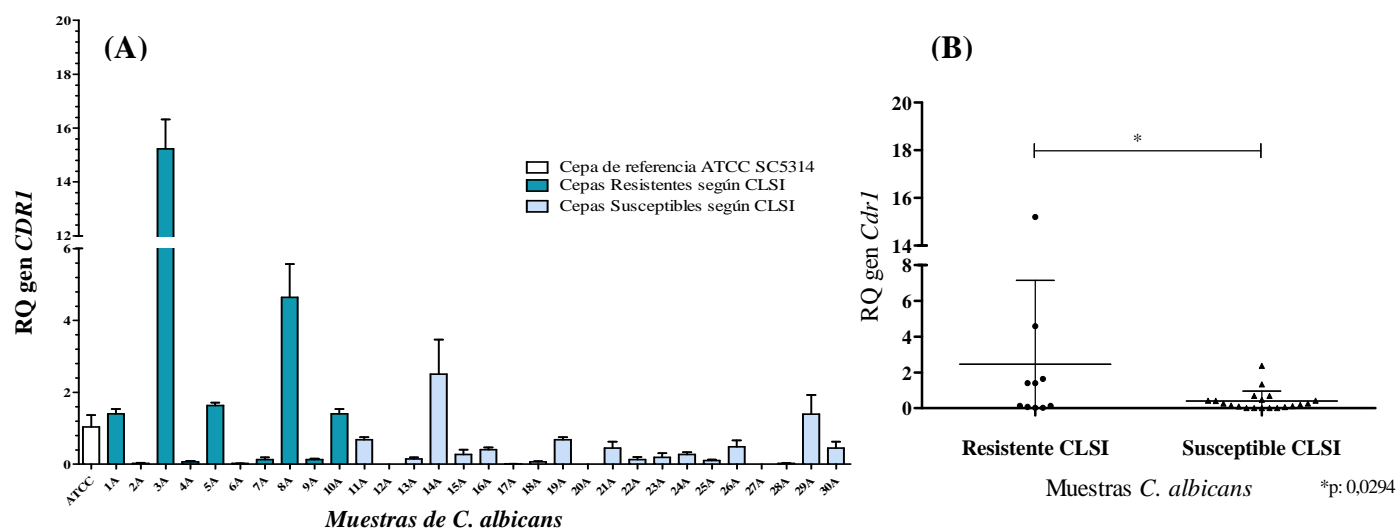
El tercer objetivo de este trabajo consistió en evaluar la expresión de las principales bombas de eflujo que podrían estar relacionadas con el desarrollo de resistencia a los azoles y a las equinocandinas. Para ello, se cuantificó la expresión de los genes que codifican las bombas *CDR1*, *CDR2* y *MDR1* en cepas resistentes y susceptibles.

Primero, se evaluó la expresión de estas bombas en cepas resistentes y susceptibles a azoles. En la cuantificación del gen *CDR1* se determinó que en 2 de 10 cepas resistentes a azoles (3A y 8A) hubo una mayor transcripción de este gen con respecto a la cepa control ATCC SC5314 y a las cepas susceptibles a azoles (Fig. 14a). El análisis de la distribución de la expresión relativa de este gen mostró que en las cepas resistentes la expresión relativa promedio fue de  $2,0 \pm 1,0$  veces, mientras que en las cepas susceptibles fue de  $0,4 \pm 0,1$  veces, siendo mayor la expresión en el grupo de cepas resistente de manera estadísticamente significativa ( $p: 0,0294$ ) (Fig. 14b).

En el estudio del gen *CDR2* se determinó que en 2 de 10 cepas resistentes hubo un aumento en la expresión transcripcional del gen (6A y 8A) con respecto al grupo de cepas susceptibles (Fig. 15a). En las cepas resistentes la expresión relativa promedio fue de  $20 \pm 10$  veces, mientras que en el grupo susceptible fue de  $7 \pm 2$  veces con respecto a la cepa control. Se observó una diferencia estadísticamente significativa en la transcripción del gen *CDR2* en ambos grupos ( $p: 0,0376$ ) (Fig. 15b).

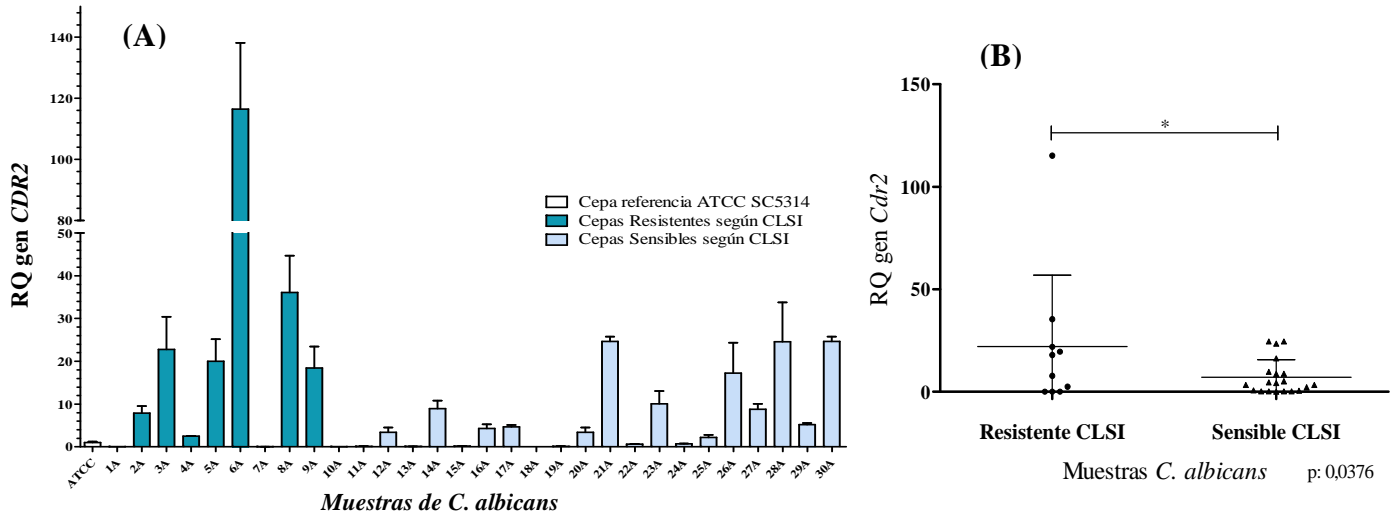
Finalmente, en el estudio del gen *MDR1* se determinó que, al igual que las bombas anteriores, 2 de 10 cepas resistentes presentaron una mayor expresión de la bomba respecto al grupo de cepas susceptibles (6A y 9A) (Fig. 16a). La transcripción relativa promedio en el grupo de cepas resistentes a azoles fue de  $1,7 \pm 0,6$  veces respecto al control, mientras que en el grupo de cepas susceptibles fue de  $0,7 \pm 0,1$  veces, encontrándose una expresión mayor en el grupo resistente de manera estadísticamente significativa ( $p: 0,0269$ ) (Fig. 16b).

De manera general, el análisis de la expresión a nivel transcripcional de *CDR1*, *CDR2* y *MDR1* mostró que en el grupo de cepas resistentes a azoles hubo una mayor transcripción de estas bombas con respecto a la cepa control y al grupo de cepas susceptibles al antifúngico. Por lo tanto, se relaciona de manera más directa al desarrollo de la resistencia que los otros mecanismos de resistencia evaluados (mutaciones y transcripción del gen *ERG11*).



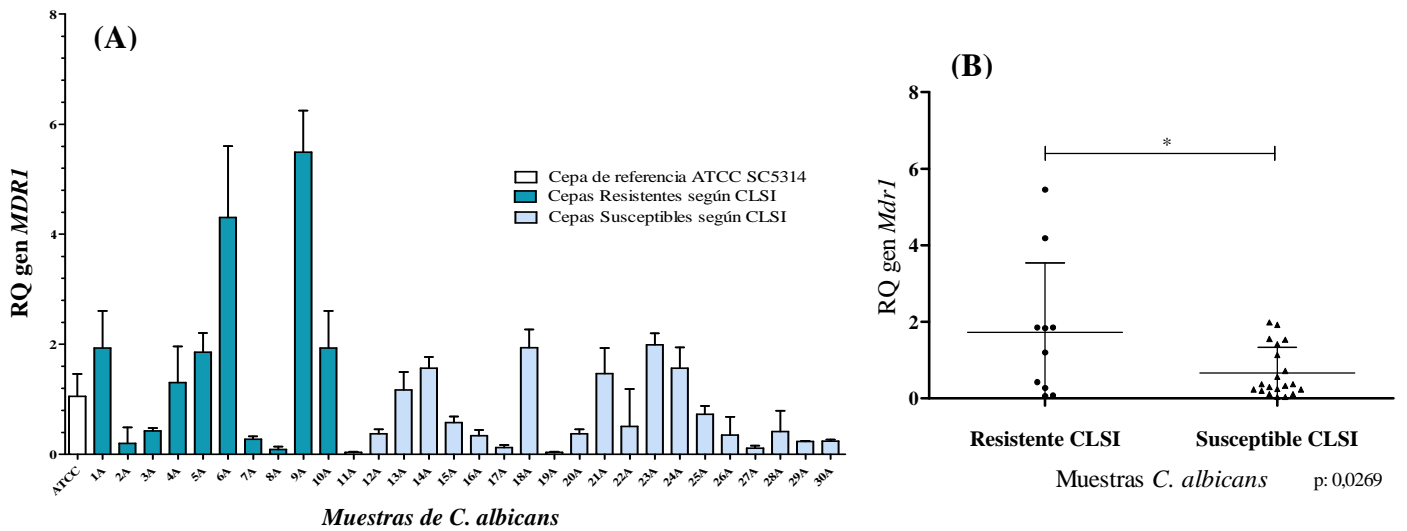
**Figura 14. Expresión relativa del gen *CDR1* en cepas de *C. albicans* resistentes y susceptibles a azoles.**

(A) Expresión relativa (RQ) del gen *CDR1* en cepas resistentes (barras azules) y susceptibles (barras celestes) a azoles. Cepa de referencia ATCC SC5314 (barra blanca) (n=3). (B) Comparación de medias mediante el gráfico de distribución de la expresión relativa de *CDR1* en el grupo de cepas resistente y susceptible a azoles. \*  $p < 0,05$ .



**Figura 15. Expresión relativa del gen *CDR2* en cepas de *C. albicans* resistentes y susceptibles a azoles.**

(A) Expresión relativa (RQ) del gen *CDR2* en cepas resistentes (barras azules) y susceptibles (barras celestes) a azoles. Cepa de referencia ATCC SC5314 (barra blanca) (n=3). (B) Comparación de medias mediante el gráfico de distribución de la expresión relativa de *CDR2* en el grupo de cepas resistente y susceptible a azoles. \*  $p < 0,05$ .



**Figura 16. Expresión relativa del gen *MDR1* en cepas de *C. albicans* resistentes y susceptibles a azoles.**

(A) Expresión relativa (RQ) del gen *MDR1* en cepas resistentes (barras azules) y susceptibles (barras celestes) a azoles. Cepa de referencia ATCC SC5314 (barra blanca) (n=3). (B) Comparación de medias mediante el gráfico de distribución de la expresión relativa de *MDR1* en el grupo de cepas resistente y susceptible a azoles. \*  $p < 0,05$ .

Los resultados obtenidos muestran que la transcripción de los genes que codifican las bombas de eflujo CDR1, CDR2 y MDR1 se relaciona con la resistencia a azoles.

Previamente, en la bibliografía se ha descrito que la transcripción de las bombas del tipo CDR se encuentra modulada por el factor de transcripción TAC1 y que la presencia de ciertas mutaciones puntuales en este gen serían las responsable de una sobreexpresión de estas bombas (Morio *et al.*, 2013). En base a estos antecedentes, se planteó el objetivo de evaluar si una mayor expresión transcripcional de las bombas del tipo CDR se relaciona con la presencia de mutaciones en *TAC1* en las cepas resistente a azoles. Para ello, se realizó la secuenciación del gen *TAC1* de acuerdo al trabajo de Morio *et al.*, 2013 con la metodología descrita en el Anexo 5.

Se determinó que todas las cepas resistentes presentaron mutaciones en el gen *TAC1*, principalmente en la región codificante del C-terminal; sin embargo, no se encontró ninguna mutación exclusiva en las cepas con mayor transcripción de CDR1 o CDR2 (Tabla 11). Con estos datos no es posible asociar alguna de las mutaciones encontradas a una mayor expresión de estas bombas.

**Tabla 11. Mutaciones no sinónimas encontradas en el factor de transcripción *TAC1*.**

<b>Id. cepa</b>	<b>Susc.<sup>a</sup></b>	<b>↑CDR1<sup>b</sup></b>	<b>↑CDR2<sup>b</sup></b>	<b>Sustitución aminoacídica<sup>c</sup></b>
1A	R			N772K, D776N, S941D
2A	R			N396S, K766N, N772K, D776N, E829Q, S941D
3A	R	+		N396S, N772K, D776N, E829Q, S941D
4A	R			N396S, N772K, D776N, E829Q, S941D
5A	R			N396S, N772K, D766N, E829Q, S941D/S
6A	R		+	N772K, D776N
7A	R			D766N, E829Q/E, S941D
8A	R	+	+	N772K, E829Q
9A	R			N396S, D766N, E829Q/E, N899S, S941D
10A	R			D772K, E829Q, S941D

<sup>a</sup>Susc.: Susceptibilidad: R: Resistente, I: Intermedia, S: Sensible.

<sup>b</sup>Sobreexpresión considerada sobre la línea de base de mayor expresión del grupo susceptible.

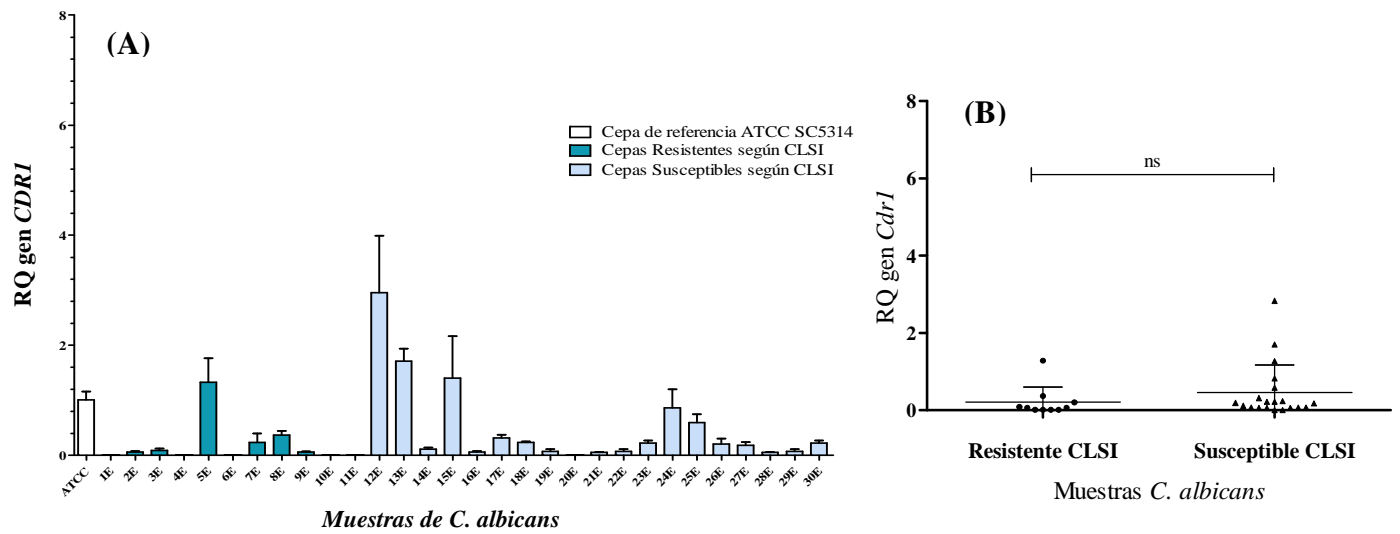
<sup>c</sup>Si ambos alelos difieren en secuencia se usa “/” para indicar la heterocigosidad.

Para finalizar este objetivo, se cuantificó la transcripción relativa de los genes *CDR1*, *CDR2* y *MDR1* en cepas resistentes y susceptibles a equinocandinas. En el estudio de la cuantificación de la transcripción del gen *CDR1* se determinó una baja expresión relativa del gen en las cepas resistentes, siendo inferior incluso que a la cepa control y que las cepas susceptibles. En las cepas resistentes la expresión promedio fue de  $0,2 \pm 0,1$  veces y en el grupo susceptible fue de  $0,4 \pm 0,1$  respecto al control ATCC, por lo que no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ( $p:0,1612$ ) (Fig. 17).

La cuantificación de la transcripción del gen *CDR2* mostró que la expresión del gen fue muy similar en ambos grupos. Se determinó que en el grupo cepas resistentes la expresión relativa promedio fue de  $11 \pm 4$  veces, mientras que el grupo susceptible fue de  $13 \pm 3$  veces, no encontrándose diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos analizados ( $p:0,3497$ ) (Fig. 18).

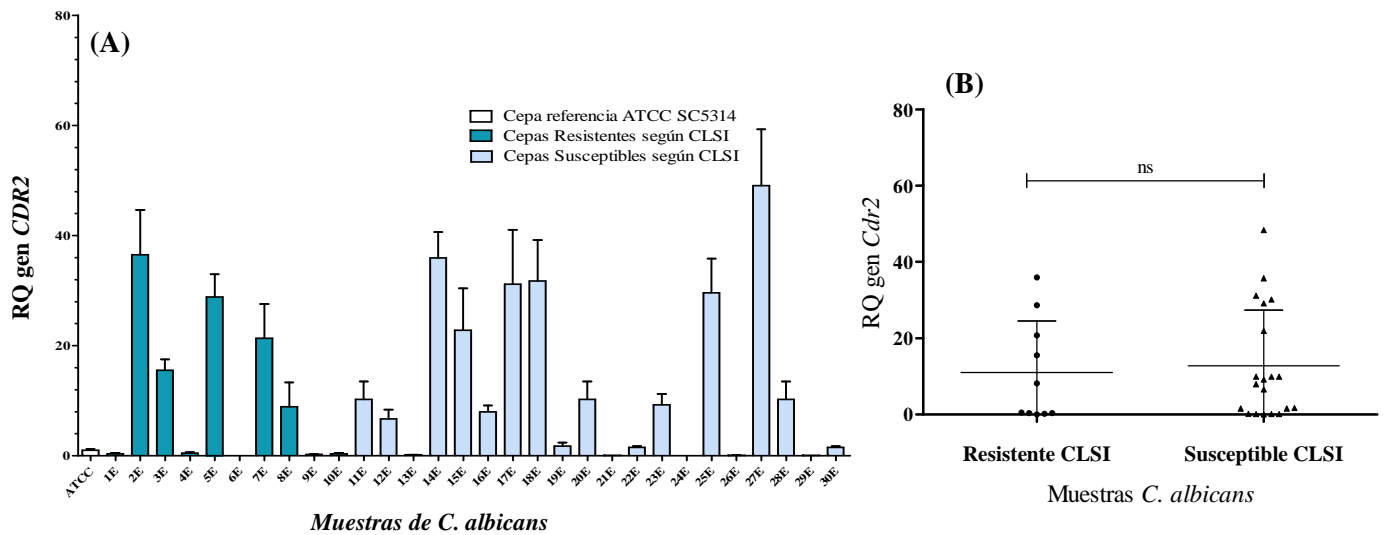
Finalmente, en la cuantificación transcripcional del gen *MDR1* se determinó que sólo una de las 10 cepas resistentes presentó una mayor transcripción de esta bomba respecto del grupo susceptible (2E); sin embargo, se encontró que la expresión transcripcional relativa promedio todas las cepas fue muy similar a la cepa control ATCC SC5314. En las cepas resistentes fue de  $1,3 \pm 0,5$  veces y en el grupo de cepas susceptibles fue de  $0,7 \pm 0,2$  veces, por lo que no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ( $p:0,0983$ ) (Fig. 19).

El análisis general de la expresión a nivel transcripcional de las bombas *CDR1*, *CDR2* y *MDR1* en el grupo de cepas resistente a equinocandinas no mostró diferencias significativas con respecto al grupo de cepas susceptibles. Por lo tanto, se concluye que este mecanismo no se relacionaría de manera directa con la resistencia a estos antifúngicos.



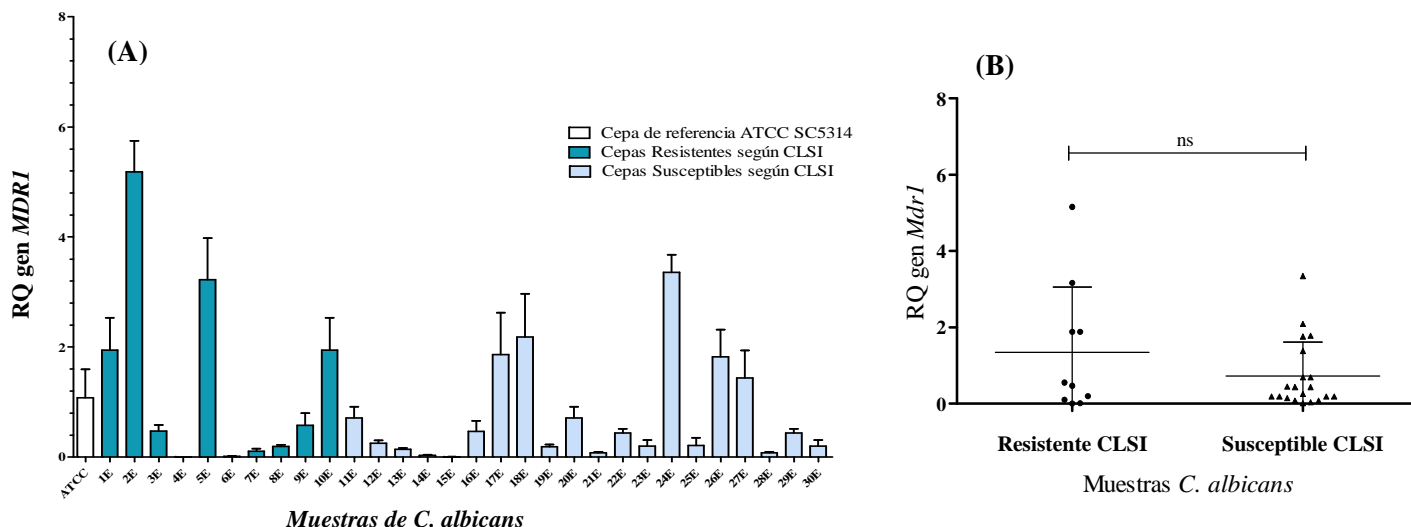
**Figura 17. Expresión relativa del gen *CDR1* en cepas de *C. albicans* resistentes y susceptibles a equinocandinas.**

**(A)** Expresión relativa (RQ) del gen *CDR1* en cepas resistentes (barras azules) y susceptibles (barras celestes) a equinocandinas. Cepa de referencia ATCC SC5314 (barra blanca) (n=3). **(B)** Comparación de medias mediante el gráfico de distribución de la expresión relativa de *CDR1* en el grupo de cepas resistente y susceptible a equinocandinas. ns: no hay diferencia estadísticamente significativa.



**Figura 18. Expresión relativa del gen *CDR2* en cepas de *C. albicans* resistentes y susceptibles a equinocandinas.**

**(A)** Expresión relativa (RQ) del gen *CDR2* en cepas resistentes (barras azules) y susceptibles (barras celestes) a equinocandinas. Cepa de referencia ATCC SC5314 (barra blanca) (n=3). **(B)** Comparación de medias mediante el gráfico de distribución de la expresión relativa de *CDR2* en el grupo de cepas resistente y susceptible a equinocandinas. ns: no hay diferencia estadísticamente significativa.



**Figura 19. Expresión relativa del gen *MDR1* en cepas de *C. albicans* resistentes y susceptibles a equinocandinas.**

(A) Expresión relativa (RQ) del gen *MDR1* en cepas resistentes (barras azules) y susceptibles (barras celestes) a equinocandinas. Cepa de referencia ATCC SC5314 (barra blanca) (n=3). (B) Comparación de medias mediante el gráfico de distribución de la expresión relativa de *MDR1* en el grupo de cepas resistente y susceptible a equinocandinas. ns: no hay diferencia estadísticamente significativa.

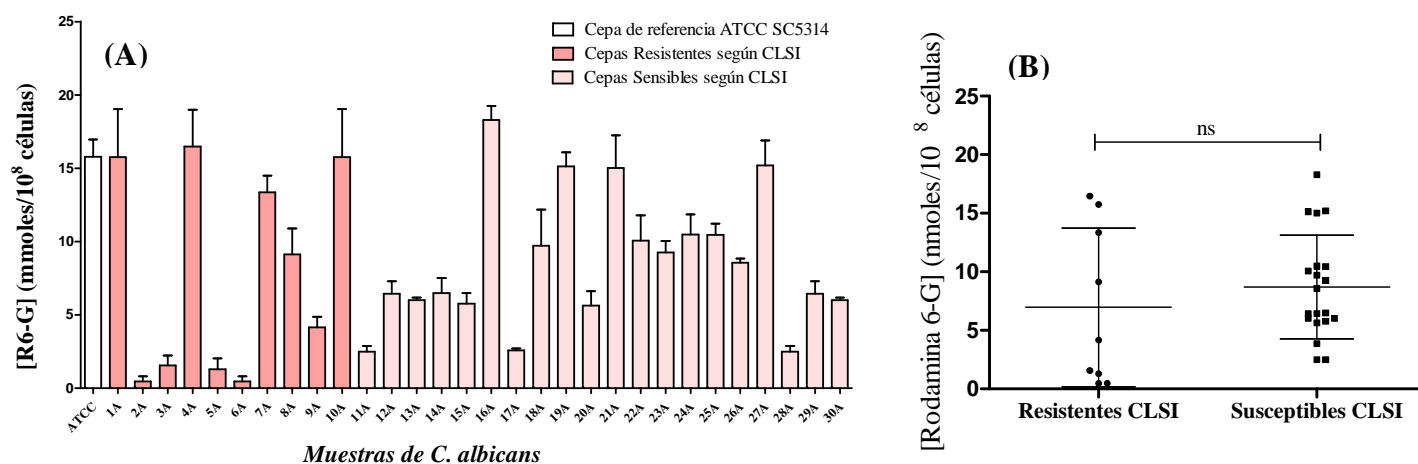
## 7. Ensayos de acumulación de rodamina 6-G

Con el fin de complementar el estudio de bombas de eflujo y su relación con el desarrollo de resistencia a los antifúngicos, se evaluó la funcionalidad de las tres bombas de eflujo mediante un ensayo de acumulación de rodamina 6-G (R6-G). La R6-G es un sustrato fluorescente que ha sido usado para demostrar la actividad de bombas de eflujo en cepas de *C. albicans* resistentes a azoles. En este trabajo se midió la concentración intracelular de R6-G en levaduras resistentes y susceptibles a los antifúngicos estudiados como se describe en la sección IV.12.

Primero, se realizó el ensayo en las cepas resistente y susceptible a azoles y se observó que en 4 de las 10 cepas resistentes hubo una baja acumulación del reactivo respecto a la cepa control y las cepas susceptibles a azoles. Estas cepas corresponden a 2A, 3A, 5A y 6A (Fig.



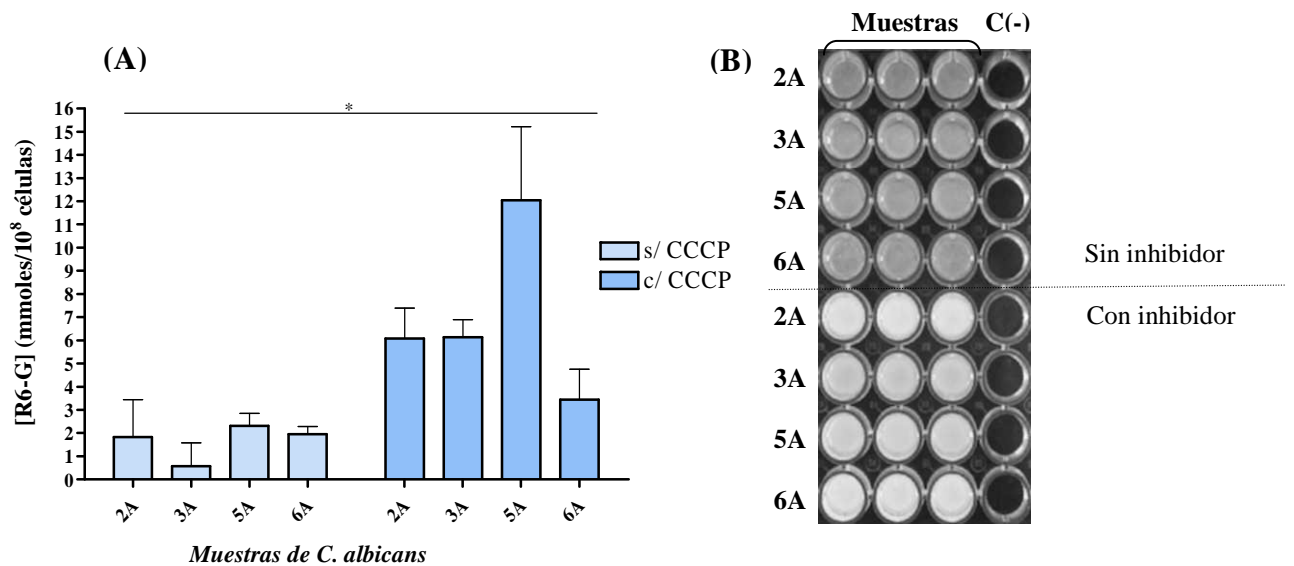
20a). El análisis general mostró que, si bien la acumulación de rodamina 6-G es levemente menor en las cepas resistentes que en las susceptibles, no hay diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos de cepas ( $p:0,2084$ ) (Fig. 20b).



**Figura 20. Acumulación de R6-G en cepas de *C. albicans* resistentes y susceptibles a azoles.**

(A) Se indican las cepas resistentes (barras rojas) y susceptibles (barras rosadas) a azoles. Cepa de referencia ATCC SC5314 (barra blanca) ( $n=3$ ). (B) Comparación de medias mediante el gráfico de distribución de la concentración intracelular de R6-G. ns: no hay diferencia estadísticamente significativa.

Las cepas resistentes a azoles que mostraron baja acumulación de R6-G fueron utilizadas para realizar un ensayo complementario en presencia del inhibidor de bombas de eflujo CCCP. Este ensayo adicional consistió en incubar las cepas 2A, 3A, 5A y 6A en medio YPD con CCCP 100  $\mu\text{g/mL}$  durante 4 h con el fin de inhibir las bombas de eflujo presentes. Luego, se incubó con el sustrato fluorescente y se midió la acumulación de R6-G en las cepas. El resultado de este ensayo mostró un aumento significativo en la acumulación de R6-G en presencia del inhibidor de bombas, a diferencia del ensayo control en ausencia de éste ( $p:0,0299$ ) (Fig. 21).



**Figura 21. Acumulación de R6-G en presencia del inhibidor de bombas de eflujo CCCP.**

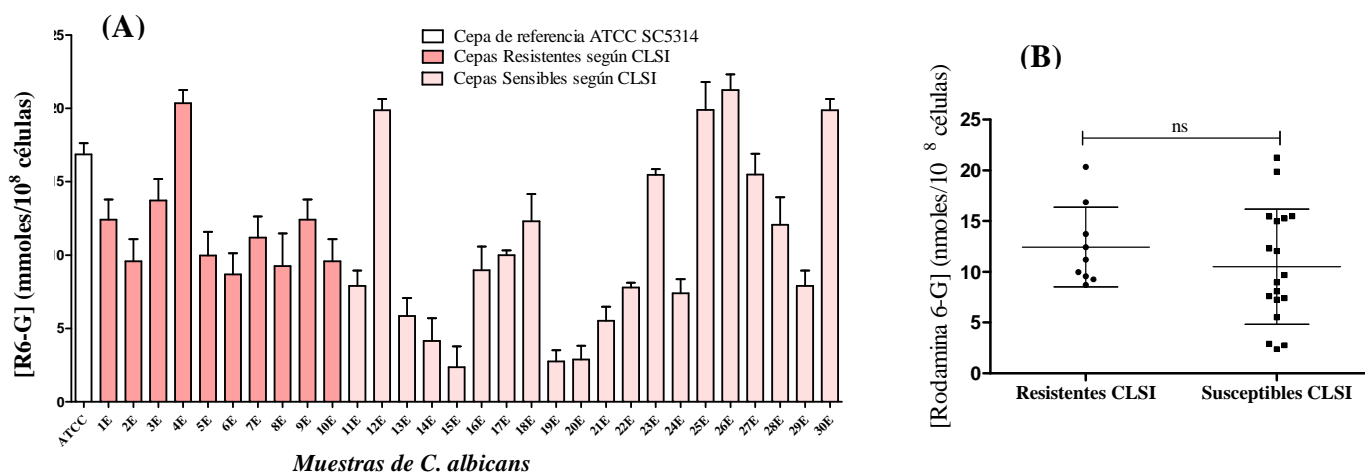
(A) Acumulación intracelular de R6-G en las cepas 2A, 3A, 5A y 6A incubadas durante 4 h en medio YPD (barras celestes) y en medio YPD más CCCP 100  $\mu$ M (barras azules) (n=3). \*  $p < 0,05$ .

(B) Fotografía de levaduras con R6-G iluminadas con lámpara UV. Las 4 filas superiores representan la acumulación de R6-G de las levaduras incubadas en medio YPD. Las 4 filas inferiores representan la acumulación de R6-G de las levaduras incubadas en medio YPD con el inhibidor CCCP.

De acuerdo a los resultados mostrados, 4 de las 10 cepas resistentes a azoles presentan una menor acumulación del sustrato fluorescente R6-G en comparación a las cepas susceptibles; sin embargo, cuando estas cepas son incubadas con el inhibidor de bombas de eflujo CCCP se observa un aumento de la concentración R6-G intracelular, por lo que se infiere que la inicial baja concentración del reactivo se debe a la acción de bombas de eflujo presentes en la cepas resistente a azoles.

Finalmente, se realizó el ensayo de acumulación de R6-G en las cepas resistentes y susceptibles a equinocandinas. En este ensayo se observó que las cepas resistentes a equinocandinas presentan niveles de acumulación de R6-G similares o superiores a las cepas susceptibles al antifúngico (Fig. 22a). No se observó diferencia estadísticamente significativa entre el grupo resistente y susceptibles a las equinocandinas ( $p:1,845$ ) (Fig.

22b). Por lo tanto, podemos decir que no se observó una diferencia en la acumulación del reactivo entre las cepas resistentes y susceptibles a equinocandinas, lo que sugiere que no existe participación de las bombas de eflujo en la resistencia a equinocandinas.



**Figura 22. Acumulación de R6-G en cepas de *C. albicans* resistentes y susceptibles a equinocandinas.**

(A) Se indican las cepas resistentes (barras rojas) y susceptibles (barras rosadas) a equinocandinas. Cepa de referencia ATCC SC5314 (barra blanca) (n=3). (B) Comparación de medias mediante el gráfico de distribución de la concentración intracelular de R6-G. ns: no hay diferencia estadísticamente significativa.

En base a los resultados obtenidos en este trabajo, se concluye que el mecanismo de resistencia más frecuente en las cepas clínicas de *C. albicans* resistente a azoles fue el aumento en la expresión/funcionamiento de las bombas de eflujo, predominando por sobre las mutaciones de *ERG11*. Por otra parte, el mecanismo de resistencia a equinocandinas más frecuente fue la presencia de mutaciones en el gen *FKSI*, no encontrándose relación directa con los otros mecanismos de resistencia a equinocandinas descritos (Tabla 12).

**Tabla 12. Mecanismos de resistencia a azoles y a equinocandinas en cepas de *C. albicans* encontradas en este trabajo.**

Mecanismos de resistencia a azoles en <i>C. albicans</i>								
Id. cepa	CIM FLU <sup>a</sup>	CIM VOR <sup>a</sup>	Mutación <i>ERG11</i> <sup>b</sup>	↑ Expresión genes <sup>c</sup>				↓ Acumulación R6-G <sup>d</sup>
				<i>ERG11</i>	<i>CDR1</i>	<i>CDR2</i>	<i>MDR1</i>	
1A	> 64	> 16	D116E; K128T/K					
2A	> 64	> 16	D116E					+
3A	> 64	> 16	D116E		+			+
4A	64	16	D116E					
5A	64	16	K128T					+
6A	64	16				+	+	+
7A	64	16	E266D	+				
8A	64	16	D116E; K128T; V437I/V		+	+		
9A	64	16					+	
10A	64	16						

Mecanismos de resistencia a equinocandinas en <i>C. albicans</i>								
Id. cepa	CIM ANI <sup>a</sup>	CIM CAS <sup>a</sup>	Mutación <i>FKS1</i> <sup>b</sup>	↑ Expresión genes <sup>c</sup>				↓ Acumulación R6-G <sup>d</sup>
				<i>FKS1</i>	<i>CDR1</i>	<i>CDR2</i>	<i>MDR1</i>	
1E	0,125	2						
2E	0,25	2					+	
3E	0,03	2						
4E	0,5	2						
5E	0,125	2						
6E	1	1						
7E	0,03	1						
8E	0,03	1						
9E	0,25	1	T643K/T					
10E	0,25	1	M622L					

<sup>a</sup>CIM expresada en µg/mL.

<sup>b</sup>Si ambos alelos difieren en secuencia se usa “/” para indicar la heterocigosidad.

<sup>c</sup>Aumento de expresión es definido sobre la línea de base de mayor expresión del grupo susceptible.

<sup>d</sup>Disminución de la acumulación de R6-G bajo la línea base de menor acumulación de R6-G del grupo susceptible.

## VI. DISCUSIÓN

En este trabajo se planteó el objetivo general de caracterizar los principales mecanismos de resistencia a azoles y equinocandinas presentes en cepas clínicas chilenas de *C. albicans*, una levadura comensal oportunista responsable de casi 45% de las infecciones fúngicas por levaduras en Chile (Silva *et al.*, 2002). En estudios previos se identificaron diversos mecanismos de resistencia a estos antifúngicos; sin embargo, hasta la realización de este trabajo no se había realizado ningún estudio chileno que identificara estos mecanismos de resistencia o que estableciera la frecuencia de éstos en cepas de *C. albicans* aisladas de instituciones de salud nacionales. Por este motivo, el presente trabajo nos permite, de manera preliminar, comprender el fenómeno de la resistencia a azoles y equinocandinas en nuestro país a nivel molecular.

El primer objetivo específico consistió en la secuenciación de los genes que codifican las proteínas blanco de los azoles y equinocandinas, *ERG11* y *FKS1*, respectivamente. La secuenciación del gen *ERG11* identificó mutaciones no sinónimas en todas las cepas estudiadas. Las sustituciones encontradas en las cepas resistentes fueron D116E, K128T, E266D y V437I; sin embargo, estas mutaciones no parecen ser responsables de la resistencia en estas cepas debido a su presencia tanto en cepas resistentes como susceptibles a los antifúngicos testeados. Trabajos anteriores describen estas mutaciones como polimorfismos comunes de este gen y que no tendrían relación directa con la resistencia a azoles (Morio *et al.*, 2010). También se analizaron las mutaciones silentes o sinónimas, encontrándose 18 mutaciones silentes a lo largo del gen. Estas mutaciones se encontraron distribuidas tanto en las cepas resistentes como en las cepas susceptibles, descartándose una posible relación con la resistencia.

La secuenciación del gen *FKS1* permitió identificar mutaciones sólo en la región HS1, las cuales generan dos sustituciones: M622L y T643K. Ambas se encontraron en cepas resistentes a equinocandinas con CIMs de 0,25 y 1 µg/mL a caspofungina y anidulafungina, respectivamente. Estas mutaciones no habían sido descritas previamente como responsables

de la resistencia. En la literatura se han descrito dos mutaciones adyacentes, L644F y S645P/Y, las cuales han sido relacionadas de manera experimental a una mayor resistencia a las equinocandinas. Es posible que las mutaciones encontradas en este trabajo estén involucradas en la resistencia de estas cepas debido a que generan cambios aminoacídicos en la misma región en que se han descrito las otras sustituciones en la literatura (Balashov *et al.*, 2006; Desnos-Ollivier *et al.*, 2008).

Debido a que estas mutaciones no se encuentran descritas en la literatura, se propone a futuro evaluar si efectivamente aumentan la resistencia, usando técnicas como expresión en el modelo heterólogo de *Saccharomyces cerevisiae* o mediante modelamiento bioinformático de la proteína, lo que permitirá evaluar si las sustituciones M622L y/o T643K generan cambios conformacionales en la proteína. Esta última técnica no se pudo realizar en este trabajo debido a que no existe un modelo estructural bioinformático disponible para la proteína FKS1 y el modelamiento *ab initio* no fue posible debido al tamaño y complejidad de FKS1, la cual tiene un tamaño de 1897 aminoácidos y más de 8 regiones transmembranales (Mio *et al.*, 1997).

El segundo objetivo consistió en evaluar la expresión a nivel de la transcripción de los genes *ERG11* y *FKS1* en las cepas resistente y susceptibles a los antifúngicos estudiados. La cuantificación de los transcritos del gen *ERG11* en las cepas resistentes y susceptibles a azoles mediante q-PCR mostró que, si bien en una cepa resistente hubo un aumento considerable de la expresión en comparación a las demás cepas, en general la expresión de *ERG11* no presenta diferencias significativas entre las cepas resistentes y las susceptibles. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de *ERG11* no sería el mecanismo responsable de la resistencia a azoles en las cepas analizadas. Estos resultados son consistentes con algunas publicaciones que mencionan que la sobreexpresión de *ERG11* no estaría claramente asociado a la generación de resistencia, tanto en *C. albicans* (Chau *et al.*, 2004; Perea *et al.*, 2011) como en otras especies de *Candida* intrínsecamente resistente a azoles, como por ejemplo *C. krusei* (Tavakoli *et al.*, 2010).

Es importante destacar que algunos autores han descrito un fenómeno de sobreexpresión *in vitro* del gen *ERG11*, mostrando que la exposición previa de *Candida* a fluconazol genera una sobreexpresión del gen *ERG11* y que este fenotipo resulta reversible. La sobreexpresión de este gen podría ser un mecanismo de resistencia adaptativo que produciría, no sólo un aumento de *ERG11*, sino también de otros 5 genes de la vía de síntesis de ergosterol, como son *Erg9*, *Erg1*, *Erg7*, *Erg25* y *Erg3* (Henry *et al.*, 2000; Ribeiro & Paula, 2007). Este efecto también se ha observado mediante la exposición a otros antifúngicos que inhiben esta vía como ketoconazol, itraconazol, clotrimazol, miconazol y terbinafina (Henry *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2005). Lamentablemente, este fenómeno de resistencia adaptativa no se analizó en este trabajo debido a que la extracción de ARN se realizó a partir de cultivos crecidos en medio YPD en ausencia de antifúngicos.

Con respecto a la expresión del gen *FKS1* y la generación de resistencia a equinocandinas, encontramos que la expresión relativa del gen fue  $\leq 1,2$  veces respecto a la cepa control *C. albicans* ATCC SC5314 en todas las cepas estudiadas (resistentes y sensibles). No existe mucha bibliografía respecto a la expresión de *FKS1* asociado a resistencia. Lo único mencionado en la literatura es un aumento en la expresión de *FKS1* en *C. albicans* cuando forma biopelículas expuestas a caspofungina o anfotericina B (Nett *et al.*, 2010; Watamoto *et al.*, 2011). Este fenómeno de modulación del gen puede impactar en la susceptibilidad de la biopelícula tanto a azoles como equinocandinas; sin embargo, es un fenómeno que sólo podría ser observado en biopelículas y no en cultivos planctónicos como los utilizados en este trabajo, por lo que los resultados obtenidos estarían de acuerdo a los observados en la literatura.

El tercer objetivo específico de esta tesis consistió en evaluar la transcripción de los genes que codifican las bombas de eflujo mayormente descritas en la literatura y relacionarlas con la resistencia a azoles y/o equinocandinas. Primero se evaluó la expresión de CDR1, CDR2 y MDR1 en las cepas resistentes y susceptibles a azoles. Se determinó que la expresión relativa de estas tres bombas de eflujo es significativamente mayor en el grupo de cepas resistentes que en el grupo de cepas susceptibles. Esto se corroboró con los ensayos de

funcionalidad con R6-G, siendo la cuantificación de la transcripción de estos genes los mejores candidatos para detectar resistencia a azoles a nivel molecular. Los ensayos con R6-G mostraron una baja acumulación del reactivo en 4 de 10 cepas resistentes a azoles; sin embargo, no todas estas cepas coinciden con aquellas de mayor expresión de bombas, incluso dos de estas cepas no presentaron sobreexpresión ni de CDR1, CDR2 o MDR1. La baja acumulación de R6-G en estas cepas podría deberse a otro tipo de bombas de eflujo no analizada en este trabajo, como por ejemplo FLU1, una bomba del tipo MFS que se ha descrito que podría tener participación en la resistencia a azoles (Calabrese *et al.*, 2000).

Es interesante mencionar sobre la inhibición de bombas de eflujo mediante el reactivo CCCP que este compuesto es un agente que desacopla el transporte de  $H^+$ , por lo que inhibe de manera directa las bombas de eflujo del tipo MFS que son dependientes de la traslocación de  $H^+$ , pero además también inhibe las bombas del tipo ABC, ya que al desacoplar la traslocación de  $H^+$  en la mitocondria, disminuye también la producción de ATP necesaria para el funcionamiento de las bombas tipo CDR. Considerando estos antecedentes y que el mecanismo predominante en la resistencia a azoles son las bombas de eflujo, algunos autores han puesto especial interés en el estudio de inhibidores de bombas de eflujo de origen natural y de baja toxicidad para el humano, con el fin de evaluar su acción antifúngica y/o posibles efectos sinérgicos con los antifúngicos convencionales como alternativas en el tratamiento de infecciones producidas por cepas resistentes (Ahmad *et al.*, 2012)

Como experimento complementario, se analizó la secuencia del factor de transcripción TAC1, responsable de la modulación de las bombas del tipo CDR con el fin de evaluar si la presencia de mutaciones en este gen se relaciona con la mayor expresión relativa de estas bombas. Se encontró que todas las cepas resistentes presentaron mutaciones en *TAC1*. Es de interés indicar que no se encontró ninguna de las sustituciones descritas en la bibliografía que generan una sobreexpresión de estas bombas (Coste *et al.*, 2006; Coste *et al.*, 2007; Morio *et al.*, 2013), por lo tanto, no se pudo establecer una relación entre las mutaciones encontradas en este gen y una mayor expresión de CDR1 o CDR2. De manera



similar al estudio del factor de transcripción *TAC1*, resultaría interesante a futuro analizar el factor de transcripción *MRR1* para establecer si se encuentran mutaciones que se relacionen de manera directa con el aumento en la expresión de las bombas del tipo MFS (bomba de eflujo MDR1). Sería importante evaluar la utilidad de estos factores de transcripción como posibles marcadores de la resistencia a azoles.

Nuestros resultados relacionan la resistencia a azoles con una mayor expresión a nivel transcripcional de los genes que codifican bombas de eflujo, lo cual es coherente con estudios previos que han descrito que uno de los mecanismos principales en cepas resistentes a fluconazol son las bombas de eflujo (Chau *et al.*, 2004; Park & Perlin, 2005; Perea *et al.*, 2011; White *et al.*, 2002). La mayoría de los trabajos descritos corresponden a estudios con cepas aisladas de pacientes hospitalizados e inmunosuprimidos, lo que difiere de nuestro trabajo en que las cepas analizadas provienen en un 80% a muestras ambulatorias de flujo vaginal. Por lo tanto, podemos inferir que los mecanismos de resistencia desarrollados en las cepas no se relacionarían con el origen de la cepa aislada ni la patología del paciente hospedero.

Finalmente, con respecto a la transcripción de los genes que codifican bombas de eflujo en cepas resistentes a equinocandinas, no se encontró aumento en la transcripción, ni aumento de la funcionalidad de las bombas analizadas, por lo que no se puede atribuir la resistencia al antifúngico a este mecanismo de resistencia. Los estudios previos difieren sobre la participación de las bombas de eflujo en la resistencia a equinocandinas; sin embargo, en el año 2006 se describió que la sobreexpresión de bombas *CDR1*, *CDR2* y *MDR1* de *C. albicans* en un modelo de expresión heteróloga de *S. cerevisiae* no genera cambios en la susceptibilidad a caspofungina y micafungina, pero sí a fluconazol, voriconazol e itraconazol (Niimi *et al.*, 2006). Este trabajo muestra que no existiría una relación directa entre la expresión de las bombas de eflujo y la resistencia a equinocandinas, como sí la hay para resistencia a azoles.

Cabe discutir en el caso particular de caspofungina, antifúngico utilizado para definir la resistencia a equinocandinas en este trabajo, la descripción de un fenómeno asociado a su resistencia denominado “efecto paradójico”. Este efecto se presenta en cultivos expuestos a altas concentraciones del antifúngico, pero que no parece estar relacionado con el gen *FKSI* ni a bombas de eflujo, sino más bien a un mecanismo de resistencia adaptativo relacionado a reordenamientos en la pared fúngica y que sería de frecuencia mínima en aislados clínicos (Rueda *et al.*, 2014; Stevens *et al.*, 2005). Además algunos autores mencionan que debido a una alta variabilidad en los resultados de CIMs a caspofungina, no sería el antifúngico más adecuado para definir una posible resistencia a las equinocandinas, por lo que recomiendan otros antifúngicos de la familia como micafungina (Pfaller *et al.*, 2014)

En resumen, los resultados encontrados en nuestro trabajo son coherentes con los trabajos previamente descritos por otros grupos de investigadores, aunque este trabajo es un estudio preliminar de los mecanismos de resistencia encontrados en cepas en Chile. A futuro sería interesante realizar un estudio con las técnicas establecidas en el presente, pero con un mayor número de cepas y obtenidas a nivel nacional de manera multicéntrica para evaluar de manera más representativa la realidad nacional de los mecanismos de resistencia a antifúngicos en *C. albicans*.

## VII. CONCLUSION

- En base a los resultados obtenidos, se concluye que la resistencia a azoles en las cepas estudiadas se relacionó con mayor frecuencia a la sobreexpresión de bombas de eflujo, no predominando ningún tipo de bomba de eflujo en particular.
- La resistencia a equinocandinas en las cepas estudiadas se relacionó con mayor frecuencia a la presencia de mutaciones puntuales en el gen *FKS1*, principalmente en la región HS1.
- Este estudio preliminar aporta interesante información acerca de los mecanismos de resistencia en un grupo de cepas chilenas; sin embargo, requiere ser validado con un mayor número de cepas de *C. albicans* provenientes de distintos hospitales del país.

## VIII. REFERENCIAS

- Ahmad, A., Khan, A. & Manzoor, N. (2012).** Reversal of efflux mediated antifungal resistance underlies synergistic activity of two monoterpenes with fluconazole. *Eur J Pharm Sci* **48**, 80-86.
- Ajenjo, H., Aquevedo, S., Guzman, D., Poggi, M., Calvo, A., Castillo, V., Leon, C., Andresen, H. & Labarca, L. (2010).** Perfil epidemiológico de la candidiasis invasora en unidades de pacientes críticos en un hospital universitario. *Rev Chil Infect* **28**, 118-122.
- Akins, R. (2005).** An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med Mycol* **43**, 285-318.
- Anderson, J. (2005).** Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. *Nat Rev Microbiol* **3**, 547-556.
- Balashov, S., Park, S. & Perlin, D. (2006).** Assessing resistance to the echinocandin antifungal drug caspofungin in *Candida albicans* by profiling mutations in *FKSI*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 2058-2063.
- Bicmen, C., Doluca, M., Gulat, S., Gunduz, A. & Tuksavul, F. (2012).** Species level identification and antifungal susceptibility of yeasts isolated from various clinical specimens and evaluation of Integral System Yeasts Plus. *New Microbiol* **35**, 327-334.
- Bidart, T. (2004).** Rol de voriconazol y caspofungina en terapia antifúngica. *Rev Chil Infect* **21**, S13-S19.
- Calabrese, D., Bille, J. & Sanglard, D. (2000).** A novel multidrug efflux transporter gene of the major facilitator superfamily from *Candida albicans* (*FLU1*) conferring resistance to fluconazole. *Microbiology* **146** ( Pt 11), 2743-2754.
- CLSI (2008).** NCCLS, Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard (Second Edition). NCCL document M27-A2 (ISB 1-56238-469-4)
- Cortés, J., Concha, M., Cediél, T. & Castillo, J. (2011).** Métodos de diagnóstico en candidemia: una revisión sistemática de la literatura con meta-análisis. *Rev Chil Infect* **28**, 423-428.

- Coste, A., Turner, V., Ischer, F., Morschhauser, J., Forche, A., Selmecki, A., Berman, J., Bille, J. & Sanglard, D. (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**, 2139-2156.
- Coste, A., Selmecki, A., Forche, A., Diogo, D., Bougnoux, M., d'Enfert, C., Berman, J. & Sanglard, D. (2007).** Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. *Eukaryot Cell* **6**, 1889-1904.
- Chau, A. S., Mendrick, C. A., Sabatelli, F. J., Loebenberg, D. & McNicholas, P. M. (2004).** Application of real-time quantitative PCR to molecular analysis of *Candida albicans* strains exhibiting reduced susceptibility to azoles. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 2124-2131.
- Desnos-Ollivier, M., Bretagne, S., Raoux, D., Hoinard, D., Dromer, F. & Dannaoui, E. (2008).** Mutations in the *FKSI* gene in *Candida albicans*, *C. tropicalis*, and *C. krusei* correlate with elevated caspofungin MICs uncovered in AM3 medium using the method of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 3092-3098.
- Diomedi, A. (2004).** Nuevos antifúngicos: Las equinocandinas. *Rev Chil Infect* **21**, 89-101.
- Dismukes, W., Pappas, P. & Sobel, J. (2003).** *Clinical Mycology*, 1th edition. NY: Oxford University Press.
- Douglas, C., D'Ippolito, J., Shei, G. & other authors (1997).** Identification of the *FKSI* gene of *Candida albicans* as the essential target of 1,3-beta-D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 2471-2479.
- EUCAST, Rodríguez-Tudela, J. L., Barchiesi, F. & other authors (2003).** Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect.* **9**, 1-8.
- Henry, K. W., Nickels, J. T. & Edlind, T. D. (2000).** Upregulation of *ERG* genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 2693-2700.

- Katiyar, S., Alastruey-Izquierdo, A., Healey, K., Johnson, M., Perlin, D. & Edlind, T. (2012).** *FKS1 and FKS2 are functionally redundant but differentially regulated in Candida glabrata: Implications for echinocandin resistance. Antimicrob Agents Chemother* **56**, 6304-6309.
- Katzung, B., Masters, S. & Trevor, A. (2009).** *Basic and Clinical Pharmacology, 11th Edition.* NY: McGraw-Hill Medical.
- Kim, J. & Sudbery, P. (2011).** *Candida albicans, a major human fungal pathogen. J Microbiol* **49**, 171-177.
- Lass-Florl, C. (2009).** The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses* **52**, 197-205.
- Lee, M., Williams, L., Warnock, D. & Arthington-Skaggs, B. (2004).** Drug resistance genes and trailing growth in *Candida albicans* isolates. *J Antimicrob Chemother* **53**, 217-224.
- Lim, C., Rosli, R., Seow, H. & Chong, P. (2012).** *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **31**, 21-31.
- Liu, T. T., Lee, R. E., Barker, K. S., Wei, L., Homayouni, R. & Rogers, P. D. (2005).** Genome-wide expression profiling of the response to azole, polyene, echinocandin, and pyrimidine antifungal agents in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 2226-2236.
- Loeffler, J. & Stevens, D. (2003).** Antifungal drug resistance. *Clin Infect Dis* **36**, S31-41.
- Marichal, P., Koymans, L., Willemsens, S. & other authors (1999).** Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 $\alpha$ -demethylase (ERG11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology* **145**, 2701-2713.
- Miceli, M., Diaz, J. & Lee, S. (2011).** Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis* **11**, 142-151.
- Mio, T., Adachi-Shimizu, M., Tachibana, Y. & other authors (1997).** Cloning of the *Candida albicans* homolog of *Saccharomyces cerevisiae* *GSCI/FKS1* and its involvement in beta-1,3-glucan synthesis. *J Bacteriol* **179**, 4096-4105.

- Morio, F., Loge, C., Besse, B., Hennequin, C. & Le Pape, P. (2010).** Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* ERG11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis* **66**, 373-384.
- Morio, F., Pagniez, F., Besse, M., Gay-andrieu, F., Miegerville, M. & Le Pape, P. (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**, 410-415.
- Morschhauser, J. (2002).** The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* **1587**, 240-248.
- Moyes, D. & Naglik, J. (2011).** Mucosal immunity and *Candida albicans* infection. *Clin Dev Immunol*, ID 346307, 1-9.
- Muñoz, P., Guinea, J., Rojas, L. & Bouza, E. (2010).** New antifungal agents for the treatment of candidaemia. *Int J Antimicrob Agents* **36 Suppl 2**, S63-69.
- Nett, J. E., Crawford, K., Marchillo, K. & Andes, D. R. (2010).** Role of FKS1p and matrix glucan in *Candida albicans* biofilm resistance to an echinocandin, pyrimidine, and polyene. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 3505-3508.
- Niimi, K., Maki, K., Ikeda, F., Holmes, A. R., Lamping, E., Niimi, M., Monk, B. C. & Cannon, R. D. (2006).** Overexpression of *Candida albicans* *CDR1*, *CDR2*, or *MDR1* does not produce significant changes in echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 1148-1155.
- Nucci, M., Queiroz-Telles, F., Tobon, A., Restrepo, A. & Colombo, A. (2010).** Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin Infect Dis* **51**, 561-570.
- Odds, F., Brown, A. & Gow, N. (2003).** Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol* **11**, 272-279.
- Pappas, P., Kauffman, C., Andes, D. & other authors (2009).** Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **48**, 503-535.

- Park, S. & Perlin, D. (2005).** Establishing surrogate markers for fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Microb Drug Resist* **11**, 232-238.
- Peman, J. & Salavert, M. (2012).** Epidemiología general de la enfermedad fúngica invasora. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **30**, 90-98.
- Perea, S., Lopez, J., Kirkpatrick, W., McTee, R., Santilla, R., Martínez, M., Calabrese, D., Sanglard, D. & Patterson, T. (2011).** 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**, 2676-2684.
- Pfaller, M. & Diekema, D. (2007).** Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* **20**, 133-163.
- Pfaller, M. (2012).** Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med* **125**, S1-S3.
- Pfaller, M., Espinel-Ingroff, A., Canton, E. & other authors (2012).** Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B, flucytosine, and itraconazole and *Candida* spp. as determined by CLSI broth microdilution. *J Clin Microbiol* **50**, 2040-2046.
- Pfaller, M., Messer, S., Diekema, D., Jones, R. & Castanheira, M. (2014).** Use of micafungin as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to caspofungin among 3,764 clinical isolates of *Candida* by use of CLSI methods and interpretive criteria. *J Clin Microbiol* **52**, 108-114.
- Ponton, J. (2008).** La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Rev Iberoam Micol* **25**, 78-82.
- Prasad, R., Sharma, M. & Rawal, M. (2011).** Functionally relevant residues of CDR1p: a multidrug ABC transporter of human pathogenic *Candida albicans*. *J Amino Acids*, ID 531412, 1-12.
- Ribeiro, M. A. & Paula, C. R. (2007).** Up-regulation of *ERG11* gene among fluconazole-resistant *Candida albicans* generated in vitro: is there any clinical implication? *Diagn Microbiol Infect Dis* **57**, 71-75.



- Rodero, L., Davel, G., Soria, M., Vivot, W., Cordoba, S., Canteros, C. & Saporiti, A. (2005).** Estudio multicéntrico de fungemias por levaduras en la república Argentina. *Rev Argent Microbiol* **37**, 189-195.
- Rodloff, C., Koch, D. & Schaumann, R. (2011).** Epidemiology and antifungal resistance in invasive candidiasis. *Eur J Med Res* **16**, 187-195.
- Rueda, C., Cuenca-Estrella, M. & Zaragoza, O. (2014).** Paradoxical growth of *Candida albicans* in the presence of Caspofungin Is associated with multiple cell wall rearrangements and decreased virulence. *Antimicrob Agents Chemother* **58**, 1071-1083.
- Ruping, M., Vehreschild, J. & Cornely, O. (2008).** Patients at high risk of invasive fungal infections: when and how to treat. *Drugs* **68**, 1941-1962.
- Sanglard, D., Ischer, F., Parkinson, T., Falconer, D. & Bille, J. (2003).** *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 2404-2412.
- Santolaya, M., Alvarado Matute, T., de Queiroz Telles, F. & other authors (2013).** Recomendaciones para el manejo de la candidemia en neonatos en América Latina. *Rev Iberoam Micol* **30**, 158-170.
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. & Azeredo, J. (2011).** *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev* **36**, 288-305.
- Silva, V., Diaz, M. & Febré, N. (2002).** Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. *Rev Med Chil* **19**, 149-156.
- Stevens, D. A., White, T. C., Perlin, D. S. & Selitrennikoff, C. P. (2005).** Studies of the paradoxical effect of caspofungin at high drug concentrations. *Diagn Microbiol Infect Dis* **51**, 173-178.
- Sudbery, P. (2011).** Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat Rev Microbiol* **9**, 737-748.
- Sun, N., Fonzi, W., Chen, H., She, X., Zhang, L. & Calderone, R. (2012).** Azole susceptibility and transcriptome profiling in the *Candida albicans* mitochondrial electron transport chain complex I mutants. *Antimicrob Agents Chemother* **57**, 532-542.
- Tavakoli, M., Zaini, F., Kordbacheh, M., Safara, M., Raofian, R. & Heidari, M. (2010).** Upregulation of the *ERG11* gene in *Candida krusei* by azoles. *Daru* **18**, 276-280.

- Tobar, E., Silva, F., Olivares, R., Gaete, P. & Luppi, M. (2011).** Candidiasis invasoras en el paciente crítico adulto. *Rev Chil Infect* **28**, 41-49.
- Watamoto, T., Samaranayake, L. P., Egusa, H., Yatani, H. & Seneviratne, C. J. (2011).** Transcriptional regulation of drug-resistance genes in *Candida albicans* biofilms in response to antifungals. *J Med Microbiol* **60**, 1241-1247.
- White, T., Holleman, S., Dy, F., Mirels, L. & Stevens, D. (2002).** Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 1704-1713.
- Wilson, L., Reyes, C., Stolpman, M., Speckman, J., Allen, K. & Beney, J. (2002).** The direct cost and incidence of systematic fungal infection. *Value in Health* **5**, 26-39.
- Xu, J., Ramos, A., Vilgalys, R. & Mitchell, T. (2000).** Clonal and spontaneous origins of fluconazole resistance in *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* **38**, 1214-1220.
- Znaidi, S., De Deken, X., Weber, S., Rigby, T., Nantel, A. & Raymond, M. (2007).** The zinc cluster transcription factor TAC1p regulates PDR16 expression in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **66**, 440-452.

## IX. ANEXOS

### Anexo 1. Carta de aprobación del Comité de Ética de la Clínica Dávila.



Santiago 23 de Enero de 2014

Dra. Cecilia Tapia P.  
Investigador Principal  
Presente.-

#### Ref: Aprobación de Estudio

Estimada Dra. Tapia:

Por medio de la presente, informo a Ud. que, el Comité Ético-Científico ha recibido y tomado conocimiento del siguiente estudio científico:

**“Estudio de susceptibilidad y mecanismos de resistencia a antifúngicos en Candida Albicans de origen clínico”.**

En relación al mencionado estudio, comunicamos a Ud. que, con fecha 22 de Enero de 2014, se ha decidido:

#### Aprobar su desarrollo en Clínica Dávila

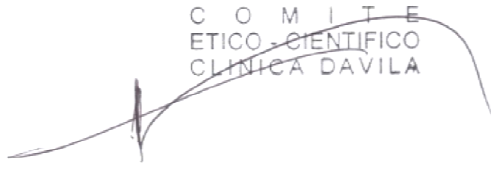
Se solicita al investigador entregar un informe con el seguimiento de la investigación a los 6 meses y/o al término de ésta.

En la evaluación participaron los siguientes miembros:

Dr. Sergio Castillo (Presidente)  
Dra. Sofía Oviedo  
Dr. Jyh Kae Nien  
Dr. Manuel Yañez  
Abog. Claudia Huerta  
E.U. ,Cecilia Benavente

Sin otro particular, le saluda atentamente,

C O M I T E  
ETICO-CIENTIFICO  
CLINICA DAVILA

  
Dr. Sergio Castillo  
Presidente  
Comité Ético-Científico  
Clínica Dávila

## Anexo 2. Medios de cultivo y soluciones

- **Medio YPD (1 L)**
  - 10 g de extracto de levadura
  - 20 g peptona
  - 20 g glucosa
  - Diluir en 1 L de agua destilada.
  
- **Medio agar Sabouraud (1 L)**
  - 65 g de extracto de levadura
  - Diluir en 1 L de agua destilada
  
- **Tampón PBS (1 L)**
  - 8,0 g de NaCl
  - 0,2 g de KCl
  - 1,44 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
  - 0,24 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - Agregar 800 mL de agua destilada
  - Ajustar pH a 7,4 con HCl
  - Aforar a 1L con agua destilada
  
- **Solución madre Rodamina 6-G 10 mM (2 mL)**
  - 0,0096 g de Rodamina 6-G
  - Diluir en 2 mL de DMSO.
  
- **Solución madre CCCP 73 mM (1 mL)**
  - 0,015 g de CCCP
  - Diluir en 1 mL de DMSO

### Anexo 3. Caracterización de ARN extraído de *C. albicans*.

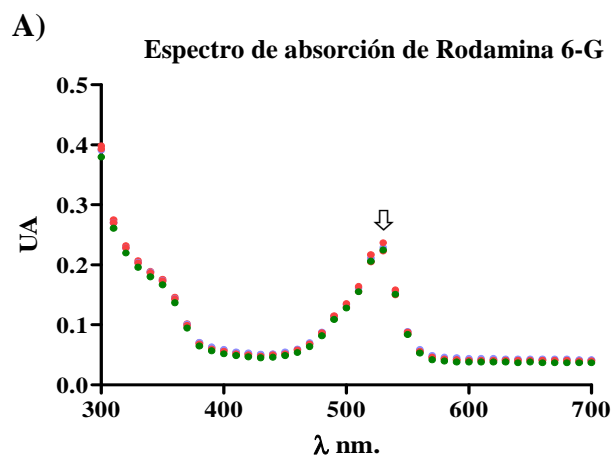
ID	Susc. <sup>a</sup>	[ARN] <sup>b</sup>	A260/A280	A260/A230	ID	Susc. <sup>a</sup>	[ARN] <sup>b</sup>	A260/A280	A260/A230
1A	R	0,250	2,20	2,21	1E	R	1,014	2,19	2,16
2A	R	0,690	2,20	2,09	2E	R	0,290	2,15	2,00
3A	R	0,767	2,20	2,17	3E	R	0,361	2,11	2,00
4A	R	0,207	2,13	2,23	4E	R	0,328	2,19	2,00
5A	R	0,244	2,15	2,18	5E	R	1,255	2,18	2,08
6A	R	0,340	2,10	2,16	6E	R	0,164	2,16	2,08
7A	R	0,190	2,11	2,21	7E	R	1,687	2,19	2,10
8A	R	0,179	2,13	2,09	8E	R	1,461	2,16	2,21
9A	R	1,089	2,20	2,00	9E	R	1,609	2,18	2,00
10A	R	0,716	2,20	2,11	10E	R	1,509	2,00	2,10
11A	SDD	0,369	2,15	2,14	11E	I	0,675	2,20	2,17
12A	SDD	0,325	2,18	2,21	12E	I	0,250	2,20	2,21
13A	SDD	1,197	2,17	2,16	13E	I	1,278	2,19	2,00
14A	SDD	0,633	2,20	2,20	14E	I	0,767	2,20	2,20
15A	SDD	0,486	2,15	2,25	15E	I	0,207	2,13	2,14
16A	SDD	0,482	2,16	2,21	16E	I	0,969	2,17	2,20
17A	SDD	0,426	2,16	2,15	17E	I	0,632	2,20	2,11
18A	SDD	0,678	2,18	2,23	18E	I	1,746	2,18	2,01
19A	SDD	0,509	2,05	2,18	19E	I	0,347	2,14	2,01
20A	SDD	0,568	2,09	2,02	20E	I	0,405	2,20	2,31
21A	S	0,564	2,19	2,13	21E	S	0,890	2,01	2,09
22A	S	0,672	2,18	2,26	22E	S	1,197	2,14	2,20
23A	S	0,994	2,17	2,02	23E	S	0,678	2,00	2,00
24A	S	0,717	2,17	2,08	24E	S	0,486	2,16	2,02
25A	S	0,720	2,19	2,00	25E	S	1,181	2,15	2,12
26A	S	0,600	2,20	2,15	26E	S	0,338	2,16	2,12
27A	S	0,730	2,20	2,20	27E	S	1,123	2,17	2,20
28A	S	0,752	2,19	2,21	28E	S	0,600	2,20	2,26
29A	S	0,969	2,17	2,10	29E	S	1,059	2,15	2,00
30A	S	0,486	2,16	2,00	30E	S	1,059	2,16	2,00

<sup>a</sup>Susc.: Susceptibilidad, R: Resistente, SDD: Sensible Dosis Dependiente, I: Intermedia, S: Sensible.

<sup>b</sup>Las concentraciones indicadas se encuentran en  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

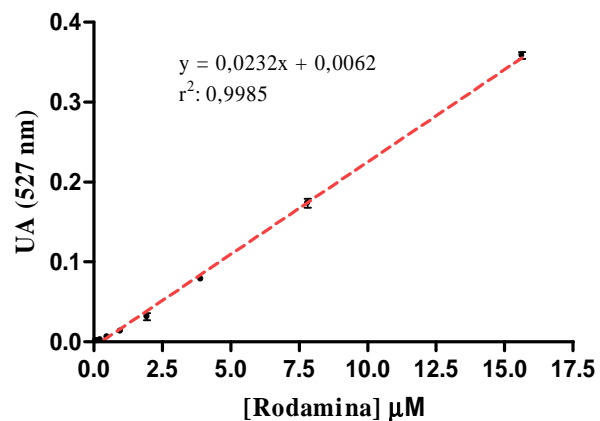
#### Anexo 4. Curva estándar de Rodamina 6-G

(A) Espectro de absorbancia de R6-G 10  $\mu\text{M}$  (n=2). (B) Curva estándar de rodamina 6-G a absorbancia de 527 nm.



B)

[Rodamina 6-G] ( $\mu\text{M}$ )	UA <sup>a</sup>	UA <sup>a</sup>
15,6	0,3555	0,3615
7,8	0,1695	0,1775
3,9	0,0775	0,0795
1,9	0,0285	0,0345
0,98	0,0135	0,0135
0,49	0,0065	0,0055
0,24	0,0025	0,0025
0,12	0,0005	0,0015
0,06	0,0015	0,0005



<sup>a</sup>UA: Unidades de absorbancia.

## **Anexo 5. Secuenciación del gen *TAC1***

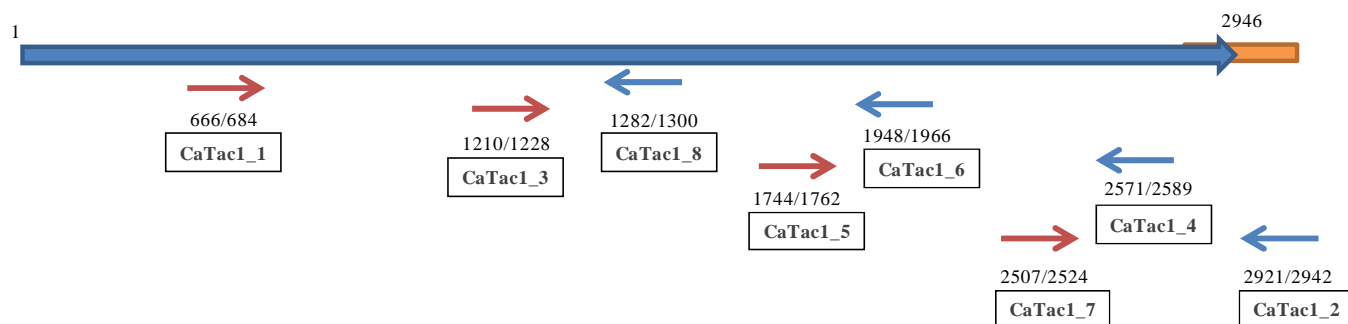
Como trabajo complementario, se secuenció el gen *TAC1* con el fin evaluar si la presencia de mutaciones en el gen que codifica este factor de transcripción se relaciona con la mayor expresión de bombas del tipo CDR en las cepas de *C. albicans* resistente a azoles. El gen *TAC1* (GenID: DQ837375) se secuenció utilizando los partidores y la estrategia descritos previamente en Morio *et al.*, 2013 (Tabla A5.1, Fig. A5.1) de manera similar a la descrita en la sección IV.5-7.

Primero, se realizó una amplificación completa del gen mediante PCR. Cada reacción contenía tampón de PCR 1x, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTP 0,2 mM, polimerasa AmpliTaq 0,05 U/μL y partidores (CaTAC1\_1 y CaTAC1\_2) 0,5 μM, 25 ng de templado de ADN genómico y se completó el volumen a 50 μL con agua bidestilada estéril. La amplificación se realizó usando un programa con desnaturalización inicial a 95°C durante 2 min y 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 seg, apareamiento a 50°C durante 30 seg y una extensión a 72°C durante 1 min. Finalmente, una extensión final a 72°C durante 5 min. El producto de PCR se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8% 70 V durante 1 h.

La amplificación del gen *TAC1* generó una banda única y definida del tamaño esperado de 2300 pb (Fig. A5.2). Los productos de PCR se purificaron usando el sistema enzimático ExoProStar y se secuenciaron en la Unidad de Genómica del Instituto de Salud Carlos III (Madrid, España). Los resultados encontrados en la secuenciación del gen *TAC1* se describen en la sección Resultados V.6.

**Tabla A5.1. Partidores utilizados para la amplificación y secuenciación del gen *TAC1*.**

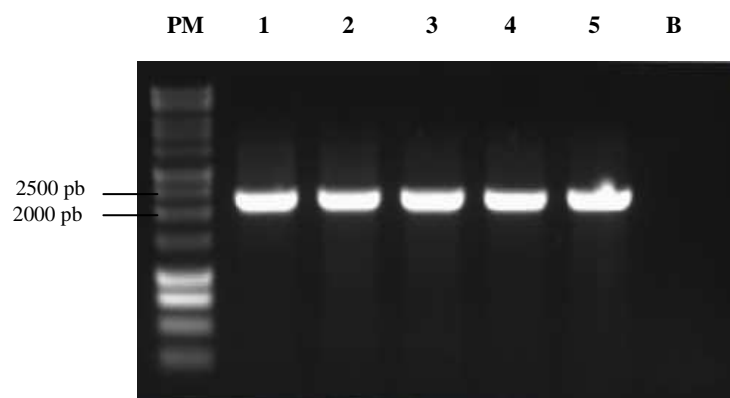
Gen	Nombre	5' → 3'	Secuencia
<i>TAC1</i>	CaTAC1_1	Sentido	TGTTGGTACTCATTCAATT
	CaTAC1_8	Antisentido	ACATCAACAATGCTTCTAC
	CaTAC1_3	Sentido	CAGAATTCGTTGGAGAATA
	CaTAC1_6	Antisentido	TGTCTCGCCTAATTGACGT
	CaTAC1_5	Sentido	GCCTTGTTACAATCAAGAA
	CaTAC1_4	Antisentido	AGTGTTCTGCTACCACAA
	CaTAC1_7	Sentido	TCCAAAACCATGCGGAAT
	CaTAC1_2	Antisentido	CATCGCTTTCACCAATTACAA



**Figura A5.1. Esquema de partidores para la secuenciación de los genes *TAC1*.**

Esquema de secuenciación para el gen *TAC1* de *C. albicans* (GenID: DQ837375). Los partidores fueron diseñados previamente en el trabajo de Morio *et al.*, 2013.





**Figura A5.2. Amplificación del gen *TAC1* mediante PCR.**

Carril PM: Marcador de peso molecular 1Kb (Promega). Carril B: Blanco de PCR. Carriles 1-5: Productos obtenidos de cepas 1A al 5A, respectivamente. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% a 70V durante 1 h.

