

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en
Ciencias Biológicas

**“Subunidades Fksp del complejo β -1,3- D-glucan sintasa de
Candida glabrata: Rol en la síntesis de la pared celular, en la
resistencia a las equinocandinas y como marcadores de
resistencia clínica”**

Nombre y Apellido Doctorando: Catiana Dudiuk

Director de Tesis: Garcia-Effron, Guillermo

Co-director de Tesis: Gamarra, Soledad



-2017-

- ❖ *A Guille y Sole, mis directores, por transmitirme toda su experiencia y el entusiasmo por este trabajo. Por todos los consejos, los estímulos, por la confianza y por darme todas la oportunidades que estuvieron a su alcance para mejorar mi formación. Pero sobre todo por ser tan buenas personas conmigo.*
- ❖ *A mis compañeras de laboratorio, por las charlas, los mates y los momentos compartidos, por las risas, por hacer el trabajo y las largas horas, mucho más llevaderas. Gracias por estar para mí.... Siempre.*
- ❖ *A Martin mi compañero de vida, por apoyarme y acompañarme en todas mis decisiones, por las horas de mates y aguante, por las noches de charlas y consejos. Gracias por estar conmigo y para mí.....incondicionalmente.*
- ❖ *A mi mamá y a mi hermana, por estar conmigo siempre. Gracias mamá por las posibilidades y por sus esfuerzos. Por darme fuerzas, por creer en mí!.*
- ❖ *A mis amigas por estar en las buenas y en la no tanto, por todos los hermosos momentos compartidos.*
- ❖ *A la Universidad Nacional del Litoral, a la Facultad de Bioquímica y Ciencias biológicas, muchas gracias por la formación académica y las oportunidades recibidas.*

Publicaciones surgidas de este trabajo

- **Catiana Dudiuk**, Soledad Gamarra, Leonardelli Florencia, Cristina Gimenez-Ortigosa, Roxana G. Vitale, Javier Afeltra, David S. Perlin, Guillermo Garcia-Effron. (2014). **“Set of Classical PCRs for Detection of Mutations in *Candida glabrata* FKS Genes Linked with Echinocandin Resistance”**. Journal Clinical of Microbiology. Tomo: 52(7).Páginas: 2609-14. doi: 10.1128/JCM.01038-14.

- **Catiana Dudiuk**, Soledad Gamarra, Cristina Jimenez-Ortigosa, Florencia Leonardelli, Daiana Macedo, David S. Perlin, Guillermo Garcia-Effron. (2015) **“Quick detection of FKS1 Mutations Responsible for Clinical Echinocandin Resistance in *Candida albicans*”**. Journal Clinical of Microbiology. doi: 10.1128/JCM.00398-15.

- **Catiana Dudiuk**, Soraya E. Morales-López, Virginia Podesta, Daiana Macedo, Florencia Leonardelli, Roxana G. Vitale, María E. Tosello, Matías S. Cabeza, Marisa Biasoli, Soledad Gamarra, Guillermo Garcia-Effron. **“Multiplex PCR designed to differentiate species within the *Candida glabrata* complex”**. Revista Iberoamericana de Micología. doi: 10.1016/j.riam.2016.04.007

Abreviaturas y Símbolos

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMB	anfotericina B
ANF	Anidulafungina
C.	<i>Candida</i>
CEREMIC	Centro de Referencia de Micología. Rosario
CFB	Capacidad Formadora de Biofilm
CFM	Concentración Fungicida Mínima
CFU	Unidades Formadoras de Colonia
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
Crz1	Factor de transcripción Crz1
CSF	Caspofungina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
et al.	Y colaboradores
ΣFIC	Sumatoria de las concentraciones inhibitorias fraccionales
FLC	Fluconazol
g	Gramos
HRM	Hospital Ramos Mejía
HS	<i>Hot Spot</i>
IC50	medida bioquímica de la sensibilidad de una enzima a un inhibidor
ITC	Itraconazol
K.	<i>Kluyveromyces</i>
kDa	Kilodaltons
LMDM	Laboratorio de Micología y Diagnóstico Molecular
M	Molar
MCF	Micafungina
ml	Mililitros
MVN	Mevinolin
N.	<i>Nakaseomyces</i>
NK	Nikkomicina Z
nt	Nucleótido
PHRI	Public Health Research Institute
Pb	Pares de base
PKC	proteín quinasa C
PSC	Posaconazol
RPM	Rapamicina
Rpm	Revoluciones por minuto
S.	<i>Saccharomyces</i>
sp.	Especie
spp.	Especies
T.	<i>Torulopsis</i>
VRC	Voriconazol
WT	Wild Type (Salvaje)

Resumen en castellano.....	1
Resumen en Ingles (Summary).....	5
1.- INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 CANDIDIASIS, DEFINICIÓN Y ETIOLOGÍA: LEVADURAS DEL GENERO CANDIDA.....	10
1.2 CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LAS CANDIDIASIS SISTÉMICAS O PROFUNDAS.....	10
1.2.1 CANDIDIASIS DEL TRACTO URINARIO.....	11
1.2.2 ENDOCARDITIS CANDIDIÁSICA.....	11
1.2.3 MENINGITIS CANDIDIÁSICA.....	11
1.2.4 CANDIDEMIA.....	11
1.3 EPIDEMIOLOGÍA DEL COMPLEJO <i>CANDIDA GLABRATA</i>	12
1.4 TAXONOMÍA Y DIVERSIDAD GENÉTICA DEL COMPLEJO <i>C. GLABRATA</i> ...	16
1.5 PATOGENIA DE <i>C. GLABRATA SENSU STRICTO</i>	19
1.5.1 ADHESIÓN Y FORMACIÓN DE BIOFILM.....	20
1.5.2 PRODUCCIÓN DE ENZIMAS.....	21
1.6 TRATAMIENTO.....	22
1.6.1 ANTIFÚNGICOS QUE TIENEN COMO DIANA A LOS ESTEROLES DE MEMBRANA (ERGOSTEROL).....	23
1.6.1.1 Polienos.....	23
1.6.1.2 Azoles.....	24
1.6.2 ANTIFÚNGICOS QUE TIENEN COMO BLANCO A LA PARED CELULAR FÚNGICA: EQUINOCANDINAS.....	27
1.6.3 SENSIBILIDAD IN VITRO DEL COMPLEJO <i>C. GLABRATA</i> A LOS ANTIFÚNGICOS.....	28
1.6.3.1 <i>C. glabrata sensu stricto</i> y su resistencia a los antifúngicos.....	28
1.6.3.2 Perfiles de resistencia de las nuevas especies del clado <i>Nakaseomyces</i> : <i>C. nivariensis</i> y <i>C. bracarensis</i>	32
1.7 COMPLEJO β -1,3-D-GLUCAN SINTASA.....	33
1.7.1 SÍNTESIS DE PARED CELULAR FÚNGICA.....	33

1.7.2 COMPLEJO β -1,3-D GLUCAN SINTASA: SUBUNIDADES PROTEICAS FKSP Y GENES QUE LAS CODIFICAN.....	34
1.7.3 FUNCIONES DE LOS DISTINTOS <i>FKS</i> . ANTECEDENTES CIENTÍFICOS EN <i>S. CEREVISIAE</i> Y OTRAS ESPECIES DEL GENERO <i>CANDIDA</i>	36
1.7.4 ANTIFÚNGICOS INHIBIDORES DEL COMPLEJO β -1,3-D-GLUCAN SINTASA: EQUINOCANDINAS.....	36
1.8 REDUCCIÓN EN LA SENSIBILIDAD A LAS EQUINOCANDINA.....	37
1.8.1 RESISTENCIA CLÍNICA: MUTACIONES EN REGIONES CONSERVADAS DE LOS GENES <i>FKS</i> DENOMINADAS <i>HOT SPOTS</i>	38
1.8.2 TOLERANCIA: VÍAS METABÓLICAS INVOLUCRADAS Y MECANISMOS DE COMPENSACIÓN CELULAR.....	39
1.8.3 DIFICULTADES PARA LA DETECCIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA RESISTENCIA A EQUINOCANDINAS.....	40
1.9 IDENTIFICACIÓN DE <i>C. NIVARIENSIS</i> Y <i>C.BRACARENSIS</i>	42
2.- OBJETIVOS	44
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	46
3.1 MICROORGANISMOS UTILIZADOS.....	47
3.1.1 CEPAS DEL COMPLEJO <i>C. GLABRATA</i>	47
3.1.2 CEPAS DE <i>CANDIDA ALBICANS</i>	47
3.1.3 CEPAS CONTROL Y DE LA COLECCIÓN AMERICANA DE CULTIVOS TIPO ATCC (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION).....	49
3.1.4 CEPAS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i>	49
3.2 PLÁSMIDOS Y VECTORES.....	50
3.2.1 PLÁSMIDO pGEM-T® EASY VECTOR.....	50
3.2.2 VECTORES FÚNGICOS.....	51
3.3 MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES.....	54
3.3.1 MEDIOS DE CULTIVO PARA LEVADURAS.....	54
3.3.1.1 CHROMA TM <i>Candida</i>	54
3.3.1.2 Dextrosa -Peptona- Extracto de Levaduras (YPD).....	54
3.1.1.3 Nitrógeno base para auxotrofia (YNB).....	54
3.3.1.4 Sabouraud glucosado.....	55

3.3.2 MEDIO DE CULTIVO PARA <i>E. COLI</i>	55
3.3.2.1 Luria-Bertani (LB).....	55
3.3.3 SOLUCIONES.....	56
3.3.3.1 Buffer de extracción de ADN fúngico.....	56
3.3.3.2 Buffer T.E. pH 7,5.....	56
3.3.3.3 Buffer de carga para electroforesis de ADN.....	56
3.3.3.4 Buffer de electroforesis: tris acetato EDTA (T.A.E.).....	57
3.3.3.5 Soluciones de Isopropyl B-D-Thiogalacto-pyranoside 200mg/ml (IPTG) y 5-Bromo-4-Cloro-3-Idol-β-D-Galactósido (X-GAL) de 20mg/ml	57
3.3.3.6 Soluciones para la extracción de ADN de plásmidos.....	58
3.4 CULTIVO Y MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS.....	58
3.4.1 CULTIVO Y MANIPULACIÓN DE CEPAS DEL COMPLEJO <i>C. GLABRATA</i> Y <i>C. ALBICANS</i>	58
3.4.1.1 Preparación de stock de levaduras para conservación de cepas.....	58
3.4.1.2 Preparación de inóculos.....	59
3.4.1.3 Transformación de <i>C. glabrata sensu stricto</i> por el método químico con Acetato de Litio.....	59
3.4.2 CULTIVO Y MANIPULACIÓN DE CEPAS DE <i>E. COLI</i>	61
3.4.2.1 Transformación de <i>E. coli</i> por método de shock térmico, y selección de transformantes.....	61
3.4.2.2 Mantenimiento de la colección de plásmidos en cepas de <i>E. coli</i> (cultivo y almacenamiento).....	61
3.5 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	62
3.5.1 ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA.....	62
3.5.2 EXTRACCIÓN DE ADN DE LEVADURAS DEL COMPLEJO <i>C. GLABRATA</i> Y DE <i>C. ALBICANS</i> POR MÉTODO QUÍMICO.....	62
3.5.3 EXTRACCIÓN DE ADN DE PLÁSMIDOS.....	63
3.5.3.1. Método artesanal.....	63
3.5.3.2. Método comercial (Promega).....	64
3.5.4 EXTRACCIÓN DE ARN DE <i>C. GLABRATA SENSU STRICTO</i>	64

3.5.5 TRASCRIPTIÓN REVERSA (SÍNTESIS DE ADNC).....	65
3.5.6 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	66
3.5.7 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR). DISTINTAS VARIANTES Y SUS RESPECTIVAS APLICACIONES.....	66
3.5.7.1 Método general de la Reacción en cadena de la polimerasa.....	66
3.5.7.2 Generación de vectores de delección de los genes FKS de <i>C. glabrata sensu stricto</i> por distintos métodos: PRODIGE (para <i>FKS1</i>), por PCR de fusión (para <i>FKS2</i>) y por digestión con enzimas de restricción (para <i>FKS3</i>).	67
3.5.7.3 PCR de punto final para la detección de sustituciones aminoacídicas en las regiones <i>hot spots</i> de los genes <i>FKS</i> de <i>C. glabrata sensu stricto</i> y de <i>C. albicans</i>	78
3.5.7.4 PCR multiplex para la identificación de cada una de las especies que conforman el complejo <i>C. glabrata</i> : <i>C. glabrata sensu stricto</i> , <i>C. nivariensis</i> y <i>C. bracarensis</i>	80
3.5.7.5 PCR real time para evaluar la expresión de quitina A y B en cepas de <i>C. glabrata sensu stricto</i> defectivas en genes <i>FKS</i>	80
3.5.8 PURIFICACIÓN EN COLUMNAS DE LOS PRODUCTOS DE PCR Y A PARTIR DE GELES DE AGAROSA.	83
3.5.9 SECUENCIACIÓN POR LA METODOLOGÍA DE SANGER.....	83
3.5.9.1 Reacción de PCR de secuenciación y análisis de las secuencias.....	83
3.5.10 CONSTRUCCIÓN DE VECTORES – CLONACIÓN DE ADN.....	84
3.5.10.1 Ligación rápida de un fragmento de PCR usando el plásmido PGEM-T Easy Vector.....	84
3.5.10.2 Digestión con enzimas de restricción.....	85
3.5.10.3 Defosforilación de plásmidos.....	85
3.5.10.4 Oligonucleótidos.....	86
3.5.10.5 Bioinformática.....	86
3.6 ANÁLISIS DE FENOTIPOS DE LAS CEPAS MUTANTES DE <i>C. GLABRATA SENSU STRICTO</i> DEFECTIVAS EN GENES FKS (FKS KNOCK-OUT).....	87
3.6.1 EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIFÚNGICOS.....	87
3.6.1.1 Técnica de microdilución en caldo utilizando como método de referencia CLSI protocolo M27-S4.....	87

3.6.1.1.1 Antifúngicos, soluciones madres e intervalos de concentraciones probadas.....	87
3.6.1.1.2 Caldo RPMI1640.....	88
3.6.1.1.3. Controles de crecimiento.....	88
3.6.1.1.4 Preparación de las placas de microdilución e inóculo para determinar CIM. Lectura e interpretación de resultados.....	88
3.6.1.2 Determinación de CIM utilizando tiras de Etest®.....	89
3.6.1.2.1 Tiras de Etest®.....	89
3.6.1.2.2 RPMI1640 agarizado.....	89
3.6.1.2.3 Preparación del inóculo. Aplicación de las tiras de Etest® a las placas inoculadas.	89
3.6.1.2.4 Lectura e interpretación de resultados.....	90
3.6.1.3 Evaluación de la combinación de antifúngicos por microdilución (método del tablero de ajedrez o checkerboard).	91
3.6.1.3.1 Soluciones madres de antifúngicos utilizados, rango de concentraciones y combinaciones probadas.....	91
3.6.1.3.2 Preparación de placas de combinaciones.....	92
3.6.1.3.3 Evaluación de la interacción entre antifúngicos.....	93
3.6.1.3.4 Modelo de interacción entre antifúngicos.....	93
3.6.1.4 Evaluación de la concentración fungicida mínima (CFM).....	95
3.6.1.4.1 Solución madre de FLC y rango de concentraciones probadas	95
3.6.1.4.2. Procedimientos de las pruebas de determinación de la CFM.....	95
3.6.1.4.3 Lectura e interpretación de resultados.....	95
3.6.2 EVALUACIÓN DE LA VIRULENCIA DE CEPAS DE <i>C. GLABRATA SENSU STRICTO</i> DEFECTIVAS EN GENES FKS EN EL MODELO INVERTEBRADO <i>GALLERIA MELLONELLA</i>	96
3.6.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DIVERSOS FACTORES FÍSICOQUÍMICOS Y SUSTANCIAS QUÍMICAS GENERADORES DE ESTRÉS CELULAR SOBRE LAS CEPAS KNOCK OUT.....	97
3.6.4 CURVAS DE CRECIMIENTO.....	100

3.6.5 PROCEDIMIENTOS DE LAS PRUEBAS DE DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD FORMADORA DE BIOFIM	100
4.- RESULTADOS.....	102
4.1 OBTENCIÓN DE CEPAS DE <i>C. GLABRATA SENSU STRICTO</i> DEFECTIVAS EN LOS GENES <i>FKS1</i> , <i>FKS2</i> Y <i>FKS3</i>	103
4.1.1 GENERACIÓN DE VECTORES DE DELECIÓN Y OBTENCIÓN DE CEPAS MUTANTES DEFECTIVAS EN GENES <i>FKS</i>	103
4.2 EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE LOS GENES <i>FKS</i> EN EL DESARROLLO, ADQUISICIÓN DE RESISTENCIA Y/O TOLERANCIA A LOS ANTIFÚNGICOS, EN LA REGULACIÓN DE VÍAS CELULARES DE RESPUESTA A ESTRÉS Y EN LA VIRULENCIA DE <i>C. GLABRATA SENSU STRICTO</i>	113
4.2.1 CURVAS DE CRECIMIENTO.....	113
4.2.2 CAPACIDAD FORMADORA DE BIOFILM.....	117
4.2.3. EVALUACIÓN DEL FENOTIPO DE LAS CEPAS EN ESTUDIO FRENTE A COMPUESTOS QUE ALTERAN LAS VÍAS CELULARES DE RESPUESTA A ESTRÉS.....	118
4.2.4 SENSIBILIDAD A LOS ANTIFÚNGICOS.	126
4.2.4.1 Método de microdilución.	126
4.2.4.2 Concentración fungicida mínima (CFM).....	127
4.2.4.3 Evaluación de la interacción entre antifúngicos: Combinación de drogas utilizando método de microdilución (placas de checkerboard).....	127
4.2.4.4 Determinación de CIM utilizando tiras de Etest®.....	128
4.2.5 ESTUDIO IN VIVO UTILIZANDO EL INVERTEBRADO <i>G. MELLONELLA</i> PARA EVALUAR LA PARTICIPACIÓN DE LOS GENES <i>FKS</i> EN LA VIRULENCIA DE <i>C. GLABRATA SENSU STRICTO</i>	135
4.2.6 EVALUACIÓN DE VÍAS DE COMPENSACIÓN DE DÉFICIT DE β -GLUCANOS: CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE LA VÍA DE SÍNTESIS DE QUITINA.....	137
4.3 IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES QUE CONFORMAN EL COMPLEJO <i>C. GLABRATA</i> : <i>C. GLABRATA SENSU STRICTO</i> , <i>C. NIVARIENSIS</i> Y <i>C. BRACARENSIS</i> UTILIZANDO PCR MULTIPLEX.....	141
4.4 GENERACIÓN DE HERRAMIENTAS MOLECULARES DE DIAGNÓSTICO DE RESISTENCIA A EQUINOCANDINAS EN <i>C. GLABRATA SENSU STRICTO</i>	143
4.4.1 DISEÑO DE PRIMERS DE CONTROL Y DE DETECCIÓN DE MUTACIONES.....	143

4.4.2. DISEÑO DEL SET DE PCR MULTIPLEX PARA LA DETECCIÓN DE RESISTENCIA A LAS EQUINOCANDINAS EN <i>C. GLABRATA SENSU STRICTO</i>	146
4.4.3. VALIDACIÓN DEL SET DE PCR MULTIPLEX A TRAVÉS DE UN ESTUDIO DOBLE CIEGO.....	148
4.5 GENERACIÓN DE HERRAMIENTAS MOLECULARES DE DIAGNÓSTICO DE RESISTENCIA A EQUINOCANDINAS EN <i>C. ALBICANS</i>	148
4.5.1 DISEÑO DE PRIMERS DE CONTROL Y DE DETECCIÓN DE MUTACIONES.....	148
4.5.2. DISEÑO DEL SET DE PCR MULTIPLEX PARA LA DETECCIÓN DE RESISTENCIA A LAS EQUINOCANDINAS EN <i>C. ALBICANS</i>	150
4.5.3. VALIDACIÓN DEL SET DE PCR MULTIPLEX A TRAVÉS DE UN ESTUDIO DOBLE CIEGO.....	151
5.- DISCUSIÓN	153
6.- CONCLUSIONES	168
7.- BIBLIOGRAFIA	171

RESUMEN

Las infecciones invasoras por *Candida spp.* se presentan como uno de los problemas clínicos más significativos en inmunocomprometidos. A pesar de los mejores esfuerzos de la comunidad médica, la morbilidad y la mortalidad asociadas con candidemias sigue siendo elevada, con tasas brutas de mortalidad mayores al 40%. Las altas tasas de mortalidad se deben, en gran parte, a la incapacidad de llegar a un diagnóstico de manera rápida y por ende a la tardanza en la aplicación de una terapéutica adecuada. Estudios de base poblacional realizados en los EE.UU., Europa y América Latina sugieren que la incidencia de candidemia se ha incrementado en la última década. La gran mayoría de estas infecciones son causadas por *Candida albicans* seguida por *Candida glabrata sensu lato* y *Candida parapsilosis sensu lato*. En Argentina *C. glabrata* es la cuarta especie aislada con mayor frecuencia en candidemias.

Las infecciones causadas por *C. glabrata*, se presentan como un reto terapéutico ya que esta especie presenta sensibilidad reducida a los polienos y tiene la capacidad de adquirir resistencias secundarias a los triazoles con gran facilidad. Esta situación se vuelve aún más complicada, por la emergencia de dos especies crípticas (*C. nivariensis* y *C. bracarensis*) dentro del grupo *glabrata*, imposibles de diferenciar fenotípicamente y con perfiles de resistencia diferentes. Por estas razones, el uso de las equinocandinas para el tratamiento de las micosis sistémicas causadas por estas levaduras se considera un gran avance en Micología.

Las equinocandinas tienen actividad fungicida frente a *Candida spp.* y actúan sobre la pared celular fúngica. Inhiben el complejo enzimático β -1,3- D-Glucan sintasa que cataliza la síntesis de los 1,3- β -D-glucanos, el componente más abundante de la pared fúngica. La reducción cuantitativa de estos glucanos por parte de las equinocandinas produce la disrupción de la estructura de la pared celular en formación, provocando la muerte celular por inestabilidad osmótica.

El complejo β -1,3- D-Glucan sintasa está formado por al menos 2 subunidades, Rho1p y Fksp. La primera es un elemento regulatorio que participa en varios procesos celulares mientras que los Fksp son el centro catalítico putativo del complejo y el blanco de las equinocandinas. Los Fksp, son codificados por 3 genes homólogos (*FKS1*, *FKS2* y *FKS3*).

La resistencia a las equinocandinas es un fenómeno raro pero cada año aumenta el número de aislamientos con sensibilidad reducida a estos antifúngicos. La resistencia clínica a las

equinocandinas en *Candida* spp. ha sido vinculada estrictamente a mutaciones en dos regiones conservadas de una de las tres subunidades Fksp homologas (Fks1p). En cambio, en *C. glabrata*, se han descrito además mutaciones en Fks2p que otorgan fenotipos de resistencia. Esto produjo que se plantearan grandes interrogantes en cuanto a la función específica de las subunidades Fks1p y Fks2p de *C. glabrata* en cuanto a la síntesis de la pared celular y a la resistencia a las equinocandinas. Por otro lado, la relación de las mutaciones en *FKS* con la resistencia a las equinocandinas no ha sido explotada en el diseño de herramientas moleculares que permitan diagnosticar la resistencia a las mismas.

En base a estos interrogantes nos planteamos cuatro objetivos. El primero fue la obtención de cepas de *Candida glabrata* defectivas en los genes *FKS1*, *FKS2* y *FKS3*, con el fin de determinar la participación de cada uno de estos genes en la resistencia a las equinocandinas y en la regulación de la síntesis de la pared celular fúngica. Con el segundo se trató de establecer la función de los genes de la vía de síntesis de quitina en la compensación de los efectos de las alteraciones funcionales del complejo β -1,3- D-Glucan sintasa. Como tercer objetivo se llevó a cabo la generación de herramientas moleculares de diagnóstico de la resistencia a las equinocandinas en *C. glabrata* y *C. albicans*. Por último, se planteó la necesidad de diseñar una herramienta molecular que permita la diferenciación de las especies crípticas que componen el complejo *C. glabrata*.

Se obtuvieron cepas de *C. glabrata sensu stricto* defectivas en los genes *FKS*, utilizándose para ello tres metodologías: PRODIGE, PCR de fusión y el método tradicional con enzimas de restricción.

Los mutantes defectivos en genes *FKS* fueron expuestos a diferentes antifúngicos, diversos compuestos que alteran diferentes vías metabólicas (calcineurina, mTOR) y, además se utilizaron para la realización de estudios de virulencia. Los resultados obtenidos demostraron que la función de los genes *FKS* es redundante durante el crecimiento normal en *C. glabrata sensu stricto* y ante la acción de las equinocandinas. Sin embargo esta redundancia se pierde cuando la célula debe responder ante situaciones de estrés. Así, se puede concluir que el gen *FKS1* es más importante para la fisiología de *C. glabrata*, ya que la mayoría de las drogas/compuestos probados afectan más al mutante defectivo en *FKS1* que sería el que tiene funciones fisiológicas constitutivas, mientras que el gen *FKS2* presenta una innegable función efectora de respuesta ante situaciones de estrés celular.

Respondiendo al objetivo número 2 se demostró que la vía de compensación de quitina parece probablemente regulada por la vía de la calcineurina. Sin embargo, no se encontraron diferencias marcadas en las expresiones de la Chitin sintase 3 (*CHS3*) en los mutantes defectivos. Esto pudo deberse a que quizás en *C. glabrata* el gen *CHS3* no sea el que principal participante en la regulación por déficit de glucanos ya que existen 8 genes parálogos, o bien en los tiempos estudiados no hay modificaciones importantes en la expresión, ya que este es un proceso dinámico que puede variar en minutos. Sin embargo, en los resultados obtenidos en las pruebas de sinergismo la participación de la quitina en la compensación del déficit de glucanos de pared resulta evidente.

En cuanto a los estudios de virulencia se realizó un estudio *in vivo* utilizando *G. mellonella* y un estudio para determinar la participación de los genes *FKS* en la formación de biofilm. En el estudio *in vivo* se observó que la deficiencia individual de cada uno de los genes *FKS* no afectarían la capacidad de *C. glabrata* para infectar a *G. mellonella*. En cuanto a la evaluación de la participación individual de los genes *FKS* de *C. glabrata sensu stricto* en la producción de biofilm, se observó que el gen *FKS2* contribuye en mayor medida con la producción de β -1,3-D-glucanos, que conforman la matriz de biofilm.

Para cumplir con el objetivo número 3 la herramienta de diagnóstico molecular diseñada permitió detectar en solo 4h, los mecanismos más comunes de resistencia a equinocandinas que se relacionan con falla terapéutica, en *C. glabrata* y *C. albicans*. Además como la detección molecular está basada en una PCR clásica solo requiere de un termociclador común, lo que lo vuelve más accesible al ambiente hospitalario.

Con la PCR múltiplex diseñada, como parte del objetivo N° 4, se logró identificar las especies del complejo *C. glabrata sensu*, con un 100% de concordancia con el método de secuenciación considerado como gold estándar. Además, la identificación es rápida (4h), al utilizarse un termociclador común su costo es bajo, y mediante la realización de un estudio doble ciego demostramos que es robusta y altamente reproducible.

SUMMARY

Candida spp. invasive infections are one of the most significant clinical problems in immunocompromised patients. Despite of the medical community efforts, candidemia associated morbidity and mortality remains high, with gross mortality rates greater than 40%. The high mortality rates are due to the inability to arrive at a diagnosis quickly and, therefore, to the delay in the application of adequate therapeutics. Population-based studies conducted in the US, Europe and Latin America suggest that the incidence of candidemia has increased in the last decade. The vast majority of these infections are caused by *Candida albicans* followed by *Candida glabrata sensu lato* and *Candida parapsilosis sensu lato*. In Argentina *C. glabrata* is the fourth most frequently isolated species in candidemias.

Infections caused by *C. glabrata* are a therapeutic challenge since this species has a reduced sensitivity to polyenes and has the ability to acquire secondary resistance to triazoles with great ease. This situation becomes even more complicated, due to the emergence of two cryptic species (*C. nivariensis* and *C. bracarensis*) within the *glabrata* group which are impossible to differentiate phenotypically and has different resistance profiles. For these reasons, the use of echinocandins for the treatment of systemic mycoses caused by these yeasts is considered a breakthrough in Mycology.

Echinocandins have fungicidal activity against *Candida* spp. and act on the fungal cell wall. They inhibit the β -1,3- D-Glucan synthase enzymatic complex which catalyzes the synthesis of β -1,3- D-glucans, the most abundant component of the fungal wall. The quantitative reduction of these glucans by the echinocandins causes the disruption of the cell wall structure in formation, causing cell death due to osmotic instability.

The β -1,3- D-Glucan synthase complex consists of at least 2 subunits, Rho1p and Fksp. The first is a regulatory element that participates in several cellular processes while the Fksp are the putative catalytic center of the complex and the target of the echinocandins. Fksp, are encoded by 3 homologous genes (*FKS1*, *FKS2* and *FKS3*).

Echinocandin resistance is a rare phenomenon but each year the number of isolates with reduced sensitivity to these antifungals increases. Clinical resistance to echinocandins in *Candida* spp. has been strictly linked to mutations in two conserved regions of one of three homologous Fksp subunits (Fks1p). In contrast, in *C. glabrata*, these mutations have also been described in Fks2p. This facts led the scientific community to wonder which the specific function of *C. glabrata* Fks1p and Fks2p subunits are in cell wall synthesis

and echinocandin resistance. On the other hand, the relationship of mutations in *FKS* with echinocandin resistance has not been exploited in the design of molecular tools to diagnose resistance.

Based on these questions, we set ourselves four objectives. The first was to obtain *Candida glabrata* strains defective in the *FKS1*, *FKS2* and *FKS3* genes, in order to determine the participation of each of these genes in echinocandin resistance and in the regulation of cell wall synthesis. The second was to establish the function of the chitin synthesis pathway genes in compensating the effects of the functional alterations of the β -1,3- D-Glucan Synthase complex. The third objective was the generation of molecular tools for the diagnosis of echinocandin resistance in *C. glabrata* and *C. albicans*. Finally, we proposed a molecular tool that allows the differentiation of the cryptic species included in the *C. glabrata* complex.

FKS defective *C. glabrata sensu stricto* strains were obtained using three methodologies: PRODIGE, fusion PCR and the traditional restriction enzyme method.

The *FKS* defective mutants were exposed to different antifungals, various compounds that alter different metabolic pathways (calcineurin, mTOR) and were also used to assess virulence differences. The results obtained showed that the function of the *FKS* genes is redundant during normal growth in *C. glabrata sensu stricto* and when the cell are exposed to echinocandins. However this redundancy is lost when the cell must respond to stressful situations. Thus, it can be concluded that the *FKS1* gene is more important for the physiology of *C. glabrata*, since most of the drugs / compounds tested affect mainly the *FKS1* defective mutant. On the other hand, *FKS2* presents an undeniable function of response to cellular stress situations.

Responding to objective number 2 it was shown that the chitin pathway seems regulated by the calcineurin pathway. However, no differences were found in the expressions of Chitin synthase 3 (*CHS3*) gene in the defective mutants. This could be due to the fact that (i) in *C. glabrata* the *CHS3* gene is not the main participant in the regulation of glucan deficiency since there are 8 paralogous genes. , or (ii) in the studied times points there were no significant modifications in the expression, since it is a dynamic process that can vary in minutes. However, the participation of chitin in the compensation of glucan deficit was evident seeing the results obtained in the synergism tests.

Regarding virulence studies, an *in vivo* study was carried out using *G. mellonella* and biofilm formation capacity was evaluated using the *FKS* deletant strains. In the *in vivo* study it was observed that individual deficiency of each of the *FKS* genes would not affect the ability of *C. glabrata* to infect *G. mellonella*. As for the evaluation of the individual participation of the *FKS* genes of *C. glabrata sensu stricto* in the production of biofilm, it was observed that the *FKS2* gene contributes to a greater extent with the production of β -1,3-D-glucans involved in biofilm matrix.

In order to comply objective 3, the molecular diagnostic tool was designed to detect the most common mechanisms of resistance to echinocandins in *C. glabrata* and *C. albicans* associated with therapeutic failure in only 4h. The molecular detection method is based on a classical PCR which only requires a common thermocycler, making it more accessible to public hospital.

With the multiplex PCR designed as part of objective N° 4, the cryptic species of the *C. glabrata* complex were identified with a 100% agreement with the gold standard. In addition, the identification was fast (4h), inexpensive, robust and highly reproducible.

INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

1.1 CANDIDIASIS, DEFINICIÓN Y ETIOLOGÍA: LEVADURAS DEL GÉNERO CANDIDA.

La incidencia de las infecciones fúngicas ha aumentado significativamente en las últimas décadas, asociada a altos niveles de morbilidad y mortalidad (Lass-Florl, 2009). Este hecho se debe principalmente al aumento de pacientes con cáncer, con algún grado de alteración de la inmunidad o trasplantados, y al aumento de tratamientos que prolongan la vida y que hace unos años no existían. El uso de antibióticos de amplio espectro, catéteres, la nutrición parenteral, la presencia de la inmunosupresión, la interrupción de las barreras de la mucosa, el uso de quimioterapia y radioterapia se encuentran entre los factores predisponentes más importante para el desarrollo de infecciones fúngicas invasivas causadas tanto por levaduras del género *Candida* como por hongos filamentosos (Bonifaz, 2012, Gabaldon y Carrete, 2016).

Las candidiasis son micosis primarias o secundarias ocasionadas por diversas especies de levaduras oportunistas del género *Candida*. Las presentaciones clínicas de esta micosis pueden ser localizadas, diseminadas o sistémicas; pueden afectar piel, mucosas, estructuras profundas y órganos internos. Las alteraciones histopatológicas varían desde inflamación mínima hasta supuración o granuloma. La evolución es aguda, subaguda o crónica (Arenas, 2011).

El género *Candida*, en la actualidad es clasificado con base en su secuenciación genética, dentro de la clase Ascomycetes y familia Saccharomycetes. Incluye más de 200 especies, de las cuales un 10% han sido identificadas como patógenas humanas (Pfaller y Diekema, 2007). Sin embargo, más del 90% de las infecciones invasoras se atribuyen solo a cinco especies: *C. albicans* (40-85%), *C. parapsilosis sensu lato*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* (Alcoba-Florez *et al.*, 2005, Chowdhary *et al.*, 2016, Tietz *et al.*, 2001).

1.2 CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LAS CANDIDIASIS SISTÉMICAS O PROFUNDAS

La candidiasis es una de las infecciones más frecuentes y polimórficas que atacan al hombre e incluyen muchos síndromes clínicos.

1.2.1 Candidiasis del tracto urinario

Se asocia sobre todo a pacientes con corticoterapia, diabéticos y con cateterismo. Es más frecuente en mujeres (4:1). El tracto urinario se ve afectado en forma de microplacas blanquecinas y, en pocas ocasiones, llega hasta los riñones, produciendo pielonefritis; esta entidad clínica se observa con más frecuencia en niños recién nacidos.

1.2.2 Endocarditis candidiásica

Es común en drogadictos heroínómanos que se administran la droga con jeringas no estériles, después de cuadros de candidemia y en pacientes con cateterismo crónico. El cuadro clínico y sintomatológico es similar al de la endocarditis bacteriana, se ha observado fiebre moderada, soplos y esplenomegalia, además de que muestra gran tendencia a generar embolismos. Su diagnóstico es difícil y debe realizarse por el aislamiento del hongo en sangre (hemocultivos), así como por serología.

1.2.3 Meningitis candidiásica

Es una afección rara y se presenta en pacientes leucémicos, diabéticos o tratados con corticoesteroides sistémicos. La meningitis candidiásica es clínicamente similar a la bacteriana. El diagnóstico se realiza simplemente con el aislamiento del hongo a partir del líquido cefalorraquídeo, el cual por lo general se presenta turbio, con discreto aumento de la densidad, disminución de la glucosa (hipogluorraquia) y escaso incremento de las proteínas (hiperproteorraquia).

1.2.4 Candidemia

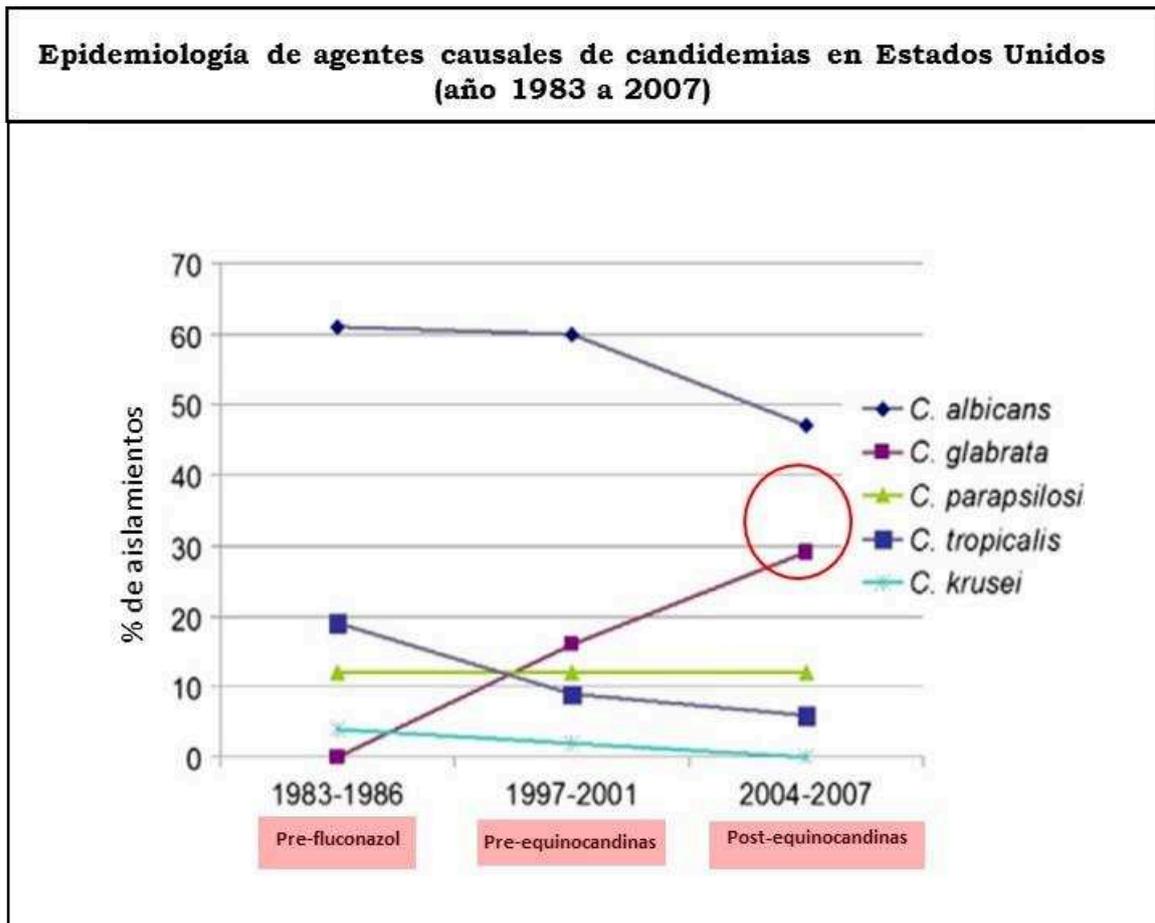
Es una entidad que se ha incrementado en los últimos años; en el medio hospitalario puede representar entre 10 a 20% de todas las candidiasis y hasta en un 10% de las infecciones del torrente sanguíneo; en especial es propia de pacientes muy inmunosuprimidos que se encuentran en unidades de cuidados intensivos y de manera especial en niños prematuros con catéteres venosos centrales. Su sintomatología es bastante vaga: se afecta el estado general, hay fiebre y escalofríos, en algunas ocasiones se asocia con una erupción cutánea pruriginosa o bien a perifoliculitis; con facilidad se confunde con septicemias bacterianas. Su diagnóstico se hace por hemocultivos y serología.

1.3 EPIDEMIOLOGÍA DEL COMPLEJO *C. glabrata*

Las especies de *Candida* pertenecen a la microbiota normal de la cavidad oral, tracto gastrointestinal y conducto vaginal humano, y son responsables de varias manifestaciones clínicas mucocutáneas e infecciones profundas que incluyen las del torrente sanguíneo.

De las especies de *Candida* aisladas de seres humanos, *C. albicans* es la más frecuente, sin embargo en las últimas dos décadas, el número de infecciones debidas a especies “no *C. albicans*” ha aumentado de manera significativa (Rodrigues *et al.*, 2014). Ante este cambio de panorama en la distribución mundial, es que surge *C. glabrata* como patógeno emergente, convirtiéndose en la segunda especie aislada con mayor frecuencia en candidemias en Estados Unidos, norte de Europa y Asia ocupando en Argentina el cuarto lugar (Cordoba *et al.*, 2011, Diekema *et al.*, 2012, Klingspor *et al.*, 2015, Rodero *et al.*, 2005). (**Figura 1**). Esta especie carece de ciertos factores de virulencia asociados a la patogenicidad como la capacidad de desarrollar pseudohifas o de secretar proteasas. A pesar de ello, *C. glabrata sensu stricto* es una preocupación creciente en el ámbito clínico, en primer lugar debido a su capacidad para provocar infecciones de las mucosas, además de estar relacionada con alrededor del 15 % de todas las infecciones del torrente sanguíneo sistémicas producidas por *Candida* spp. (Pfaller *et al.*, 2004, Wisplinghoff *et al.*, 2006). En segundo lugar, debido a los inconvenientes que trae su tratamiento, ya que esta especie presenta sensibilidad reducida a los polienos y tiene la capacidad de adquirir resistencias secundarias a los triazoles con gran facilidad. La incidencia de *C. glabrata sensu stricto* es mayor en adultos mayores de 60 años, siendo muy pocos los aislamientos en recién nacidos. Los factores de riesgo predisponentes observados en pacientes que sufren infecciones por *C. glabrata sensu stricto* son los tiempos prolongados de hospitalización, el uso de antimicrobianos de amplio espectro, trasplantes de órgano sólido y enfermedades oncohematológicas (Diekema *et al.*, 2012).

(Figura 1A)



(Figura 1B)

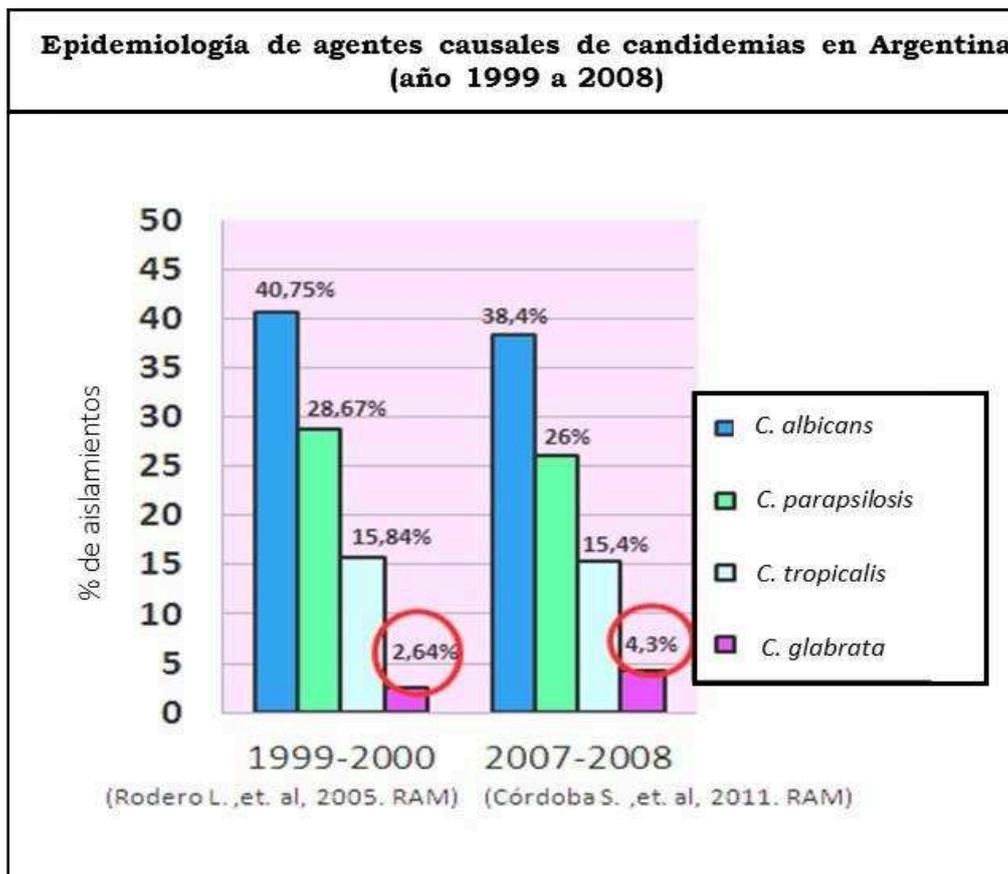


Figura 1.- Cambios en la distribución de especies causales de candidemias en: (A) Estados Unidos 1983-2007. Círculo rojo, indica emergencia de *C. glabrata sensu stricto* (Modificado de (Diekema *et al.* 2012)). (B) Argentina 1999-2008. (Modificado de (Cordoba *et al.*, 2011)).

Actualmente, se sabe que *C. glabrata* es un complejo que incluye tres especies patógenas humanas: *C. glabrata sensu stricto*, *C. nivariensis* y *C. bracarensis* (se verá en mayor detalle en el punto 1.4). Hasta el momento, si bien está documentado que *C. glabrata* es parte de la biota comensal del tracto gastrointestinal humano, *C. bracarensis* y *C. nivariensis* rara vez han sido reportados como comensales de biota humana. Sin embargo, el análisis de los aislamientos descritos en la bibliografía, lleva a suponer que estas dos nuevas especies podrían tener nichos similares en el humano: digestivo (orofaríngea, heces), genitales (vagina) y orina (Angoulvant *et al.*, 2016).

En el caso de *C. nivariensis*, se aisló por primera vez en la naturaleza, de la superficie de plantas, lo que sugirió que su colonización en humanos podría haberse dado desde este entorno (Gabaldon *et al.*, 2013). Alcoba - Flórez *et al.* fueron los primeros en aislar *C. nivariensis* de muestras clínicas: lavado bronco-alveolar (BAL), sangre y orina, en pacientes de un hospital español (Alcoba-Florez *et al.*, 2005). Luego, también fue descrito

como agente causal de candidemias, candidiasis orofaríngea y vulvovaginal (Chowdhary *et al.*, 2010, Fujita *et al.*, 2007, Wahyuningsih *et al.*, 2008). Los distintos aislamientos tuvieron lugar en diferentes partes del mundo: España, Australia, Reino Unido, India, Indonesia, Japón y América Latina, lo que lleva a inferir el carácter cosmopolita de este patógeno. **(Figura 2).**

C. bracarensis fue aislada por primera vez en 2006 de una muestra de exudado vaginal en Portugal (Correia *et al.*, 2006), recuperándose tiempo después, también en Reino Unido de una muestra de hemocultivo de un paciente inmunocomprometido (Warren *et al.*, 2010). El programa ARTEMIS, a través de un estudio retrospectivo, reportó dos *C. bracarensis* aisladas de 1.598 cepas clínicas de *C. glabrata*. Estas cepas provenían en su totalidad de una sola institución de Estados Unidos, donde uno de los aislamientos fue de una muestra de esputo en el año 2002 y la otra de una infección del torrente sanguíneo en 2004 (Lockhart *et al.*, 2009). Bishop *et al.* publicaron el aislamiento de 3 cepas de *C. bracarensis* en una colección de 137 levaduras identificadas previamente como *C. glabrata* (2,2%). Uno de los aislamientos se recuperó de un absceso pélvico y los otros dos se encontraron colonizando dos pacientes oncológicos adultos (Bishop *et al.*, 2008). **(Figura 2).**

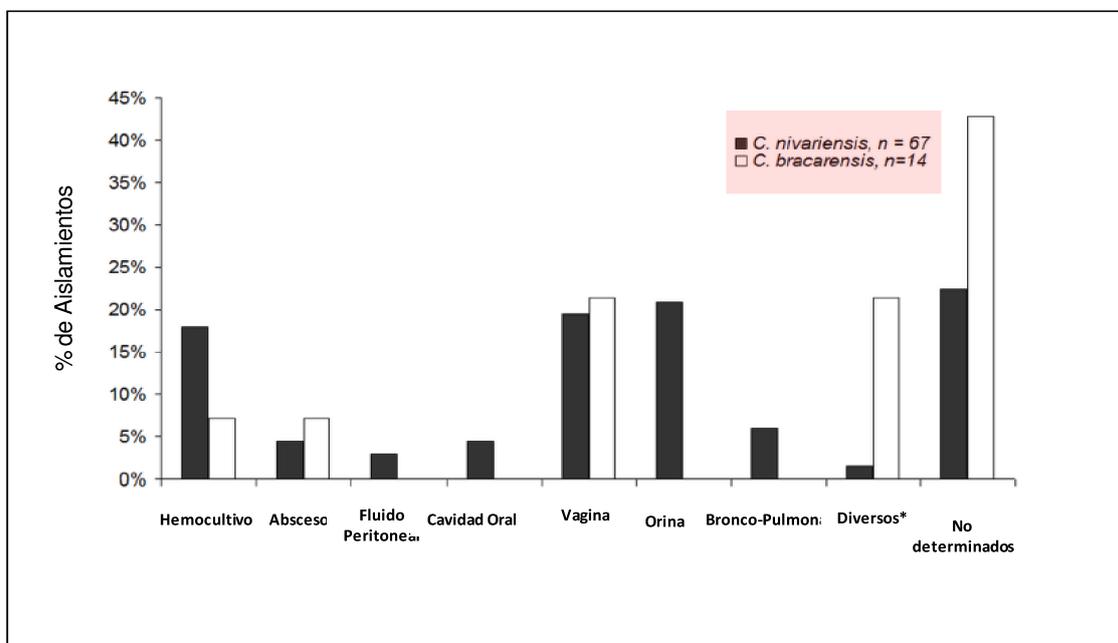


Figura 2.- Revisión de los sitios de aislamiento de *C. bracarensis* y *C. nivariensis* de todos los artículos publicados hasta el 2016. Diversos*: una *C. nivariensis* de garganta y dos *C. bracarensis* de heces. (Modificado de (Angoulvant *et al.*, 2016)).

En la actualidad los datos epidemiológicos sobre las dos especies patógenas que conforman el complejo *C. glabrata* son escasos. Esto en parte es debido, a que los test bioquímicos de rutina no permiten distinguir a *C. nivariensis* y *C. bracarensis* de *C. glabrata*, lo cual lleva a errores en la identificación, subestimando su prevalencia.

1.4 TAXONOMÍA Y DIVERSIDAD GENÉTICA DEL COMPLEJO *C. glabrata*.

C. glabrata fue aislada por primera vez de materia fecal humana en 1917 y fue clasificada como *Cryptococcus* (Anderson HW, 1917). En 1938, Lodder y de Vries denominaron a esta especie como perteneciente al género *Torulopsis* basándose en su incapacidad para producir pseudomicelio y en sus características morfológicas y fisiológicas (Lodder y De Vries, 1983). Odds *et al.* en 1997 demostraron con su estudio que la diferenciación entre los géneros *Candida* y *Torulopsis*, basándose únicamente en la formación o no de pseudohifas, era poco fidedigna (Odds *et al.*, 1997). En base a esto se propuso que *T. glabrata* sea clasificada dentro del género *Candida*, esta incorporación requirió que la descripción del género *Candida* sea cambiada a: "cepas de especies o variedades con pseudohifas ausente, rudimentaria o bien desarrolladas" (Fidel, Jr. *et al.*, 1999).

Una de las dificultades a la hora de caracterizar a las especies del género *Candida*, es que ellas no comparten un mismo origen evolutivo. Lo cual llevó a que se asigne con el término de "*Candida*" a los hongos que no tienen claramente definido un ciclo sexual. Taxonómicamente, las distintas especies de *Candida* pueden clasificarse en dos grandes grupos. El primer grupo incluye las pertenecientes al clado "CTG" (lectura del codón CTG como serina en vez de leucina), el cual incluye la mayoría de las especies patógenas (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *Candida dubliniensis*, *Candida guilliermondii* y *Candida lusitanae*) (Fitzpatrick *et al.*, 2006, Maguire *et al.*, 2013). El segundo grupo incluye especies que han sufrido la duplicación de todo el genoma, el cual es denominado: Whole-Genome Duplication, siendo *C. glabrata* una de las dos especies patógenas que lo conforman (Byrne y Wolfe, 2007, Fitzpatrick *et al.*, 2006, Gabaldon *et al.*, 2013). Si bien una de las características de los integrantes de este grupo de levaduras es que son todas haploides, *C. glabrata* presenta en su genoma todos los genes requeridos para el apareamiento y la meiosis (Fitzpatrick *et al.*, 2006, Wong *et al.*, 2003). Sin embargo, su

ciclo sexual aún no ha sido descrito aunque se ha observado *mating type switching* (Brockert *et al.*, 2003, Butler *et al.*, 2004, Edskes y Wickner, 2013).

El análisis molecular de los ADN ribosomales (ADNr) sitúa claramente a *C. glabrata* dentro del phylum Ascomycetes, estando estrechamente relacionada con el grupo de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces* y alejada filogenéticamente de *C. albicans* (Brockert *et al.*, 2003, Butler *et al.*, 2004, Kurtzman CP y Fell JW, 1998). En 2003 Kurtzman *et al.* propusieron incluir a *C. glabrata* en un clado al que se lo llamó *Nakaseomyces*, junto con tres especies ambientales *C. castelli*, *N. delphensis* (syn. *Kluyveromyces delphensis*) y *N. bacillisporus* (syn. *K. bacillisporus*) (Brockert *et al.*, 2004, Kurtzman, 2003). Unos años más tarde, *C. nivariensis* y *C. bracarensis* fueron añadidas a este clado (Alcoba-Florez *et al.*, 2005, Correia *et al.*, 2006).

Dentro de este clado se pueden distinguir claramente dos linajes bien divididos: uno de ellos conformado por *C. castelli* y *N. bacillisporus* aisladas del ambiente, con caminos evolutivos muy divergentes. El segundo linaje, llamado “grupo *glabrata*” se encuentra conformado por: *C. glabrata*, *C. bracarensis*, *C. nivariensis* y por *N. delphensis*, cercana filogenéticamente a las últimas dos especies incorporadas al clado (Gabaldon *et al.*, 2013). Todas las especies del “grupo *glabrata*”, a excepción de *N. delphensis* son patógenas humanas (**Figura 3**).

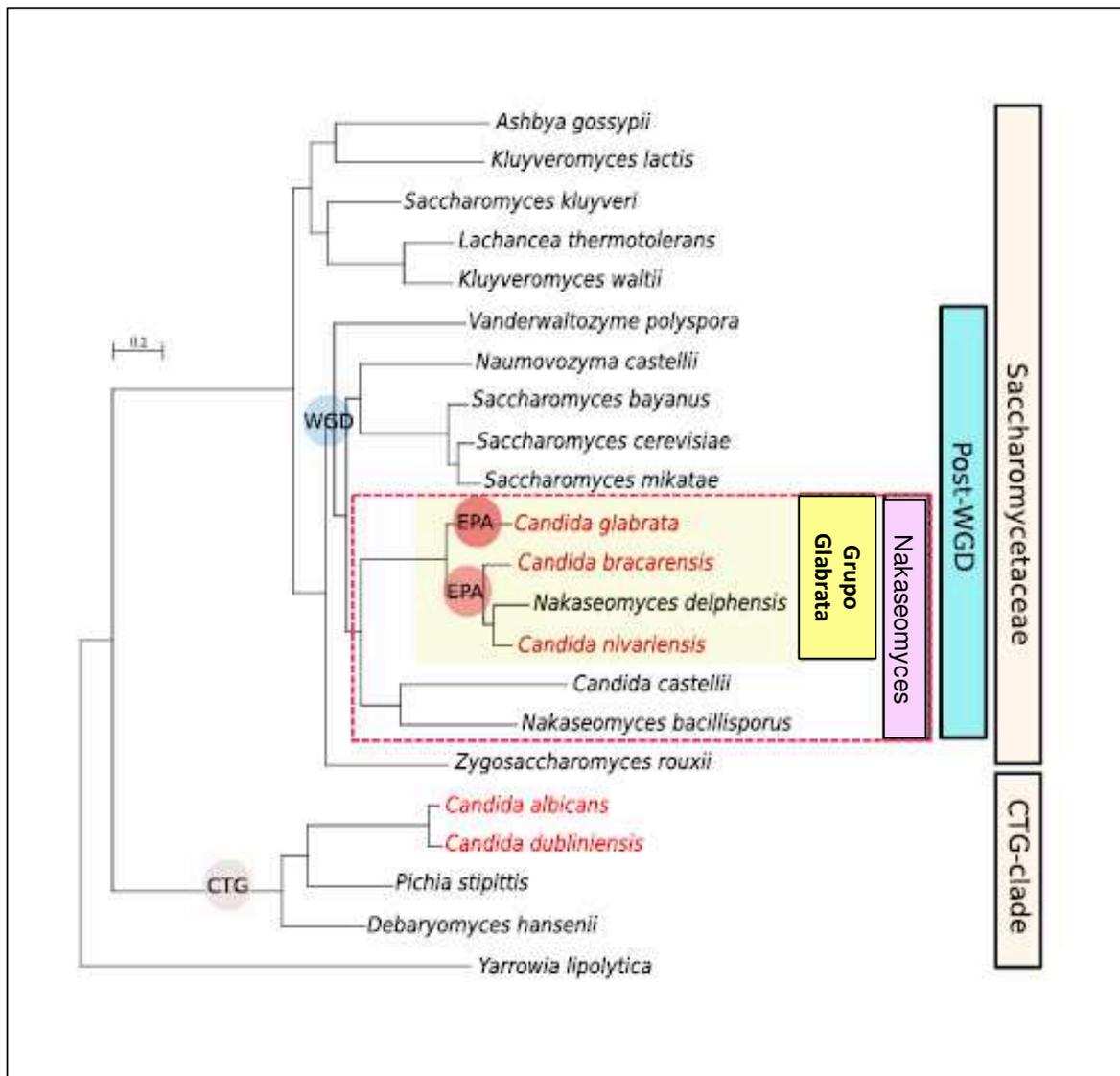


Figura 3.- Relación filogenética de las especies del “Grupo *glabrata*”. El árbol filogenético derivó de un análisis de alineamientos concatenados de 603 genes ortólogos. Los nombres en color rojo indican especies fúngicas patógenas para los humanos. Los grupos taxonómicos relevantes y los eventos evolutivos importantes, se encuentran indicados en recuadros a la derecha del árbol filogenético y en círculos coloreados, respectivamente. (CTG) indica una transición del código genético en el clado (CTG) *Candida*; (WGD) Indica la duplicación / hibridación ancestral de todo el genoma; y (EPA) indica los linajes donde ocurrieron las dos expansiones independientes de los genes EPA. (Modificado de (Gabaldon y Carrete, 2016)).

El genoma de una cepa *wild type* (WT) de *C. glabrata sensu stricto* fue publicado en 2004 (Dujon *et al.*, 2004), mientras que la secuencia de las otras cinco especies del clado *Nakaseomyces* fueron publicadas en 2013 (Gabaldon *et al.*, 2013). Estos estudios revelaron la pérdida generalizada de genes con respecto a *Saccharomyces cerevisiae*. Esta

pérdida incluyó genes involucrados en las vías del metabolismo de galactosa (*GAL1*, *GAL7*, *GAL10*), fosfato (*PHO3*, *PHO5*, *PHO11*, *PHO12*), nitrógeno (*DAL1*, *DAL2*), y ácido nicotínico (genes *BNA*). Una característica particular es la expansión de la familia de genes *EPA*, conocidos por su papel en la adhesión al epitelio humano (Cormack *et al.*, 1999). La expansión de los genes *EPA*, parece haber ocurrido de manera linaje-específica ya que solo se observa en las tres especies patogénicas que componen el clado *Nakaseomyces* (Gabaldon *et al.*, 2013). Esta familia de genes está completamente ausente en los genomas de *C. castellii* y *K. basillisorus*, y solo existe un gen de esta familia en la especie no patógena, *N. delphensis* (Gabaldon *et al.*, 2013). Esta correlación entre la expansión de la familia de genes *EPA* y la virulencia indican que son necesarios para la adhesión de *C. glabrata sensu stricto* y su patogénesis. En el genoma de *C. glabrata sensu stricto* también se encuentran expandidas las familias YPS y MNT3, involucradas en el metabolismo de carbohidratos. Esta amplificación se observó exclusivamente en *C. glabrata sensu stricto*, lo que podría explicar, en parte, su mayor virulencia con respecto a las otras especies patógenas dentro del grupo *Nakaseomyces* (Turner y Butler, 2014). Los análisis genómicos y filogenéticos revelan que el escenario más probable es que las especies del clado *Nakaseomyces* se hayan pre-adaptado fortuitamente al huésped humano, y que la comensalidad/patogenicidad surgió de forma independiente en las tres especies.

1.5 PATOGENIA DE *C. glabrata SENSU STRICTO*

La candidiasis es considerada una enfermedad oportunista que por lo tanto requiere de factores predisponentes del huésped, independientemente de la especie de *Candida* de que se trate. Generalmente, se origina de manera endógena y casi siempre es atribuible al desequilibrio de la biota microbiana por cambios de pH, acumulación de glucógeno o por el uso de antibacterianos que favorece el incremento de *Candida* spp. o debido a enfermedades o procesos que influyan en la respuesta inmune, sobre todo a nivel celular, por ejemplo defectos en el número o función de leucocitos polimorfonucleares (PMN) y linfocitos T y B. Los casos de candidiasis exógenos siempre se inician por el ingreso al organismo de grandes cantidades de levaduras (p. ej., vía cateterismo o drogadicción), en los que se inoculan los microorganismos de manera directa al torrente circulatorio (Bonifaz, 2012).

Décadas atrás, se creía que el estado inmunológico del huésped era el factor determinante para el establecimiento de una infección fúngica oportunista. Hoy en día este concepto se modificó y se sabe que estos organismos participan dinámicamente en la fisiopatología del proceso de la enfermedad, a través de mecanismos de agresión llamados factores de virulencia. La patogenicidad de levaduras del género *Candida* es atribuida a ciertos factores de virulencia vinculados a la capacidad de evadir las defensas del huésped por producción de pseudohifas, capacidad de adherencia, capacidad de formación de biofilm (tanto en el tejido del huésped como en dispositivos médicos), protección contra los mecanismos de defensas del huésped, resistencia a los antifúngicos y la capacidad de generar daño al tejido por la producción de enzimas hidrolíticas tales como fosfolipasas, lipasas y hemolisinas .

En el caso de *C. glabrata sensu stricto*, estudios experimentales de infección en modelos animales evidenciaron que es menos virulenta que *C. albicans*. Sin embargo, y en contraposición a estos resultados presentó una alta tasa de mortalidad y una amplia capacidad de diseminación (Silva *et al.*, 2012, Tamura *et al.*, 2007).

1.5.1 Adhesión y Formación de Biofilm

C. glabrata sensu stricto es capaz de colonizar los tejidos del huésped, así como superficies abióticas, donde desarrolla una estructura de biofilm formada por múltiples capas, a pesar de no ser capaz de formar filamentos (Silva *et al.*, 2009). Un importante factor que se correlaciona con la capacidad de adhesión de *Candida* spp. es la presencia de proteínas específicas sobre la pared celular, denominadas adhesinas. En *C. glabrata*, el mayor grupo de adhesinas esta codificado por la familia de genes *EPA* (codifican adhesinas epiteliales) (De Las Penas A. *et al.*, 2003). La estructura general de las proteínas Epa es similar a la de las proteínas Als (aglutininas) de *C. albicans*. Aunque hay pocos estudios sobre las proteínas Epa de *C. glabrata*, se sabe que la proteína Epa1p es una lecitina Ca^{2+} dependiente que se une a N-acetil-lactosamina en los glicoconjugados (Cormack *et al.*, 1999). Además, a pesar del gran número de genes *EPA*, se ha demostrado que simplemente con la supresión del gen *EPA1* se reduce la adhesión *in vitro* (De Las Penas *et al.*, 2003). El gen *EPA6* no se expresa *in vitro*. Sin embargo, su expresión aumenta durante la infección urinaria *in vivo*, lo que sugiere que *C. glabrata* es capaz de adaptarse a diferentes condiciones ambientales (Domergue *et al.*, 2005, Jayatilake *et al.*, 2006).

La capacidad formadora de biofilm puede conferir a *C. glabrata* una ventaja ecológica, favoreciendo su supervivencia en los seres humanos como comensal y como patógeno. De esta manera logra evadir los mecanismos inmunes del huésped, resistir los tratamientos antifúngicos, soportar la presión de competencia de otros microorganismos y subsistir en dispositivos médicos permanentes (Silva *et al.*, 2010). Comparando a *C. glabrata* con otras *Candida* spp., esta presenta la actividad metabólica formadora de biofilm más baja, a pesar de obtener la mayor cantidad de biofilm en cultivos celulares. Por lo tanto, en general, los biofilm formados por *C. glabrata* tienen menos biomasa total y una estructura en multicapa con blastoconidios íntimamente empaquetados o con grupos de células, con ausencia total de hifas y pseudohifas. Una característica a destacar en *C. glabrata* en comparación con otras especies del género *Candida* (no-*C. albicans*), es que la matriz del biofilm presenta mayor cantidad de proteínas y carbohidratos (5 veces más), entre los cuales se incluye β -1,3-D glucanos (**Figura 4**) (d'Enfert y Janbon, 2016, Rodrigues *et al.*, 2014).

1.5.2 Producción de enzimas

La secreción general de enzimas, tales como proteasas, fosfolipasas, lipasas, y hemolisinas, les permiten a las levaduras sobrevivir y replicarse dentro de los macrófagos y ser capaces de destruir el epitelio. Como se mencionó anteriormente, *C. glabrata* no produce proteasas, en oposición al resto de las especies del género (Rodrigues *et al.*, 2014). Las fosfolipasas hidrolizan los fosfolípidos a ácidos grasos, contribuyendo al daño de la membrana celular del huésped o la exposición de receptores que favorecen la adherencia *C. glabrata*. Esto promueve una poderosa unión con la mucosa del huésped destruyéndola y provocando una invasión del tejido involucrado (Marcos-Arias *et al.*, 2011). Recientemente, algunos autores han descrito que las especies de *Candida* no-*albicans*, como *C. glabrata* son capaces de degradar la hemoglobina utilizando enzimas denominadas hemolisinas, para obtener hierro. *C. glabrata* puede desarrollarse en el huésped a partir de la utilización del hierro, mediante la degradación de la hemoglobina, para llevar adelante sus procesos metabólicos.

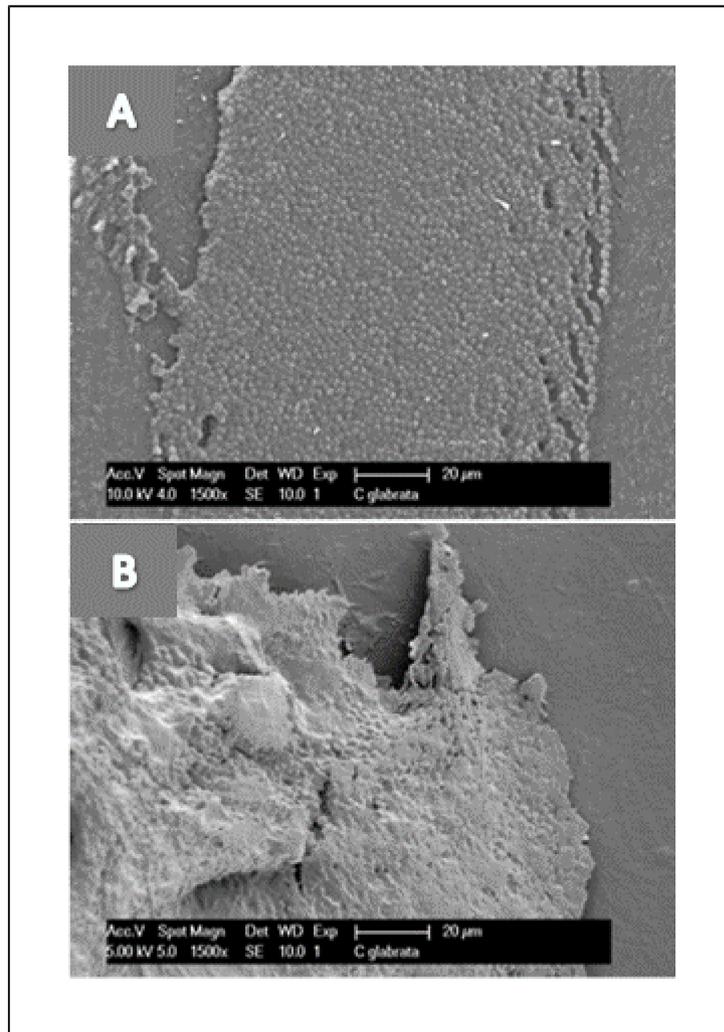


Figura 4.- Ultraestructura de biopelículas de *C. glabrata* obtenidas *in vitro* e *in vivo*. Se muestran micrográficas electrónicas de barrido de biofilms de *C. glabrata* formadas *in vitro* (A) o en un modelo subcutáneo de formación de biofilm (B) durante 6 días en dispositivos de poliuretano. La aparición de la matriz extracelular en la que están incrustadas las células de *C. glabrata* es visible en (B). Barras de escala = 20 µm. (Modificado (d'Enfert y Janbon, 2016)).

1.6 TRATAMIENTO

Las opciones de tratamiento antifúngico para las micosis invasoras son limitadas. Existen tres blancos terapéuticos y cuatro clases de antifúngicos disponibles y aprobados para el tratamiento de estas micosis. Estas clases incluyen los polienos macrólidos (anfotericina B, AMB), los azoles (triazoles como fluconazol - FLC, itraconazol - ITC, voriconazol - VRC y posaconazol - PSC e imidazoles como ketoconazol), la 5 fluorcitocina y las

equinocandinas (anidulafungina - ANF, caspofungina – CSF y micafungina - MCF). Los polienos y los azoles tienen como blanco a la membrana celular fúngica (ergosterol), la 5 fluorcitocina a la síntesis de ácidos nucleicos y las equinocandinas a la pared celular fúngica. Además, existen otros grupos antifúngicos de uso tópico o sistémico pero activos contra infecciones superficiales como las alilaminas (terbinafina) y las morfolininas.

1.6.1 Antifúngicos que tienen como diana a los esteroides de membrana (Ergosterol)

El ergosterol es el esteroide de membrana más abundante en la mayoría de las especies fúngicas. Su función es regular la fluidez y asimetría de la membrana y por tanto, la integridad de la misma (Ghannoum y Rice, 1999). El ergosterol también participa en la regulación hormonal del ciclo celular fúngico (Bard *et al.*, 1993). Dada su importancia para la viabilidad celular y a la inexistencia de este esteroide en las membranas celulares de mamíferos y plantas, es el blanco de la mayoría de los antifúngicos existentes, ya sean de uso tópico como sistémico. La acción antifúngica se produce por inhibición de la síntesis de ergosterol al interferir en la acción de distintas enzimas de la vía de síntesis o por interacción directa entre la droga y el esteroide de membrana. Así, las alilaminas inhiben la escualeno epoxidasa (Erg1p), los azoles inhiben la 14-alfa esteroide demetilasa (Erg11p/Cyp51p), las morfolininas que inhiben la C-14 esteroide reductasa (Erg24p) mientras que los polienos actúan uniéndose directamente a la molécula del ergosterol produciendo la muerte celular (Sanglard *et al.*, 2003, White, 1997). **Tabla 1.**

1.6.1.1 Polienos

Esta clase de antifúngicos incluye drogas fungicidas, de amplio espectro e importante potencia antifúngica. Sin embargo, estas terapias tienen como efecto secundario la nefrotoxicidad, lo que limita su uso (Sabra y Branch, 1990). Recientemente, estos efectos adversos han sido disminuidos con las nuevas formulaciones lipídicas y liposomales de AMB que mejoran la biodisponibilidad y reducen la toxicidad de la misma (Moen *et al.*, 2009). El mecanismo de acción de esta clase antifúngica es poco conocido, sin embargo existe una clara asociación entre la sensibilidad a los polienos y la presencia de esteroides

de membrana (Norman *et al.*, 1972). En el caso de la AMB, se ha propuesto que la interacción entre el antifúngico y los esteroides de membrana, resulta en la producción de poros acuosos formados por ocho moléculas de AMB unidas hidrofóticamente a los esteroides de membrana (**Figura 5**). Estos poros provocan una alteración de la permeabilidad de la membrana provocando el literal vaciamiento de la célula fúngica y su muerte. Otros autores han sugerido que el efecto antifúngico de los polienos se asocia a pérdida de iones con la subsiguiente alteración del gradiente de protones (Vanden Bossche, 1997) y daños oxidativos de la droga sobre la célula fúngica que provocan la pérdida del contenido citoplasmático (Blum *et al.*, 2008). Por lo tanto, la gran mayoría de los autores coinciden en que la acción fungicida de la AMB se debe a la pérdida de contenido citoplasmático, sea cual fuere el mecanismo responsable de la misma.

1.6.1.2 Azoles

Los primeros antifúngicos azólicos denominados imidazoles (clotrimazol y miconazol y posteriormente ketoconazol) comenzaron a ser utilizados al final de la década de 1960 (Sheehan *et al.*, 1999). Luego, se desarrollaron la nueva generación de antifúngicos azólicos, los triazoles (FLC e ITC) que presentan grandes ventajas respecto a los más antiguos como menor toxicidad y mayor espectro. Esto convirtió a los triazoles en los antifúngicos de elección para el tratamiento de un gran número de infecciones fúngicas.

Tabla 1.- Principales antifúngicos en uso clínico que tienen como diana al ergosterol y/o las enzimas que participan en su síntesis.

Clase antifúngica	Ejemplos	Blanco y mecanismo de acción	Gen que codifica la molécula blanco
Alilaminas^a	Terbinafina	Inhibición de la Escualeno epoxidasa (Erg1p)	<i>erg1</i>
Azoles	FLC	Inhibición de la 14- α esterol demetilasa (Erg11p / Cyp51p)	<i>erg11</i> (levaduras)
	ITC		<i>cyp51</i> (Hongos filamentosos)
	VRC		
Morfolinas^b	Amorolfina	Inhibición de la C-14 esterol reductasa (Erg24p)	<i>erg24</i>
Polienos	AMB	Interacción directa con el ergosterol de la membrana y formación de poros	No se conoce aunque probablemente impacte en varios genes.

^a Utilizados en forma tópicos o sistémicos solo para tratar infecciones fúngicas de piel, mucosas y faneras.

^b Utilizados solo para tratamientos tópicos.

FLC: fluconazol, ITC: itraconazol, VRC: voriconazol, AMB: anfotericina B.

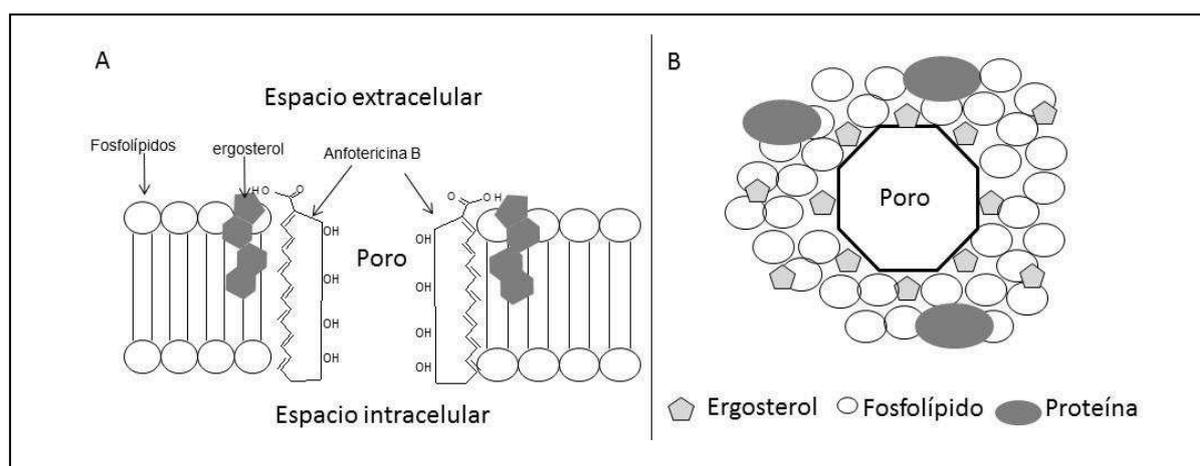


Figura 5.- Representación esquemática de la interacción entre la AMB y los esteroides de membrana. Se aprecia el poro que se forma por la unión de al menos 8 moléculas de AMB.

El uso indiscriminado de estos triazoles provocó la selección de organismos resistentes, por lo que en la década de 1990 se comenzaron a desarrollar los triazoles de segunda generación. Estos nuevos triazoles (VRC, ravuconazol y PSC) cuentan con gran potencia antifúngica, espectro mejorado y son activos frente a ciertos organismos resistentes (Denning *et al.*, 2002, Maertens *et al.*, 2009). Recientemente, se desarrolló una nueva droga azólica llamada isavuconazol que es activa frente a hongos emergentes resistentes a PSC y VRC (Datta *et al.*, 2013).

Estos antifúngicos actúan inhibiendo las enzimas 14- α esterol demetilinas fúngicas que son codificadas por los genes homólogos *ERG11* y *CYP51* de levaduras y hongos filamentosos, respectivamente. En levaduras, los genes *ERG11* son únicos y tienen como sustrato al lanosterol. Por este motivo, la Erg11p se denomina también 14- α lanosterol demetilasa. Estas enzimas, tiene un grupo hemo que conforma el centro catalítico de la enzima. Los azoles, interactúan irreversiblemente con este grupo inhibiendo la reacción de demetilación. Esto provoca la acumulación de esteroides precursores, la depleción de ergosterol en la membrana celular fúngica y la inhibición del crecimiento (Podust *et al.*, 2001, Sanati *et al.*, 1997, van Nistelrooy *et al.*, 1996). (**Figura 6**).

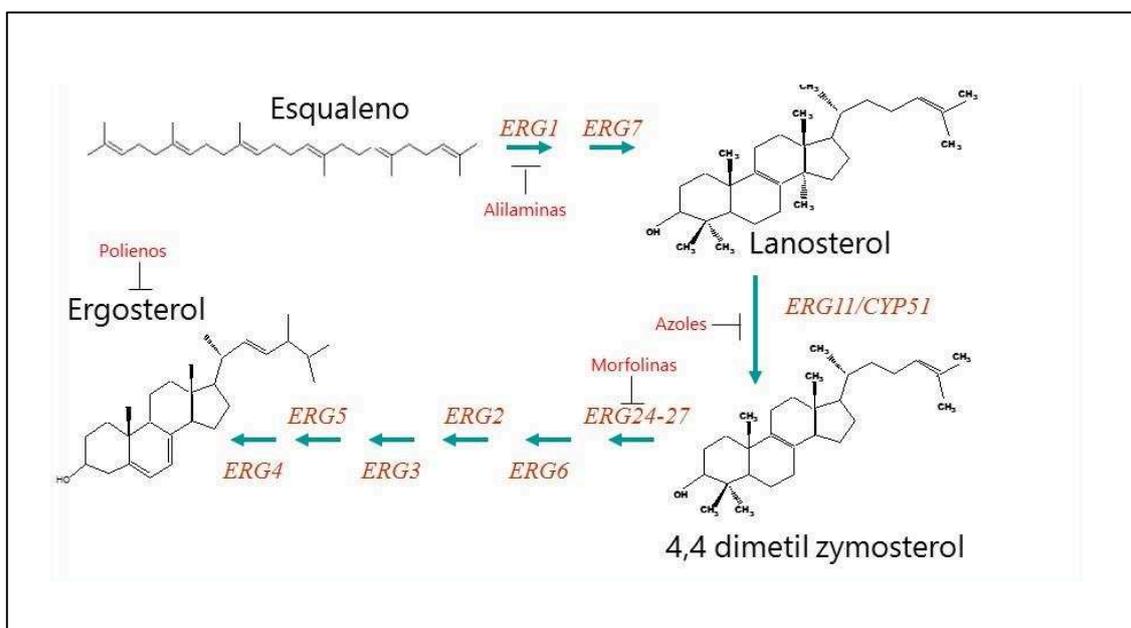


Figura 6.- Esquema de la vía de síntesis del ergosterol desde esqualeno. Descrito en *S. cerevisiae* (Modificado (Parks *et al.*, 1985)).

1.6.2 Antifúngicos que tienen como blanco a la pared celular fúngica: Equinocandinas.

El mantenimiento de la integridad de la pared celular es esencial para que las células fúngicas puedan sobrevivir. La inexistencia de la misma e incluso una alteración importante de esta estructura significa la muerte celular por descompensación osmótica (Bowman *et al.*, 2002, Douglas, 2001, Perlin, 2007).

La pared celular es una matriz extracelular organizada en capas, consistente de una capa externa de glicoproteínas y una capa interna de polímeros de carbohidratos que incluyen glucanos, quitina y galactomananos (Bernard y Latge, 2001, Cid *et al.*, 1995, Douglas, 2001, Masuoka, 2004). En la mayoría de los hongos, la capa de carbohidratos está formada principalmente por β -1,3-D glucanos y α -1,3- D glucanos, aunque también destacan la quitina y los β -1,6- D glucanos (Beauvais y Latge, 2001, Hochstenbach *et al.*, 1998) (**Figura 7**).

Las equinocandinas son hexapéptidos cíclicos N-sustituidos por una cadena lateral aminoacil-lipídica. Inhiben al complejo β -1,3- D glucan sintasa que es el responsable de la biosíntesis del mayor biopolímero de la pared celular, los β -1,3- D glucanos (Cabello *et al.*, 2001, Kurtz y Douglas, 1997). Dicha inhibición desorganiza la estructura de la pared celular en crecimiento, provocando una inestabilidad osmótica y la muerte de las células sensibles (Bowman *et al.*, 2002). El complejo β -1,3- D glucan sintasa está compuesto por al menos 2 subunidades funcionales, el Fksp y el Rho1p. La última es la unidad reguladora del complejo enzimático mientras que los Fksp son las unidades catalíticas y los blancos moleculares de las equinocandinas (Douglas *et al.*, 1994, Douglas *et al.*, 1997a, Douglas, 2001).

Actualmente, existen tres equinocandinas aprobadas por la Food and Drug Administration (FDA): CSF, MCF y ANF. Estas drogas tienen una actividad antifúngica de amplio espectro con gran inocuidad y tolerabilidad lo que las posicionó como una muy buena opción de tratamiento (Denning, 2003). Son activas frente a *Candida* spp. y *Aspergillus* spp. sin que exista resistencia cruzada con antifúngicos pertenecientes a otras clases químicas. Por lo tanto, son efectivas frente a hongos resistentes a azoles y AMB (Denning, 2003, Diekema *et al.*, 2003, Pacetti y Gelone, 2003, Pfaller *et al.*, 2003, Pfaller *et al.*, 2005).

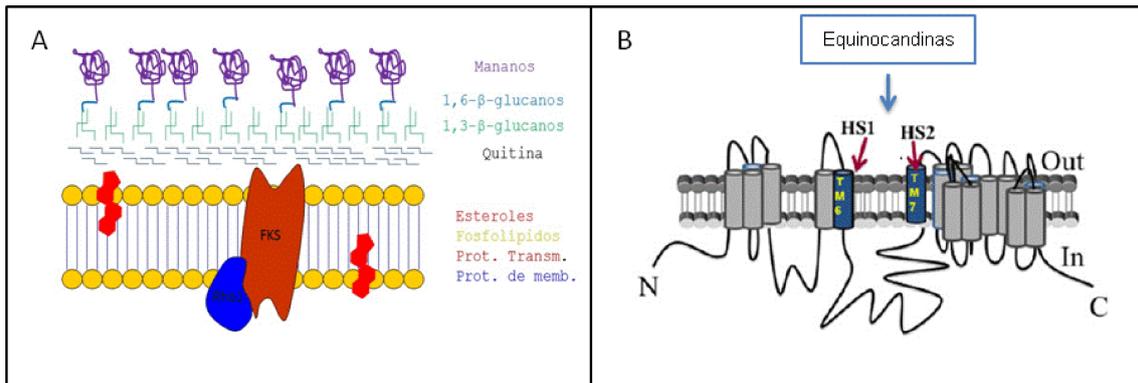


Figura 7.- A) Esquema de la pared celular fúngica y ubicación de las proteínas identificadas como parte del complejo β -1,3-D glucan sintasa. B) Modelo topológico del complejo β -1,3- D glucan sintasa, donde se indica sitio de acción de las equinocandinas. (Modificado de Perlin, 2015).

Las equinocandinas han sido aprobadas para el tratamiento de infecciones fúngicas severas incluyendo aspergilosis invasora, candidiasis esofágica, candidemia y otras infecciones por *Candida* spp. También, son utilizadas en el tratamiento empírico de pacientes con fiebre persistente y neutropenia en los que se sospeche una infección fúngica (Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2011). Sin embargo, se ha comprobado que las equinocandinas tienen menor o nula actividad frente a infecciones producidas por *Mucormyces*, *Cryptococcus* spp. y *Fusarium* spp. siendo desaconsejado su uso en caso de infecciones causadas por estos hongos (Denning, 2003).

Las equinocandinas tienen actividad diferencial frente a levaduras y hongos filamentosos. Así, son consideradas fungicidas frente a los primeros y fungistáticos contra los mohos (Denning, 2003). Esta diferencia de actividad radica en que estos antifúngicos bloquean solo el crecimiento apical de las hifas de los hongos filamentosos manteniendo intactas las células alejadas del ápice (Bowman, 2002).

1.6.3 Sensibilidad in vitro del complejo *Candida glabrata* a los antifúngicos

1.6.3.1 *C. glabrata sensu stricto* y su resistencia a los antifúngicos

Cada clase de antifúngico, como se detalló anteriormente, utiliza distintos medios para inhibir el desarrollo de patógenos fúngicos. Los mecanismos de resistencia a los

antifúngicos pueden ser primarios o secundarios relacionándose con características intrínsecas o adquiridas, respectivamente, que presentan los patógenos fúngicos.

La plasticidad genómica es un mecanismo importante para la adaptación a las señales ambientales, así *C. glabrata*, al igual que todas las especies de *Candida*, poseen la capacidad de responder a las alteraciones medioambientales con el objetivo de adaptarse a la presencia de agentes antifúngicos y, de esta manera, generar protección contra las terapias antimicrobianas.

El desarrollo de resistencia a los antifúngicos es un proceso complejo. Esta puede ser inducible en respuesta a un compuesto o puede generar un cambio genético irreversible como resultado de una exposición prolongada. En detalle, estos incluyen alteraciones o incluso una sobreexpresión de moléculas diana, la eliminación a través de bombas de flujo, difusión limitada, la tolerancia y la densidad celular, son los mecanismos característicos utilizados por los hongos para combatir los efectos de los tratamientos antifúngicos.

❖ Azoles

En el caso de *C. glabrata*, esta presenta una sensibilidad disminuida a los azoles, incluyendo a los imidazoles (por ejemplo miconazol) y los triazoles de administración oral-parenteral (FLC y VRC). La resistencia adquirida es el resultado de mutaciones raras, que se producen por la presión de la droga. Generalmente las mutaciones tienen lugar en los genes *ERG3*, *ERG6*, *ERG7*, *ERG9* y especialmente en el *ERG11*, el cual codifica la enzima que es la encargada de convertir lanosterol en 4,4-dimetilcolesta-8, 14,24 trienol. Los potenciales mecanismos de resistencia descritos incluyen una menor afinidad natural de su lanosterol 14 alfa desmetilasa por los azoles o una alta capacidad para hiperexpresar los *ERG11*, *CDR1* y *PDR1* luego de una exposición a azoles. El *CDR1* es un transportador de la familia ABC (ATP Binding Cassete) que tiene la capacidad de reducir la concentración de azoles en el citoplasma de la levadura funcionando como una bomba de eflujo de fármacos. Por su parte, el Pdr1p es un factor de transcripción, que funciona como el principal regulador de la expresión de los genes que codifican transportadores ABC y se ha encontrado que es un componente clave de la resistencia pleiotrópica del fármaco (PDR) (Vermitsky y Edlind, 2004). La disfunción mitocondrial es otro posible mecanismo por el cual puede darse la resistencia a azoles en *C. glabrata*. Pfaller, *et al.*

publicaron que el 82% de cepas de *C. glabrata* resistentes a FLC también lo fueron a VRC y el 70% también lo son a PSC (Pfaller *et al.*, 2010).

❖ Polienos

Los mecanismos moleculares que permiten la resistencia a los polienos están poco estudiados en cepas de *C. glabrata*. En estudios previos, se analizaron aislamientos clínicos de *C. glabrata* resistentes a los polienos y recuperados de pacientes tratados con AMB. Estas cepas presentaron una disminución del contenido de ergosterol en su membrana, con respecto a cepas WT, lo cual se vinculó a una mutación en el gen *ERG6* (Vandeputte *et al.*, 2008). Así, una deficiencia de ergosterol y una acumulación de metabolitos intermediarios, generan defectos en las etapas finales de la vía del ergosterol. Mediante secuenciación se expuso, la existencia de una única mutación sin sentido en *ERG6*, lo que implicaba la sustitución de una cisteína por una fenilalanina en la proteína correspondiente. Más tarde, una PCR en tiempo real demostró una sobreexpresión de los genes que codifican enzimas implicadas en los pasos finales de la biosíntesis de ergosterol. Para probar que la disminución de la sensibilidad a los polienos podría deberse a esta mutación en el gen *ERG6* de *C. glabrata*, se transformó la cepa clínica con el gen *ERG6* de una cepa WT restableciéndose la sensibilidad a los polienos (Vandeputte *et al.*, 2008).

❖ Equinocandinas

Las equinocandinas son consideradas como primera línea terapéutica para el tratamiento de candidiasis invasiva por *C. glabrata*, debido a su sensibilidad reducida a FLC y AMB. Sin embargo, la bibliografía evidencia un incremento de aislamientos que presentan resistencia a las equinocandinas (Alexander *et al.*, 2013). La resistencia clínica a las equinocandinas en *C. glabrata* se encuentra estrictamente vinculada con sustituciones en regiones denominadas *hot spot* de las subunidades Fks1p y Fks2p del complejo β -1,3- D-Glucan sintasa (blanco de las equinocandinas). La detección de estas mutaciones en los genes *FKS* es considerada la forma más exacta para predecir la falla en el tratamiento con equinocandinas (Dudiuk *et al.*, 2014, Garcia-Effron *et al.*, 2009a, Garcia-Effron *et al.*, 2009b). En un estudio realizado en el Hospital de la Universidad de Duke en Durham (EEUU), se realizó un análisis de cepas de *C. glabrata* aisladas de pacientes con candidemias. En este trabajo los pacientes recibieron como tratamiento algunas de las tres equinocandinas: CSF, ANF o MCF, correlacionándose la respuesta al tratamiento con los

valores de CIM y con la presencia de mutaciones en los genes *FKS1* y *FKS2*. Los resultados del estudio mostraron un aumento de la resistencia a las equinocandinas de 4,9% al 12,3%, en el período de tiempo estudiado que fue de 2001 a 2010 (**Figura 8**). Sin embargo, la información más relevante brindada por este estudio, fue el hecho que de 78 aislamientos de *C. glabrata* que presentaron resistencia a FLC, el 14,1% también presentó resistencia a una o más equinocandinas. Estos aislamientos presentaron mutaciones en los genes *FKS1* y/o *FKS2*, lo cual se vinculó con el tratamiento previo con equinocandinas y sus valores de CIM fueron valores interpretados como intermedios o resistentes. En 2012, el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012) modificó los puntos de corte para las equinocandinas, lo que favoreció la diferenciación entre cepas de *C. glabrata* WT y resistentes.

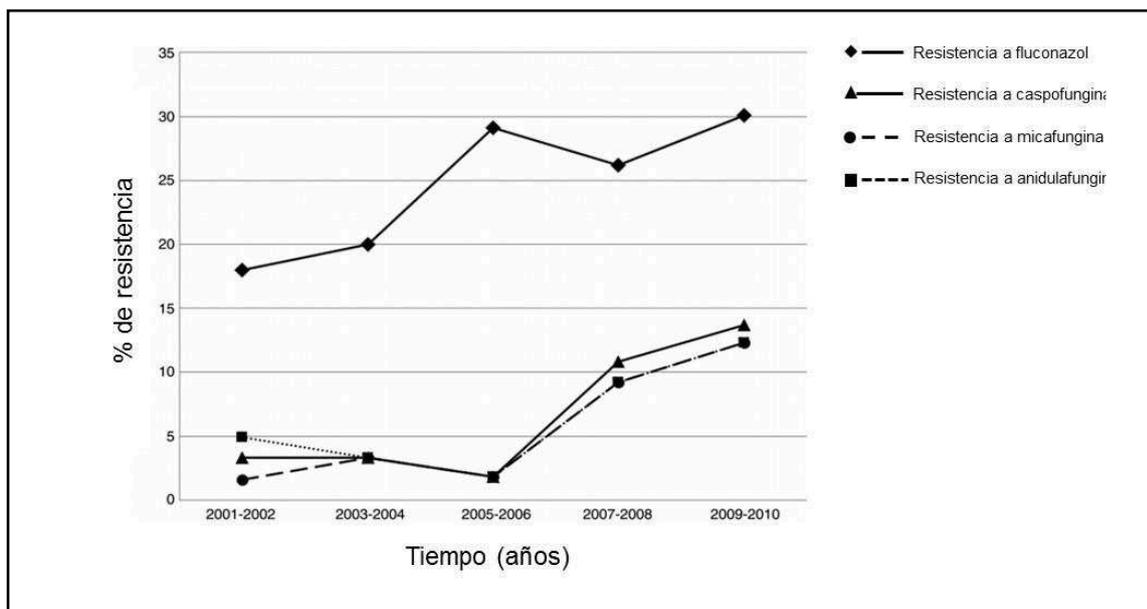


Figura 8.- Variación temporal de la resistencia a FLC y a equinocandinas en *C. glabrata*. Resistencia a FLC (línea continua con diamantes). Resistencia a ANF (línea corta discontinua con cuadrados), CSF (línea continua con triángulos), y MCF (línea larga discontinua con círculos) (Modificado de Alexander *et al.*, 2013).

1.6.3.2 Perfiles de resistencia de las nuevas especies del clado *Nakaseomyces*: *C. nivariensis* y *C. bracarensis*.

La información que existe sobre el perfil de sensibilidad de *C. nivariensis* y *C. bracarensis* es limitada. En el caso de *C. nivariensis* existen trabajos donde se reportaron cepas con CIM bajas a AMB y CSF, observándose resistencia a FLC, así como CIM elevadas a VRC, PSC e ITC (4, 2 y > 16 µg/ml, respectivamente) (Borman *et al.*, 2008, Fujita *et al.*, 2007, Sharma *et al.*, 2013). Dado que algunas cepas exhiben CIM altas solo a FLC o a todos los azoles, se podría pensar que los mismos mecanismos de resistencia presentes en *C. glabrata* podrían estar involucrados. A pesar de la falta de puntos de corte clínicos y epidemiológicos para esta especie, *C. nivariensis* ha sido descrita en la literatura como un patógeno emergente con sensibilidad variable a los azoles (Borman *et al.*, 2008).

En lo que concierne a *C. bracarensis* los datos publicados sobre su perfil de sensibilidad a los antifúngicos es variable. Los valores de CIM de los aislamientos mundiales para FLC, pueden definirse como “sensibles dependiente de la dosis” (utilizando los puntos de corte descritos para *C. glabrata sensu stricto*) (Borman *et al.*, 2008, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012) no documentándose aún cepas de *C. bracarensis* resistentes. Los valores de CIM para AMB, son variables con valores que van de 0,5 a 8 µg/ml (Bishop *et al.*, 2008, Moreira *et al.*, 2015). En cuanto a las equinocandinas, Gil-Alonso *et al.* realizaron un estudio donde evaluó valores de CIM y actividad fungicida de estas drogas sobre cepas de *C. nivariensis* y *C. bracarensis* (Gil-Alonso *et al.*, 2015). Los valores de CIM de la ANF y la MCF fueron similares para las dos especies, siendo la ANF el agente más activo contra *C. bracarensis* y *C. nivariensis*. Sin embargo, se encontraron diferencias en la actividad fungicida ya que todas las equinocandinas fueron más letales sobre *C. bracarensis* que sobre *C. nivariensis* aunque se demostró que la MCF no presenta efecto fungicida sobre esta última especie.

El desarrollo de resistencia a la mayoría de los azoles, la sensibilidad variable a la AMB y la baja actividad de las equinocandinas, aparecen como características de estas nuevas especies del complejo *C. glabrata*. Esto pone en relieve la importancia de una correcta identificación y de conocer los patrones de sensibilidad a los antifúngicos de estas especies crípticas, para la aplicación de una terapéutica adecuada.

1.7 COMPLEJO β -1,3-D-GLUCAN SINTASA.

1.7.1 Síntesis de pared celular fúngica.

La pared celular de los hongos es una estructura con gran plasticidad, que da forma a la célula, controla la permeabilidad celular y protege a la célula de los cambios osmóticos. Además de estas importantes funciones, constituye el lugar de interacción con el medio externo, localizándose en ella las adhesinas y un gran número de receptores que tras su activación, desencadenarán una compleja cascada de señales en el interior de la célula. Dada su localización en el exterior de la célula, la pared es el primer lugar de interacción con el hospedador, jugando un papel muy importante en el desarrollo de la acción patógena fúngica. La pared fúngica está compuesta básicamente de polisacáridos y proteínas. Entre los polisacáridos se destacan la quitina, los glucanos y mananos o galactomanano. Las proteínas generalmente están asociadas a polisacáridos formando glicoproteínas. Todos estos componentes están asociados entre sí dando lugar a una estructura rígida (Ponton, 2008).

❖ **Glicoproteínas.** Las proteínas representan el 30-50 % del peso seco de la pared fúngica en los hongos levaduriformes. La mayoría de las proteínas están asociadas a glúcidos por enlaces O o N, formando glicoproteínas. Las paredes celulares de *S. cerevisiae* y *C. albicans*, por ejemplo, contienen manoproteínas, que son glicosilados con cadenas ricas en manosa, conocidas como mananos. Las proteínas de la pared tienen diversas funciones, participan en el mantenimiento de la forma celular, intervienen en los procesos de adhesión (Alsp y Hwp1), protegen a la célula de sustancias extrañas, participan en la absorción de moléculas, transmiten señales al citoplasma, sintetizan y remodelan los componentes de la pared (Bowman y Free, 2006).

❖ **Quitina.** La síntesis de quitina está mediada por la enzima quitina sintasa. Es una enzima integral de membrana que cataliza la transferencia de N-acetilglucosamina a partir de uridina difosfato (UDP)-N- acetilglucosamina, a una cadena de quitina en crecimiento. El proceso de síntesis de quitina se produce principalmente en sitios de crecimiento activo y de remodelación de la pared celular. Para las levaduras, esto incluye áreas tales como el lugar donde se genera la gemación durante el crecimiento polarizado y el anillo de constricción durante citocinesis. En cuanto a su contribución a la composición de la pared, es la que se encuentra en menor cantidad (representa solo 1-2 % de la pared celular de la levadura en seco), pero estructuralmente su función es muy importante. La quitina

contribuye significativamente a la integridad global de la pared celular. Cuando la síntesis de quitina se interrumpe, la pared se desordena y la célula fúngica se vuelve osmóticamente inestable (Bowman y Free, 2006).

❖ **Glucanos.** Es el polisacárido estructural más importante de la pared y representa el 50-60 % del peso seco de esta estructura. La mayoría de los polímeros de glucano están compuestos de unidades de glucosa con uniones β -1,3 (65-90 %), aunque también hay glucanos con enlaces β -1,6 (en *Candida* pero no en *Aspergillus*), β -1,4-1,3 y -1,4. El β -1,3-D-glucano es el componente estructural más importante de la pared, al que se unen covalentemente otros componentes de esta estructura. El β -1,3-D-glucano se sintetiza por un complejo de enzimas situado en la membrana plasmática, denominadas β -1,3-D glucan sintasas. Estas enzimas catalizan la formación de cadenas lineales de glucano compuestas por aproximadamente 1.500 residuos de glucosa. En estas cadenas, cada 40-50 residuos de glucosa se unen nuevas unidades de glucosa por enlaces β -1,3 para dar lugar a una estructura ramificada. Estas ramificaciones pueden unirse a otros glucanos, a la quitina o a las manoproteínas, proporcionando a la pared una gran resistencia mecánica esencial para mantener la integridad celular (Bowman y Free, 2006).

La pared celular fúngica se encuentra en constante remodelación, los polímeros constitutivos se sintetizan constantemente, se modifican químicamente y se reordenan durante la biosíntesis de la pared. El crecimiento de la mayoría de las células fúngicas es polarizado, y este se genera mediante la coordinación entre el citoesqueleto, transporte intracelular y otros procesos intracelulares, que proporcionan la maquinaria biosintética de la pared celular, en los sitios de crecimiento activo. La regulación temporal y espacial de la maquinaria de la pared celular, incluyendo la β -1,3-D Glucan sintasa debe ser minuciosamente coordinado (Bowman y Free, 2006).

1.7.2 Complejo β -1,3-D glucan sintasa: *Subunidades proteicas Fksp* y *genes que las codifican.*

El complejo β -1,3-D glucan sintasa es responsable de la construcción de la pared celular fúngica, a través de la síntesis de β -glucanos. La subunidad catalítica de este complejo enzimático es una proteína transmembrana, que se caracterizó tanto en *S. cerevisiae* como en *C. albicans* o *Aspergillus fumigatus*. El complejo está formado por al menos 2 subunidades, Rho1p y Fksp. La actividad de la β -1,3-D glucan sintasa se encuentra regulada por el ciclo celular y está bajo el control del gen *RHO1*, que interactúa no solo

con las proteínas Fks sino con la proteína quinasa C (PKC), un regulador de la cascada MAP (*mitogen-activated protein*) y participantes de la vía mTOR (Kondoh *et al.*, 1997, Roh *et al.*, 2002). Los Fksp son el centro catalítico putativo del complejo (Sawistowska-Schroder *et al.*, 1984, Tang y Parr, Jr., 1991) y son codificados por 3 genes homólogos *FKS1*, *FKS2* y *FKS3* (Perlin, 2007).

Estudios realizados en *S. cerevisiae*, mostraron que el gen *FKS1* codifica un polipéptido de 1876 aminoácidos, cuyo peso fue calculado en 215 kDa. Mediante un análisis de hidropatía se predijo que el Fks1p es una proteína integral de membrana que presenta entre 14 y 16 hélices transmembrana, con un dominio que presenta un gran segmento citoplasmático. En el caso de Fks2, este fue deducido por su secuencia de ADN, ya que presenta un 88 % de identidad con respecto al Fks1p. El análisis hidropático reveló que Fks2p presenta un pliegue polipeptídico putativo similar a Fks1p, una proteína transmembrana integral con un dominio β -1,3-D-glucan sintasa flanqueado por dos dominios multi-transmembrana. En el caso del gen *FKS3*, este se identificó en la secuenciación sistemática del genoma de *S. cerevisiae*. Se realizó un estudio que consistió en el knock-out del gen *FKS3*, concluyendo que este sería un gen no esencial. El perfil de hidropatía de la proteína Fks3p deducida de su secuencia de ADN es similar a la de Fks1p y Fks2p. Su secuencia de aminoácidos mostró un 55 % de identidad con la de Fks1p y Fks2p. La función de Fks3p es actualmente poco clara (Liu y Balasubramanian, 2001).

C. glabrata es evolutivamente cercana a *S. cerevisiae* y su genoma incluye ortólogos sinténicos de *FKS1*, *FKS2*, y *FKS3* (Katiyar *et al.*, 2012). En el caso particular de *C. glabrata*, estudios anteriores demostraron que el complejo β -1,3-D-glucan sintasa tiene dos isoenzimas Fksp. Sin embargo, al estudiar la IC50 (medida bioquímica de la sensibilidad de una enzima a un inhibidor) y los perfiles cinéticos no revelaron la presencia de especies enzimáticas mixtas, lo que sugiere que las proteínas Fksp pueden formar una subunidad funcional catalítica multimérica (Fks1p y Fks2p) que se comporta como una sola entidad cinética. El *FKS3*, no parece jugar un papel en la acción de la β -1,3-D-glucan sintasa (García-Effron *et al.*, 2009a).

En *S. cerevisiae* y *C. albicans* se definieron, mediante secuenciación de los genes *FKS1*, regiones de aminoácidos que hoy se denominan regiones *hot spot*. La importancia del estudio de estas regiones está relacionada con el desarrollo de resistencia a equinocandinas. Dichas porciones de los Fksp son regiones conservadas en distintas

especies fúngicas y están formados por 9 aminoácidos cada uno. En *C. albicans* Fks1p presenta dos regiones: el *hot spot* 1 desde F641 a P649 y el *hot spot* 2 desde V1356 a L1364. En el caso de *C. glabrata* también fueron definidas las regiones *hot spot*, pero tanto en Fks1p como en Fks2p. En el Fks1p la región *hot spot* 1 va desde F625 a P633 y el *hot spot* 2 de D1340 a L1347. Mientras que en Fks2p la región *hot spot* 1 abarca desde F659 a P667 y la región *hot spot* 2 desde V1374 a L1381.

1.7.3 Funciones de los distintos FKS. Antecedentes científicos en *S. cerevisiae* y otras especies del género *Candida*.

Las vías de síntesis de β -1,3-D-glucanos han sido bien estudiadas en *S. cerevisiae* y *C. albicans*. En estas levaduras, Fks1p participa en la biosíntesis de β -1,3-D-glucanos en condiciones fisiológicas normales. Por otro lado, Fks2p se expresa cuando *FKS1* es deletado o cuando las levaduras crecen en ausencia de glucosa y en otras situaciones de estrés como por ejemplo altas temperaturas. La expresión de Fks2p es regulada de manera dual por la vía de la calcineurina y por la PKC (mTOR). Por último, la función de Fks3p es desconocida hasta el momento en todas las especies fúngicas estudiadas (Douglas *et al.*, 1997a, Heinisch *et al.*, 1999).

En *S. cerevisiae*, Fks1p tienen funciones primarias en el crecimiento vegetativo mientras que Fks2p está involucrado en la esporulación y formación de la pared. Sin embargo, las cepas defectivas en el gen *FKS1* son viables, aunque con defectos en el crecimiento, indicando que Fks1p y Fks2p serían parcialmente redundantes para el crecimiento vegetativo. En *C. albicans* esta redundancia parece no existir, ya que cepas defectivas homocigotas en el gen *FKS1* no son viables. En este sentido, *C. albicans* es similar a hongos como *A. fumigatus* y *Cryptococcus neoformans*, que codifican un único Fks1p esencial (Ha *et al.*, 2006, Thompson *et al.*, 1999)

Estas diferencias entre los complejos enzimáticos β -1,3-D-glucan sintasa de *C. glabrata* y los de las demás especies del género, justifican el estudio genético, funcional y de la regulación de la expresión de cada uno de las subunidades Fksp que lo conforman.

1.7.4 Antifúngicos inhibidores del complejo β -1,3-D-glucan sintasa: Equinocandinas.

Las equinocandinas son lipopéptidos que funcionan como inhibidores no competitivos de la β -1,3-D-glucan sintasa. Esta inhibición conlleva la reducción cuantitativa de β -

glucanos, lo cual genera la disrupción de la pared celular en formación, provocando la muerte celular por inestabilidad osmótica. CSF, ANF y MCF fueron aprobadas por la FDA para el tratamiento de candidiasis esofágica e invasiva, candidemias, como terapia empírica en pacientes neutropénicos febriles y como profilaxis en pacientes que se someten a trasplantes de células hematopoyéticas. Las equinocandinas son activas para la mayoría de las especies de *Candida*, sobre las cuales ejercen un efecto fungicida *in vitro*. En contraste, su efecto es fungistático sobre *Aspergillus* spp. Estas drogas, presentan un espectro de acción limitado, ya que son inactivas frente a *Mucormycetes*, *Cryptococcus* spp., y *Fusarium* spp.. Las equinocandinas presentan una baja toxicidad renal y hepática, y no exhibe interacciones con otras drogas. Su baja toxicidad se relaciona el hecho de que el complejo β -1,3-D-glucan sintasa, su target, es una enzima específica fúngica que no se encuentra en humanos (Perlin, 2015).

La resistencia a las equinocandinas es un fenómeno poco frecuente pero cada año aumenta el número de aislamientos con sensibilidad reducida a estos antifúngicos. Sin embargo, la prevalencia general sigue siendo baja en *C. albicans* (aproximadamente 2-3%) y la mayoría de las demás *Candida* spp. La excepción está dada por *C. glabrata* (Perlin, 2015). La alta frecuencia de aislamientos resistentes, se asocia con la preexposición a los antifúngicos. A nivel mundial la tasa de resistencia a las equinocandinas en *C. glabrata* aumentando de 2-3% a >13%. Esta situación es alarmante debido a que el aumento de resistencia a las equinocandinas en esta especie, va acompañado paralelamente con el incremento de resistencia a azoles, lo que da como resultados cepas multiresistentes, para las cuales las opciones terapéuticas quedan casi agotadas (Alexander *et al.*, 2013).

1.8 REDUCCIÓN EN LA SENSIBILIDAD A LAS EQUINOCANDINAS

Se han descrito múltiples mecanismos moleculares que reducen la sensibilidad a las equinocandinas en *S. cerevisiae* y *Candida* spp. Así por ejemplo, se comprobó que la vía de las MAP kinasas (PKC/mTOR) y otros genes participantes en las vías de integridad celular reducen hasta en 4 veces la sensibilidad a las equinocandinas (Reinoso-Martin *et al.*, 2003). Asimismo, se estableció que mutaciones en genes de las vías de biosíntesis de quitina, ergosterol y mananos, genes con funciones de transporte vacuolares, de control de la transcripción y de regulación de la calcineurina modificaban la sensibilidad a las equinocandinas (Markovich *et al.*, 2004). Todos estos mecanismos tienen el potencial de contribuir a la resistencia clínica, sin embargo, es importante distinguir entre estos bajos

niveles de reducción de la sensibilidad (tolerancia) y los altos niveles de resistencia que llevan a una falla en el tratamiento antifúngico.

1.8.1 Resistencia clínica: Mutaciones en regiones conservadas de los genes *FKS* denominadas *hot spots*.

El estudio de los mecanismos de acción y de resistencia a las equinocandinas comenzó en *S. cerevisiae* y *C. albicans*. En estas levaduras, se determinó que el Fks1p es la diana de las equinocandinas (Douglas *et al.*, 1994, Douglas *et al.*, 1997a). Estudios iniciales con mutantes espontáneos de *C. albicans* resistentes al N2-PnB0 (análogo de la CSF) demostraron que los mismos tenían valores de CIM 70 veces superiores que las cepas salvajes. Además, utilizando fracciones microsomales aisladas de dichos mutantes, se observó que estos tenían valores de IC₅₀ (medida bioquímica de la sensibilidad de una enzima a un inhibidor) hasta 1000 veces mayores que los complejos aislados de las cepas salvajes. Así se demostró que la resistencia a las equinocandinas está relacionada con una alteración en un componente de dicha fracción microsomal (Kurtz y Douglas, 1997). Estos mutantes fueron estudiados genéticamente y se confirmó que Fks1p es la diana de las equinocandinas y que sustituciones de amino ácidos en dicha proteína podrían alterar la interacción diana-droga produciendo el fenotipo de resistencia (Douglas *et al.*, 1997a, Kurtz y Douglas, 1997). Al secuenciar los genes *FKS1* de estas cepas, se definió las regiones de aminoácidos que hoy se denominan regiones *hot spot*. La realización de un mapa topológico de las regiones *hot spot* mutadas de Fks1p indica, que las sustituciones de aminoácidos ocurren cerca de la superficie de la membrana extracelular dentro de los segmentos transmembrana 6 y 7 (Johnson y Edlind, 2012). Dependiendo de donde tienen lugar las sustituciones dentro del *hot spot* de los *FKS*, es el rango de fenotipos que se observa clínicamente. Esto se correlaciona con la modificación de la interacción droga-target, resultando en una cinética de inhibición alterada (IC₅₀). Es decir, cuanto más cerca del extremo N-Terminal del *hot spot* se de la mutación mayor será el fenotipo de resistencia clínica. Las sustituciones en estas regiones tienen una relación directa y estricta con las fallas terapéuticas a las equinocandinas (Garcia-Effron *et al.*, 2009b). Garcia-Effron *et al* publicaron trabajos sobre los mecanismos de resistencia de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* y *C. orthopsilosis* a las equinocandinas y estudiaron los complejos β-1,3-D-glucan sintasa de estas especies

(Garcia-Effron *et al.*, 2008a, Garcia-Effron *et al.*, 2008b, Garcia-Effron *et al.*, 2009a, Garcia-Effron *et al.*, 2009b). Los mismos presentaron las siguientes características comunes: las mutaciones en los *hot spots* de *FKS1* son las responsables de los fenotipos de resistencia a las equinocandinas. Cuando Fks1p presentaba sustituciones de aminoácidos en los *hot spots*, los complejo β -1,3-D-glucan sintasa presentaban reducciones en su velocidad de catálisis (menores V_{max}) que significaban una reducción del contenido de β -1,3-D-glucanos en la pared. Este déficit de β -1,3-D-glucanos es compensado por un aumento de expresión de *FKS2*.

En 2008, Cleary *et al.* describieron por primera vez la existencia de mutaciones en el gen *FKS1* de *C. glabrata* y su vinculación con el fenotipo de resistencia clínica a las equinocandinas (Cleary *et al.*, 2008). Posteriormente, en 2009, describieron 11 mutaciones nuevas responsables de resistencia a las equinocandinas y distribuidas en las regiones *hot spots* de *FKS1* y *FKS2* de *C. glabrata* (Garcia-Effron *et al.*, 2009a). Así, se desestimó la idea inicial de que la subunidad Fks2p de *C. glabrata* es funcionalmente equivalente al Fks1p de *S. cerevisiae* y *C. albicans*. Además, los complejos β -1,3-D-glucan sintasa de estas cepas resistentes fueron aislados y estudiados bioquímicamente.

1.8.2 Tolerancia: vías metabólicas involucradas y mecanismos de compensación celular

La pared celular fúngica es una estructura dinámica que cambia durante el crecimiento y desarrollo, requiriendo la remodelación del entrelazado de 1,3 y β -1,6-D glucanos. Debido a que la pared celular es crítica para la supervivencia de la célula fúngica, drogas como las equinocandinas que alteran la integridad de la pared, generan un significativo estrés celular. En respuesta a esto, los hongos poseen un repertorio de mecanismos de respuesta adaptativo que los protegen contra tales situaciones de estrés que desestabilizan su medioambiente (Perlin, 2007). Las equinocandinas inducen la expresión de un grupo de genes, encargados de mantener la integridad de la pared y su arquitectura, a través de la vía de señalización celular mediada por la PKC (parte de la vía mTOR). Las señales de estrés como la inhibición de la biosíntesis de β -1,3-D-glucanos por las equinocandinas, son censadas en la superficie celular por la GTPasa Rho1p. Esta enzima induce: la PKC, la vía Ca^{+} /calcineurina/Crz1 (factor de transcripción crazy), los genes *HOG* (high osmolarity glicerol, glicerol de alta osmolaridad) y la Hsp90 (Perlin, 2015, Reinoso-Martin *et al.*, 2003). Esto permite la tolerancia a las equinocandinas a través de su proteína cliente (client protein) calcineurina, Mkc1 y su chaperona Sgt1 (Singh *et al.*, 2009). La

acción de este grupo de drogas induce además, aumentos compensatorios en la síntesis de quitina, los cuales permiten mantener la integridad estructural de la pared celular. La quitina reemplaza los β -1,3-D-glucanos, por lo que disminuye la sensibilidad a la droga. Estos aumentos compensatorios de quitina son coordinados por las vías de señalización PKC, HOG y calcineurina.

Para la mayoría de las especies de *Candida* spp. la activación de Chs2p y Chs8p (quitina sintetasas 2 y 8) permite la supervivencia de las levaduras en la presencia de niveles fungicidas de equinocandinas (Munro *et al.*, 2007). En *C. glabrata*, Slt2p (último proteína de la cascada de señalización celular por PKC), controla los niveles de quitina en respuesta a las equinocandinas (Cota *et al.*, 2008). En estudios previos donde cepas de *C. glabrata* fueron expuestas a diferentes concentraciones de CSF, no se evidenció aumento de quitina como si ocurre en otras especies de *Candida* spp. En general, las respuesta celulares adaptativas al estrés estabilizan la célula en presencia de la droga, lo cual le da tiempo a las células para generar mutaciones en las regiones *hot spot* de los genes *FKS* y de esa manera escapar de la acción de las equinocandinas (**Figura 9**) (Walker *et al.*, 2013).

1.8.3 Dificultades para la detección *in vitro* de la resistencia a equinocandinas

Los métodos de evaluación de la sensibilidad *in vitro* a las equinocandinas han sido estandarizados y son utilizados en distintos laboratorios del mundo. Sin embargo, desde que se comenzó a estudiar la sensibilidad *in vitro* a estos antifúngicos, se pudo observar que no existía una correlación estricta entre los fallos terapéuticos *in vivo* y el aumento de los valores de CIM. Esto fue confirmado cuando Kartsonis *et al.* demostraron que los valores de CIM elevados para CSF no predicen una resistencia *in vivo* (Kartsonis *et al.*, 2005). Esto se debe a la existencia de los mecanismos de adaptación de los hongos (mecanismos de respuesta al estrés) que elevan los valores de CIM *in vitro* pero no influyen en la evolución clínica de un paciente bajo tratamiento. Por el contrario, los mecanismos de resistencia son aquellos que se relacionan directamente con un fallo terapéutico, altos niveles de resistencia a las equinocandinas en modelos animales, IC₅₀ elevadas y mutaciones en las regiones *hot spots* de *FKS1* (Perlin, 2007).

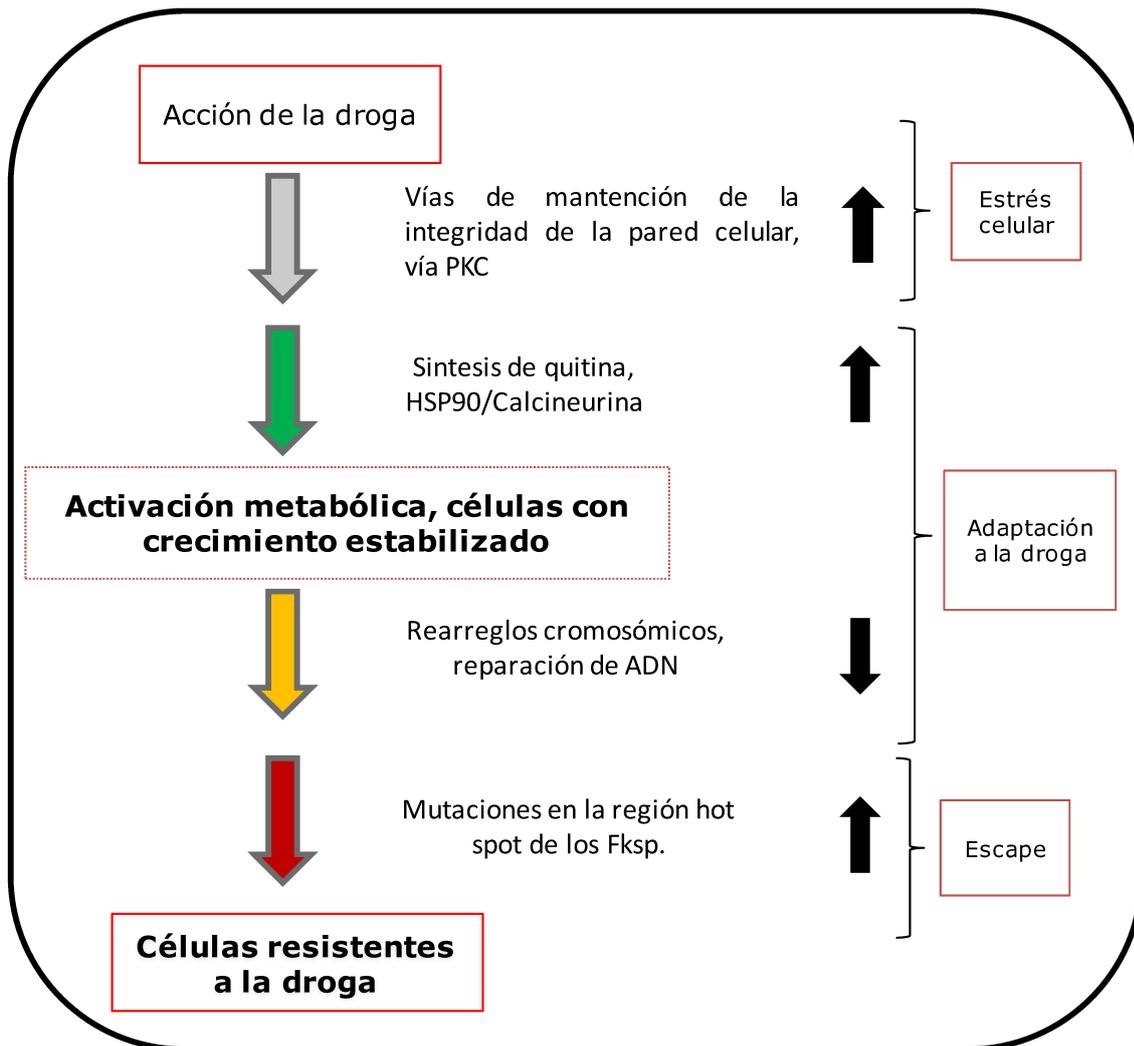


Figura 9.- Esquema de los estados críticos en la evolución de la generación de resistencia a las equinocandinas luego de su exposición. (Modificado de Perlin, 2015).

El CLSI y el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), establecieron métodos de referencia de microdilución para evaluar la sensibilidad a las equinocandinas en *Candida* spp. En 2012, el CLSI modificó los puntos de corte para las equinocandinas, lo que favoreció la detección de cepas de *C. glabrata* resistentes. Sin embargo, estos métodos tienen varias limitaciones: el tiempo y el alto costo que insumen, el hecho de que las equinocandinas como droga estándar pura (indispensables para el CLSI o métodos EUCAST) no se encuentran todas disponibles en el mercado, la variabilidad interlaboratorio que presentan los resultados, la existencia de superposición de valores de sensibilidad *in vitro* entre poblaciones sensibles y resistentes y la necesidad de esperar al menos 24 h para la obtención de resultados.

Todas las limitaciones descritas de los métodos estandarizados junto con la estricta relación existente entre mutaciones en las regiones *hot spot* de los genes *FKS* y la resistencia clínica a las equinocandinas, permitirían utilizar la detección de estas mutaciones como marcadores diagnósticos alternativos.

1.9 IDENTIFICACIÓN DE *C. nivariensis* Y *C. bracarensis*.

Contrariamente a lo que sucede con la mayoría de las especies de *Candida* asociadas a infecciones humanas, *C. glabrata* no produce pseudohifas incluso en condiciones patogénicas (Vandeputte *et al.*, 2008). Esto podría representar una limitación para el diagnóstico, ya que, contrariamente a la mayoría de las especies patógenas de *Candida*, la colonización y la infección no pueden ser diferenciadas por el solo resultado de un examen directo y cultivo. Esta característica es un factor común en las tres especies patógenas humanas que conforman el clado *Nakaseomyces* (Alcoba-Florez *et al.*, 2005, Correia *et al.*, 2006).

En medio Sabouraud a una temperatura de incubación de 37 °C, *C. glabrata*, *C. nivariensis* y *C. bracarensis*, se desarrollan en forma de colonias blancas y cremosas, similares a la mayoría de especies de *Candida*. Las tres especies del complejo *C. glabrata* se reproducen por gemación, siendo las células pequeñas (3-4,5µm) subglobosas u ovoidales.

Desde la descripción del complejo *C. glabrata* algunos autores proponen metodologías de diferenciación en base a las características de color y morfología de colonias (Alcoba-Florez *et al.*, 2005, Bishop *et al.*, 2008, Lockhart *et al.*, 2009). Sin embargo, estos métodos no resultan 100 % específicos, ya que algunos resultados se superponen. Por ejemplo, Bishop *et al.* en su estudio propusieron la utilización del medio CHROMAgar *Candida*® para distinguir *C. glabrata sensu stricto* que se desarrolla formando colonias violetas de *C. nivariensis* y *C. bracarensis* que producen colonias blancas. Sin embargo, existen cepas de *C. glabrata sensu stricto* que pueden producir también colonias blancas (Bishop *et al.*, 2009). Una situación similar tiene lugar con los paneles comerciales de identificación, los cuales no incluyen a las nuevas especies del clado *Nakaseomyces* en su base de datos. Esto conlleva a identificaciones erróneas como se ha demostrado por ejemplo en el caso del sistema ID32 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), en el cual la especificidad puede ser un problema ya que se identifica erróneamente *C. nivariensis*

como *Zygosaccharomyces* sp. o como en el caso de Auxacolor 2, un test colorimétrico de asimilación de azúcares donde se identifica *C. nivariensis* como *Candida inconspicua* (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) (Wahyuningsih *et al.*, 2008). Por otro lado existe un test rápido de reducción de trealosa como es el RTT Test (Fumouze Diagnostics, Levallois-Perret, France), específicos de *C. glabrata*. No obstante, se han reportado resultados positivos con el RTT Test para aislamientos de cepas de *C. nivariensis*. Lo que sugiere que esta prueba bioquímica también puede carecer de especificidad para la diferenciación entre *C. glabrata* y *C. nivariensis*. Con estos datos, se puede concluir que no existen métodos fenotípicos capaces de diferenciar inequívocamente estas especies (Bishop *et al.*, 2012). Las diferencias reportadas en la virulencia y en la sensibilidad a los antifúngicos entre las especies de este complejo (Borman *et al.*, 2015, Kaur *et al.*, 2007, Swoboda-Kopec *et al.*, 2014) impulsaron el diseño de diversas metodologías moleculares para identificarlos (Cornet *et al.*, 2011, Enache-Angoulvant *et al.*, 2011, Ghosh *et al.*, 2015, Gorton *et al.*, 2013, Mirhendi *et al.*, 2011, Pinto *et al.*, 2011, Telleria *et al.*, 2012) como por ejemplo, la hibridación *in situ* utilizando sondas específicas para *C. nivariensis* y *C. bracarensis* (Bishop *et al.*, 2008, Pinto *et al.*, 2011), la identificación molecular secuenciando directamente el locus ITS o la región D1/D2 del ADN ribosomal (Alcoba-Florez *et al.*, 2005, Bishop *et al.*, 2008, Borman *et al.*, 2008, Cornet *et al.*, 2011, Lockhart *et al.*, 2009, Pinto *et al.*, 2011, Romeo *et al.*, 2009) o la utilización de polimorfismos de la longitud de un fragmento amplificado que codifica el gen RPL31 (Angoulvant *et al.*, 2016). Durante la última década el Matrix Assisted LASER Desorption/Ionization – Time of Flight (MALDI-TOF) emergió como una herramienta poderosa para la identificación de aislamientos fúngicos clínicos, incluso aquellos estrechamente relacionados, o pertenecientes al mismo complejo. Ahora, *C. glabrata*, *C. nivariensis* y *C. bracarensis* están incluidos en las bases de datos de los fabricantes de espectrómetros de MALDI-TOF y se pueden identificar de forma segura (Ferroni *et al.*, 2010, Lacroix *et al.*, 2014, Pinto *et al.*, 2011).

Cada uno de estos métodos tiene sus ventajas y desventajas, y ninguno es ideal en términos de costos y/o velocidad. Por esta razón se propone la necesidad de generar técnicas basadas en biología molecular que permitan diferenciar *C. glabrata sensu stricto*, de *C. nivariensis* y *C. bracarensis*, de manera rápida, barata, robusta y altamente reproducible.

OBJETIVOS

2.- OBJETIVOS

Objetivos generales

1- Conseguir evidencias genéticas y bioquímicas de la forma en que se sintetiza la pared celular en *Candida glabrata* para contar con la base teórica para el diseño de antifúngicos efectivos.

2- Obtener métodos rápidos, sensibles y específicos de detección de la resistencia a las equinocandinas.

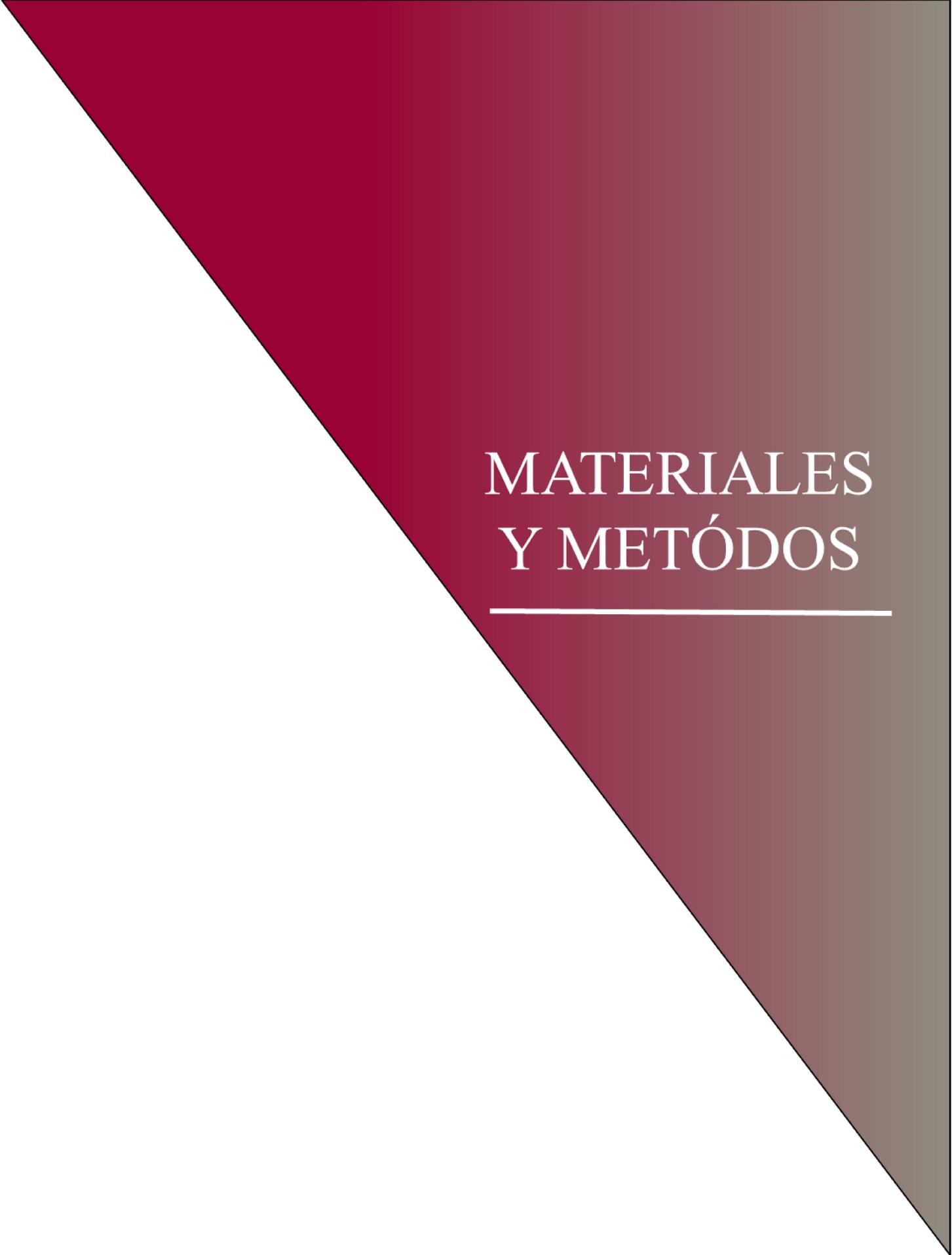
Objetivos específicos

1- Obtener cepas de *Candida glabrata* defectivas en los genes *FKS1*, *FKS2* y *FKS3* para determinar la participación de cada uno de ellos en la resistencia a las equinocandinas y en la regulación de la síntesis de la pared celular fúngica.

2- Establecer la función de las vías de compensación celular en los efectos de las alteraciones funcionales del complejo 1,3- β -D-glucan sintasa en *C. glabrata*.

3- Generar herramientas moleculares de diagnóstico de la resistencia a las equinocandinas en *C. glabrata* y *C. albicans*.

4- Establecer una técnica capaz de diferenciar las especies crípticas del complejo *C. glabrata*.



MATERIALES
Y METÓDOS

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 **MICROORGANISMOS UTILIZADOS**

3.1.1 Cepas del complejo *Candida glabrata*

Se utilizaron 216 cepas pertenecientes al complejo *C. glabrata*. Dentro de esta colección, se incluyen 196 cepas aisladas en diferentes ciudades de Argentina: Santa Fe, Rosario, Buenos Aires y Paraná. Todos estos aislamientos fueron agentes causales de enfermedad fúngica probada (candidiasis vaginal, candidemia, aisladas de líquidos de punción). Las 20 cepas restantes de esta colección fueron cedidas por el Dr. David Perlin del Public Health Research Institute (PHRI; Rutgers University, NJ), y aisladas, en su totalidad, de pacientes con enfermedad fúngica invasora probada. Estas últimas cepas presentan mutaciones en la región *hot spot* de los genes *FKS1* o *FKS2*, a excepción de una identificada como *C. nivariensis*. **Tabla 2.**

3.1.2 Cepas de *Candida albicans*

En este estudio se utilizaron 50 cepas de *C. albicans*, de las cuales, 37 forman parte de la colección de cultivos del Laboratorio de Micología y Diagnóstico Molecular, aportadas por el hospital José María Cullen (Santa Fe, Argentina), mientras que las 13 restantes fueron cedidas por el Public Health Research Institute (PHRI; Rutgers University, NJ). Todas las cepas del PHRI, presentan mutaciones en la región *hot spot* 1 o 2 del gen *FKS1* y fueron aisladas, de pacientes con enfermedad fúngica invasora probada. **Tabla 3.**

Tabla 2.- Cepas del complejo *C. glabrata* utilizadas en el estudio experimental.

n	Organismo ^a	Genotipo ^b	Origen ^c	Utilizadas para:
1	<i>C. glabrata ss</i>	F659del HSP1 <i>FKS2</i>	PHRI	Set PCR de diagnóstico
3	<i>C. glabrata ss</i>	F659S HSP1 <i>FKS2</i>		
		F659Y HSP1 <i>FKS2</i>		
		F659V HSP1 <i>FKS2</i>		
4	<i>C. glabrata ss</i>	V1352F HS2 <i>FKS1</i> -S663P HS1 <i>FKS2</i>		
		W645stop HS1 <i>FKS1</i> -S663P HS1 <i>FKS2</i>		
		S663P HS1 <i>FKS2</i>		
		S663P HS1 <i>FKS2</i>		
1	<i>C. glabrata ss</i>	S663F HS1 <i>FKS2</i>		
2	<i>C. glabrata ss</i>	D666G HS1 <i>FKS2</i>		
		D666E HS1 <i>FKS2</i>		
1	<i>C. glabrata ss</i>	L664R HS1 <i>FKS2</i>		
1	<i>C. glabrata ss</i>	P667T HS1 <i>FKS2</i>		
1	<i>C. glabrata ss</i>	W1375L HS2 <i>FKS2</i>		
3	<i>C. glabrata ss</i>	D632G HS1 <i>FKS1</i>		
		D632E HS1 <i>FKS1</i>		
		D632Y HS1 <i>FKS1</i> - R1377stop HS2 <i>FKS2</i>		
1	<i>C. glabrata ss</i>	F625S HS1 <i>FKS1</i>		
1	<i>C. glabrata ss</i>	S629P HS1 <i>FKS1</i>		
192	<i>C. glabrata ss</i>	WT ^c	HRM	PCR de Identificación
			CEREMIC	
			LMDM	
2	<i>C. bracarensis</i>	WT ^b	LMDM	
3	<i>C. nivariensis</i>	WT ^b	LMDM	
			PHRI ^a	

^a *C. glabrata ss*: *C. glabrata sensu stricto*.

^b HS: hot spot. wt: Wild Type.

^c PHRI: Public Health Research Institute. HRM: Laboratorio de Micología del Hospital Ramos Mejía de Buenos Aires. CEREMIC: Centro de Referencia de Micología. Rosario (Santa Fe). LMDM: Laboratorio de Micología y Diagnóstico Molecular (UNL-CONICET).

Tabla 3.- *Candida albicans* utilizadas en el estudio experimental.

n	Organismo	Genotipo ^a	Origen ^b	Utilizadas para:
37	<i>C. albicans</i>	WT	LMDM	Set de PCR de diagnóstico
1	<i>C. albicans</i>	F641L HS1 <i>FKSI</i>	PHRI	Set de PCR de diagnóstico
2	<i>C. albicans</i>	F641S HS1 <i>FKSI</i>		
2	<i>C. albicans</i>	S645P HS1 <i>FKSI</i>		
1	<i>C. albicans</i>	S645S/P HS1 <i>FKSI</i>		
2	<i>C. albicans</i>	S645F HS1 <i>FKSI</i> - R1361R/H		
2	<i>C. albicans</i>	S645F HS1 <i>FKSI</i>		
1	<i>C. albicans</i>	S645Y HS1 <i>FKSI</i>		
1	<i>C. albicans</i>	P649H HS1 <i>FKSI</i>		
1	<i>C. albicans</i>	D648Y HS1 <i>FKSI</i>		
2	<i>C. albicans</i>	R1361R/H HS2 <i>FKSI</i>		
1	<i>C. albicans</i>	R1361H HS2 <i>FKSI</i>		

^aHS: *hot spot*. wt: Wild Type.

^b PHRI: Public Health Research Institute. LMDM: Laboratorio de Micología y Diagnóstico Molecular (UNL-CONICET).

3.1.3 Cepas control y de la colección Americana de Cultivos Tipo ATCC (American Type Culture Collection).

Las cepas de control utilizadas en las distintas técnicas fueron: *C. glabrata* ATCC 90030, *C. glabrata* BG14 deficiente en el gen *URA3* (Δ *URA*) que proviene de la cepa ATCC 90030 (Cormack *et al.*, 1999), *C. albicans* ATCC 90028, *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis sensu stricto* ATCC 22019. En el caso particular de las cepas *C. nivariensis* y *C. bracarensis* utilizadas para la puesta a punto de la herramienta molecular de identificación, sus ITS fueron secuenciados y comparados con los de las cepas *C. nivariensis* CBS 9983 y *C. bracarensis* CBS 10154, respectivamente.

3.1.4 Cepas de Escherichia coli

La cepa de *E. coli* Top 10 (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina), se utilizó para propagar el plásmido pGEM[®]-T Easy Vector en el que se insertaron los distintos fragmentos de ADN amplificados por PCR. La cepa Top 10, esta modificada genéticamente presentando mutaciones en los genes *recA*, *endA* y *hsd*. La mutación en la endonucleasa (*endA*) mejora la calidad del ADN obtenido, ya que se elimina la actividad endonucleasa

inespecífica, mientras que la mutación de *recA* provoca una deficiencia en la recombinación, mejorándose así la estabilidad del inserto. La mutación *hsdR17*, protege de la digestión al ADN clonado por un sistema endógeno de endonucleasas (EcoK). Estas características genéticas le confieren ciertas ventajas para su utilización en técnicas moleculares de clonaje y propagación básicas. Además, es portadora del gen *lacIqZΔM15*, que permite la selección de plásmidos recombinantes por el método de selección por color.

3.2 PLÁSMIDOS Y VECTORES

Los fragmentos de ADN amplificados por PCR se clonaron en el plásmido pGEM-T[®] easy vector que permite individualizar y amplificar el ADN en grandes cantidades a partir de la transformación de células competentes. Estas células presentan la ventaja de ser fáciles de conservar tanto a 4 °C (corto plazo) como congeladas a – 80 °C (a largo plazo).

3.2.1 Plásmido pGEM-T[®] easy vector

Este sistema de clonaje comercial (Promega, Buenos Aires, Argentina) se utilizó para clonar y amplificar los distintos fragmentos de ADN obtenidos por PCR. El vector pGEM-T[®] Easy Vector está preparado mediante digestión con la enzima de restricción EcoRI y adición de una timidina terminal en ambos extremos 3'. Esto evita la recircularización del vector y mejora notablemente la eficacia de ligación de los fragmentos de PCR, puesto que la mayoría de las polimerasas termoestables agregan una deoxiadenosina al extremo 3' de los fragmentos amplificados. El pGEM-T[®] Easy Vector posee un segmento de clonaje múltiple con sitios de corte para diversas enzimas que sirve además, para dividir la región codificante del péptido α de la enzima β -galactosidasa (**Figura 10**). Esta característica permite seleccionar los clones recombinantes en los que se produce la inactivación de este gen por la inserción del fragmento clonado. La selección de colonias que contienen plásmido con inserto se realiza directamente por diferencias de color en placas que contienen el indicador X-gal (Sigma-Aldrich Química, Argentina). Este vector contiene promotores de ARN polimerasa T-7 y SP-6 flanqueando la región de clonaje múltiple. A partir de estos promotores se diseñaron oligonucleótidos que permiten secuenciar el fragmento clonado. Este vector posee, además, un gen que codifica una β -lactamasa que proporciona resistencia a ampicilina que se utiliza como antibiótico para la selección de colonias.

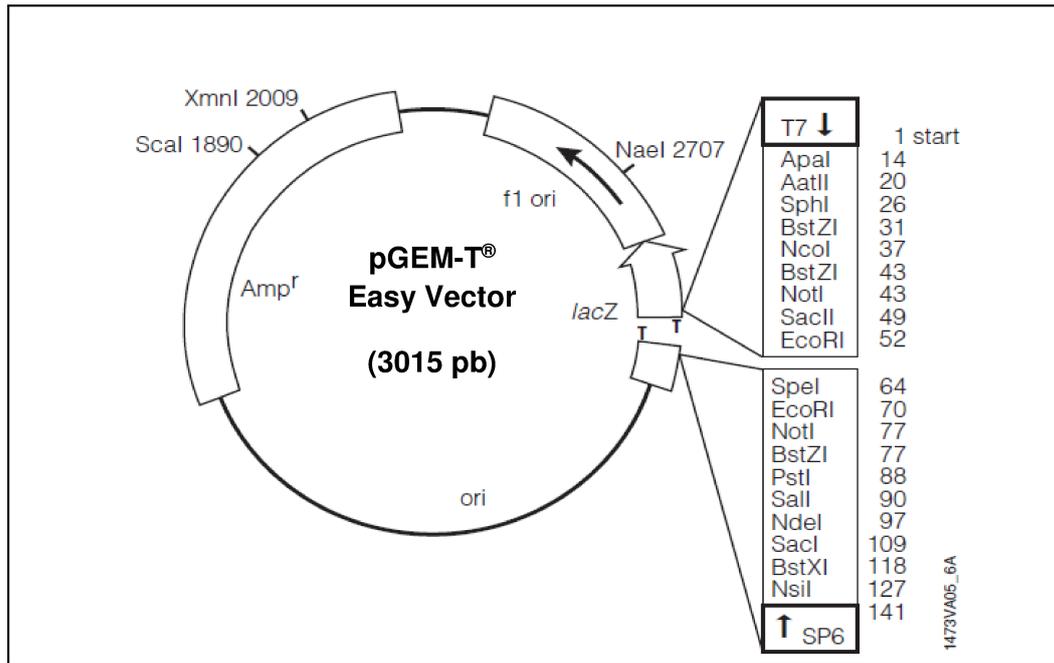


Figura 10.- Mapa del pGEM-T® easy vector y puntos de referencia en la secuencia. (Modificado de Promega).

3.2.2 Vectores Fúngicos

Las modificaciones genéticas de *C. glabrata sensu stricto* se realizaron utilizando vectores con ADN clonado en el plásmido descrito anteriormente. Estos vectores, se conservaron hasta su posterior utilización, como plásmidos incorporados a cepas bacterianas (*E. coli* Top 10).

❖ Plásmido LMDM P-56

Es un plásmido PGEMT-easy® que contiene en su polilinker una construcción génica formada por el gen *URA3* de *S. cerevisiae* sin su promotor, flanqueado por las regiones 5'UTR (-1200 nt a -1 upstream del codón de inicio) y 3'UTR (+1 a +1000 downstream del codón STOP de *FKS1*) del gen *FKS1* de *C. glabrata sensu stricto*. Este vector fue utilizado para lograr la delección total del gen *FKS1* de *C. glabrata* luego de las transformaciones. Esta construcción se obtuvo utilizando la técnica PRODIGE, la cual se describe en el punto 3.5.7.2. (**Figura 11A**).

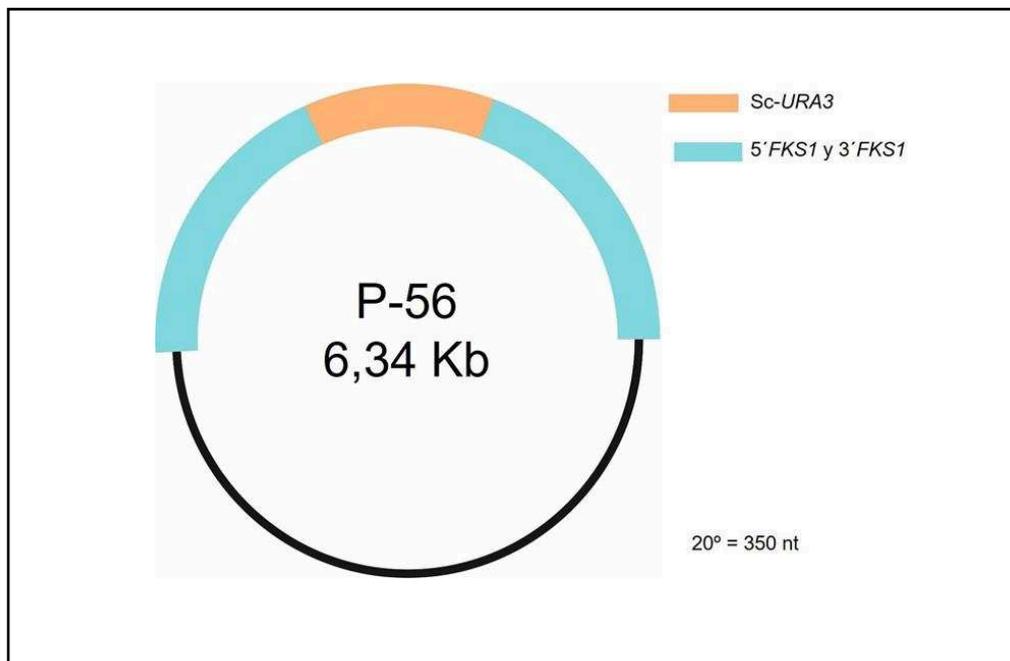
❖ Plásmido LMDM P-40

Es un vector con la misma base que el anterior que incluye el gen *URA3* de *C. glabrata* con su promotor, rodeado por las regiones 5' y 3' UTR (-1000 pb y +1000 pb) del gen *FKS2* de *C. glabrata sensu stricto*. La delección total del gen *FKS2* se logró transformando *C. glabrata sensu stricto* con esta construcción, que se obtuvo utilizando la técnica de PCR de fusión, descrita en el punto 3.5.7.3. (**Figura 11 B**).

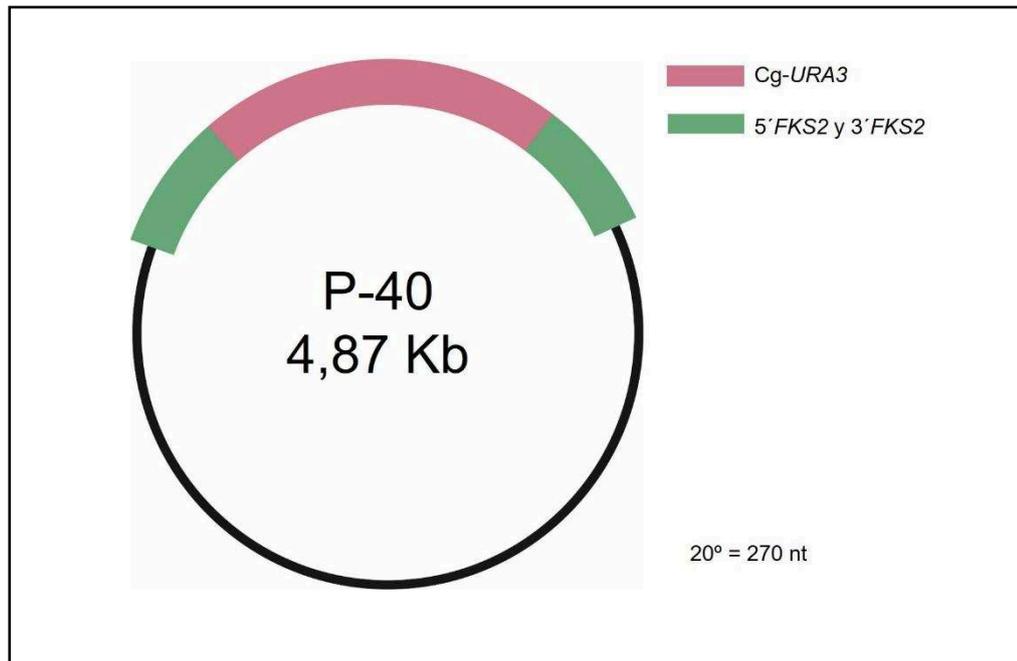
❖ Vector LMDM P-36

Es un vector derivado de la clonación en PGEMT-easy® de una construcción génica formada por el gen *URA3* de *C. glabrata* con su promotor, flanqueado por 2 regiones del gen *FKS3* de *C. glabrata sensu stricto* (nt. 1271 a 1768 en el extremo 5' y desde el nt. 4012 a 4487 en el extremo 3'). Esta construcción fue utilizada para lograr el knockin del gen *FKS3* de *C. glabrata sensu stricto* luego de las transformaciones. Esta construcción se obtuvo utilizando la técnica de digestión con enzimas de restricción, descrita en el punto 3.5.7.4. (**Figura 11 C**).

(Figura 11A)



(Figura 11B)



(Figura 11C)

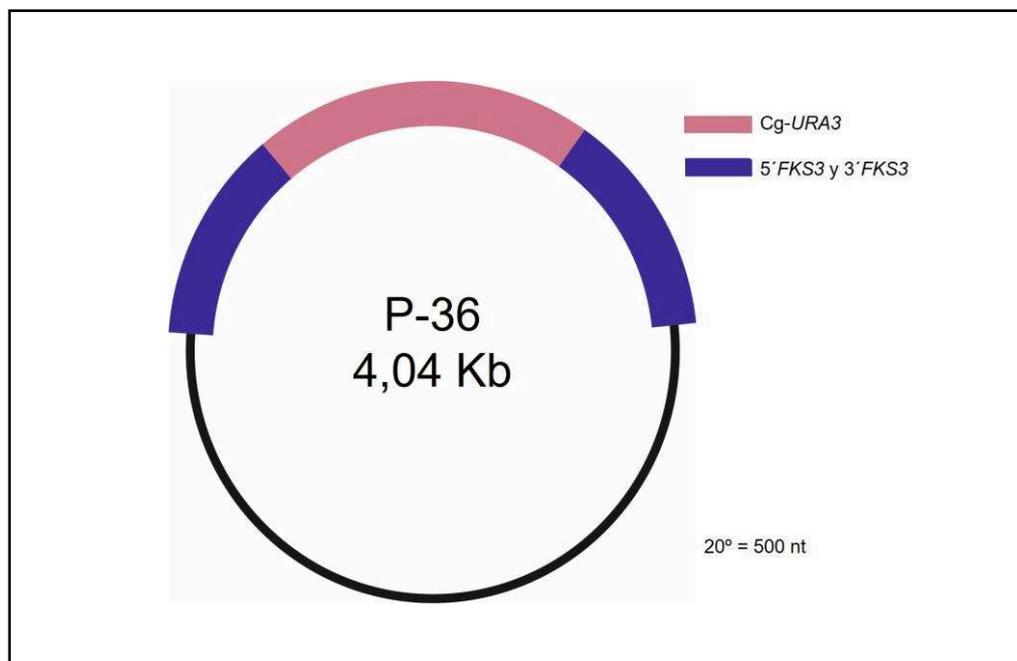


Figura 11.- Esquema de vectores de clonación utilizados para la generación de cepas de *C. glabrata* defectivas en genes *FKS*. A) LMDM P-56. *URA3 Sc*: gen *URA3* de *S. cerevisiae*. B) LMDM P-40. *URA3 Cg.*: gen *URA3* de *C. glabrata* C) LMDM P-36. *URA3 Cg.*: gen *URA3* de *C. glabrata*.

3.3 MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

3.3.1 Medios de cultivo para levaduras

3.3.1.1 CHROMAgar™ Candida

Medio cromogénico para el aislamiento y diferenciación de las especies más importantes del género *Candida*. Se pesaron 47,7 g de medio para un volumen de 1000 ml de agua destilada estéril. Se llevó a ebullición en microonda y se comprobó la transparentización del medio. Se enfrió a baño maría a 50 °C y se fraccionó en placas de Petri que se guardaron a 4 °C hasta su utilización.

3.3.1.2 Dextrosa -Peptona- Extracto de Levaduras (YPD)

Este medio contiene peptona como fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales. El extracto de levadura funciona como fuente de nitrógeno mientras que la dextrosa es la fuente de hidratos de carbono. La composición es la siguiente:

- Peptona de carne o pluripeptona 20 g
- Extracto de levadura 10 g
- Glucosa 20 g
- Agua destilada 1000 ml

Para YPD solido: agregar 15 g de agar

Se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 min.

3.1.1.3 Nitrógeno base para auxotrofia (YNB)

Es un medio de cultivo de referencia utilizado para el desarrollo de levaduras, rico en nutrientes como: nitrógeno, vitaminas, oligoelementos y sales. Se utiliza para la clasificación de levaduras sobre la base de los requerimientos de carbono y aminoácidos. Su composición es la siguiente:

- Yeast Nitrogen Base (YNB) 0,17 g
- Sulfato de amonio (SO₄NH₄) 0,5 g
- Glucosa 2 g
- Agua destilada 100 ml

Para YNB sólido: agregar 1,5 g de agar

Se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 min.

3.3.1.4 Sabouraud glucosa

Medio utilizado para el aislamiento, identificación y conservación de hongos patógenos y saprófitos. También es útil para el cultivo de levaduras. El alto contenido de glucosa, la presencia de cloranfenicol y el pH ácido, favorecen el crecimiento de hongos por sobre el de bacterias. Para la elaboración del medio Agar Sabouraud Glucosado (Laboratorios Britania S.A, Buenos Aires. Argentina) se pesaron 65 g y se disolvieron completamente en 1000 ml de agua destilada, esta solución se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 min.

3.3.2 Medio de cultivo para *E. coli*

3.3.2.1 Luria-Bertani (LB).

Este medio se utilizó en el crecimiento de *E. coli* para extracción de ADN plasmídico. Su composición es la siguiente:

- Tripteina Bacteriológica 1,0 g
- Extracto de Levadura 0,5 g
- Cloruro de sodio 0,5 g
- Agua destilada 100 ml

Para LB sólido: agregar 1,8 % (p/v) de agar

Para LB-GLUCOSA: agregar 2 % (p/v) de glucosa

Se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 min.

Cuando fue necesario se añadió ampicilina (Sigma Aldrich, Argentina) en una proporción de 0,5 µl de solución stock de ampicilina (200 mg/ml) por ml de LB.

Solución stock de Ampicilina

- Ampicilina 1 g
- Agua destilada estéril 5 ml

3.3.3 Soluciones

3.3.3.1 Buffer de extracción de ADN fúngico

- Tris-HCl pH=7,5 (1M) 20 ml
- NaCl 2,92 g
- EDTA pH =8 (0,5M) 20 ml
- SDS 1g

Enrasar a 100 ml con agua destilada

3.3.3.2 Buffer T.E. pH 7,5

- Tris-HCl a pH 7,5 10 mM
- EDTA a pH 8,0 50 mM

3.3.3.3 Buffer de carga para electroforesis de ADN

Este tampón se utilizó para depositar la muestra en los pocillos de los geles de agarosa antes de realizar las electroforesis.

- Azul de Algodón 0,25 %
- Glicerol 30 %
- Agua destilada estéril 69,75 %

El tampón se fraccionó en tubos eppendorf y se almacenó a – 20 °C. Este reactivo se utilizó en una proporción de 1 µl de tampón de carga por cada 3 µl de muestra.

3.3.3.4 Buffer de electroforesis: tris acetato EDTA (T.A.E.)

Este tampón se utilizó para realizar las electroforesis de ADN en una concentración de 1 X. La solución madre (50 X) se preparó de la siguiente manera:

- Tris Base 24,2 g
- Ácido Acético 5,71 ml
- EDTA pH =8 (0,5M) 10 ml
- SDS 1 g

Enrasar a 100 ml con agua destilada

3.3.3.5 Soluciones de Isopropyl B-D-Thiogalacto-pyranoside 200mg/ml (IPTG) y 5-Bromo-4-Cloro-3-Idol-β-D-Galactósido (X-GAL) de 20mg/ml.

El IPTG (Sigma) y el 5-Bromo-4-Cloro-3-Indol-β-D-galactósido (X-Gal) (Sigma), se utilizaron como indicadores de la integración de un fragmento de ADN en los plásmidos de pGEM-T[®] Easy Vector. La solución de IPTG se preparó pesando 250 mg que se disolvieron en 1,25 ml de agua destilada estéril. La solución obtenida se esterilizó por filtración utilizando filtros millipore de 0,22 µm de diámetro (Millipore Corporation). El X-Gal se disolvió en 1 ml de dimetil formamida para obtener una concentración de 20 mg/ml. Estas soluciones se fraccionaron y se guardaron a – 20 °C.

3.3.3.6 Soluciones para la extracción de ADN de plásmidos

❖ Solución I

- Glucosa (2 M) 2,5 ml
- Tris-HCl pH 7,5 (1 M) 2,5 ml
- EDTA pH 8 (0,5 M) 2 ml

Enrasar a 100 ml con agua destilada estéril

Se esterilizó a vapor fluente 15 min.

❖ Solución II

- NaOH (10 M) 2 ml
- SDS 10 % 10 ml

Enrasar a 100ml con agua destilada estéril

Se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 min.

❖ Solución III

- Acetato de potasio (5 M) 60 ml
- Ácido acético glacial 11,5 ml
- Agua destilada estéril 28,5 ml

Se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 min.

3.4 CULTIVO Y MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS

3.4.1 Cultivo y manipulación de cepas del complejo *C. glabrata* y *C. albicans*

3.4.1.1 Preparación de stock de levaduras para conservación de cepas

La recuperación de las cepas enviadas desde los distintos laboratorios, se realizó en medio Sabouraud sólido. El crecimiento de las cepas para su procesamiento y conservación, se

llevó a cabo en el medio YPD líquido, incubándolas a 37 °C en agitación a 200 rpm, durante 24 h. Las cepas se conservaron a -80°C concentrando 10 veces: 2 ml del cultivo de 24 h en YPD líquido por centrifugación (llevando a 200 µl) y agregando 200 µl de glicerol.

3.4.1.2 Preparación de los inóculos

Para preparar inóculos, se procedió de igual manera que en la preparación de stock de levaduras para conservar cepas, pero con la diferencia de que el inóculo final de trabajo se obtuvo haciendo un recuento microscópico en una cámara hematocitométrica (Improved Neubauer Chamber; Merck S.A.) y ajustando la concentración de levaduras mediante diluciones en agua destilada estéril.

3.4.1.3 Transformación de *C. glabrata sensu stricto* por el método químico con Acetato de Litio (Guldener *et al.*, 1996)

El procedimiento por el cual se incorpora ADN exógeno a una célula se denomina transformación. Para realizar las transformaciones de *C. glabrata sensu stricto* se utilizó un método químico. Este método se fundamenta en el uso de acetato de litio, que permite la permeabilización de la pared y membrana celular y el ingreso del ADN exógeno. Como ADNs exógenos se utilizaron fragmentos lineales de ADN obtenidos a partir de la digestión con enzimas de restricción del vector apropiado o utilizando un fragmento de PCR purificado.

La cepa a transformar se cultivó durante 16-18 horas en 20 ml de YPD líquido a 150 rpm y a 37°C. De este cultivo, se tomaron 1,5 ml y se inocularon en 50 ml de YPD. La incubación se realizó a 37°C en agitación (150 rpm) hasta alcanzar una concentración de levaduras de al menos 2×10^7 cel./ml (aproximadamente 4-5 h). Alcanzada la concentración deseada, se centrifugó 5 minutos a 4000 rpm a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el culote de células se lavó con 25 ml de agua destilada estéril 2 veces, centrifugando entre lavados. Luego el culote se resuspendió en 1,5 ml de TE/LiOAc 1X (acetato de litio 1M y buffer TE 0,1 M pH 7,5), se centrifugó 1 minuto a 5000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió finalmente en 200µl de TE/LiOAc 1X. En este paso la concentración de células debe alcanzar 2×10^9 cel/ml.

De esta suspensión de células competentes se tomaron 50 μ l y se agregó: 5 μ g de ADN de espermatozoos de salmón (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina) hervido previamente por 20 min y enfriado en hielo hasta su uso, 12 μ l de ADN lineal purificado (5-10 μ g) y 300 μ l de PEG 40 % (polietilenglicol, 8 partes de PEG 50 %: 1 parte de buffer TE: 1 parte de acetato de Litio 1 M) (Sigma Aldrich). Se mezcló con micropipeta y se incubó 30 minutos a 30°C en agitación constante. Luego se agregaron 43 μ l de Dimetilsulfoxido (DMSO) (Sigma Aldrich), incubándose 15 min a 42 °C. Posteriormente se agregaron 800 μ l de agua destilada estéril y se centrifugó 10 segundos a 13000 rpm. En último lugar, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de YPD, incubándose entre 2 o 3 h a 30 °C. Cumplido el tiempo de incubación, se centrifugó 10 seg. a 13000 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el culote de células con 1 ml de agua destilada estéril para lavar. Se volvió a centrifugar 10 seg. a 13000 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 200 μ l de agua destilada estéril. Finalmente se plaquearon 50 μ l de la suspensión celular transformada en el medio de selección adecuado. Se incubó entre 28-37 °C entre 4-7 días.

Preparación soluciones madres

❖ BUFFER TE 10 X (0,1 M Tris-HCl; 0,01 M EDTA, pH 7,5)

- Tris-HCl (Genbiotech) 0,6 g
- EDTA 0,18 g
- Agua destilada estéril 50 ml

❖ LiAc (Sigma)

- LiAc 1 M 2.55 g
- Agua destilada estéril 25 ml

❖ PEG (Sigma) 40 %

- PEG 12,5 g
- Agua destilada estéril 25 ml

3.4.2 Cultivo y manipulación de cepas de *E. coli*

Las cepas de *E. coli* Top 10, se cultivaron y conservaron a – 80 °C en medio de cultivo LB agar y LB con glicerol, respectivamente.

3.4.2.1 Transformación de *E. coli* por método de shock térmico, y selección de transformantes.

❖ Preparación de células competentes:

Se obtuvo un cultivo saturado de *E. coli* TopTen por incubación en agitación por 16-18 horas a 37 °C en medio LB líquido. Luego, este cultivo se diluyó 1:20 en medio LB y se incubó en agitación a 37 °C hasta alcanzar una $DO_{600} = 0,5-0,6$. Alícuotas de 1 ml de éstas células se cosecharon por centrifugación a 5000 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en 500 µl de solución de transformación 1 (ST1, MOPS-NaOH 10 mM, KCl 10 mM, pH 7,0). Se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en 500 µl de solución de transformación 2 (ST2, MOPS-NaOH 100 mM, KCl 10 mM, CaCl₂ 50 mM, pH 6,5). Se incubaron en hielo durante 15 minutos, se centrifugaron y se resuspendieron en 100 µl de ST2.

❖ Transformación de células competentes:

A 100 µl de una suspensión de bacterias competentes se le adicionaron 3 µl de ADN plasmídico (ó 7 µl de la mezcla de ligación). La mezcla se incubó 1 hora en hielo, luego de lo cual se realizó el choque térmico: 45 segundos a 42 °C. Posteriormente, se agregó 1 ml de medio LB-glucosa y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Finalmente, las células se centrifugaron durante 5 minutos a 4800 rpm, se resuspendieron en 100 µl de medio y se sembraron en placas de LB-agar suplementado con ampicilina (utilizado para la selección de transformantes).

3.4.2.2 Mantenimiento de la colección de plásmidos en cepas de *E. coli* (cultivo y almacenamiento).

Para conservar las cepas de *E. coli* TopTen, que contenían los plásmidos utilizados, se sembraron por aislamiento en medio LB sólido con ampicilina y se incubaron a 37 °C durante 18 h. A partir del aislamiento, se seleccionó una colonia que se inoculó en 3 ml de medio LB ampicilina líquido, incubándose en agitación (150 rpm) a 37 °C durante 18 h. Se alicuotaron distintos tubos con 200µl del cultivo y 200 µl de glicerol estéril,

congelándose a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cada cepa con plásmido se nombró como “P” y el número correlativo que correspondiera.

Cuando se necesitó recuperar el plásmido de la colección, se pasó el tubo eppendorf de freezer de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a hielo y con la ayuda de una micropipeta se tomaron $10\text{ }\mu\text{l}$ de la mezcla que se sembraron en LB ampicilina líquido. Se incubó durante 18 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 150 rpm.

3.5 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.5.1 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Para el análisis de fragmentos de ADN se utilizaron geles de agarosa de 0,8 a 1,5 % (dependiendo del tamaño de los fragmentos) preparados con agarosa de bajo índice de electroendosmosis (Invitrogen) disuelta en tampón TAE (1X). La solución de agarosa se calentó en microondas hasta total disolución, se agregó Gel Green (Biotium, Buenos Aires, Argentina) en una proporción de $1\mu\text{l}$ por cada 10 ml de gel, y se dejó solidificar en la cubeta de electroforesis deseada.

*3.5.2 Extracción de ADN de levaduras del complejo *C. glabrata* y de *C. albicans* por método químico*

El ADN genómico de las levaduras utilizadas en este estudio, fue extraído por el método de Fenol-Cloroformo (Sambrook J. *et al.*, 1998). Las cepas fueron crecidas en medio YPD líquido en agitación a 37°C (16-20 h), y se recolectaron por centrifugación. Al culote de células se le añadió 0,4 ml de buffer de lisis y un volumen de perlas de vidrio, vortexeando a máxima velocidad por 1 min. Intercalando con incubaciones en hielo también de 1 min. Luego se les agregó 0,4 ml de Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (FCI) 25:24:1 (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina), se agitó suavemente y se centrifugó 15 min a 13000 rpm, recogiendo el sobrenadante. A este se le añadió cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se agitó en vórtex y se centrifugó 5 min. a 13000 rpm.

El ADN presente en el sobrenadante obtenido, se precipitó con $18\text{ }\mu\text{l}$ de Acetato de Sodio 3M y 0,6 ml de etanol absoluto frío. Esta solución se centrifugó a 13000 rpm 10 min. El precipitado se lavó con etanol 70 % y se resuspendió en 25 - 50 μl de agua destilada estéril. Se realizó tratamiento con RNAsa (Sigma), incubándose 1 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.5.3 Extracción de ADN de plásmidos

3.5.3.1. Método artesanal

Este protocolo de extracción de ADN se utilizó para analizar los plásmidos obtenidos en las distintas transformaciones realizadas para la obtención de los vectores. El producto obtenido no tiene una gran pureza pero es un procedimiento económico y rápido, que permite analizar un gran número de plásmidos y realizar una selección de los mismos para obtener el plásmido con el inserto deseado. Las colonias de *E. coli* seleccionadas de las placas de LB con IPTG y X-Gal se incubaron toda la noche a 37 °C a 150 rpm en 3 ml de LB líquido con ampicilina. Del cultivo se conservó 1 ml en un tubo eppendorf entre 2 – 8 °C para poder subcultivar la bacteria con el plásmido seleccionado. El volumen restante se centrifugó a 10000 rpm durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y se dejaron los tubos invertidos sobre papel de filtro para que el sedimento se secase. Posteriormente, el pellet celular se resuspendió en 100 µl de la solución 1 (descrita en el punto 3.3.3.6), se incubó 5 min a temperatura ambiente y se añadieron 200 µl de la solución 2 (descrita en el punto 3.3.3.6). La suspensión viscosa formada se mezcló por inversión varias veces, se incubó 5 min en hielo y posteriormente se le añadieron 150 µl de solución 3 fría (descrita en el punto 3.3.3.6).

El precipitado viscoso que contenía los restos celulares, se separó del sobrenadante por centrifugación a 8000 rpm a 4 °C durante 5 min y se recogieron 400 µl del mismo que se pasaron a un tubo limpio.

Al sobrenadante se le añadió el mismo volumen (400 µl) de FCI. Esta emulsión se agitó 10 seg en vórtex y se centrifugó a 8000 rpm a 4 °C durante 5 min. El ADN presente en 300 µl de la fase acuosa se precipitó añadiendo dos volúmenes (600 µl) de etanol absoluto frío, se mezcló por inversión y se centrifugó a 8000 rpm y a 4 °C durante 5 min. El precipitado se lavó con 300 µl de etanol 70% frío y posteriormente se centrifugó otra vez, eliminándose luego el sobrenadante por aspiración. El sedimento se resuspendió en 50 µl de agua con 2 µl de RNAsa (stock a 1 mg/ml). La solución de ADN se incubó 1 h a 37 °C.

3.5.3.2. Método comercial (Promega)

Este protocolo se usó para obtener cantidades de hasta 20 µg de ADN de plásmidos multicopia a partir de cultivos de *E. coli*. La utilización de un método comercial tiene la ventaja de que el producto final posee una gran pureza.

Los clones seleccionados en medio LB con ampicilina (5 ml con 2,5 µl de ampicilina 200 mg/ml) se cultivaron durante toda la noche a 37 °C en agitación (150 rpm). Estos inóculos se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el sedimento de células con el tubo invertido sobre un papel Wathman. El sedimento se resuspendió en 250 µl de la solución de resuspensión celular. A esta suspensión celular se le añadió 250 µl de la solución de lisis y se mezcló suavemente por inversión cuatro veces. Luego se agregó 10 µl de proteasa alcalina y se mezcló por inversión, incubándose a temperatura ambiente durante 5 min. Al precipitado viscoso formado se le agregaron 350 µl de la solución de neutralización mezclándose inmediatamente por inversión. Se centrifugó a máxima velocidad durante 10 min. El sobrenadante obtenido, se traspasó a la columna Wizard® Plus SV Minipreps con su tubo colector y se centrifugó a máxima velocidad por 1 min. Se descartó el contenido del tubo colector y se volvió a insertar la columna en el mismo tubo. Se agregó 750 µl de solución de lavado (que contiene etanol absoluto), centrifugándose a máxima velocidad por 1 min. Este paso de lavado se repitió dos veces.

Se transfirió la columna a un tubo eppendorf de 1,5 ml estéril. Se agregó 100 µl de agua libre de nucleasas y se centrifugó 1min. a máxima velocidad a temperatura ambiente. Se descartó la columna y se guardó el ADN a -20 °C.

3.5.4 Extracción de ARN de *C. glabrata sensu stricto*

Para aislar el ARN total de *C. glabrata sensu stricto* se sembraron 10 µl del stock conservado a -80 °C en una placa de YPD agar, utilizando la técnica de 5 estrías. La incubación se realizó a 37 °C durante 16 h. De esa placa sembrada en 5 estrías se tomó una colonia individual, la cual se inoculó en un tubo con 5 ml de YPD líquido, incubándose a 37 °C a 200 rpm. El tiempo de incubación fue establecido teniendo en cuenta las fases del desarrollo de la levadura donde se planteó evaluar los niveles de

expresión de los genes en estudio. Se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min, se descartó el sobrenadante y se colocó el tubo eppendorf con el culote de levaduras en baño de etanol absoluto a -80°C por 60 minutos. Se retiró el tubo del etanol frío en hielo y se agregó 1 ml de RNazol (Molecular Research Center, Inc. Genbiotech, Buenos Aires. Argentina) frío. Posteriormente, se procedió a vortexear por 5 ciclos de 30 seg intercalados con incubaciones de 30 seg en hielo.

El homogenado crudo obtenido en el paso anterior se centrifugó 5 min a 12000 g para clarificarlo y se transfirió el sobrenadante limpio a un tubo nuevo. Si se observó una capa superficial lipídica (exceso de lípidos en la muestra), se procedió a eliminarla por aspiración antes de continuar con la técnica. Se separó el sobrenadante en un tubo nuevo. Se agregó 400 μl de agua *RNAse-free* por cada 1 ml de RNazol utilizado para la homogenización. Se mezcló vigorosamente durante 15 seg y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente para posteriormente centrifugar 15 min a 16000 g. Con este procedimiento, las proteínas y la mayoría de polisacáridos precipitan y el ARN permanece en el sobrenadante. Esta última porción, se transfirió a un tubo nuevo tomando hasta un 85% del total de volumen del sobrenadante (1 ml aproximadamente). Si se obtuvieron más de 500 μl de sobrenadante, se lo fraccionó en dos tubos para poder agregar el volumen adecuado de isopropanol en el paso siguiente de precipitación del ARN total. Se agregó al tubo con el sobrenadante igual volumen de isopropanol y se incubó 10 min a temperatura ambiente para luego centrifugar 10 min a 12000 g. Se retiró el sobrenadante con micropipeta. Se agregó sobre el pellet de ARN 500 μl de solución de etanol 75% (v/v) (preparada en el momento con agua *RNAse-free*) y se mezcló por inversión. Se centrifugó 3 min a 8000 g y se removió el etanol con micropipeta. El pellet se resuspendió en agua *RNAse-free* (30-50 μl) y se mezcló con vórtex a temperatura ambiente durante 2-5 min.

3.5.5 Transcripción reversa (síntesis de ADNc)

La transcripción reversa se realizó utilizando la enzima AMV RT (Promega). Este procedimiento consta de dos partes. La primera etapa de la técnica se realizó en un volumen final de 5 μl con 2 μg de ARN y 1 μg de Oligo (dT), llevando a volumen con agua libre de nucleasas. Estos tubos se incubaron a 70°C durante 5 min en un bloque

precalentado y luego se pusieron en hielo al menos 5 minutos. Antes de pasar a la segunda etapa se centrifugaron los tubos durante 10 seg.

La segunda etapa de la técnica se realizó en un volumen final de 15 μ l. Se realizó una mezcla conteniendo 4 μ l de buffer AMV-RT 5 X, 2 μ l de la mezcla de deoxinucleótidos trifosfato, 10 μ l de inhibidor de RNasa (rRNasin[®]), 1,5 μ l de transcriptasa reversa AMV-RT. A esta mezcla se añadieron los 5 μ l de la primera etapa para obtener un volumen total de 20 μ l. Posteriormente, se realizó una reacción en el termociclador con las siguientes condiciones: 25 °C durante 5 min, 42 °C durante 60 min y 70 °C durante 15 min. Se incluyó un tubo de control negativo conteniendo todos los componentes de las reacciones excepto la transcriptasa reversa para comprobar si existía ADN contaminante. El ADNc obtenido se guardó a – 20 °C hasta su utilización.

3.5.6 Cuantificación de ácidos nucleicos.

La concentración, pureza y cantidad de ADN y ARN total, se determinaron utilizando el espectrofotómetro Nanodrop lite (Thermo Scientific), midiendo concentración de ácidos nucleicos en 260 nm y la pureza utilizando la relación 260/280 nm.

3.5.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Distintas variantes y sus respectivas aplicaciones

3.5.7.1 Método general de la Reacción en cadena de la polimerasa

Las amplificaciones se realizaron en un volumen final de 25 μ l, conteniendo 10 mM de Tris-CIH (pH 8,8) – 5 mM KCl, 2,5 mM de MgCl₂, 125 μ M de cada uno de los dNTPs, 1 μ M de cada primer, 1,25U de ADN Polimerasa Taq Pegasus, 1U de PFU ADN polimerasa (ambas PBL, Buenos Aires, Argentina) o 1U de Taq Platinum ADN polimerasa (Invitrogen), y 10 a 25 ng de ADN genómico de *C. glabrata* (incluyéndose las especies integrantes del complejo) o *S. cerevisiae* o *C. albicans*. El termociclador (Applied Biosystems 2720 thermocycler) fue programado para el caso de Taq Pegasus

con: un ciclo de 2 min a 94 °C, luego 30 ciclos de 15 seg a 92 °C, 30 seg a la temperatura de acoplamiento adecuada para cada reacción en particular y entre 1 y 2 min a 72 °C dependiendo del tamaño del fragmento a amplificar, seguidos por un ciclo final de 10 min a 72 °C. Mientras que para la enzima PFU y Taq Platinum las condiciones de ciclado fueron las siguientes: un ciclo de 2 min a 94 °C, luego 30 ciclos de 15 seg a 92 °C, 30 seg a la temperatura de acoplamiento adecuada para cada reacción en particular y entre 1 y 2 min a 68 °C dependiendo del tamaño del fragmento a amplificar, seguidos por un ciclo final de 2-5 min a 68 °C. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa.

3.5.7.2 Generación de vectores de delección de los genes FKS de *C. glabrata sensu stricto* por distintos métodos: PRODIGE (para FKS1), por PCR de fusión (para FKS2) y por digestión con enzimas de restricción (para FKS3).

❖ PRODIGE para la generación de un vector de delección para la disrupción del gen *FKS1*

Para la disrupción de un gen, se emplea convencionalmente una casete que contiene dos regiones de homología con el gen diana. Estas regiones se encuentran flanqueando un gen marcador seleccionable (auxotrofia o resistencia a alguna droga). Este gen marcador incluye generalmente la región promotora y de poliadenilación, ambas requeridas para su expresión. En el caso particular de *C. glabrata sensu stricto*, la cual presenta bajo índice de recombinación homóloga, estudios previos evidencian que regiones con homologías de 50 pb, generan eficiencias de transformación menores o iguales al 2 % (Cormack y Falkow, 1999; Weig *et al.*, 2001). Ante esta situación se desarrolló una metodología denominada PRODIGE (Promoter-dependent disruption of genes), que se basa en la eliminación del promotor del gen que se utiliza para seleccionar, de manera que la expresión de este gen marcador dependa de las secuencias regulatorias (por ejemplo: promotor) del gen que se intenta knockear.

La generación del vector de disrupción se llevó a cabo utilizando como base la secuencia del gen *FKS1* de *C. glabrata sensu stricto* GenBank XM_446406 y la secuencia del gen *URA3* de *S. cerevisiae* ATCC 9763 GenBank U03450. Se extrajo ADN de ambas cepas utilizando el método de fenol-cloroformo descrito anteriormente en el punto 3.5.2. Mediante una reacción de PCR de punto final, se generó el casete de disrupción

amplificando por un lado el gen *URA3* (marcador de selección) utilizando como templado el ADN de *S. cerevisiae* ATCC 9763. Por otro lado se amplificaron la región inmediatamente corriente arriba del codón del inicio del gen *FKS1* de *C. glabrata sensu stricto* (5'UTR) y la inmediatamente corriente abajo del codón stop del mismo gen (3'UTR). La purificación de cada uno de los fragmentos obtenidos se llevó a cabo con el kit AccuPrep® (BIONNER, Buenos Aires, Argentina). Obtenidos y purificados los fragmentos se utilizó PCR de fusión para la unión del gen *URA3* con sus dos regiones flanqueantes pertenecientes al gen *FKS1* (**Figura 12**). Cada uno de los primers utilizados en la PCR de fusión fue diseñado con unas 25 pb de bases de homología con la región a fusionar consecutiva. Los protocolos, tanto de la PCR de punto final para cada porción del vector, como de la PCR de fusión se detallan en la **Tabla 4**. La secuencia de todos los primers utilizados se encuentran descritos en la **Tabla 5**. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis. Para su almacenamiento el vector generado se clonó en un pGEM-T® easy vector, almacenándose en bacterias *E. coli* TopTen, siguiendo el protocolo detallado en el punto 3.4.2.2.

El vector de disrupción generado se utilizó para la transformación de la cepa de *C. glabrata* BG14 Δ *URA3* (Cormack y Falkow, 1999) utilizando el método descrito anteriormente en el punto 3.4.1.3. Las cepas mutantes obtenidas presentaron el genotipo Δ *FKS1::URA3*, las cuales se seleccionaron utilizando el medio de auxotrofia yeast nitrogen base (YNB) sin uridina uracilo.

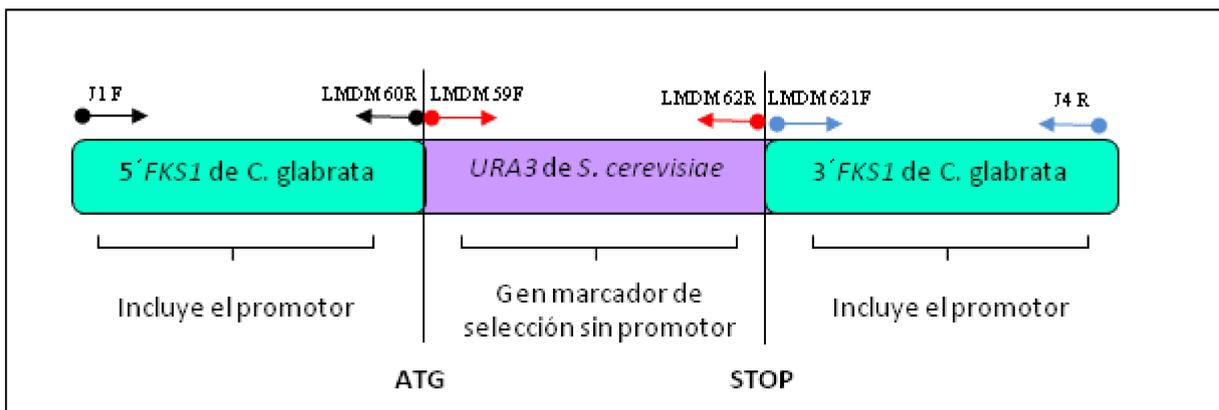


Figura 12.- Vector de disrupción utilizando el método PRODIGE para knockear el gen *FKS1* de *C. glabrata sensu stricto*.

Tabla 4.- Protocolos de PCR utilizados para la obtención del vector de interrupción. (A) PCR punto final. (B) PCR fusión.

(A)

PCR de punto final					
5'FKS1 de <i>C. glabrata</i>		URA3 de <i>S. cerevisiae</i>		3'FKS1 de <i>C. glabrata</i>	
Buffer HiFi	2,5 µl	Buffer HiFi	2,5 µl	Buffer HiFi	2,5 µl
MgCl ₂	2,5 µl	MgCl ₂	2,5 µl	MgCl ₂	2,5 µl
dNTP	0,5 µl	dNTP	0,5 µl	dNTP	0,5 µl
J1 Forward	0,5 µl	LMDM 59 Forward	0,5 µl	LMDM 61 Forward	0,5 µl
LMDM 60 reverse	0,5 µl	LMDM 62 reverse	0,5 µl	J4 reverse	0,5 µl
Enzima Taq Platinum®	0,1 µl	Enzima Taq Platinum®	0,1 µl	Enzima Taq Platinum®	0,1 µl
H ₂ O	18,4 µl	H ₂ O	18,4 µl	H ₂ O	18,4 µl
ADN de <i>C. glabrata</i>	0,5 µl puro	ADN de <i>S. cerevisiae</i>	0,5 µl dil 1/20	ADN de <i>C. glabrata</i>	0,5 µl puro

Condiciones de ciclado: descritas en la sección 3.5.7.1 para Taq Platinum ® high fidelity y una T° de acoplamiento de 54°C y 1 min 30 seg de elongación

(B)

PCR de Fusión	
Buffer HiFi	2,5 µl
MgCl ₂	2,5 µl
dNTP	0,5 µl
J1 Forward	0,5 µl
J4 Reverse	0,5 µl
Enzima Taq Platinum®	0,1 µl
H ₂ O	16,9 µl
Producto de PCR 5'FKS1 de <i>C. glabrata</i>	0,5 µl
Producto de PCR 3'FKS1 de <i>C. glabrata</i>	0,5 µl
Producto de PCR URA3 de <i>S. cerevisiae</i>	0,5 µl

Condiciones de ciclado: descritas en la sección 3.5.7.1 para Taq Platinum ® high fidelity y una T de acoplamiento de 50°C y 3 min 30 seg de elongación

Tabla 5.- Primers utilizados para la generación del vector de disrupción.

Primers	Secuencia 5'→3'	Propósito
J1 Foward	TTCTACGCACTGCCTGGCTAAAG	5'FKS1 de <i>Cg^a</i>
LMDM 60 Reverse	<u>TCCTTATATGTAGCTTTTCGACATAGCGAATGTATATCAAACAAGAGCAA</u> AAAAAAAAG	5'FKS1 de <i>Cg^a</i>
LMDM 59 Foward	CTTTTTTTTTTGGCTCTTGTTTGATATACATTTCGCT <u>ATGTCGAAAGCTACA</u> <u>TATAAGGA</u>	5'URA3 de <i>Sc^b</i>
LMDM 62 Reverse	GAATAACAATAAAAATCACGCAAATTATTGAAATGGATTAGTTTTGCTG <u>GCCGCATCTTC</u>	3'URA3 de <i>Sc^b</i>
LMDM 61 Foward	<u>GAAGATGCGGCCAGCAAACTAATCCATTTCAATAATTTGCGTGATTTT</u> ATTGTTTATTC	3'FKS1 <i>Cg^a</i>
J4 Reverse	GCACCAGCGGCTACAAAGAAAGAA	3'FKS1 <i>Cg^a</i>

a- *C. glabrata*. b- *S. cerevisiae*. Las porciones de secuencia subrayadas marcan las regiones codificantes de URA3 de *S. cerevisiae*.

❖ PCR de fusión para la generación de un vector de delección para la disrupción del gen FKS2 de *C. glabrata sensu stricto*

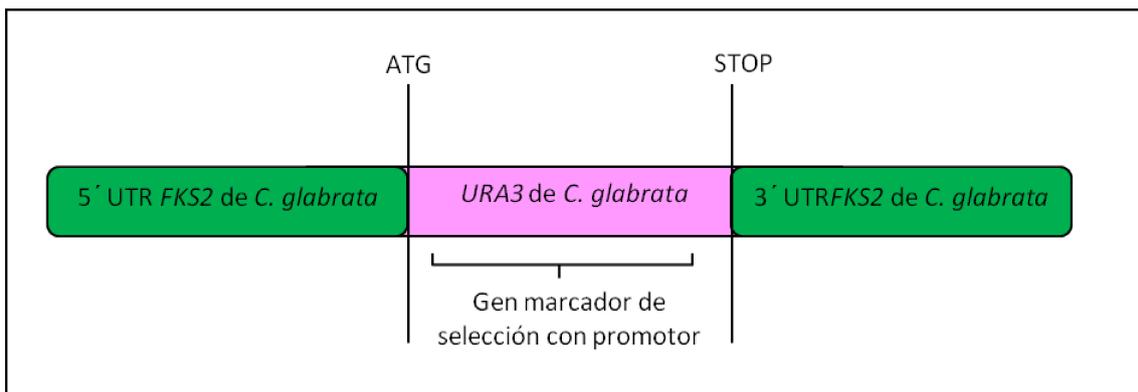
La PCR de fusión es un método utilizado para ligar cadenas de ADN, sin utilizar enzimas de restricción o ligasas (Horton *et al.*, 1989). Para la fusión de los tres fragmentos que conforman el vector, son necesarios seis primers: dos primers ordinarios y 4 primers de fusión. Los primers de fusión óptimos tienen al menos 20 bp homólogas con el siguiente fragmento y la eficiencia de fusión es altamente dependiente del contenido CG dentro de estas regiones. Cada fragmento es amplificado con primers que generan regiones de homología correspondientes al siguiente fragmento a fusionar.

La generación del vector de disrupción se llevó a cabo utilizando como base la secuencia del gen FKS2 y URA3 de *C. glabrata sensu stricto*, con los números de acceso de GenBank XM_448401 y L13661.1, respectivamente. Se extrajo ADN de la cepa *C. glabrata sensu stricto* ATCC 90030 utilizando el método de fenol-cloroformo descrito anteriormente en el punto 3.5.2. Este ADN se utilizó como templado para la amplificación mediante PCR de punto final, de cada uno de los tres fragmentos que constituyen el vector de disrupción: por un lado el gen URA3 (gen de selección) con su respectivo promotor, y por otro lado la región inmediatamente corriente arriba del codón del inicio del gen FKS2 y la inmediatamente corriente abajo del codón de stop del mismo gen (**Figura 13**). Las

condiciones de reacción y los oligonucleótidos que fueron utilizados se describen en la **Tabla 6**. Una vez obtenidos los tres fragmentos, se procedió a su purificación utilizando el kit AccuPrep[®] para la purificación de productos de PCR (BIONEER, Buenos Aires, Argentina). Los productos de PCR y de la purificación, fueron analizados por electroforesis.

Para la PCR de fusión se utilizaron: los tres fragmentos purificados, cuyas secuencias contenían regiones de solapamiento (complementariedad) que hicieron posible la unión de los mismos de la manera buscada, y para la amplificación se utilizaron los primers más externos los cuales fueron denominados como LMDM 1 y LMDM 6, describiéndose las condiciones de reacción en la **Tabla 6**. La manera en que tiene lugar la reacción de fusión se esquematiza en la (**Figura 14**). El producto de PCR de fusión se analizó mediante una corrida electroforética. Para su almacenamiento se clonó en un pGEM-T[®] easy vector (LMDM-P40/41/42), almacenándose en bacterias *E. coli* TopTen, siguiendo el protocolo detallado en el punto 3.4.2.2.

El casete de disrupción generado, se utilizó para la transformación de la cepa de *C. glabrata* BG14 Δ URA3 (Comark y Falkow 1999), utilizando el método descrito anteriormente en el punto 3.4.1.3. Las cepas mutantes obtenidas que presentaron el genotipo Δ FKS2::URA3, se seleccionaron utilizando el medio de auxotrofia yeast nitrogen base (YNB) sin uridina uracilo.



. **Figura 13.-** Vector de disrupción utilizando el método de PCR de fusión para knockear el gen *FKS2* de *C. glabrata sensu stricto*

Tabla 6.- Descripción de las condiciones de PCR para la obtención del vector de disrupción y secuencias de los primers utilizados. (A) PCR punto final. (B) PCR fusión. (C) Secuencias primers.

(A)

Protocolo PCR de punto final					
5'FKS2 de <i>C. glabrata</i>		URA3 de <i>C. glabrata</i>		3'FKS2 de <i>C. glabrata</i>	
Buffer HiFi	2,5 µl	Buffer HiFi	2,5 µl	Buffer HiFi	2,5 µl
MgCl ₂	2 µl	MgCl ₂	2 µl	MgCl ₂	2,5 µl
dNTP	0,5 µl	dNTP	0,5 µl	dNTP	0,5 µl
LMDM 1 Forward	0,5 µl	LMDM 3 Forward	0,5 µl	LMDM 5 Forward	0,5 µl
LMDM 2 reverse	0,5 µl	LMDM 4 reverse	0,5 µl	LMDM 6 reverse	0,5 µl
Enzima Taq Platinum®	0,1 µl	Enzima Taq Platinum®	0,1 µl	Enzima Taq Platinum®	0,1 µl
H ₂ O	18,4 µl	H ₂ O	18,4 µl	H ₂ O	18,4 µl
ADN de <i>C. glabrata</i>	0,5 µl dil.=1/20	ADN de <i>C. glabrata</i>	0,5 µl dil 1/20	ADN de <i>C. glabrata</i>	0,5 µl dil.=1/20

Condiciones de ciclado: descritas en la sección 3.5.7.1. para Taq Platinum ® high fidelity y una T de acoplamiento de 54°C y 1 min 15 seg de elongación

(B)

PCR FUSIÓN	
Buffer HiFi	2,5 µl
MgCl ₂	2,0 µl
dNTP	0,5 µl
LMDM 1 Forward	0,5 µl
LMDM 6 Reverse	0,5 µl
Enzima Platinum ®	0,1 µl
H ₂ O	17,4 µl
Producto de PCR 5'FKS2 de <i>C. glabrata</i>	0,5 µl
Producto de PCR 3'FKS2 de <i>C. glabrata</i>	0,5 µl
Producto de PCR URA3 de <i>C. glabrata</i>	0,5 µl

Condiciones de ciclado: descritas en la sección 3.5.7.1. para Taq Platinum ® high fidelity y una T de acoplamiento de 54°C y 2 min de elongación

(C)

Primers	Secuencia 5' → 3'	Propósito
LMDM1 Foward	AGTTAGTTCCTTCCCAAGTG	5' FKS2 de <i>C. glabrata</i>
LMDM 2 Reverse	GGGATGATGCAATTGGTTCTCGAGAAGCGAATTGTCAGC ACAAGT	5' FKS2 de <i>C. glabrata</i>
LMDM 3 Foward	CCCACTTGTGCTGACAATTCGCTTCTCGAGAACCAATTGC ATCAT	URA3 <i>C. glabrata</i>
LMDM 4 Reverse	ACCATCGCAATAAATAGTCTCTTTCCGAATATTTATTGAA TGATG	URA3 <i>C. glabrata</i>
LMDM 5 Foward	CTAGTAAATGCATCATTCAATAAATATTCGGAAAGAGACT ATTTA	3' FKS2 de <i>C. glabrata</i>
LMDM 6 Reverse	AGCACTTGACAACACACAAGT	3' FKS2 de <i>C. glabrata</i>

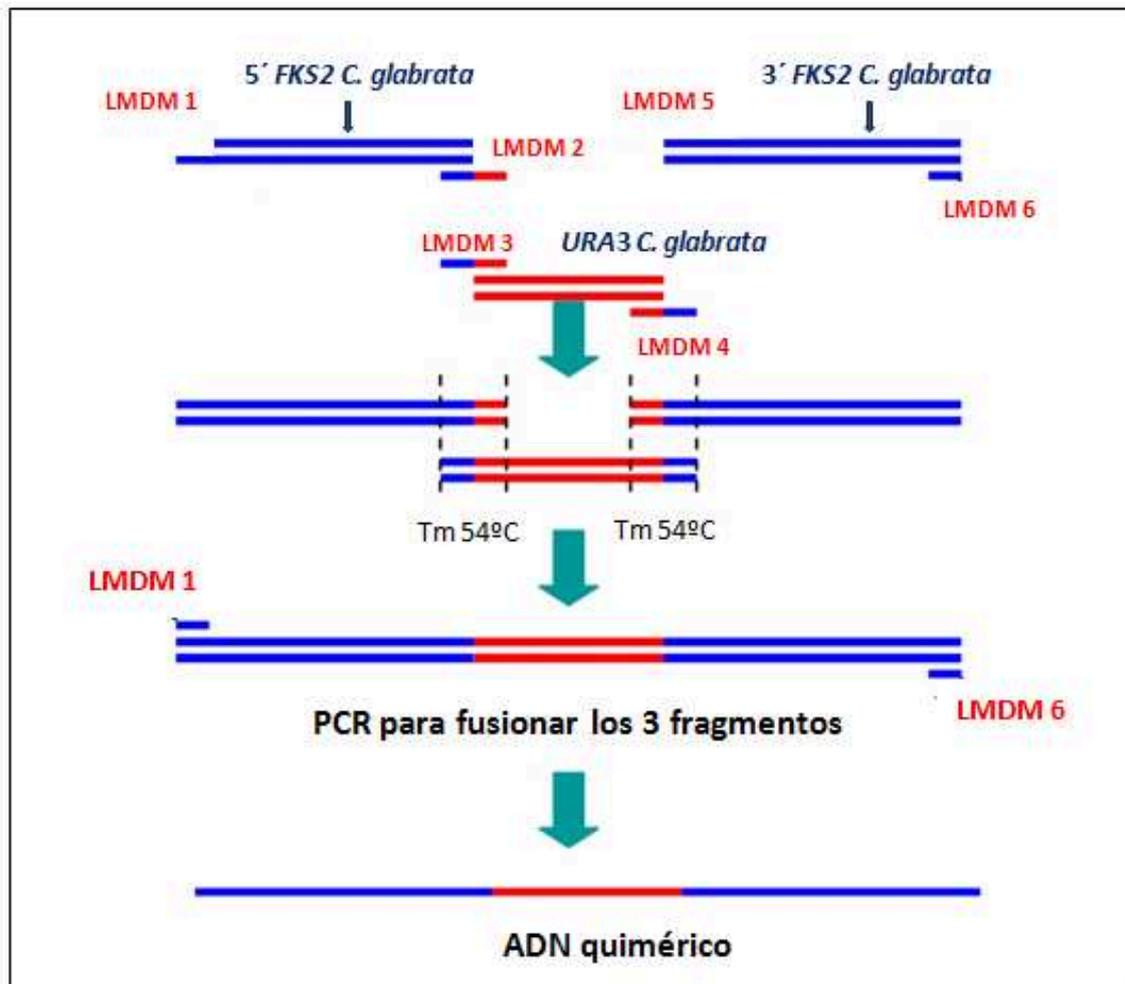


Figura 14.- Esquematación de la síntesis del vector de interrupción por PCR de fusión.

- ❖ Digestión con enzimas de restricción para la generación de un vector de delección para la interrupción del gen *FKS3* de *C. glabrata sensu stricto*

La generación del vector de interrupción del gen *FKS3* se llevó a cabo utilizando como base la secuencia del gen *FKS3* y *URA3* de *C. glabrata sensu stricto*, con los números de acceso de GenBank HQ845285.1 y L13661.1, respectivamente. Se extrajo ADN de la cepa *C. glabrata sensu stricto* ATCC 90030 utilizando el método de fenol-cloroformo descrito anteriormente en el punto 3.5.2. Su realización tuvo lugar en tres etapas. En la primera etapa, usando de templado el ADN extraído, se amplificó por PCR una fracción del gen *FKS3*, la que abarcó desde el nucleótido 1271 al 4486, utilizándose los primers LMDM 11 y LMDM 12. Las condiciones de la PCR y las secuencias de los primers

empleados se detallan en la **Tabla 7**. El producto de PCR obtenido se analizó mediante una corrida electroforética y se purificó utilizando el kit AccuPrep[®] (BIONEER). Esta fracción del gen *FKS3* se clonó en un vector pGEM-T[®] easy vector (Promega), cuyo protocolo se describe en la **Tabla 8**. Este plásmido, al que se designó con el nombre LMDM-P30, fue guardado en bacterias *E. coli* TopTen (Invitrogen), las cuales fueron transformadas siguiendo el método del Cl₂Ca descrito en el punto 3.4.2.1 y guardadas a -80°C. La elección del plásmido pGEM-T[®] easy vector, estuvo condicionada por la ausencia de sitios de corte para las enzimas BamHI y ClaI, alrededor del polilinker. Estas enzimas fueron utilizadas para la generación del vector de disrupción, ya que la fracción del gen *FKS3* amplificada, presenta sitios de corte para las mismas.

En una segunda etapa, utilizando de templado el mismo ADN de *C. glabrata sensu stricto* ATCC90030, se llevó a cabo la amplificación del gen *URA3* mediante PCR de punto final, cuya secuencia incluyó su promotor. Para la amplificación de gen se utilizaron los oligonucleótidos LMDM 13 y LMDM 14, que fueron diseñados para contener el sitio de corte para BamHI (G/GATCC) y ClaI (AT/CGAT), respectivamente. El producto de PCR se purificó utilizando el kit accuPrep[®] (BIONEER) y se analizó por electroforesis. Las condiciones de reacción y la secuencia de los primers utilizados se detallan en la **Tabla 7**.

La tercera etapa comenzó con la extracción del plásmido LMDM-P30 utilizando el método comercial descrito en el punto 3.5.3.2. Luego se procedió a digerir con las enzimas BamHI y ClaI, tanto el *URA3* como el plásmido previamente extraído LMDM-P30. El protocolo utilizado en ambas digestiones se detalla en la **Tabla 9**. Ambos productos de digestión se corrieron en un gel low melting (Genbiotech), para su posterior purificación utilizando el kit AccuPrep[®] (BIONEER). Solamente el plásmido digerido fue tratado con fosfatasa alcalina de carnero (CIAP) (PROMEGA), con el fin de eliminar los fosfatos que se generan luego de la digestión. Estos fosfatos interfieren durante la ligación disminuyendo su eficiencia. El protocolo de la CIAP se describe en el punto 3.5.11.3. Como último paso se llevó a cabo la ligación del *URA3* con el LMDM-P30 desfosforilado. El protocolo de ligación se detalla en la **Tabla 10**. El plásmido generado como producto de la ligación ($\Delta FKS3::URA3$) se denominó LMDM-P36/37, almacenándose en bacterias *E. coli* TopTen, siguiendo el protocolo detallado en el punto 3.4.2.2.

El casete de disrupción generado, se utilizó para la transformación de la cepa de *C. glabrata* BG14 $\Delta URA3$ (Cormack y Falkow, 1999), utilizando el método descrito anteriormente en el punto 3.4.1.3. Las cepas mutantes obtenidas que presentaron el

genotipo $\Delta FKS3::URA3$, se seleccionaron utilizando el medio de auxotrofia yeast nitrogen base (YNB) sin uridina uracilo.

Tabla 7.- (A) protocolo PCR para la amplificación de la región del gen *FKS3* de *C. glabrata* comprendida entre el nt. 1271 a 4486 y las secuencias de los primers utilizados. (B) protocolo PCR para la amplificación del gen *URA3* de *C. glabrata*, y las secuencias de los primers utilizados. Las regiones subrayadas marcan los sitios de restricción incorporados a los primers (BamHI y ClaI). Los nucleótidos en minúscula indican las secuencias adicionadas como “anclaje” de las enzimas de restricción.

(A)

PCR para la amplificación de la región del gen <i>FKS3</i>	
Buffer HiFi	2,5 μ l
MgCl ₂	2,0 μ l
dNTP	0,5 μ l
LMDM 11 Forward	1,0 μ l
LMDM 12 Reverse	1,0 μ l
Enzima Taq Platinum [®]	0,25 μ l
H ₂ O	16,75 μ l
ADN de <i>C. glabrata</i> dil=1/20	1,0 μ l

Condiciones de ciclado: descritas en la sección 3.5.7.1. para Taq Platinum[®] high fidelity y una T de acoplamiento de 60°C y 4 min de elongación

Primers	Secuencia 5' → 3'	Propósito
LMDM11 Foward	ATAACCAGCCAACGATGCAAGCAC	<i>FKS3</i> de <i>C. glabrata</i> nt.1271
LMDM 12 Reverse	TTCCAGTGAACCGTGATCGTGAAC	<i>FKS3</i> de <i>C. glabrata</i> nt.4486

(B)

PCR para la amplificación del gen <i>URA3</i>	
Buffer HiFi	2,5 µl
MgCl ₂	2,0 µl
dNTP	0,5 µl
LMDM 13 Forward	0,5 µl
LMDM 14 Reverse	0,5 µl
Enzima Taq Platinum®	0,1 µl
H ₂ O	18,4 µl
ADN de <i>C. glabrata</i> dil=1/20	0,5 µl

Condiciones de ciclado: descritas en la sección 3.5.7.1. para Taq Platinum® high fidelity y una T de acoplamiento de 55°C y 1 min de elongación.

Primers	Secuencia 5' → 3'	Propósito
LMDM 13 Forward	cccGGATCCCTCGAGAACCAATTGCATCATCCC	<i>URA3</i> de <i>C. glabrata</i>
LMDM 14 Reverse	ggtATCGATTTATTGAATGATGCATTTACTAG	<i>URA3</i> de <i>C. glabrata</i>

Tabla 8. - Protocolo ligación pGEM-T® easy vector.

- Buffer de ligación 2X 5 µl
- PGEMT-easy vector 1 µl
- T4 ADN Ligasa 1 µl
- Producto de PCR 1 µl (ratio 1:1)
- H₂O 2 µl

Incubar a 4 °C overnight

Tabla 9.- Protocolo de digestión para las enzimas BamHI y ClaI.

LMDM-P30		Producto PCR <i>URA3</i>	
Buffer de ligación 4 10X	1 µl	Buffer de ligación 4 10X	1 µl
BamHI	0,25 µl	BamHI	0,25 µl
ClaI	0,25 µl	ClaI	0,25 µl
LMDM-P30	0,5 µl	<i>URA3</i>	5 µl
H ₂ O	8 µl	H ₂ O	3 µl
		BSA	0,5 µl
Incubación 2 h a 37 °C			

Tabla 10.- Protocolo de ligación de LMDM-P30 y *URA3* luego de la digestión con las enzimas BamHI y ClaI.

- Buffer de ligación 10X 5 µl
- T4 ADN Ligasa 1 µl
- Producto de PCR *URA3* 3 µl
- LMDM-P30 5 µl

Incubar a 4°C overnight

3.5.7.3 PCR de punto final para la detección de sustituciones aminoacídicas en las regiones hot spot de los genes *FKS* de *C. glabrata sensu stricto* y de *C. albicans*.

❖ *C. glabrata sensu stricto*

Los genes *FKS1* (N° de acceso GenBank XM_446406) y *FKS2* (N° de acceso GenBank XM_448401) de *C. glabrata*, fueron utilizados para el diseño de los primers. Se generaron dos grupos de primers: los del primer grupo (Primers control), conformaron dos pares: 1-1670F / 1-2225R, y 2-1619F / 2-2177R, y fueron diseñados para hibridar específicamente con los genes *FKS1* y *FKS2*, respectivamente. El segundo grupo de primers, denominado primers de detección de mutaciones, incluye 5 oligonucleótidos que fueron diseñados para detectar las 10 mutaciones más frecuentemente relacionadas con la resistencia a las

equinocandinas. Estos primers hibridan en la región *hot spot 1* de los genes *FKS1* y *FKS2*, denominándose: 1-F625, 1-S629, 1-D632 y 2-F659, 2-S663, respectivamente. Cada tubo del set de PCR multiplex contenía el par de los primers de control y un primer de detección de mutaciones. El diseño de los primers se realizó utilizando IDT SciTools (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA).

La amplificación de los productos de PCR se llevó a cabo siguiendo las condiciones descritas en la sección 3.7.5.1. para Taq pegasus® con una temperatura de acoplamiento de 56 °C y 1 min de elongación. Esto se llevó a cabo en un termociclador Applied Biosystems thermocycler. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis.

❖ *C. albicans.*

El gen *FKS1* (Nº de acceso GenBank XM_446406) de *C. albicans* fue utilizado para el diseño de dos grupos de primers siguiendo la misma estrategia que para *C. glabrata*. Así, se diseñó un grupo de primers (primers de control): 1752-F / 2232-R y 3518-F / 4266-R, los cuales hibridan específicamente con las regiones *hot spot 1* y *hot spot 2* del gen *FKS1*, respectivamente. Estos primers fueron utilizados como control de amplificación en cada uno de los tubos del set de PCR multiplex. El segundo grupo, al igual que para *C. glabrata* incluyó 5 oligonucleótidos (primers de detección de mutaciones) que fueron diseñados para detectar las 8 mutaciones más comunes, relacionadas con la resistencia a equinocandinas en *C. albicans*. Estos primers hibridan en la región *hot spot 1* y *hot spot 2* denominándose: F641, S645, D648, P649 y R1361, respectivamente. Cada tubo del set de PCR multiplex contenía el par de los primers de control y un primer de detección de mutaciones. El diseño de los primers se realizó utilizando IDT SciTools (Integrated DNA Technologies).

La amplificación de los productos de PCR se llevó a cabo siguiendo las condiciones descritas en la sección 3.7.5.1. para Taq pegasus® con una temperatura de acoplamiento de 57°C y 1 min de elongación. Esto se llevó a cabo en un termociclador Applied Biosystems thermocycler. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis.

3.5.7.4 PCR multiplex para la identificación de cada una de las especies que conforman el complejo *C. glabrata*: *C. glabrata sensu stricto*, *C. nivariensis* y *C. bracarensis*.

El diseño de los oligonucleótidos específicos para cada una de las especies del complejo se realizó teniendo en cuenta las diferencias encontradas en las secuencias nucleotídicas de la región ITS de *C. glabrata*, *C. nivariensis* y *C. bracarensis*. Estos 3 oligonucleótidos, se asociaron a los primers universales ITS1 e ITS4 para obtener los pares de primers que se utilizaron en la PCR multiplex. Los primers universales, se utilizan para amplificar la región ITS y están diseñados para que hibriden regiones evolutivamente conservadas de los genes ribosomales (White *et al.*, 1990). Por su parte, los primers específicos de especie (CgITS1F, CbITS1F y CnITS2F) fueron diseñados para hibridar zonas exclusivas de cada una de las especies, permitiendo de esta manera la diferenciación de las mismas. El diseño de los primers se realizó utilizando herramientas bioinformáticas de IDT SciTools (Integrated DNA Technologies) y fueron comprados de IDT-Biodynamics (Buenos Aires, Argentina).

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo siguiendo las condiciones descritas en la sección 3.5.7.1. para Taq pegasus® incluyendo en la mezcla 0,1 µM de primer ITS1, 0,2 µM de ITS4 y 0,4 µM de cada uno de los primers específicos CgITS1F, CbITS1F y CnITS2F, con una temperatura de acoplamiento de 55 °C y 1 min de elongación. Esto se llevó a cabo en un termociclador Applied Biosystems thermocycler. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis.

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis, en geles de agarosa al 1,5 %.

3.5.7.5 PCR real time para evaluar la expresión de quitina A y B en cepas de *C. glabrata sensu stricto* defectivas en genes *FKS*.

Para amplificar el ADNc y detectar diferencias en la tasa de expresión de los genes *CHS3A* (codifica para la Quitina Sintasa A) y *CHS3B* (codifica para la Quitina Sintasa B) en las cepas de *C. glabrata sensu stricto*: ATCC90030, BG14 Δ URA3 (la que se denominó 331 y es parental de la ATCC90030), Δ FKS1::URA3 (la que se denominó 760), Δ FKS2::URA3 (la que se denominó 389) y Δ FKS3::URA3 (la que se denominó 402), se utilizó el equipo Step One Real Time PCR system (Applied Biosystem). En este trabajo se utilizó una cuantificación, basada en la expresión relativa de los genes en estudio

respecto a la expresión de un gen de referencia, que normalmente forman parte del mantenimiento del metabolismo celular y por ello se expresan de forma constitutiva y uniforme durante el crecimiento. Estos experimentos se realizaron en un volumen final de 20 μl : con 4 μl de 5X HOT FIREPol[®]EvaGreen[®] qPCR Mix Plus (ROX) (Solis BioDyne, Tartu, Estonia), 0,5 μM de cada oligonucleótido y 5 μl de ADNc diluido 1/5, llevando a volumen final con agua estéril. Las muestras fueron sometidas a un ciclo de 15 min a 95 °C para activar HOT FIREPol[®] DNA polimerasa, y posteriormente a 40 ciclos que consistían en: 15 seg a 95 °C, 15 seg a 57 °C, 15 seg a 72 °C y 10 seg a 75°C (lectura). Los equipos para PCR a tiempo real permiten realizar el análisis de las curvas de disociación (curvas de melting) de los productos amplificados por PCR. Este análisis se basa en la aplicación de un gradiente de temperaturas creciente realizado a continuación de la PCR, obteniéndose una gráfica que se corresponde con la cinética de disociación de los fragmentos amplificados. Mediante esta aplicación se puede determinar la temperatura de melting (T_m , temperatura a la que el 50% del ADN de la molécula está desnaturalizado) de los productos de PCR. Cada fragmento amplificado tiene una T_m característica, que depende principalmente de la longitud del fragmento y de su composición en nucleótidos. Esta prueba permite diferenciar la fluorescencia correspondiente a la amplificación de un producto de PCR (T_m superior a 80 °C) de la fluorescencia debida a la formación de dímeros de los oligonucleótidos, cuya T_m es más baja (entre 70 y 80 °C). En cada reacción se programó la realización de una curva de melting: 15 seg a 95 °C, realizando la lectura 1 min/grado de 60-95 °C, 15 seg a 95 °C. Los oligonucleótidos utilizados se describen en la **Tabla 11**. El mismo ensayo se realizó a distintos tiempos: 4 h, 8 h, 12 h y 16 h, con el fin de evaluar si se produce o no alguna modificación en la expresión de los genes *CHS3A* y *CHS3B* en las cepas defectivas en los genes *FKS*, durante el desarrollo de *C. glabrata sensu stricto*. En cada ensayo se incluyeron reacciones por duplicado y se repitieron dos veces. Los resultados se normalizaron utilizando los datos obtenidos para el gen de referencia *ACT1* de *C. glabrata* (Actina1). Para realizar la cuantificación relativa, se utilizó el método matemático descrito por Pfaffl (Pfaffl *et al.*, 2004) que utiliza la siguiente fórmula:

$R = \frac{(E_t)^{\Delta C_{tt}(\text{control} - \text{sample})}}{(E_r)^{\Delta C_{tr}(\text{control} - \text{sample})}}$	<p>R = Proporción (ratio)</p> <p>E = Eficiencia</p> <p>ΔC_t = Derivada de los “crossing points” (punto de cruce)</p> <p>t = gen en estudio (target gene)</p> <p>r = gen de referencia (reference gene)</p>
---	---

El valor C_t se define como el punto donde la fluorescencia asciende apreciablemente por encima de la línea basal.

La eficiencia (E) se calculan a partir de las pendientes de la curva estándar obtenidas después de realizar diluciones seriadas con las reacciones de la PCR en tiempo real (Pfaffl *et al.*, 2004) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$E = 10^{-1/\text{slope}}$$

Básicamente, en este método la proporción de expresión relativa del gen en estudio en una muestra se determinó comparando esta con la expresión de un gen de referencia y teniendo en cuenta la eficiencia de cada reacción de PCR en tiempo real. Dicha eficiencia se consideró de 2 (100 %), al obtenerse luego de la realización de la curva un valor de pendiente -1,98.

Tabla 11.- Oligonucleótidos utilizados en la PCR cuantitativa para la cuantificación relativa de la expresión de los genes *CHS3A* y *CHS3B*.

Primers	Secuencia 5' → 3'
ACT1 Foward	GTCTGGATCGGTGGTTCTATTC
ACT1 Reverse	TGGACCACTTTCGTCGTATTC
CHS3A Foward	GGGTGCTTACCCTGTTGATAA
CHS3A Reverse	GCTCCGGTTGAACTGTCTTA
CHS3B Foward	GGAGAGACTAGAGCAACGAAAG
CHS3B Reverse	GACCCTCTAGCCTTCTCATCTA

3.5.8 Purificación en columnas de los productos de PCR y a partir de geles de agarosa.

Se utilizaron los kit AccuPrep® para la purificación de productos de PCR y para la purificación a partir de geles de agarosa siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante. La purificación de ADN utilizando estos kits se fundamenta en la adsorción de ADN por parte de una sal caotrópica sobre una membrana a base de sílice y empaquetada en columnas. La adsorción del ADN es tan selectiva que la agarosa y sales fundidas no se adsorben, pasando por el tubo de la columna. A través de los lavados se eliminan las sales y restos de gel de agarosa residual. Los fragmentos de ADN se eluyen con un tampón de elución proporcionado y presentan alta pureza.

3.5.9 Secuenciación por la metodología de Sanger

3.5.9.1 Reacción de PCR de secuenciación y análisis de las secuencias

Antes de secuenciar un fragmento de ADN, se realizó una reacción de PCR en un volumen final de 10 µl, añadiendo 2 µl del tampón BigDye (BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction System; Applied Biosystem), 3 µl de ADN a secuenciar (150 ng), 1 µl del primer elegido (2 µM). El termociclador fue programado con un ciclo de 3 min a 94 °C, luego 25 ciclos de 10 seg a 96 °C, 5 seg a 50 °C y 4 min a 52 °C, culminando con un ciclo final de 5 min a 60 °C.

La secuenciación de ADN se llevó a cabo en el secuenciador automático de (ABI Prism 377-DNA Sequencer; Applied Biosystem) en el Servicio de Genómica, del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Hurlingham, Buenos Aires. Argentina.

Las secuencias obtenidas se analizaron utilizando el programa Chromas Lite 2.1.

3.5.10 Construcción de vectores – clonación de ADN

El proceso de construcción de moléculas de ADN recombinante depende del vector utilizado. Los vectores que se utilizaron en este trabajo son los plásmidos bacterianos pGEM-T Easy Vector Systems®. La clonación de ADN, junto con la PCR, constituyen dos procedimientos experimentales que tienen como objetivo la amplificación de secuencias de ADN de un genoma concreto. Se diferencian en que la clonación, consiste en una amplificación llevada a cabo *in vivo* y de una forma no específica (cualquier región del genoma), mientras que la técnica de PCR consiste en una amplificación *in vitro* y de una forma muy específica (se amplifica una región muy concreta del genoma de la cual se tiene información previa de su secuencia).

La clonación de fragmentos de ADN en plásmidos bacterianos puede dividirse en varios pasos, estos son:

- Ligación del fragmento de PCR al plásmido: tiene como objetivo obtener un plásmido bacteriano recombinante.
- Transformación bacteriana: tiene como intención incorporar a la bacteria el plásmido recombinante obtenido previamente (punto 3.4.2.1).
- Multiplicación y almacenamiento: su propósito es la amplificación del fragmento de PCR incorporado en el plásmido recombinante y poder perpetuar el plásmido obtenido (punto 3.4.2.2).

3.5.10.1 Ligación rápida de un fragmento de PCR usando el plásmido PGEM-T Easy Vector.

Para obtener plásmidos recombinantes y así poder amplificar *in vivo* un fragmento de PCR, se prepararon 2 tubos de ligación, uno con una relación plásmido : inserto de 1:1 y otro con una relación 1:3, como sigue: 5 µl de tampón de ligación rápida 2 X (agitando en vórtex antes de usar), 1 µl de pGEM-T Easy (50 ng), 1 ó 3 µl del producto de PCR, 1 µl de T4 ADN ligasa y 3 o 1 µl de agua destilada. La reacción se mezcló y se incubó 1 h a temperatura ambiente o a 4 °C durante toda la noche para aumentar el rendimiento de la ligación.

3.5.10.2 Digestión con enzimas de restricción

Las enzimas de restricción, también conocidas como endonucleasas, son enzimas que reconocen secuencias específicas del ADN de doble cadena y cortan los enlaces fosfodiéster del mismo. Los enzimas más utilizados para clonaje reconocen sitios de corte de 4 a 8 nucleótidos, que tienen un eje de simetría (secuencias palindrómicas).

Estas enzimas se utilizaron para generar fragmentos para ser clonados en los vectores apropiados (creación de ADN recombinante).

Para obtener un volumen final de 10 μl se prepararon soluciones con las siguientes cantidades:

- 10 X Tampón 1,5 μl
- enzima 0,75 μl
- ADN Variable dependiendo del tipo y origen*

Agua destilada hasta un volumen total de 10 μl

*8 μl (genómico), 5 μl (plasmídico obtenido por método manual), 1 μl (plasmídico obtenido por método comercial).

Cuando se quiso digerir un plásmido para liberar su inserto, se utilizaron los protocolos antes descritos teniendo en cuenta de utilizar el tampón más adecuado para cada enzima y 0,25 μl de cada una de las endonucleasas.

3.5.10.3 Defosforilación de plásmidos

Este proceso consta de 2 etapas: digestión del plásmido y defosforilación.

La digestión se realizó utilizando las enzimas de restricción elegidas para linearizar el plásmido. Se realizó en un volumen final de 50 μl , utilizando 8 a 10 μl del plásmido purificado por el método comercial Promega (punto 3.5.3.2). La mezcla se incubó a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 h. La calidad de la digestión se comprobó en un gel de agarosa utilizando 5 μl de la reacción anterior.

Para la defosforilación de plásmidos se utilizó fosfatasa alcalina de carnero (CIAP), que cataliza la hidrólisis de los grupos fosfatos ubicados en posición 5' de ADN, ARN y de

ribo o desoxiribonucleosidos trifosfatos. Esta enzima es utilizada para prevenir la recircularización y la religación del vector linearizado ya que remueve los grupos fosfatos de ambos extremos terminales 5'. Para esta etapa, se trabajó con 40 µl del plásmido digerido en la etapa anterior que se desfosforilaron a los que se le adicionaron 5 µl de Buffer de reacción CIAP 10X, incubándose a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, se agregó al tubo 5 µl de la enzima CIAP (0,01 U/µl) repitiendo la incubación. Para detener la defosforilación, se agregaron 300 µl de CIAP stop buffer (Buffer de Lisis) y acto seguido, se procedió a extraer el ADN siguiendo el protocolo descrito en el punto 3.5.2 sin el agregado de RNAasa al final.

Como último paso se llevó a cabo la ligación con T4 ligasa.

3.5.10.4 Oligonucleótidos

Síntesis de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies (IDT, Buenos Aires, Argentina), se recibieron liofilizados y se resuspendieron con agua destilada estéril. El volumen de agua a agregar, se calculó siguiendo las instrucciones del fabricante para obtener una concentración de 100 µM en la solución madre de los primers. A partir de esta solución madre se prepararon diluciones de 10 µM o 5 µM en función de si los oligonucleótidos iban a ser utilizados en PCR o para secuenciación, respectivamente. Estas soluciones se conservaron a -20 °C.

3.5.10.5 Bioinformática

National Center for Biotechnology Information (NCBI):

Este portal incluye, entre otras aplicaciones, un buscador de citas bibliográficas (Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>), secuencias de genes, proteínas, estructuras tridimensionales, y comparación de secuencias de nucleótidos (blastn) y proteínas (blastp) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> y Entrez: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.html>)

All-I ONE SEQ-ANALYZER Version 1.36 (<http://www-personal.umich.edu/~ino/blast.html>) se utilizó para generar secuencias FASTA y eliminar errores en las secuencias.

BioEdit Sequence Alignment Editor v7.1.3.0 se utilizó para el análisis de secuencias de nucleótidos, para la realización de alineamientos, análisis comparativos (herramienta: ClustalW Multiple Alignment) y mapas de restricción de las secuencias.

3.6 ANÁLISIS DE FENOTIPOS DE LAS CEPAS MUTANTES DE *C. glabrata sensu stricto* DEFECTIVAS EN GENES FKS (FKS KNOCK-OUT)

3.6.1 Evaluación de la sensibilidad a los antifúngicos

3.6.1.1 Técnica de microdilución en caldo utilizando como método de referencia CLSI protocolo M27-A3-S4.

3.6.1.1.1 Antifúngicos, soluciones madres e intervalos de concentraciones probadas.

En este trabajo se utilizaron los siguientes antifúngicos: anfotericina B (AMB), fluconazol (FLC), voriconazol (VRC), itraconazol (ITC), posaconazol (PSC), clotrimazol (CTZ) y caspofungina (CSF). La totalidad de los antifúngicos utilizados fueron adquiridos de Sigma-Aldrich . Todos los antifúngicos fueron obtenidos como polvo estándar del fabricante y disueltos en DMSO, con la excepción de FLC que se disolvió en agua destilada estéril y se conservaron a – 80 °C hasta su uso.

Para la preparación de las soluciones madres de los antifúngicos se siguió el documento M27-S4 de CLSI. Los intervalos de concentraciones utilizados para CSF, AMB, ITC, PSC, CTZ y VRC fueron de 0,0157 a 8 µg/ml (dada la baja solubilidad que presentó sobre todo el ITC a 16 µg/ml) y para FLC de 0,125 a 64 µg/ml. Por lo tanto, las concentraciones de las soluciones madres fueron: 1.600 µg/ml para aquellos antifúngicos cuyo valor mayor del rango fuera 8 µg/ml y de 12.800 µg/ml para el FLC.

3.6.1.1.2 Caldo RPMI 1640

Para la determinación de la sensibilidad a los antifúngicos se utilizó como medio de cultivo el RPMI 1640 con L-glutamina (SIGMA Aldrich, Argentina) y tamponado con MOPS (CALBIOCHEM, Merck, Buenos Aires, Argentina).

Para preparar el caldo RPMI 2X se pesó 20,8g de RPMI 1640 comercial en polvo y 69,06g de MOPS, disolviéndose en 1000 ml de agua destilada estéril, previa calibración a pH 7. Se esterilizó por filtración con filtros millipore de 0,22 μ m de diámetro (Millipore Corporation). Luego, se realizaron controles de esterilidad y crecimiento rotulando la fecha de preparación, número de lote y resultados de los controles.

3.6.1.1.3. Controles de calidad del caldo RPMI 1640

Para los controles de calidad del caldo RPMI 1640, se utilizó un inóculo de 1×10^5 UFC/ml de *Candida krusei* ATCC 6258 del que se dispensaron 100 μ l en placas de microdilución con fondo en U que contenían 100 μ l del RPMI 2 X. Se incubó a 37 °C durante 48 h. La lectura se determinó a las 24 y 48 h visualmente utilizando como blanco otros pocillos de la misma placa inoculados con 100 μ l de agua estéril (control de esterilidad).

3.6.1.1.4 Preparación de las placas de microdilución e inóculo para determinar CIM. Lectura e interpretación de resultados.

Para preparar las placas de microdilución se siguió el protocolo de determinación de la CIM para levaduras por el método de microdilución recomendado por la CLSI (Documentos M27-A3 y M27-S4). Las placas se sembraron con un inóculo final de trabajo de $0,5 - 2,5 \times 10^3$ UFC/ml obtenido haciendo un recuento microscópico en una cámara hematocitométrica (Improved Neubauer Chamber) (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012). La lectura de los valores de CIM se realizó de manera visual (a ojo desnudo) y la interpretación de los resultados se hizo siguiendo los puntos de corte modificados en el documento M27-S4 de CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012).

3.6.1.2 Determinación de CIM utilizando tiras de Etest®

3.6.1.2.1 Tiras de Etest®

El Etest® (bioMérieux) es un sistema comercial que se utiliza para determinar la CIM en levaduras del género *Candida* y *Cryptococcus neoformans*, con alcance además para *Aspergillus* spp. El reactivo consiste en una tira de material inerte cargada con un gradiente de concentraciones definidas de antifúngicos. El Etest® es particularmente valioso en laboratorios de baja o mediana complejidad, ya que permite la determinación de la CIM.

3.6.1.2.2 RPMI 1640 agarizado

Se siguió el mismo procedimiento descrito en el punto 3.6.1.1.2 para preparar el caldo RPMI 2X con MOPS. Por otro lado, se prepararon 500 ml de agar al 3 % (2X) y se esterilizó por 15 min. a 121°C. Se llevó el agar 2X a 60 °C y finalmente se mezclaron ambas soluciones, para obtener 1000 ml de RPMI agar.

3.6.1.2.3 Preparación del inóculo. Aplicación de las tiras de Etest® a las placas inoculadas.

❖ Escala McFarland:

Los patrones McFarland se utilizan como patrones de turbidez en la preparación de suspensiones de microorganismos. Para la preparación del inóculo se utilizó un estándar con una turbidez equivalente a 0,5 McFarland. Los reactivos utilizados para la preparación del estándar fueron: solución acuosa de Cloruro de Bario (BaCl_2) al 0,048 M (mol/litro) y ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,18 M. Para un volumen final de 100ml de estándar 0,5 McFarland, se mezclaron 99,5 ml de H_2SO_4 con 0,5 ml de BaCl_2 . Para verificar la correcta densidad de la turbidez se utilizó un espectrofotómetro, en el cual la absorbancia a 625 nm debe ser de 0,08 a 0,10. Se alicuotó 5ml en tubos de vidrio, almacenándolos a una temperatura de entre 2 a 25 °C, al resguardo de la luz.

❖ Preparación del inóculo:

El inóculo se preparó mediante la suspensión en 5 ml de agua destilada estéril de cinco colonias representativas, obtenidas de un cultivo de entre 18-24 h en agar Sabouraud a 37 °C. Se resuspendió uniformemente el inóculo agitando vigorosamente en un vórtex durante 15 seg. Se ajustó la D.O. a 0.5 McFarland (equivalente a un rango de 1×10^6 a 5×10^6 UFC/ml) midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro a 530 nm de longitud de onda y añadiendo agua estéril cuando fue necesario. Las placas se inocularon dentro de los 30 minutos de ajustada la turbidez del inóculo.

❖ Inoculación de las placas**Siembra por dispersión con hisopo**

Se sumergió un hisopo de algodón estéril en el inóculo. El exceso de líquido se eliminó girando el hisopo varias veces contra las paredes interiores del tubo. El inóculo se extiende por toda la superficie de la placa en 3 direcciones diferentes para asegurar la distribución uniforme del inóculo.

Colocación de las tiras de Etest®

Las tiras se colocaron dentro de los 15 min. de inoculadas las placas, de esa forma la difusión y el crecimiento ocurren en simultáneo. Para asegurar el completo contacto se presionó suavemente la tira contra la superficie del agar. Las placas inoculadas se incubaron a 35 °C durante 24 h - 48 h, dentro de los 15 min. de aplicada la tira de Etest®.

3.6.1.2.4 Lectura e interpretación de resultados.

La lectura de las tiras de Etest® se realizó de manera visual, teniendo en cuenta la intersección entre el crecimiento del microorganismo y la zona de inhibición en forma de elipse, lo cual se tomó como la CIM. Para los azoles y las equinocandinas, la CIM se consideró como la concentración de antifúngico en el punto de intersección de la elipse que inhibe ≥ 80 % del crecimiento. La presencia de colonias de menor tamaño en el interior de la elipse de inhibición no fue considerada. Por el contrario, para la AMB, la

inhibición dentro de la elipse debió ser del 100 %. Así, toda colonia en el interior de la elipse de inhibición, independientemente de su tamaño, fue considerada como resistente.

3.6.1.3 Evaluación de la combinación de antifúngicos por microdilución (método del tablero de ajedrez o checkerboard).

En este trabajo se utilizaron las siguientes drogas y antifúngicos en combinación: FLC, CSF, Mevinolin, FK506, Rapamicina y Nikkomycin Z obtenidos como polvos estándares (Sigma Aldrich). Todos los antifúngicos y drogas se disolvieron en DMSO (Sigma) y se conservaron a – 80 °C hasta su uso.

3.6.1.3.1 Soluciones madres de antifúngicos utilizados, rango de concentraciones y combinaciones probadas

Para la preparación de las soluciones madres de los antifúngicos se siguieron las recomendaciones del documento M27-A3 de CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008) modificando el solvente utilizado para disolver el FLC que en vez de agua destilada (como sugiere el CLSI) se utilizó DMSO para permitir la solubilidad de las otras drogas cuando se utilizaban en combinaciones. De todos modos, se ha comprobado que el cambio de DMSO por agua en la preparación de soluciones madres de FLC no altera los resultados finales. Las combinaciones que se ensayaron se detallan en la **Tabla 12**.

Tabla 12.- Combinaciones de drogas evaluadas en los mutantes de *C. glabrata sensu stricto* defectivos en los genes *FKS*.

Combinaciones probadas	Máximas concentraciones utilizadas
Fluconazol- FK506	64 µg/ml- 20 µg/ml
Fluconazol- Mevinolin	64 µg/ml- 50 µg/ml
Fluconazol-Rapamicina	64 µg/ml- 5 µg/ml
Fluconazol- Nikkomycin Z	64 µg/ml- 20 µg/ml
Caspofungina-FK506	0,25 µg/ml- 20 µg/ml
Nikkomycin Z- Rapamicina	20 µg/ml- 5 µg/ml
FK506- Nikkomycin Z	64 µg/ml- 20 µg/ml

Para los estudios de combinaciones, cada solución madre de antifúngico se diluyó $\frac{1}{2}$ en forma seriada en DMSO, y luego nuevamente 1/100 en RPMI 1640 de acuerdo al esquema propuesto por la CLSI para antifúngicos hidrófobos (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008). De esta manera se debe partir de soluciones del antifúngico cuatrocientas veces más concentradas de la concentración final deseada. Por esta razón las concentraciones de las soluciones madres que se utilizaron son: 1 $\mu\text{g/ml}$ para CSF, 80 $\mu\text{g/ml}$ para FK506, 20 $\mu\text{g/ml}$ para Rapamicina, 256 $\mu\text{g/ml}$ para el FLC, 80 $\mu\text{g/ml}$ para Nikkomycin Z y 200 $\mu\text{g/ml}$ para Mevinolin.

3.6.1.3.2 Preparación de las placas con las combinaciones

Para explicar cómo se prepararon las placas de sinergismo, se tomará como ejemplo la preparación de una placa de FLC-FK506. Una alícuota de 50 μl de cada dilución de FLC se dispensó en las columnas 1 a 10 entre las líneas A y H de las placas de fondo plano de 96 pocillos (Costar® 96 Cultek, Argentina). De igual manera se procedió en la columna 11 entre las líneas A y G dejando el pocillo 11 H libre. Luego, en todas las columnas se agregaron 50 μl de cada dilución de FK506 desde la fila A hasta la G. De esta manera, se obtuvo un volumen final de 100 μl con ambos antifúngicos al doble de la concentración final deseada. En los pocillos de la columna 12 y la fila H se dispensaron 50 μl de RPMI 1640 con 1 % de DMSO. Así, la línea H entre los pocillos H1 y H10 solo contenía FLC y la columna 12 entre los pocillos A12 y G12 solo contenía FK506. En los pocillos 11 H y 12 H se añadieron 100 μl de RPMI 1640 con 1 % de DMSO y fueron utilizados como controles de crecimiento y esterilidad, respectivamente (**Figura 15**).

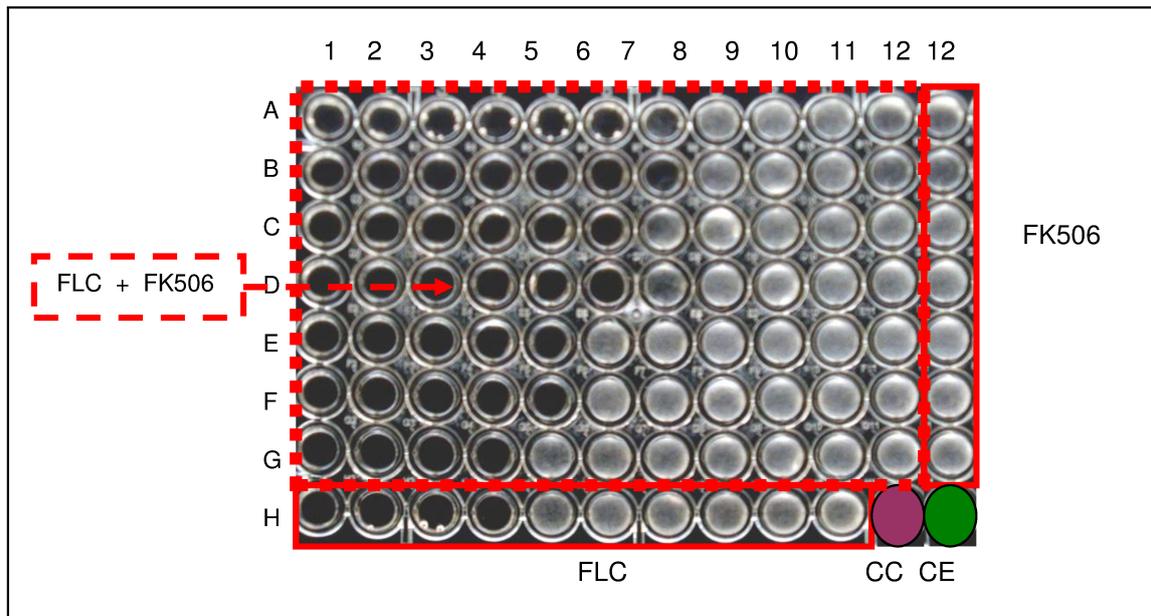


Figura 15.- Placa de combinación FLC-FK506. FLC: fluconazol. CC: control de crecimiento. CE: control de esterilidad.

Se realizó el mismo protocolo para cada una de las combinaciones descritas en la **Tabla 12**.

3.6.1.3.3 Evaluación de la interacción entre antifúngicos

Para la evaluación de la interacción ente antifúngicos se utilizó un modelo bi-dimensional, de 2 agentes en combinación utilizando la técnica de microdilución en tablero de ajedrez en placas de 96 pocillos con fondo plano.

3.6.1.3.4 Modelo de interacción entre antifúngicos.

Para determinar el tipo de interacción que existía entre dos antifúngicos, los datos obtenidos se analizaron utilizando la teoría de aditividad no-paramétrica de Johnson *et al.* (Johnson *et al.*, 2004) actualizada por Odds, 2003 (Odds, 2003). Para cada combinación se calculó la sumatoria de la concentración fraccional inhibitoria (Σ FIC, del inglés fractional inhibitory concentration) .El cálculo de la sumatoria se realiza teniendo en cuenta previamente los siguientes valores:

- **FIC del agente A** = CIM agente A en combinación

CIM del agente A solo

$$\Sigma \text{FIC} = \text{FIC de A} + \text{FIC de B}$$

- **FIC del agente B** = CIM agente B en combinación

CIM del agente B solo

Esta sumatoria es calculada automáticamente en una planilla prediseñada, al cargar los datos provenientes de las combinaciones, utilizando un sistema de matriz. Si hay desarrollo se ingresa en la planilla el número 1, mientras que cuando no hay desarrollo se ingresa el número 0. (**Figura 16**). Se interpreta que hay “*sinergismo*” (la actividad de los dos antimicrobianos combinados, es mayor que la actividades separados de los mismos) cuando la $\Sigma \text{FIC} \leq 0,5$; “*antagonismo*” (la actividad de los dos antimicrobianos combinados es menor, que la de cada uno individualmente) cuando la $\Sigma \text{FIC} > 4$, y “*no interacción*” (la actividad de los antimicrobianos combinados, no difiere de la actividad de cada uno por separado) cuando $0,5 < \Sigma \text{FIC} \leq 4$.

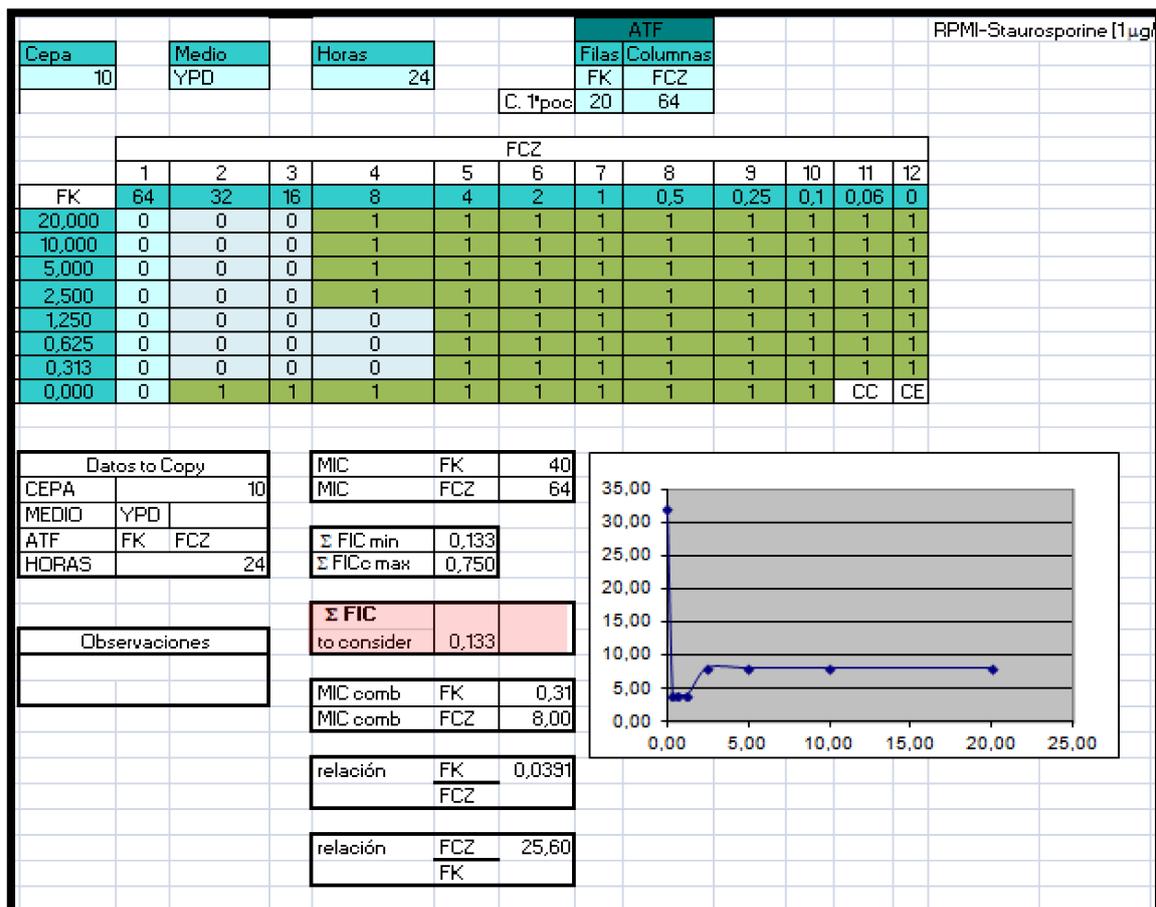


Figura 16.- Planilla modelo utilizada para calcular la ΣFIC .

3.6.1.4 Evaluación de la concentración fungicida mínima (CFM)

3.6.1.4.1 Solución madre de FLC y rango de concentraciones probadas

Para la evaluación de la CFM se utilizó el mismo FLC que el descrito anteriormente. Se lo disolvió en agua destilada estéril y se lo conservó a -80°C hasta su uso.

Para la preparación de las soluciones madres de los antifúngicos se siguió el documento (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012). Los intervalos de concentraciones y soluciones madres fueron los mismos utilizados para la determinación de la CIM.

3.6.1.4.2. Procedimientos de las pruebas de determinación de la CFM.

Para la evaluación de CFM se siguieron los mismos pasos descritos anteriormente para las pruebas de CIM tanto en la preparación del medio de cultivo líquido (caldo), la realización de controles, la preparación del inóculo, la inoculación e incubación de las placas.

3.6.1.4.3 Lectura e interpretación de resultados.

La actividad fungicida in vitro se determinó para FLC como ha sido descrito previamente con las siguientes modificaciones. El inóculo inicial que se utilizó fue el mismo utilizado para la determinación de CIM. A las 48 h de incubación se recogieron 100 μl de cada pocillo que presentó una inhibición total del crecimiento (determinado visualmente), del último que presentó crecimiento visible y del control de esterilidad y se subcultivaron en placas de Petri de 90 mm de diámetro con Sabouraud agar. Se incubaron a 37°C hasta que se observó crecimiento visible y se realizó el recuento. Se definió CFM como la menor concentración de antifúngico en la que se observara una disminución del 99 % en el número de colonias respecto al inóculo inicial que se determinó por recuento en cámara hemocitométrica.

3.6.2 Evaluación de la virulencia de cepas de *C. glabrata sensu stricto* defectivas en genes *FKS* en el modelo invertebrado *Galleria mellonella*.

Los modelos animales mamíferos (por ej. ratones) son habitualmente utilizados en Micología para el estudio de los mecanismos de virulencia, de la interacción hongo-huésped y de la evaluación de la eficacia de drogas. Sin embargo, la manutención de bioterios supone grandes costos y la necesidad de contar con grandes infraestructuras. A estos inconvenientes se les suman las reservas éticas que estos modelos implican. En un intento por reducir los costos, obviar las limitaciones éticas y como una forma de poder utilizar muchos individuos en modelos complejos, se ha propuesto el uso de modelos de invertebrados. Dentro de estos, se han utilizado en Micología a la *Drosophila melanogaster* y sobre todo *Galleria mellonella* (Lepidoptera).

Las larvas de *G. mellonella* presentan la ventaja de ser relativamente baratas, fáciles de mantener y de manipular. Habiéndose utilizado antes en modelos de infecciones por *Candida* spp, *Fusarium* spp., *Cryptococcus* sp. y otros patógenos fúngicos (Gago *et al.*, 2014, Garcia-Rodas *et al.*, 2011, Mesa-Arango *et al.*, 2013, Rueda *et al.*, 2014, Scorzoni *et al.*, 2013).

Para la implementación del modelo experimental invertebrado, se utilizaron larvas de *G. mellonella* en la etapa final del desarrollo (Alcotán, Valencia, España). Se formaron 6 grupos constituidos cada uno por 10 larvas de aproximadamente entre 300-400 mg de peso. La descripción del modelo experimental se detalla en la **Tabla 13**. Las cepas de *C. glabrata* se crecieron en medio YPD líquido durante 16 horas. El inóculo para inyectar las larvas fue de 5×10^8 lev/ml, es decir, 5×10^6 lev/larva. El inóculo se ajustó por recuento en cámara hematocitométrica de Neubauer, y se realizó en una solución compuesta por: Buffer fosfato salino (PBS) y ampicilina 20 μ g/ml. La viabilidad del inóculo de cada cepa, fue controlada realizando una dilución de manera que la concentración final sea de 5×10^3 lev/ml, de lo cual se sembró 50 μ l en placas de agar Sabouraud para su recuento.

La infección de las larvas se realizó con 10 μ l de la suspensión de inóculo, utilizándose para ello una jeringa Hamilton (Hamilton, EEUU). La inyección se realizó en el hemocel de cada *G. mellonella*, a través de la última propata izquierda. Las larvas se dividieron en 3 grupos denominados: infectadas, control (inyectadas con PBS más ampicilina 20 μ g/ml) y las untouched (no fueron inyectadas). Todos los grupos se incubaron a 37 °C por siete días. La supervivencia de las larvas fue monitoreada diariamente, teniendo en cuenta la

muerte de las larvas cuando no responden a la presión física. Cada experimento se realizó por duplicado, fueron inoculadas 20 larvas en total con cada cepa.

Se utilizaron las curvas de Kaplan-Meier, para graficar la tasa de supervivencia de las larvas de *G. mellonella* en función del tiempo. Los valores de probabilidad (p) se calcularon utilizando la prueba de log-rank utilizando GraphPad Prism 5 y el valor de $p < 0,01$ fue considerado significativo.

Tabla 13.- Modelo de diseño experimental para estudio de la virulencia en el modelo invertebrado *G. mellonella*.

Nº de placas por cepa	Cepa	Tratamiento	Inóculo (CFU/larva)	Nº de larvas por placa	Tamaño de larvas (gramos)
1		Untouched		10	0,3-0,4
1		PBS+ Ampicilina 20µg/ml		10	0,3-0,4
2	ATCC 90030 (WT)		5×10^6	10	0,3-0,4
2	LMDM 331 (Δ URA)		5×10^6	10	0,3-0,4
2	LMDM 760 (Δ FKS1)		5×10^6	10	0,3-0,4
2	LMDM 389 (Δ FKS2)		5×10^6	10	0,3-0,4
2	LMDM 402 (Δ FKS3)		5×10^6	10	0,3-0,4

3.6.3 Evaluación del efecto de diversos factores físicoquímicos y sustancias químicas generadores de estrés celular sobre las cepas Knock out.

Basándonos en estos estudios previos descritos previamente en la introducción, se realizaron estudios exponiendo a las cepas mutantes generadas (Δ FKS1::URA3,

$\Delta FKS2::URA3$ y $\Delta FKS3::URA3$) a compuestos que afectan distintas vías de síntesis y de señalización celular. Las pruebas para evaluación de fenotipo fueron realizadas tanto en medio sólido utilizando como medio base YPD descrito en el punto 3.3.1.2., como en placas de 96 pocillos utilizando el medio RPMI 1640. Las pruebas que se realizaron en medio sólido fueron: calcofluor white, rojo congo, brefeldina A, NaCl, hygromicina B, temperatura, FK506, rapamicina, SDS, agua oxigenada y pH. Todos, excepto FK506 y rapamicina, se llevaron a cabo realizando la técnica de *spot*, para la cual se prepararon inóculos de concentraciones decrecientes: 2×10^6 a 2×10^3 células/ml, de las 5 cepas en estudio (ATCC 90030, 331 ΔURA , $\Delta FKS1::URA3$, $\Delta FKS2::URA3$ y $\Delta FKS3::URA3$). Luego se sembraron 5 μ l de cada inóculo, para cada cepa como se esquematiza en la (Figura 17). FK506 y rapamicina, se probaron a distintas concentraciones impregnando discos de papel de filtro, los cuales posteriormente, se aplicaron sobre la superficie de un medio con YPD agar que fue inoculado con 1×10^6 a 5×10^6 UFC/ml de cada cepa en estudio. Mevinolin, calfostin, tunicamicina y nikkamicina (todas las drogas de Sigma) fueron realizadas en placas de 96 pocillos. Los compuestos y/o condiciones utilizadas, con las vías que afectan y las concentraciones probadas, se detallan en la Tabla 14.

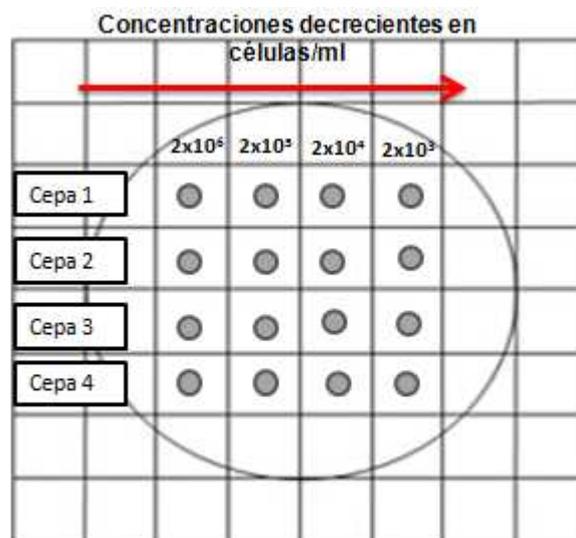


Figura 17.- Esquema de la técnica de *spot* para evaluación de fenotipos.

Tabla 14.- Agentes químicos y físicos a ser utilizados en la evaluación del fenotipo de los mutantes de *C. glabrata sensu stricto* defectivas en los genes *FKS*.

Compuestos que actúan sobre:		Mecanismo de acción	Concentraciones probadas
PARED	Calcofluor white (CFW)	Inhibe el ensamblamiento de la quitina por unión a las cadenas nacientes. Cuanto menos cantidad de quitina tenga la pared más resistente a CFW y RC.	5, 10, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$
	Nikkomycin Z		
	Rojo congo (RC)		
MEMBRANA	Mevinolin	Inhibidor de la Mevalonato NADP Oxidoreductasa lo cual genera la inhibición de la síntesis del colesterol.	100 $\mu\text{g/ml}$
SINTESIS PROTEICA	Brefeldina A	Inhibe el transporte de proteínas del retículo endoplasmático al Golgi. Tiene como diana: GBF1 (Golgi Brefeldin A Resistant Guanine Nucleotide Exchange Factor 1) media la formación de vesículas.	20 y 40 $\mu\text{g/ml}$
	Hygromicina B	Inhibe la síntesis de proteínas	10, 20, 50 y 200 $\mu\text{g/ml}$
	Tunicamicina	Bloquea la formación de uniones N-glicosídicas a proteínas por la inhibición del paso de N-acetilglucosamina 1-fosfato a dolicol monofosfato. Es decir inhibe la N-acetilglucosamina transferasa.	50 $\mu\text{g/ml}$
VÍAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR	Tacrolimus (FK506)	Inhibidor de la Calcineurina, por unión del complejo FKBP-FK506 a la misma.	10, 20 y 50 $\mu\text{g/ml}$
	Rapamicina	Inhibe la vía TOR (Serina/treonina kinasa).	10, 20 y 50 $\mu\text{g/ml}$
	Calfostin	Inhibición de la proteína kinasa C.	16 $\mu\text{g/ml}$
GENERADORES DE ESTRÉS CELULAR	NaCl	Estrés osmótico	1M
	Temperatura	Estrés térmico	30, 37 y 42°C
	SDS (Dodecilsulfato sódico)	Compuesto anionico tensoactivo. Rompe enlaces no covalentes en las proteínas.	50 y 100 $\mu\text{g/ml}$
	Agua Oxigenada (H_2O_2)	Estrés oxidativo	0,1; 0,3; 0,5 y 0,7 M

3.6.4 Curvas de crecimiento

Se planteó la realización de curvas de crecimiento para cada uno de los mutantes de *C. glabrata sensu stricto* defectivas en genes *FKS*, con el fin de evaluar la participación de los mismos durante la división celular. Se evaluaron las cepas defectivas en genes *FKS*, la ATCC 90030 y su parental $\Delta URA3$ (LMDM 331). Se estableció un inóculo inicial de 2×10^6 cel/ml, en un volumen final de 5 ml de YPD. Se realizó el seguimiento de los cultivos inoculados por 10 h, midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 620nm, cada 2 h. Para las lecturas se transfirieron 200 μ l de cultivo a placas de fondo plano. Las lecturas fueron realizadas en un lector de ELISA (Thermo Scientific Multiskan® FC Microplate Photometer). Las curvas de crecimiento para cada cepa se repitieron por triplicado. El análisis de los datos se realizó utilizando Microsoft Excel, donde se graficó densidad óptica vs tiempo.

3.6.5 Procedimientos de las pruebas de determinación de la capacidad formadora de Biofilm

❖ Preparación de la suspensión de levaduras

Tanto las cepas de *C. glabrata sensu stricto* defectivas en los genes *FKS*, como las cepas ATCC 90030 y su parental LMDM331, fueron cultivadas durante 48 h a temperatura ambiente en medio agar Sabouraud. Luego de la incubación, se prepararon suspensiones de cada cepa en una concentración de $3,5 \times 10^7$ CFU/ml, en PBS estéril, contadas en cámara de Neubauer.

❖ Formación de biofilm

El desarrollo de biofilm de cada cepa fue evaluado utilizando placas estériles de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano. En primer lugar, se preparó la placa para la adherencia de las levaduras agregando 50 μ l de PBS y se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Luego de la incubación, se lavaron los pocillos una vez con PBS y se agregó 100 μ l de la suspensión de levaduras estandarizada ($3,5 \times 10^7$ CFU/ml) anteriormente. Las placas fueron incubadas durante 90 minutos a 37°C. Luego de la fase de adherencia, los pocillos se lavaron cuidadosamente con PBS para remover las levaduras que no se adhirieron a la

placa. Finalmente, se agregaron 200 μ l de caldo Sabouraud glucosado estéril a cada pocillo y se incubó la placa durante 48 h a 37 °C. Luego de 48 h, se lleva a cabo el ensayo de reducción de 2 metoxi 4 nitro 5 sulfonil 5 fenilalanina carbonil 2H tetrazolium hidróxido (XTT). Cada cepa fue ensayada por triplicado en un total de 4 experimentos.

❖ **Ensayo de XTT** (Jin *et al.*, 2004)

Para preparar la formulación estándar de XTT, el reactivo fue disuelto en PBS estéril a una concentración final de 1mg/ml, alicuotado y almacenado a -20 °C. Inmediatamente antes de realizar el ensayo se preparó una solución de Menadiona disuelta en acetona de una concentración de 1mg/ml.

Se lavó cuidadosamente el biofilm formado con PBS y se agregó a cada pocillo 100 μ l de una solución de XTT 0,5g/L (10 ml PBS + 500 μ l XTT estándar) a la cual se le agregó 10 μ l de Menadiona 1mg/ml preparada anteriormente. Las placas fueron incubadas protegidas de la luz a 37°C durante 5 h. La cantidad de XTT reducido a formazan fue medido espectrofotométricamente en lector de placas a 490 nm. De acuerdo al desarrollo, las cepas fueron clasificadas con Baja, Moderada o Alta capacidad formadora de biofilm.

RESULTADOS

4.- RESULTADOS

4.1 OBTENCIÓN DE CEPAS DE *C. glabrata sensu stricto* DEFECTIVAS EN LOS GENES *FKS1*, *FKS2* Y *FKS3*.

4.1.1 Generación de vectores de delección y obtención de cepas mutantes defectivas en genes *FKS*.

❖ Generación de un vector de delección utilizando el método *PRODIGE* para la disrupción del gen *FKS1*

El vector de disrupción del gen *FKS1* se generó en dos pasos. El primero consistió en la realización de tres reacciones de PCR independientes. Se amplificó por un lado el gen *URA3* (marcador de selección) de *S. cerevisiae* ATCC 9763 (GenBank U03450), y por otro lado la región inmediatamente corriente arriba del codón del inicio del gen *FKS1* (GenBank XM_446406) de *C. glabrata sensu stricto* (5'UTR) y la inmediatamente corriente abajo del codón stop del mismo gen (3'UTR). Los fragmentos amplificados: 5'UTR y 3'UTR del gen *FKS1*, fueron de 1200 pb y 1387 pb, respectivamente. Mientras que el gen *URA3* presentó 918 pb. Los primers y sus respectivas secuencias, utilizados para la amplificación de cada uno de los fragmentos se detallan en la Tabla 4 y 5 del punto 3.5.7.2. Los tres fragmentos obtenidos fueron analizados por electroforesis. (**Figura 18**). En el segundo paso se llevó a cabo la fusión de los tres fragmentos obtenidos en el paso 1, lo cual dio como resultado el vector de disrupción de 3345 pb. El producto de la fusión se analizó por electroforesis. (**Figura 19**). Este vector se utilizó para transformar la cepa de *C. glabrata sensu stricto* BG14 (la cual se llamará 331Δ*URA3* de ahora en adelante). De esta manera, se obtuvo una cepa defectiva en el gen *FKS1* pero con el gen *URA3* funcional. Los transformantes obtenidos por transformación con acetato de litio (punto 3.4.1.3.), fueron analizados para corroborar si el vector se incorporó al genoma en el lugar esperado (reemplazando el gen *FKS1*) o ectópicamente (incorporación aleatoria al genoma). El análisis de las cepas mutantes se realizó por PCR, para lo cual se diseñó un par de primers que hibridan en una región del gen que desaparece si se genera el knock-out esperado. (**Figura 20**).

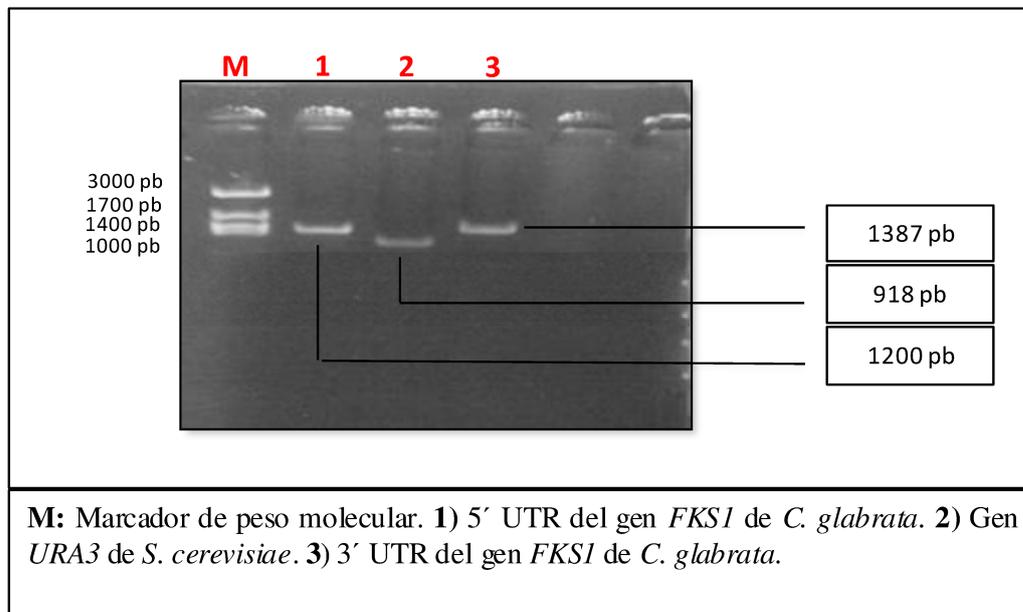


Figura 18.- Electroforesis de los fragmentos 5' UTR del gen *FKS1* de *C. glabrata*, gen *URA3* de *S. cerevisiae* y 3' UTR del gen *FKS1* de *C. glabrata*.

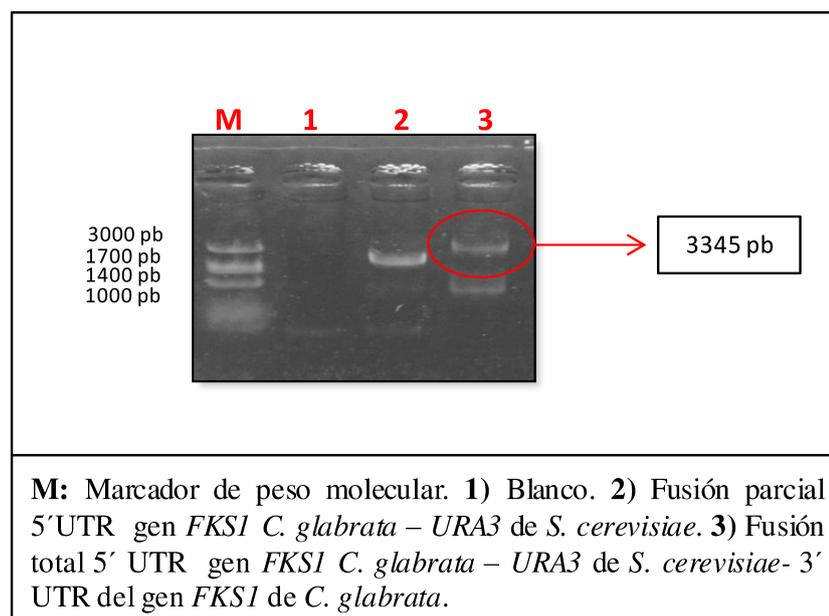


Figura 19.- Electroforesis del vector de disrupción, producto de la fusión de los tres fragmentos 5' UTR gen *FKS1* *C. glabrata* – *URA3* de *S. cerevisiae*- 3' UTR del gen *FKS1* de *C. glabrata*.

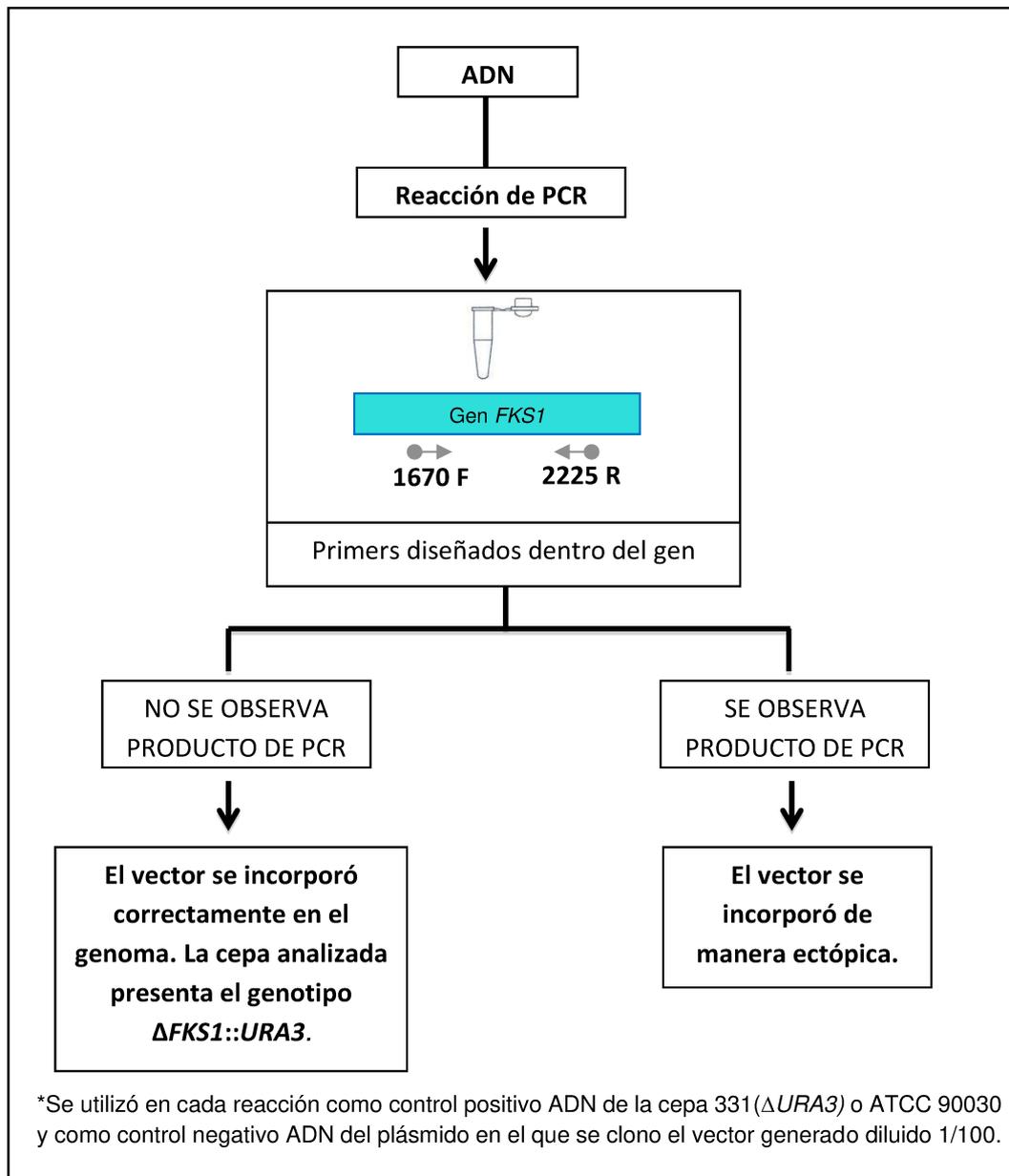


Figura 20.- Esquema para la detección de cepas mutantes defectivos en el gen *FKS1*.

❖ Generación de un vector para la disrupción del gen *FKS2* de *C. glabrata sensu stricto* por PCR de fusión.

La generación del vector de disrupción se llevó a cabo utilizando como base la secuencia del gen *FKS2* (GenBank XM_448401) y *URA3* (L13661.1) de *C. glabrata sensu stricto*. De la misma manera que para el gen *FKS1*, este vector se generó por PCR en dos pasos. En el primer paso se amplificó el gen *URA3* (gen de selección) con su respectivo promotor, la región inmediatamente corriente arriba del codón del inicio del gen *FKS2* (región 5'UTR) y la inmediatamente corriente abajo del codón de stop del mismo gen (región 3'UTR), generándose fragmentos de 1072 pb, 528 pb y 379 pb, respectivamente. El análisis de los fragmentos se realizó por electroforesis (**Figura 21**). En el segundo paso, se fusionaron estos tres fragmentos a través de una PCR de fusión. La fusión es posible ya que los fragmentos presentan regiones de solapamiento que permite la unión de los mismos de la manera buscada. La fusión de los tres fragmentos, dio como resultado un vector de disrupción de 1876 pb, que se analizó por electroforesis. (**Figura 22**). Este vector se utilizó para transformar la cepa de *C. glabrata sensu stricto* 331(Δ *URA3*). De esta manera, se obtuvo una cepa defectiva en el gen *FKS2* pero con el gen *URA* de *C. glabrata* funcional y regulado por su propio promotor. Los transformantes obtenidos por selección en medio YNB, fueron analizados para corroborar si el vector se incorporó al genoma en el lugar esperado (recombinación homóloga reemplazando el gen *FKS2*) o ectópicamente. El análisis de las cepas mutantes obtenidas se realizó por PCR. Para el análisis se utilizó un par de primers, donde uno hibrida en la región 5'UTR del gen *FKS2* y el otro se diseñó de manera que hibride con una región del gen *FKS2* que desaparece si se genera el knock-out (**Figura 23**).

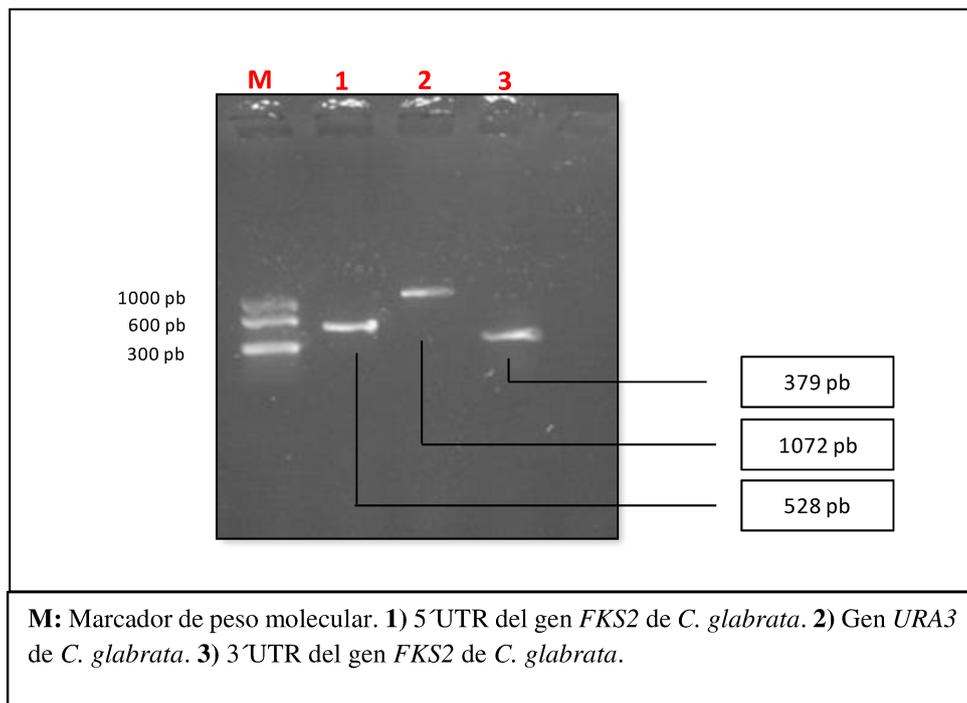


Figura 21.- Electroforesis de los fragmentos 5' UTR del gen *FKS2*, gen *URA3* y 3' UTR del gen *FKS2* de *C. glabrata sensu stricto*.

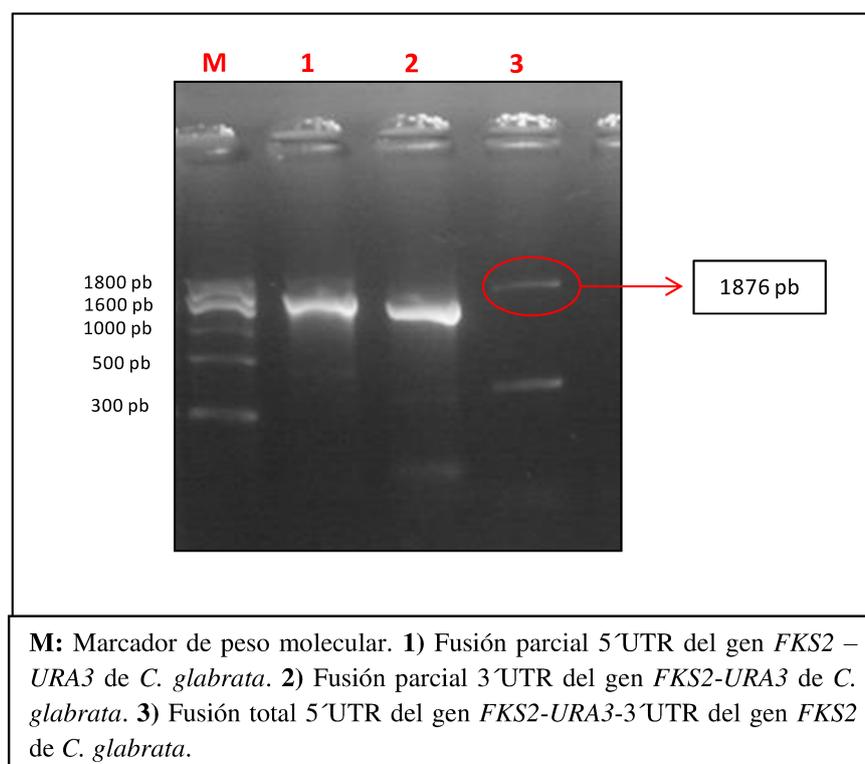


Figura 22.- Electroforesis del vector de interrupción, producto de la fusión de los tres fragmentos 5' UTR del gen *FKS2*, gen *URA3* y 3' UTR del gen *FKS2*.

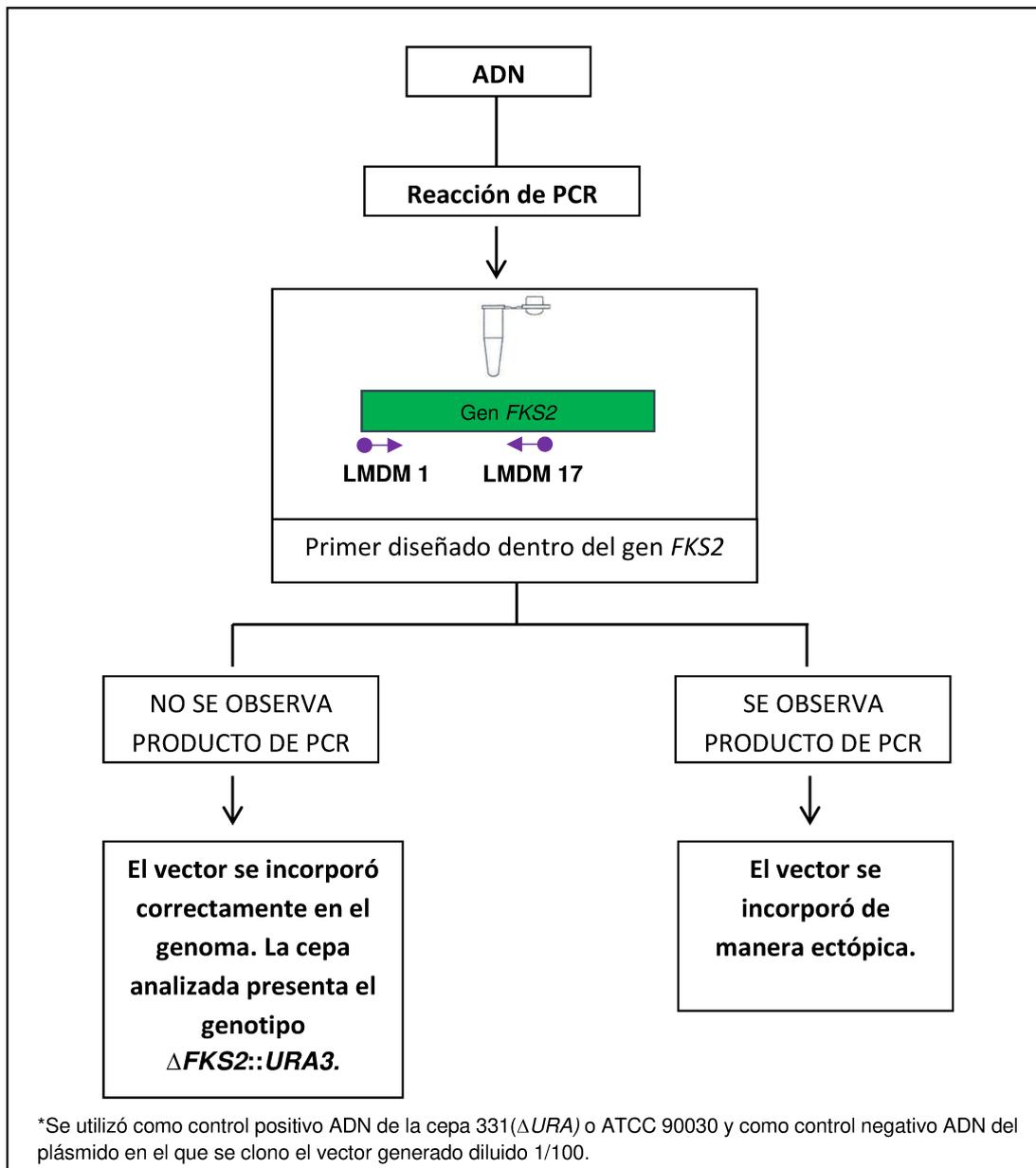


Figura 23.- Esquema para la detección de cepas mutantes defectivos en el gen *FKS2*.

❖ Generación de un vector para la disrupción del gen *FKS3* de *C. glabrata sensu stricto* por digestión con enzimas de restricción.

El vector de disrupción se generó utilizando como base la secuencia del gen *FKS3* (GenBank HQ845285.1) y *URA3* (L13661.1) de *C. glabrata sensu stricto*. Se realizó en tres etapas. En la primera se amplificó por PCR una porción del gen *FKS3* (nt. 1271 al 4486), produciendo un producto de 3215 pb. El análisis del producto de PCR se realizó por electroforesis (**Figura 24**). Esta porción del gen *FKS3* se clonó en el plásmido pGEM-T[®] easy vector al que se denominó LMDM-P30. La segunda etapa consistió en la amplificación del gen *URA3* de *C. glabrata* de 1043 pb utilizando primers que incorporaron los sitios de restricción BamHI y ClaI en los extremos 5' y 3' del gen, respectivamente. La electroforesis del producto de amplificación se muestra en la (**Figura 25**). En la tercera etapa tanto la fracción del gen *FKS3* clonado (LMDM-P30) como el gen *URA3*, fueron digeridos con las enzimas de restricción BamHI y ClaI. Esta digestión produjo la pérdida de una porción de 2304 nt. en el plásmido LMDM-P30. Este fragmento eliminado, incluye las regiones *hot spot* 1 y 2 putativas de Fks3p. Posteriormente se llevó a cabo la ligación de ambos fragmentos digeridos, completando de esta manera, la generación del vector de disrupción al que se denominó LMDM-P36. El vector presentó un tamaño total de 1995 pb. La correcta conformación del vector se evaluó mediante PCR, utilizando los pares de primers LMDM11-LMDM4 y LMDM3-LMDM12. La esquematización del proceso de obtención del vector y la evaluación de su conformación se muestran en la (**Figura 26**). Este vector se utilizó para transformar la cepa de *C. glabrata sensu stricto* 331(Δ *URA*). De esta manera, se obtuvo una cepa defectiva en el gen *FKS3* pero con el gen *URA* funcional. Los transformantes obtenidos por selección en medio YNB, fueron analizados para corroborar si el vector se incorporó de manera homóloga o ectópica al genoma. El análisis de las cepas mutantes se realizó por PCR, utilizando el par de primers LMDM 11 y LMDM 16. El primer LMDM 11 hibrida en el nucleótido 1271 del gen *FKS3* y LMDM 16 se diseñó de manera que hibride con una región del gen *FKS3* que desaparece si se genera el knock-out (**Figura 27**).

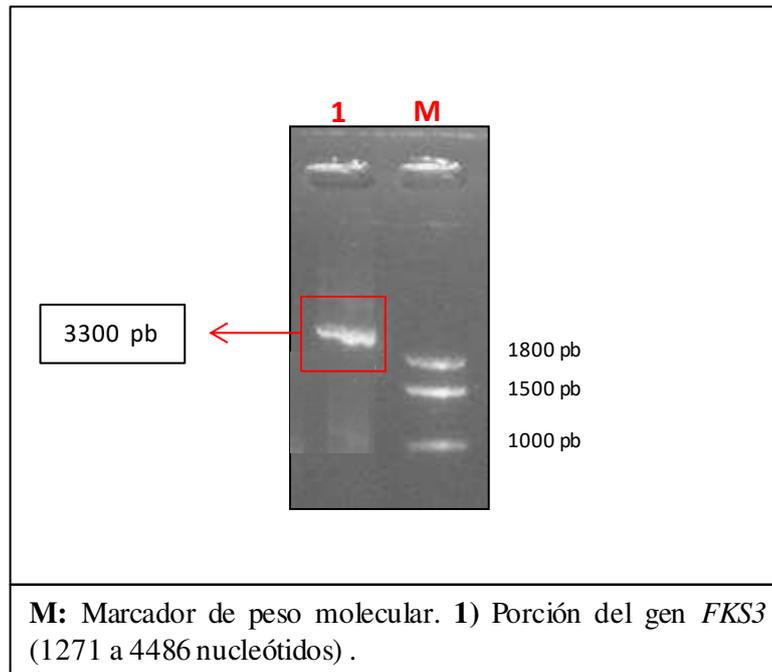


Figura 24.- Electroforesis de la porción del gen *FKS3* de *C. glabrata sensu stricto*.

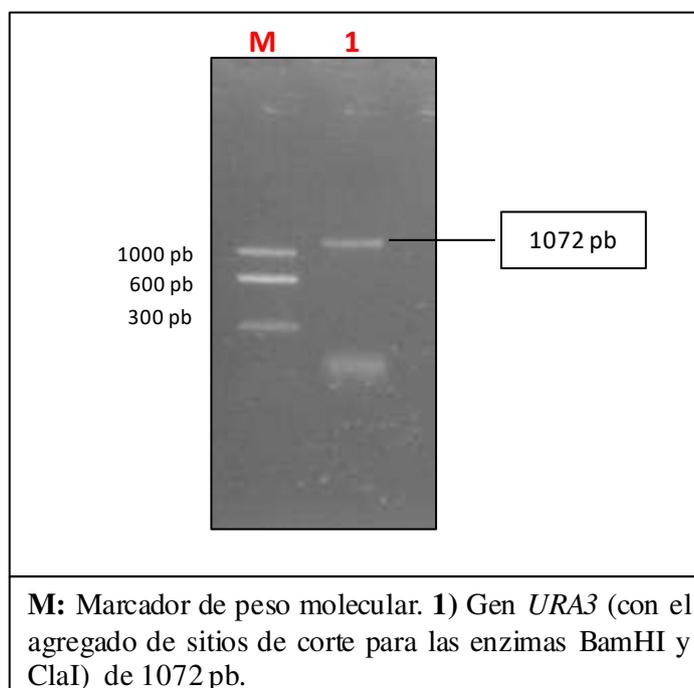


Figura 25.- Electroforesis del gen *URA3* de *C. glabrata sensu stricto*.

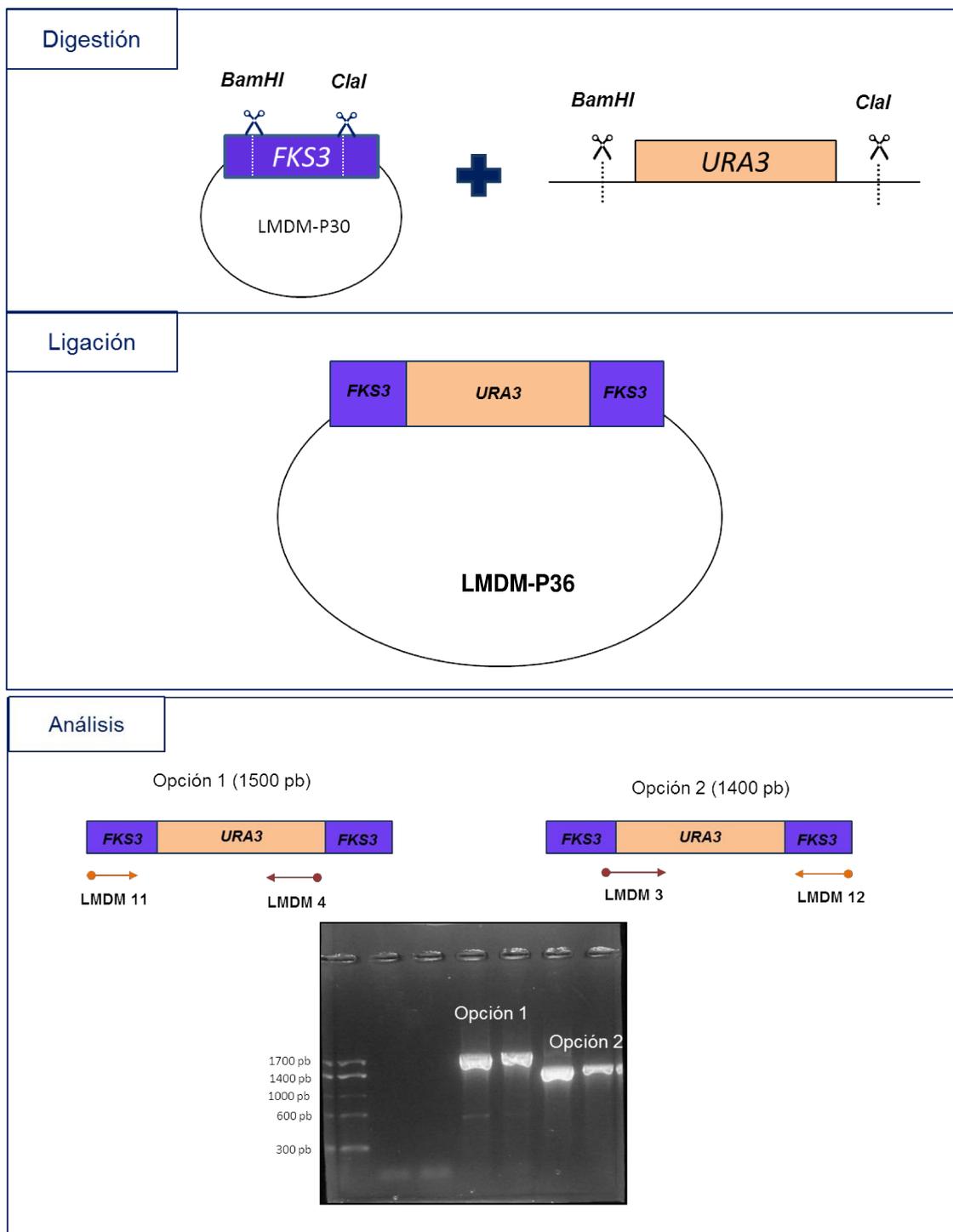


Figura 26.- Proceso de obtención del vector de interrupción y evaluación de su conformación. Análisis: línea 1 peso molecular. Líneas 2 y 3 controles negativos. Líneas 4 y 5 resultados positivos para la combinación de primers LMDM 11 – LMDM 4 (Opción 1). Líneas 6 y 7 resultados obtenidos con los primers LMDM 3 y LMDM 12 (Opción 2).

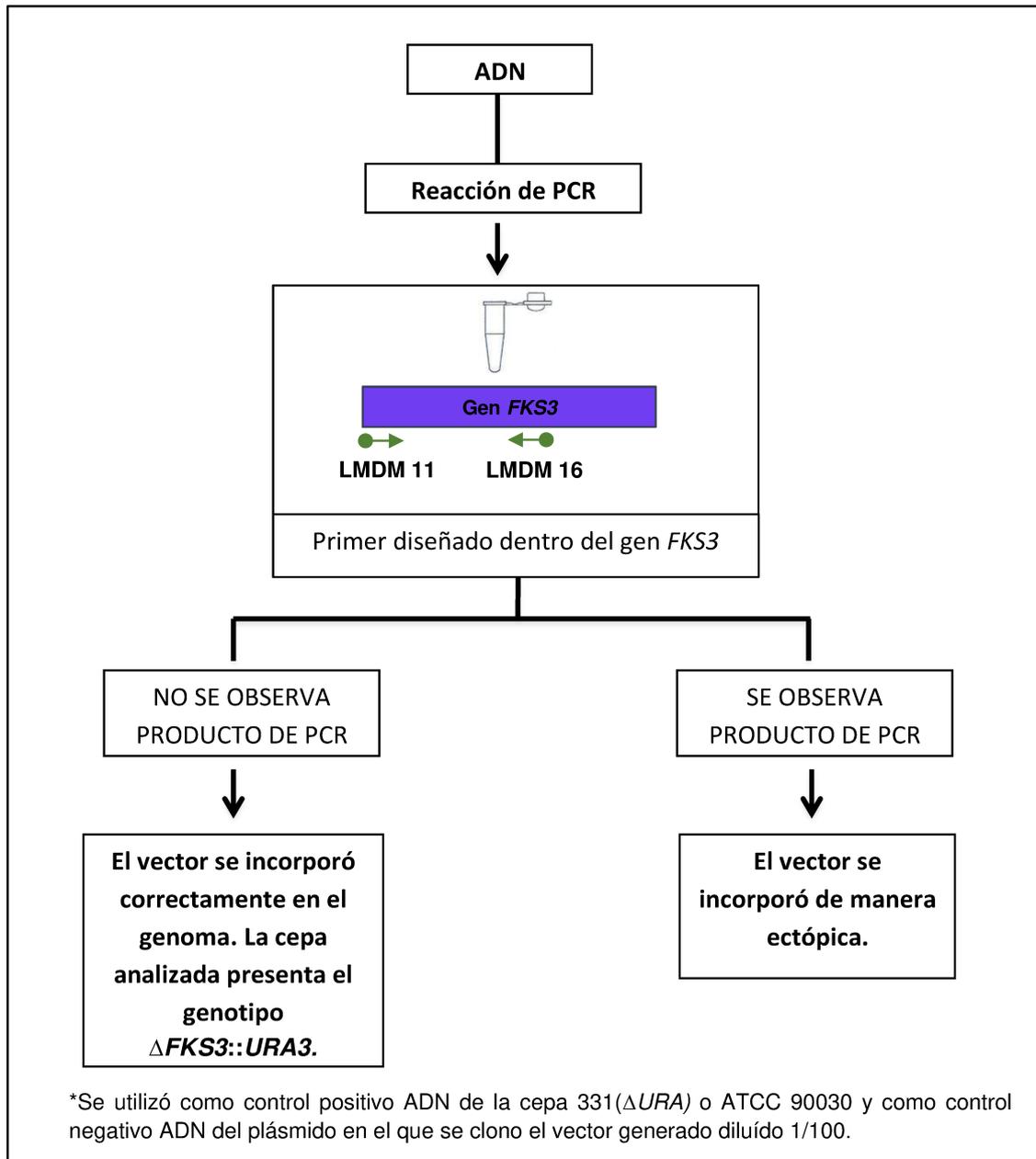


Figura 27.- Esquema para la detección de cepas mutantes defectivos en el gen *FKS3*.

4.2 EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE LOS GENES *FKS* EN EL DESARROLLO, ADQUISICIÓN DE RESISTENCIA Y/O TOLERANCIA A LOS ANTIFÚNGICOS, EN LA REGULACIÓN DE VÍAS CELULARES DE RESPUESTA A ESTRÉS Y EN LA VIRULENCIA DE *C. glabrata sensu stricto*.

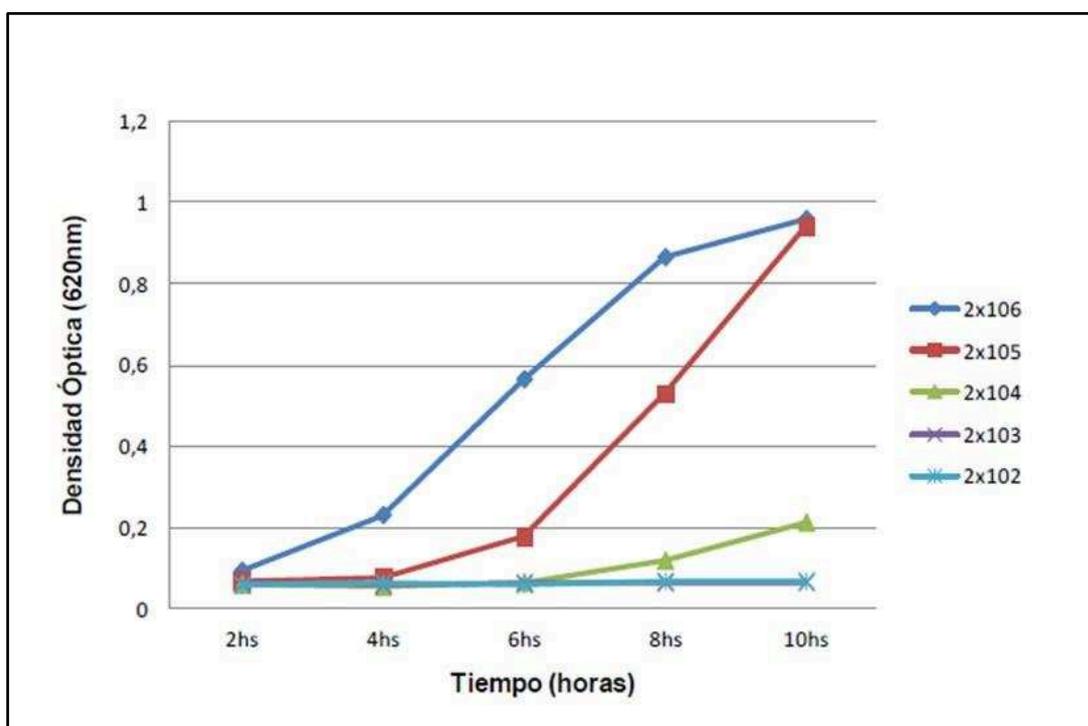
4.2.1. Curvas de crecimiento

Se realizó el análisis de las curvas de crecimiento, que fueron obtenidas al evaluar durante 10 h el desarrollo de las cepas defectivas en los genes *FKS*, la cepa ATCC 90030 (WT) y la cepa 331(Δ URA). Se comenzó con el establecimiento del inóculo utilizando la cepa WT. Se eligió el inóculo de 2×10^6 células/ml, que permitió evaluar en el tiempo de estudio, las tres fases de una curva de crecimiento: latencia, logarítmica y estacionaria. **Tabla 15 y figura 28 A.** Los valores de densidad óptica (DO) obtenidos para cada cepa, en los tiempos evaluados (2 h, 4 h, 6 h, 8 h y 10 h) se describen en la **Tabla 16**. Estos valores de DO surgen de la realización del promedio, producto de las tres repeticiones realizadas en distintos días. Solo se observó una disminución visible en la velocidad de crecimiento en la cepa defectiva en el gen *FKSI*, a todos los tiempos evaluados, al compararla con las cepas ATCC90030 y 331(Δ URA). En el caso del mutante Δ FKS2::*URA3* se observó un comportamiento similar al de la cepa ATCC 90030, mientras que en el mutante Δ FKS3::*URA3* el comportamiento hasta las 4 h es similar a la cepa WT evidenciándose luego una disminución en la velocidad de crecimiento (**Figura 28**).

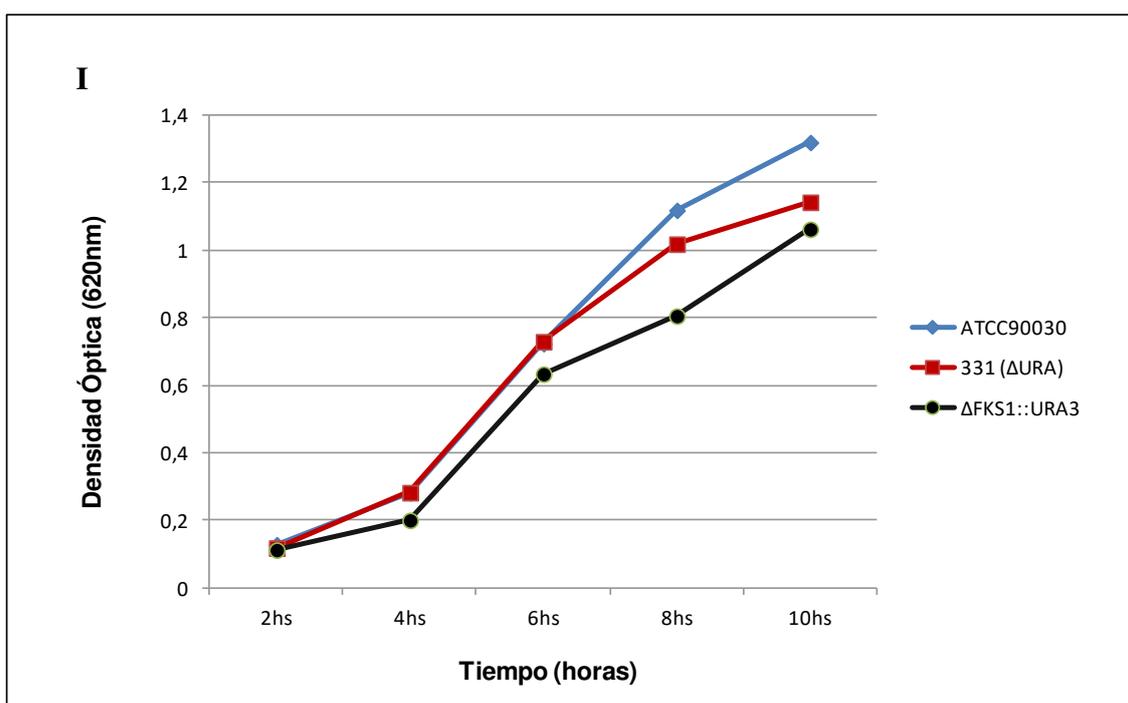
Tabla 15.- Establecimiento del inóculo inicial utilizando la cepa ATCC 90030 (WT).

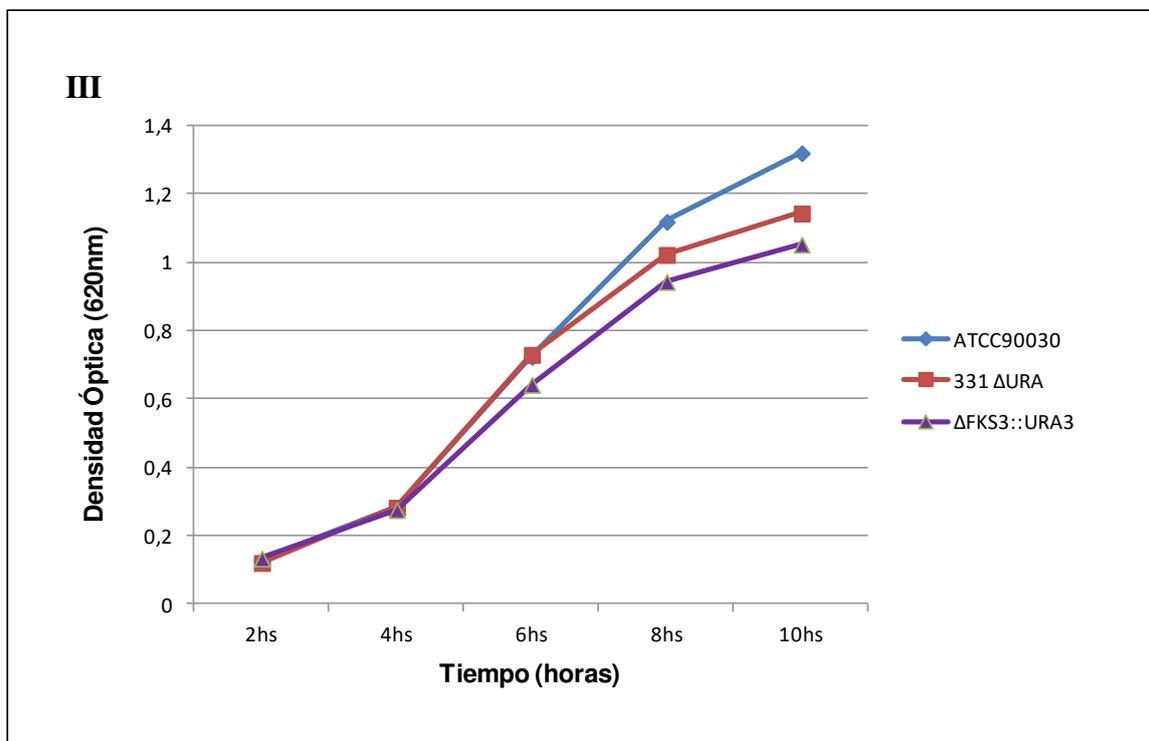
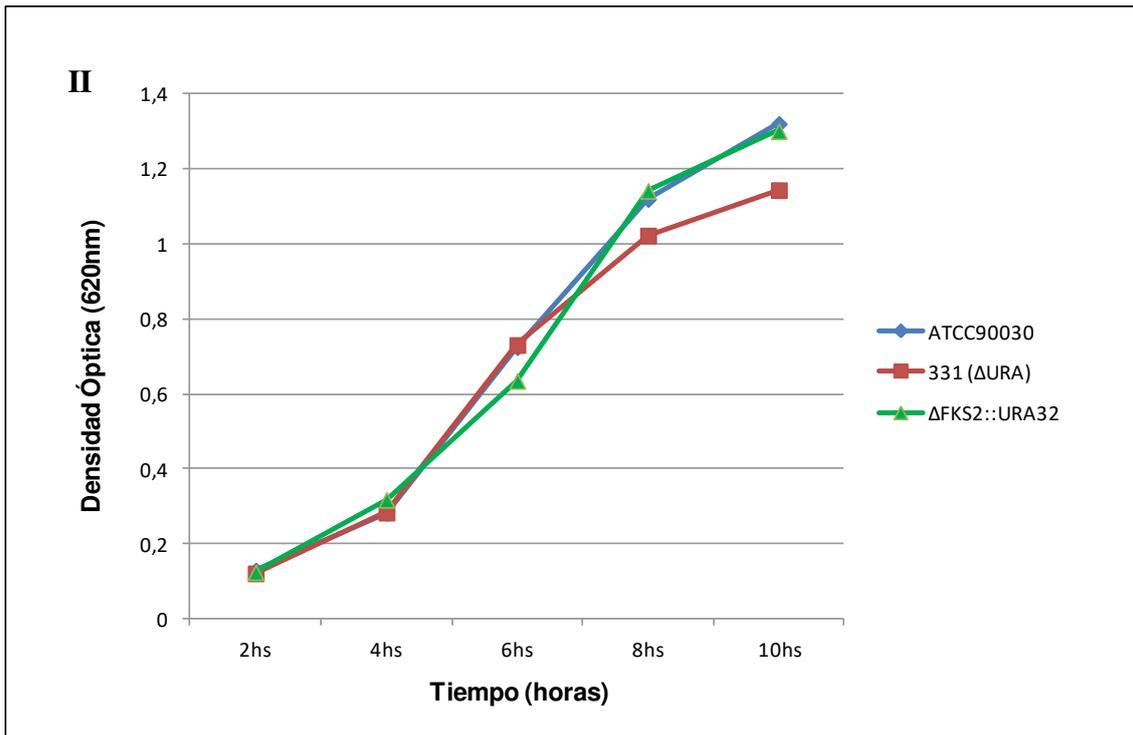
Tiempo (horas)	2×10^6 cel./ml	2×10^5 cel./ml	2×10^4 cel./ml	2×10^3 cel./ml	2×10^2 cel./ml
2 h	0,094	0,068	0,06	0,062	0,058
4 h	0,231	0,076	0,054	0,058	0,063
6 h	0,565	0,177	0,065	0,064	0,06
8 h	0,865	0,528	0,119	0,064	0,068
10 h	0,959	0,941	0,213	0,065	0,06

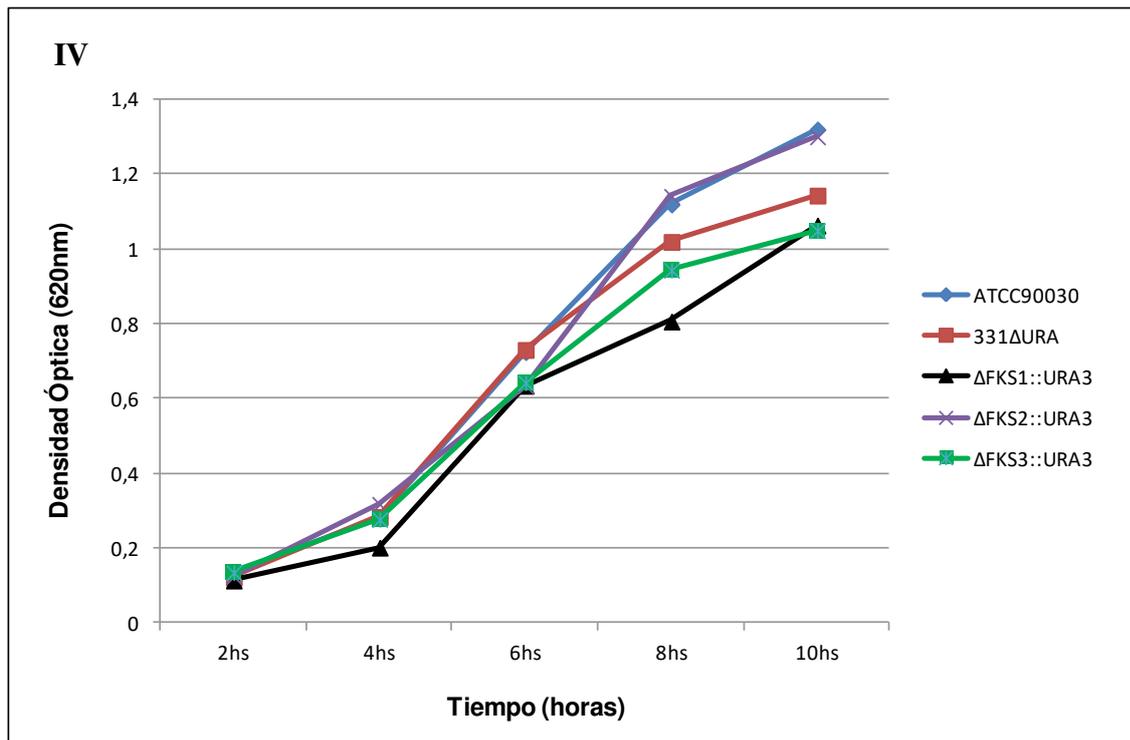
(A)



(B)







C)

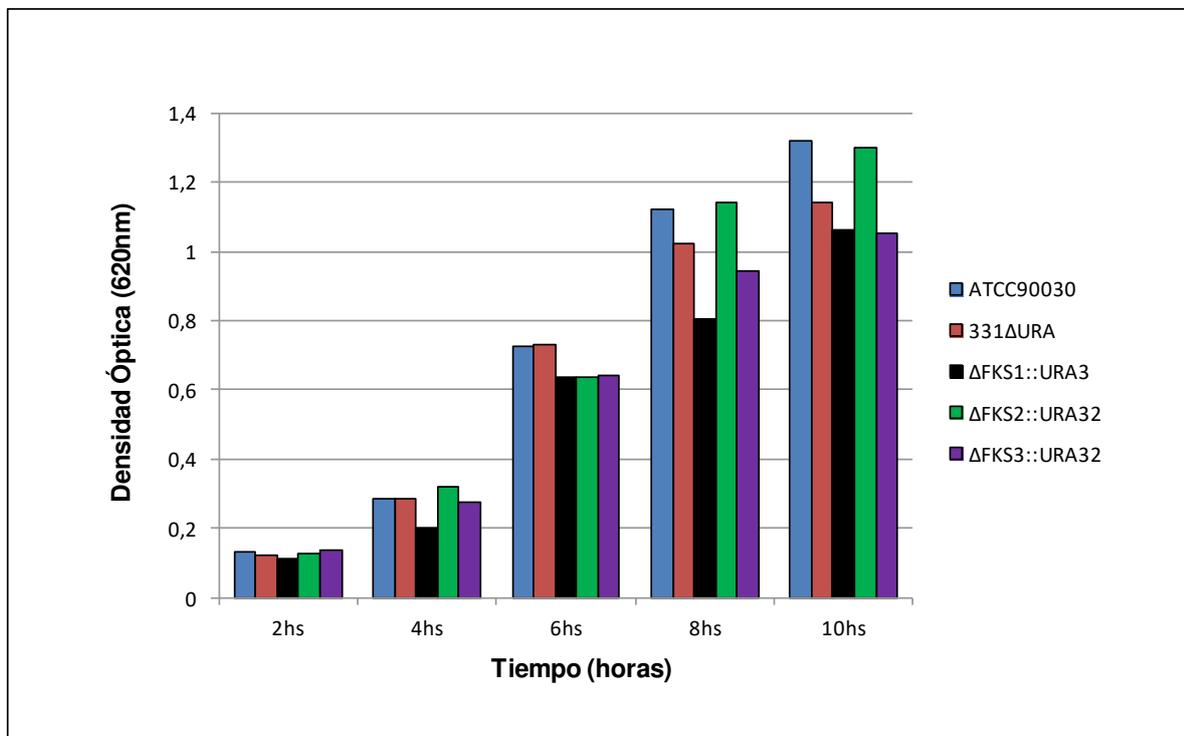


Figura 28.- Curvas de crecimiento. **A)** Curva de crecimiento utilizando la cepa ATCC 90030 para puesta a punto del inóculo inicial. **B)** Comparación del crecimiento de cada una de las cepas defectivas en los genes *FKS*, con la cepa WT y 331(Δ URA3). **I-** Δ FKS1::*URA3*. **II-** Δ FKS2::*URA3*. **III-** Δ FKS3::*URA3*. **IV-** Todas las cepas. **C)** Esquematación de las variaciones en la velocidad de crecimiento de cada una de las cepas en estudio cada 2 h.

Tabla 16.- Valores de DO (620nm) de las cepas defectivas en los genes *FKS*, ATCC90030 y 331(Δ URA) en los tiempos evaluados.

Tiempo (horas)	ATCC90030	331(Δ URA3)	Δ FKS1:: <i>URA3</i>	Δ FKS2:: <i>URA3</i>	Δ FKS3:: <i>URA3</i>
2 h	0,130	0,122	0,114	0,125	0,135
4 h	0,283	0,284	0,202	0,318	0,277
6 h	0,725	0,731	0,635	0,635	0,643
8 h	1,120	1,02	0,807	1,142	0,944
10 h	1,321	1,144	1,064	1,301	1,05

4.2.2 *Capacidad formadora de biofilm*

Tanto en las cepas de *C. glabrata sensu stricto* defectivas en los genes *FKS* como en la cepa 331 (Δ URA3), la capacidad formadora de biofilm fue evaluada utilizando el método XTT descrito en el punto 3.6.5. Por este método la capacidad formadora de biofilm, se clasifica como: pobre cuando la absorbancia (abs.) < 0,205, buena cuando 0,205 < abs. < 0,605 y alta cuando 0,605 > abs. Así, las cepas: 331 Δ URA, Δ FKS2::*URA3* y Δ FKS3::*URA3*, se clasificaron como: capacidad formadora de biofilm “buena”. Mientras que la cepa Δ FKS1::*URA3* se clasificó con capacidad formadora de biofilm “alta”. Los valores obtenidos por el método XTT para cada cepa se detallan en la **Tabla 17**. El experimento fue realizado en el Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunológica (CIBICI), Córdoba, Argentina.

Tabla 17.- Valores de absorbancia obtenidos por el método XTT para las cepas en estudio.

Cepas	Absorbancia (a 490nm)
331 (ΔURA)	0,318
$\Delta FKS1::URA3$	0,710
$\Delta FKS2::URA3$	0,453
$\Delta FKS3::URA3$	0,604

4.2.3. Evaluación del fenotipo de las cepas en estudio frente a compuestos que alteran las vías celulares de respuesta a estrés

Se evaluó en las cepas defectivas en los genes *FKS*, cepa ATCC 90030 y 331 (ΔURA) el efecto de diversos factores fisicoquímicos y sustancias químicas que afectan distintas vías de síntesis y de señalización celular. A continuación se detallan los resultados obtenidos para todas las cepas en estudio, clasificando las sustancias según su sitio diana:

- ❖ **Compuestos que actúan sobre la PARED:** las cepas en estudio se expusieron a calcofluor white, rojo congo y nikkomicina Z, los dos primeros se realizaron siguiendo la técnica de *spots* en medio sólido y la nikkomicina Z se realizó en una placa de 96 posillos utilizando RPMI. Ambas técnicas se encuentran detalladas en el punto 3.6.3. Cuando las cepas en estudio fueron expuestas a calcofluor white y a rojo congo, se observó que: 331 ($\Delta URA3$), $\Delta FKS2::URA3$ y $\Delta FKS3::URA3$, se comportaban igual a la cepa ATCC90030 (WT). Es decir su crecimiento se percibía hasta la última dilución, al igual que la cepa WT. La excepción fue la cepa $\Delta FKS1::URA3$ en la cual se percibió una disminución de crecimiento a la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$, con respecto a la cepa WT, siendo más marcada en el Calcofluor White. Las imágenes de las placas de *spot* se presentan en la **Figura 29**.

En el caso de la nikkomicina Z no se observó diferencias entre la cepa WT, la cepa 331 ($\Delta URA3$) y las cepas defectivas en los genes *FKS*. Para todas las cepas la CIM fue $> 100 \mu\text{g/ml}$.

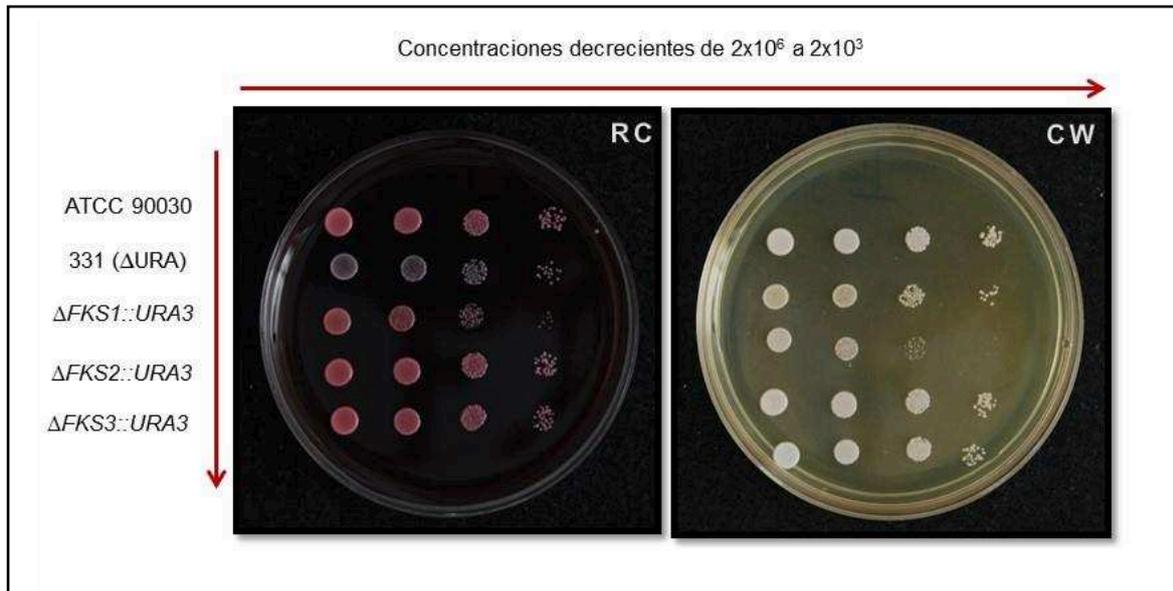


Figura 29.- Placas de *spot* de rojo congo (RC) y calcofluor white (CW) a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$.

❖ **Compuestos que actúan sobre la MEMBRANA CELULAR:** para la evaluación de este fenotipo tanto las cepas defectivas en los genes *FKS*, ATCC 90030 (WT) y 331 (ΔURA3) se expusieron a mevinolin, un compuesto inhibidor de la síntesis de esteroides en sus etapas tempranas de la vía (antes de la formación de escualeno). Este ensayo se realizó en placas de 96 pocillos. No se observó diferencia en el crecimiento de las cepas mutantes con respecto al WT, observándose en todos los casos una CIM $>$ a 100 $\mu\text{g/ml}$.

❖ **Compuestos que afectan la SÍNTESIS DE PROTEÍNAS:** las cepas en estudio se expusieron a brefeldina A, hygromicina B y tunicamicina, los dos primeros se realizaron siguiendo la técnica de *spots* en medio sólido y la tunicamicina se realizó en una placa de 96 pocillos utilizando RPMI. Cuando las cepas en estudio fueron expuestas a concentraciones de 20 y 40 $\mu\text{g/ml}$ de **brefeldina A**, no se observó diferencia entre la cepa ATCC 90030 (WT) y las cepas defectivas. En el caso de la **hygromicina B** se probaron concentraciones de 10, 20, 50 y 200 $\mu\text{g/ml}$, en todas las cepas estudiadas. Para las concentraciones de 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$, no se observó diferencia en el crecimiento en ninguna de las cepas estudiadas. Mientras que a las concentraciones de 50 y 200 $\mu\text{g/ml}$ no hubo desarrollo de ninguna cepa. Las imágenes de las placas de *spot* se presentan en la **Figura 30**.

En el caso de la **tunicamicina**, las placas partieron de una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$. Se observó una diferencia de dos diluciones entre la cepa ATCC 90030 (WT) cuya CIM fue

de 12,5 $\mu\text{g/ml}$, y las cepas 331 (ΔURA3), $\Delta\text{FKS2}::\text{URA3}$ y $\Delta\text{FKS3}::\text{URA3}$ cuya CIM fue de 3,12 $\mu\text{g/ml}$, en todos los casos. La cepa $\Delta\text{FKS1}::\text{URA3}$ presentó una CIM de 6,25 $\mu\text{g/ml}$.

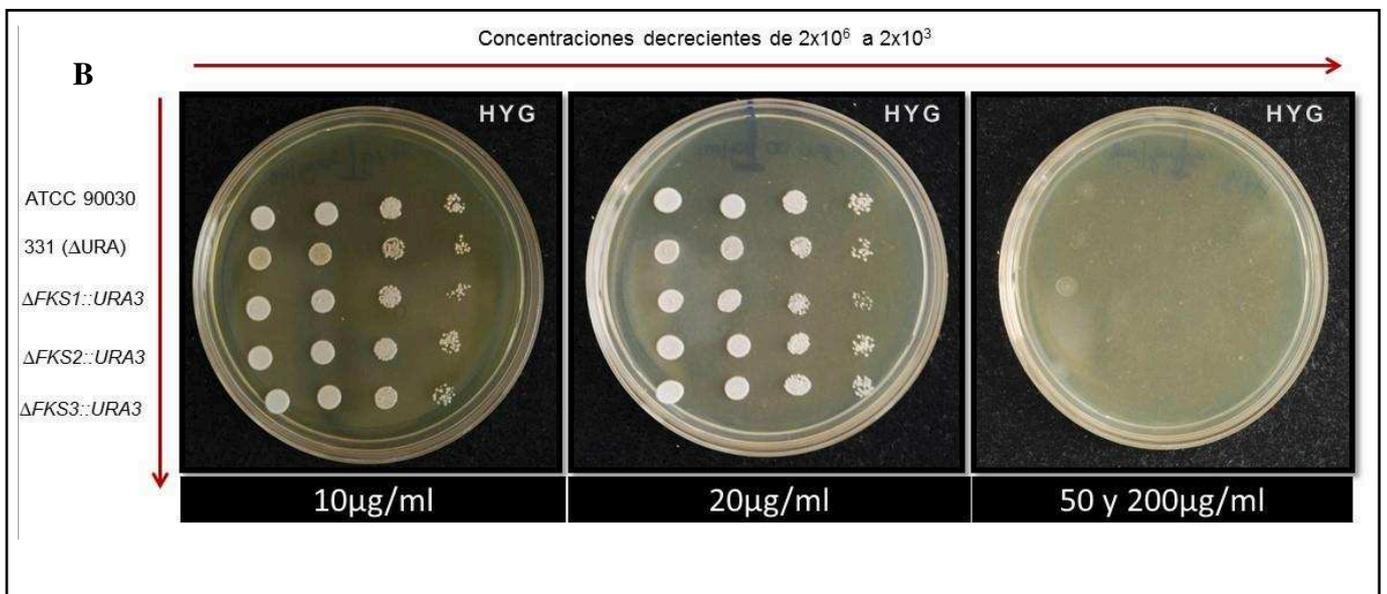
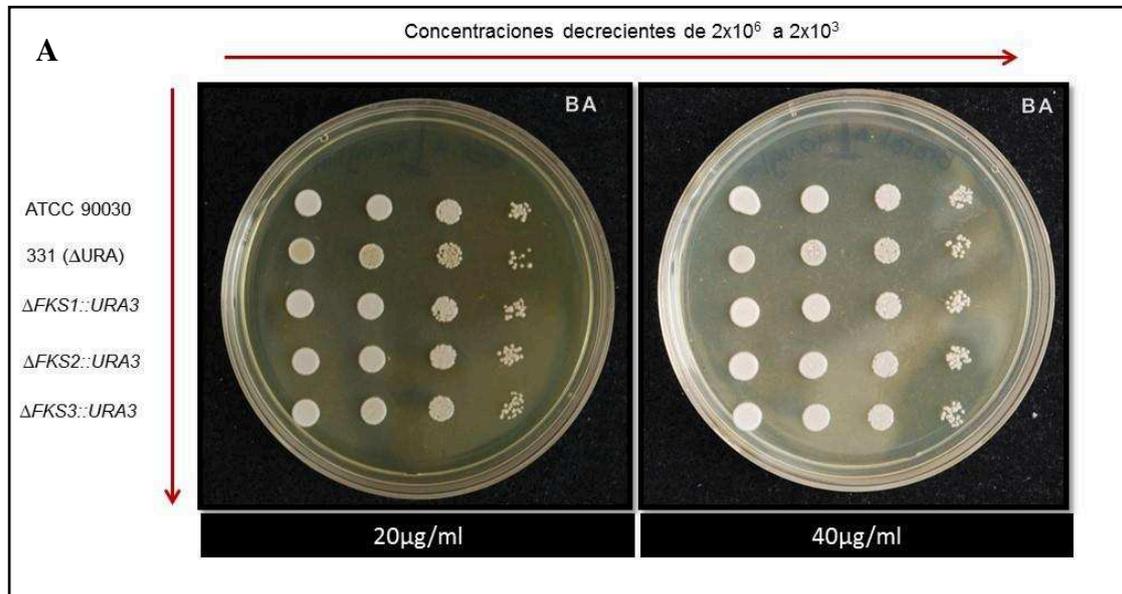


Figura 30.- Placas de *spot* de Brefeldina A (BA) e hygromicina B (HYG). **A)** Placas de Brefeldina A de 20 y 40 $\mu\text{g/ml}$. **B)** placas de hygromicina B de 10, 20, 50 y 200 $\mu\text{g/ml}$.

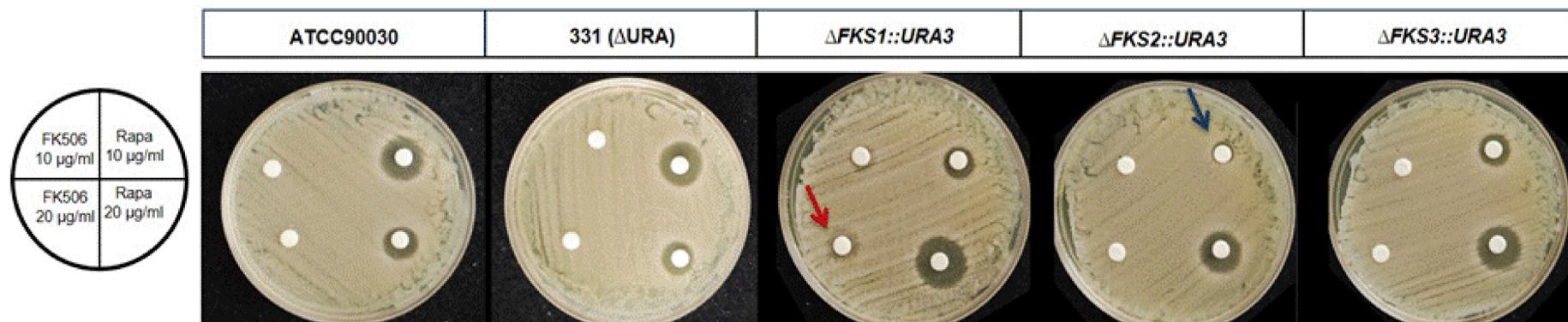
❖ **Compuestos que afectan distintas VIAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR:** Los compuestos utilizados fueron rapamicina, FK506 y calfofostin. El estudio de fenotipo en las cepas defectivas en los genes *FKS*, 331 (Δ URA3) y ATCC 90030 (WT), se realizó con discos en el caso de rapamicina y FK506, y en placa en el caso del calfofostin. Al exponer a las cepas en estudio a discos con 10, 20 y 50 μ g/ml de **FK506** solo se evidenció una inhibición parcial del crecimiento a 20 y 50 μ g/ml en la cepa Δ FKS1::URA3. En el caso de la **rapamicina** se probaron discos con concentraciones de 10, 20 y 50 μ g/ml. En las cepas ATCC90030, 331 (Δ URA3) y Δ FKS3::URA3, los halos de inhibición de crecimiento, presentaron iguales diámetros en cada una de las concentraciones evaluadas. En la cepa Δ FKS2::URA3 no hubo inhibición del crecimiento a 10 μ g/ml, mientras que a 20 y 50 μ g/ml se observó halos de inhibición de diámetro similar a los de las cepas ATCC90030, 331 (Δ URA) y Δ FKS3::URA3. El crecimiento de la cepa Δ FKS1::URA3 a 10 μ g/ml se vio afectado en menor medida que la cepa WT, mientras que los halos de inhibición de crecimiento a 20 y 50 μ g/ml fueron más grandes que el resto de las cepas en estudio, es decir, la cepa Δ FKS1::URA3 fue la más afectada a estas concentraciones. En la **Tabla 18** se detallan los diámetros de los halos de inhibición para todas las concentraciones de rapamicina ensayadas. Las imágenes de las placas con discos de FK506 y rapamicina, a todas las concentraciones probadas, para todas las cepas en estudios se muestran en la **Figura 31**.

En el caso del **calfofostin**, la placa partió de una concentración de 16 μ g/ml. No se observó diferencias en el crecimiento de ninguna de las cepas en estudio con respecto al WT. La CIM fue $>$ a 8 μ g/ml para todos los casos.

Tabla 18.- Diámetros (mm) de halos de inhibición, producidos por discos de rapamicina a 10, 20 y 50 μ g/ml.

Diámetros halos de inhibición (mm)			
Cepas	10 μg/ml	20 μg/ml	50 μg/ml
ATCC 90030	19 mm	23 mm	27 mm
331 (Δ URA3)	18 mm	23 mm	27 mm
Δ FKS1::URA3	16 mm	29 mm	32 mm
Δ FKS2::URA3	11 mm	23 mm	27 mm
Δ FKS3::URA3	18 mm	24 mm	29 mm

A



B

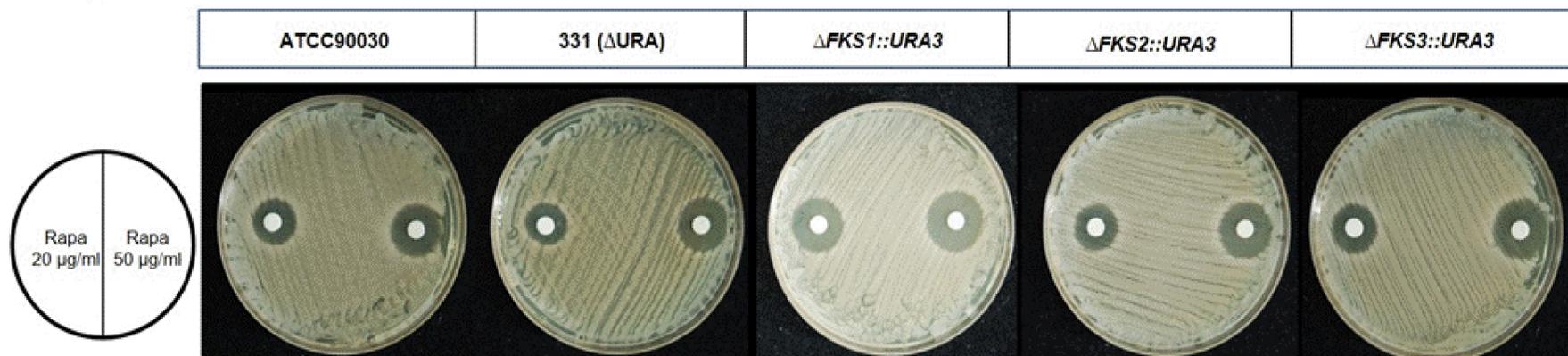
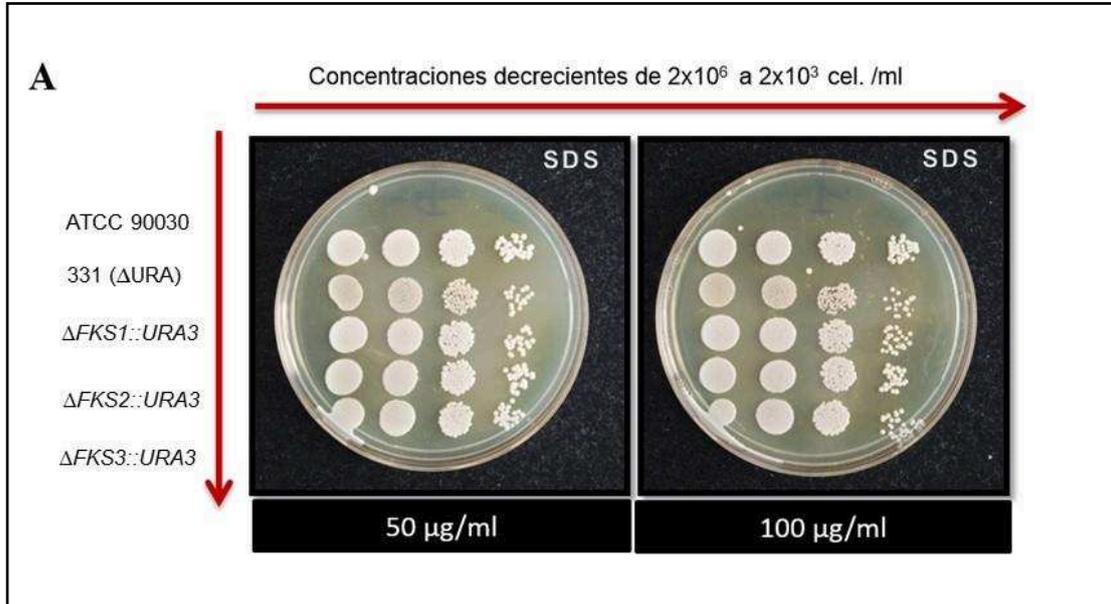




Figura 31.- Placas con discos de FK506 y rapamicina, ensayados en las cepas ATCC90030 (WT), 331 (Δ URA) y las cepas defectivas en genes *FKS*. **A) Placas con discos de FK506 y rapamicina a concentraciones de 10 y 20 μ g/ml.** La flecha roja marca la inhibición parcial del crecimiento observada a 20 μ g/ml de FK506 (cepa Δ FKS1::URA3) y la flecha azul marca la menor inhibición de rapamicina 10 μ g/ml en la cepa defectiva en el gen *FKS2*. **B) Placas con discos de rapamicina a concentraciones de 20 y 50 μ g/ml.** **C) Placas con discos de FK506 a concentraciones de 20 y 50 μ g/ml.** Las flechas rojas marcan la inhibición parcial del crecimiento, descrita anteriormente en el texto, observada en la cepa Δ FKS1::URA3 a ambas concentraciones. Las medidas de los halos aparecen en la tabla 18.

❖ **Compuestos y condiciones GENERADORES DE ESTRÉS CELULAR:** para la evaluación del fenotipo de las cepas en estudio, se utilizaron compuestos generadores de estrés celular como cloruro de sodio (NaCl), dodecilsulfato de sodio (SDS) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Además se evaluaron diferentes condiciones de temperatura. Todos los ensayos se realizaron utilizando la técnica de *spots* en medio sólido. Cuando las cepas en estudio fueron expuestas a **SDS (50 y 100 µg/ml)** y a diversas **temperaturas (30, 37 y 42 °C)**, no se observó diferencias de crecimiento en las cepas defectivas con respecto a la cepa WT. Sin embargo, cuando se expusieron las cepas a **NaCl (1-1,5 y 2 M)** y **H₂O₂ (0,1 M)**, se observaron diferencias en el crecimiento de algunas de las cepas con respecto a la cepa ATCC 90030. En el caso del ensayo con **NaCl** solo la cepa $\Delta FKS1::URA3$ mostró afectado su crecimiento a la concentración de 2M. En el caso del ensayo con H₂O₂, el crecimiento se vio comprometido en las cepas $\Delta FKS2::URA3$ y $\Delta FKS3::URA3$ con respecto a la cepa WT. Las imágenes de las placas de *spot* para cada compuesto y condición ensayada se muestran en la **Figura 32**.



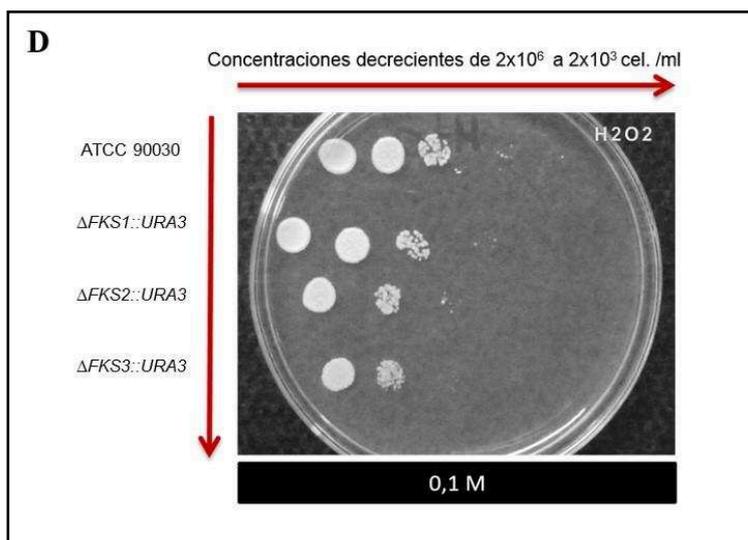
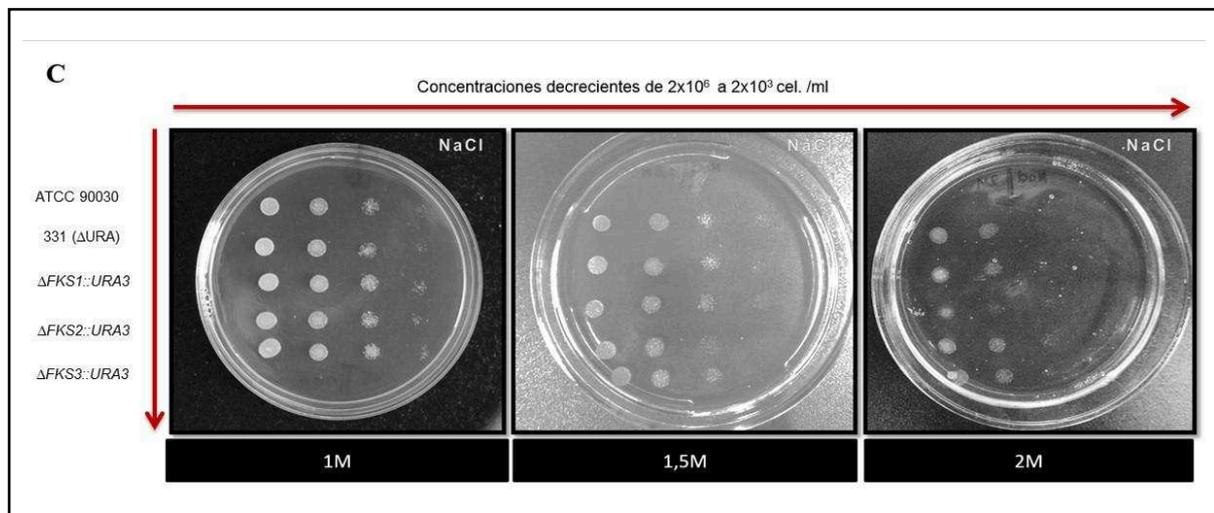
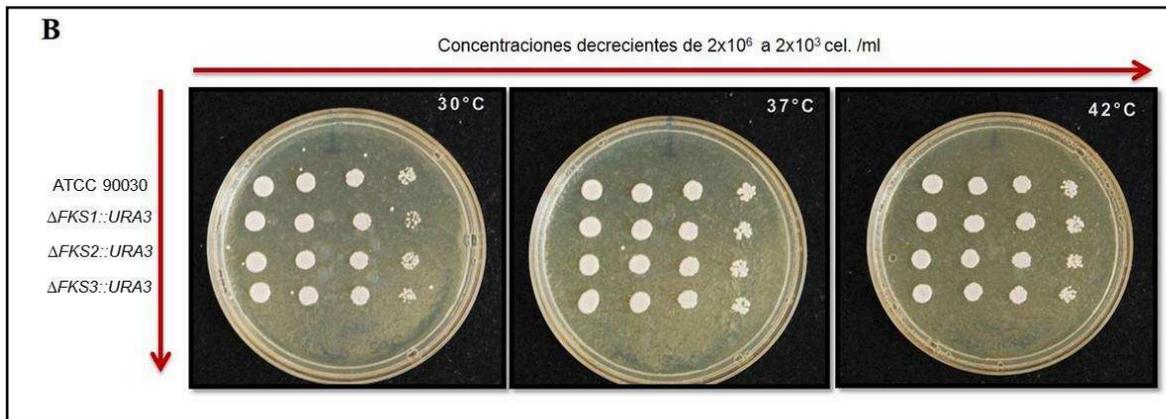


Figura 32.- Placas de *spot* de compuestos generadores de estrés celular. A) SDS. B) Temperatura. C) NaCl. D) H₂O₂.

4.2.4 Sensibilidad a los antifúngicos.

4.2.4.1 Método de microdilución.

Se determinó la CIM a los distintos antifúngicos de las cepas de *C. glabrata sensu stricto* defectivas en los genes *FKS* y las cepas control ATCC 90030 y 331 ($\Delta URA3$). Los valores de CIM obtenidos se detallan en la **Tabla 19**. Se utilizaron como controles de calidad las cepas de referencia *C. parapsilosis sensu stricto* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258 establecidas en el protocolo M27-S4 de CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012).

No se observó resistencia a los antifúngicos probados, en ninguna de las cepas estudiadas. En el caso particular de CSF, la disrupción de los genes *FKS* (diana de las equinocandinas) no alteró la sensibilidad a dichas drogas. En el caso de FLC, VRC y PSC, se observó que la cepa defectiva en el gen *FKS1* presentó CIM de 4 $\mu\text{g/ml}$, 0,5 $\mu\text{g/ml}$ y 1 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente; siendo una dilución por encima de los valores obtenidos para la cepa WT. Estos cambios en los valores de CIM no son significativos estadísticamente.

Tabla 19.- Valores de CIM obtenidos para las cepas en estudio.

Cepas	CIM ($\mu\text{g/ml}$)*						
	FLC	VRC	ITC	PSC	CTZ	CSF	AMB
ATCC 90030	2	0,125	0,125	0,5	0,25	0,03	0,06
331 ($\Delta URA3$)	2	0,25	0,06	0,25	0,015	0,06	0,06
$\Delta FKS1::URA3$	4	0,5	0,06	1	0,06	0,03	0,06
$\Delta FKS2::URA3$	1	0,125	0,06	0,5	0,03	0,06	0,06
$\Delta FKS3::URA3$	2	0,25	0,06	1	0,03	0,12	0,06

*Medias geométricas de los valores de CIM obtenidos con al menos tres repeticiones realizadas en días distintos. Fluconazol (FLC), voriconazol (VRC), itraconazol (ITC), posaconazol (PSC), clotrimazol (CTZ), caspofungina (CSF) y anfotericina B (AMB).

4.2.4.2 Concentración fungicida mínima (CFM)

La prueba de CFM se realizó tanto en las cepas de *C. glabrata defectiva en los genes FKS* como en las cepas salvaje ATCC 90030 y en la 331 ($\Delta URA3$). Se decidió evaluar solo FLC debido a las diferencias encontradas con respecto a la cepa salvaje y entre las cepas mutantes. Estas pruebas se efectuaron tres veces en tres días distintos y los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente. No se encontró efecto fungicida, en ninguna de las concentraciones evaluadas (CFM > 64 $\mu\text{g/ml}$).

4.2.4.3 Evaluación de la interacción entre antifúngicos: combinación de drogas utilizando método de microdilución (placas de checkerboard).

Debido a las limitadas opciones a la hora de aplicar un tratamiento antifúngico y a los reportes cada vez más frecuentes de aislamientos resistentes, se planteó la necesidad de buscar alternativas terapéuticas combinando diferentes antifúngicos con compuestos que inhiben distintas vías de señalización celular (FK506: inhibidor de la calcineurina; Rapamicina: inhibidor de la vía mTOR), que inhiben la síntesis de componentes esenciales de membrana (por ej. Mevinolin) o que inhiben síntesis de componentes de la pared (Nikkomycin Z: inhibe síntesis de quitina). La interacción *in vitro* de las combinaciones FLC-FK506, FLC-mevinolin, FLC-rapamicina, FLC-nikkomycin Z, CSF-FK506, nikkomycin Z- rapamicina y FK506- nikkomycin Z, se evaluaron en las cepas de *C. glabrata sensu stricto* defectivas en los genes *FKS*, ATCC90030 y en su cepa parental 331($\Delta URA3$). En la **Tabla 20** se presentan las ΣFIC de las cepas estudiadas, para cada una de las combinaciones de antifúngicos probadas. El cálculo de la ΣFIC y su respectiva interpretación se llevó a cabo según lo detallado en el punto 3.6.1.3.4 de materiales y métodos. Se observó sinergismo en todas las cepas estudiadas, para las combinaciones: FLC-nikkomycin Z, FK506-CSF y FK506-nikkomycin Z. Mientras que solamente la cepa $\Delta FKS1::URA3$ presentó sinergismo para las combinaciones: FLC-FK506 y FLC- rapamicina, no observándose interacción para estas combinaciones, en las demás cepas estudiadas. De la misma manera, no se evidenció interacción en ninguna de las cepas expuestas a la combinación FLC-mevinolin. En el caso particular de la combinación nikkomycin Z-rapamicina, a las 24 h se observó una ΣFIC que evidenciaba una no interacción entre drogas, para todas las cepas estudiadas. Sin embargo a las 48 h,

en las cepas ATCC 90030, $\Delta FKS2::URA3$ y $\Delta FKS3::URA3$ se observó efecto fungistático (crecimiento que se percibía como un puntillado fino), mientras que en las cepas 331 ΔURA y $\Delta FKS1::URA3$ se observó efecto fungicida (no se percibió visualmente crecimiento). Para verificarlo se sembraron 20 μ l de 6 pocillos al azar, donde no se percibía crecimiento, en placas de YPD agar. Esto se realizó para ambas cepas. Además se sembraron los pocillos correspondientes a los controles de crecimiento diluidos 1/10000. No se observó desarrollo, corroborándose el efecto fungicida de esta combinación para ambas cepas. No se observó antagonismo para ninguna de las combinaciones probadas.

Tabla 20.- Resultados de la Σ FIC para las cepas estudiadas.

Cepas	Σ FIC (Interpretación)*						
	FLC-FK506	FLC-RPM ^a	FLC- NK ^b	FLC-MVN ^c	FK506-CSF	NK ^b - RPM ^a	FK506- NK ^b
ATCC 90030	0,508 (NI)	2,008 (NI)	0,039 (S)	1,031 (NI)	0,125 (S)	2,00 (NI)	0,039 (S)
331 ($\Delta URA3$)	0,,508 (NI)	2,,12 (NI)	0,,047 (S)	2,00 (NI)	0,094 (S)	2,00 (NI)	0,070 (S)
$\Delta FKS1::URA3$	0,,133 (S)	0,,039 (S)	0,141 (S)	2,00 (NI)	0,094 (S)	2,00 (NI)	0,070(S)
$\Delta FKS2::URA3$	0,,508 (NI)	1,,25 (NI)	0,070 (S)	2,00 (NI)	0,125 (S)	2,00 (NI)	0,039 (S)
$\Delta FKS3::URA3$	0,,508 (NI)	2,00 (NI)	0,039 (S)	2,00 (NI)	0,125 (S)	2,00 (NI)	0,023 (S)

*Medias geométricas (Tres repeticiones en días distintos). Interpretación: (S) Sinergismo, (NI) No Interacción. Σ FIC, Sumatoria de las concentraciones inhibitorias fraccionales. a) **RPM**: rapamicina; b) **NK**: nikkomicina Z; c) **MVN**: mevinolin.

4.2.4.4 Determinación de CIM utilizando tiras de Etest®

Al igual que lo observado cuando se llevó a cabo la determinación de CIM por el método de microdilución, todas las cepas en estudio resultaron sensibles a los antifúngicos probados, teniendo en cuenta los puntos del corte del protocolo M27-S4 del CLSI. Los valores de CIM en μ g/ml se detallan en la **Tabla 21**. En cuanto a la interpretación de los valores descritos en la tabla 21, vale aclarar que los que aparecen entre paréntesis, son las CIM observadas al realizar la lectura de las placas a las 24 h. Sin embargo, estos valores no suelen observarse comúnmente cuando se realiza el método de microdilución siguiendo el protocolo M27-S4. Por esta razón se consideró como la CIM en las tiras de Etest® a los valores inmediatamente

superiores al valor de lectura que figura entre paréntesis, y que concuerdan con los que se obtendrían utilizando el método de microdilución. Las imágenes de las lecturas de CIM, para las distintas cepas se muestran en la **Figura 33**.

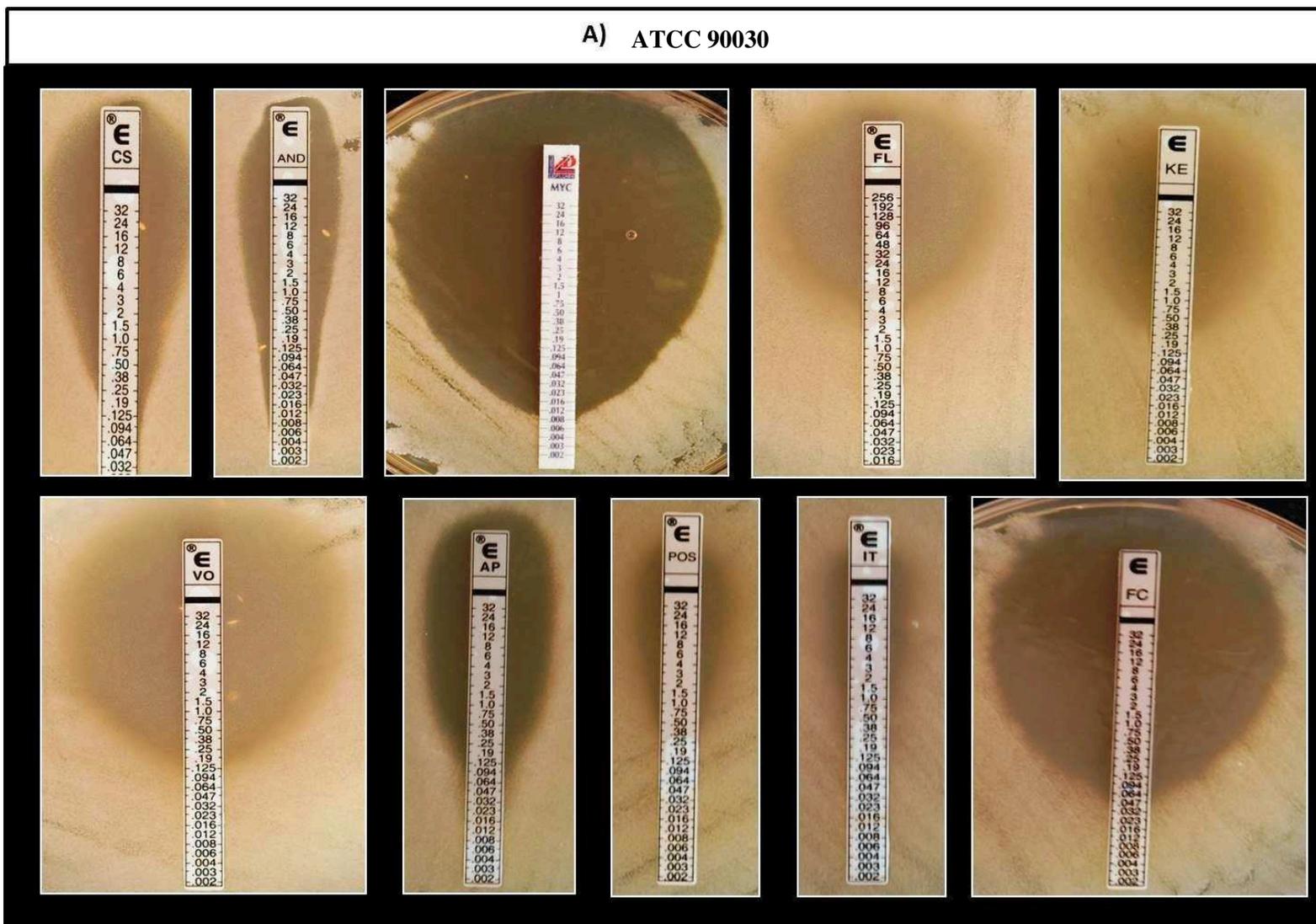
En el caso particular de la cepa $\Delta FKS1::URA3$, se observó que la CIM a FLC fue 2 diluciones mayor con respecto a la cepa ATCC90030 (WT) y a las demás cepas mutantes. En el caso del VRC se evidencia la misma tendencia que lo observado por microdilución pero solo con una dilución de diferencia. La cepa 331($\Delta URA3$) no desarrolló, ya que el medio RPMI1640 agar, carece de uridina uracilo.

Tabla 21.- Determinación a las 24 h de la CIM ($\mu\text{g/ml}$) por Etest® a 10 antifúngicos.

CIM ($\mu\text{g/ml}$) por Etest®					
Antifúngicos	ATCC90030	331 $\Delta URA3$	$\Delta FKS1::URA3$	$\Delta FKS2::URA3$	$\Delta FKS3::URA3$
AMB	0,12 (0,09)	ND*	0,50 (0,38)	0,50	0,50 (0,38)
5 FC	0,06 (0,04)	ND	0,06 (0,03)	0,06 (0,047)	0,06 (0,047)
KTC	0,25 (0,19)	ND	0,25 (0,19)	0,125 (0,125)	0,125 (0,125)
FLC	4,00 (4,00)	ND	16,00 (16,00)	4,00 (4,00)	4,00 (4,00)
VRC	0,12 (0,12)	ND	0,25 (0,25)	0,125 (0,125)	0,125 (0,125)
PSC	0,50 (0,38)	ND	0,50 (0,50)	0,50 (0,50)	0,50 (0,38)
ITC	0,12 (0,12)	ND	0,50 (0,50)	0,25 (0,25)	NO SE PUDO LEER
CSF	0,25 (0,19)	ND	0,06 (0,05)	0,25 (0,19)	0,25 (0,19)
ANF	0,02 (0,01)	ND	0,015 (0,08)	0,015 (0,016)	0,015 (0,08)
MCF	0,02 (0,01)	ND	0,02 (0,01)	0,015 (0,006)	0,015 (0,006)

. *ND: no desarrolló. Anfotericina B (AMB), 5 fluorcitocina (5FC), ketoconazol (KTC), fluconazol (FLC), voriconazol (VRC), posaconazol (PSC), itraconazol (ITC), caspofungina (CSF), anidulafungina (ANF) y micafungina (MCF)

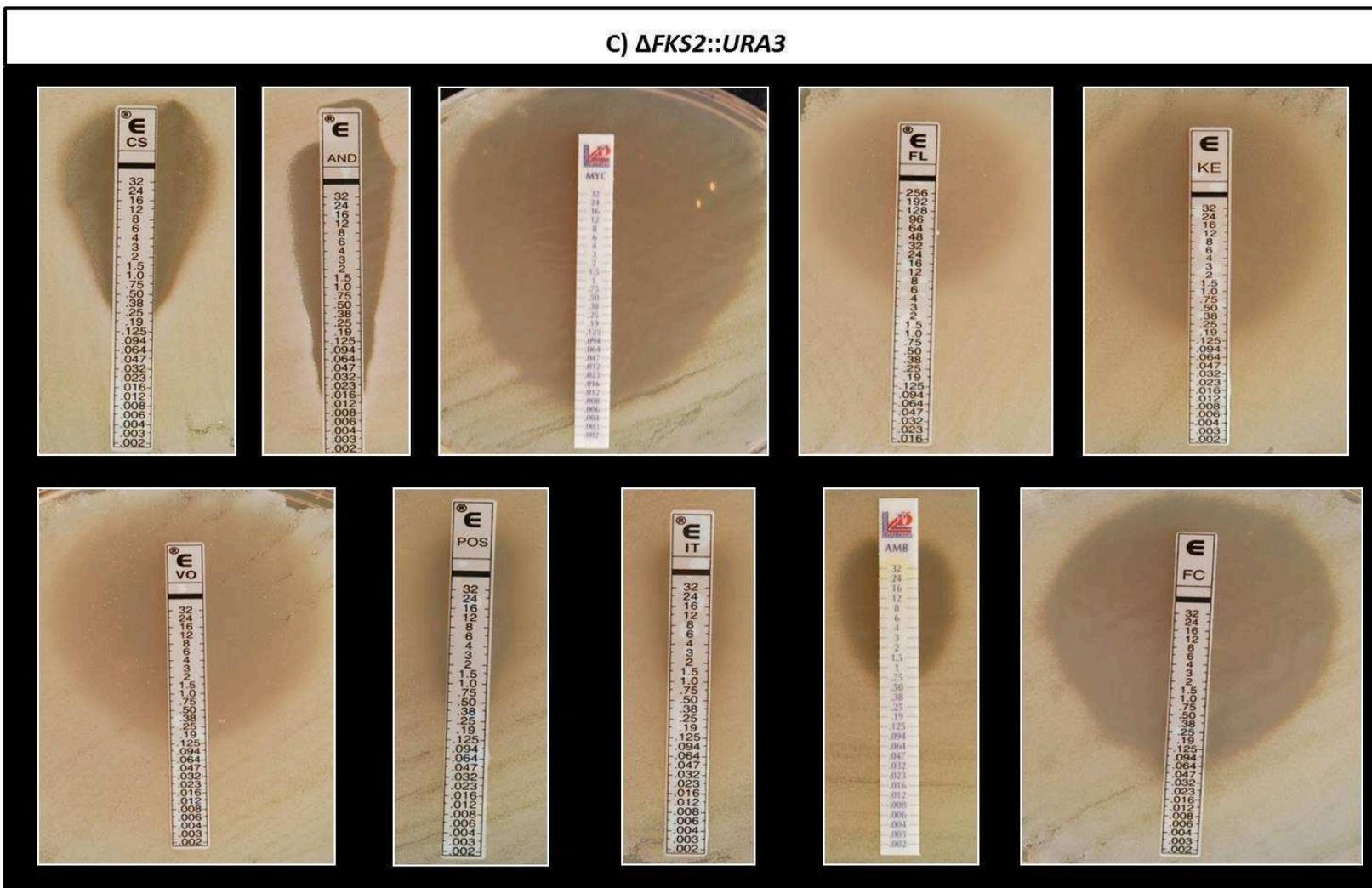
A) ATCC 90030



B) $\Delta FKS1::URA3$



C) Δ FKS2::URA3



D) Δ FKS3::URA3



Figura 33.- Imágenes de las lecturas de CIM de todos los antifúngicos probados, para todas las cepas en estudio: A) ATCC90030, B) $\Delta FKS1::URA3$, C) $\Delta FKS2::URA3$ y D) $\Delta FKS3::URA3$. **CS:** caspofungina, **AND:** anidulafungina, **MYC:** micafungina, **FL:** fluconazol, **KE:** ketoconazol, **VO:** voriconazol, **AP/AMB:** anfotericina B, **POS:** posaconazol, **IT:** itraconazol, **FC:** 5-Fluorcitocina.

4.2.5 Estudio in vivo utilizando el invertebrado *Galleria mellonella* para evaluar la participación de los genes *FKS* en la virulencia de *C. glabrata sensu stricto*.

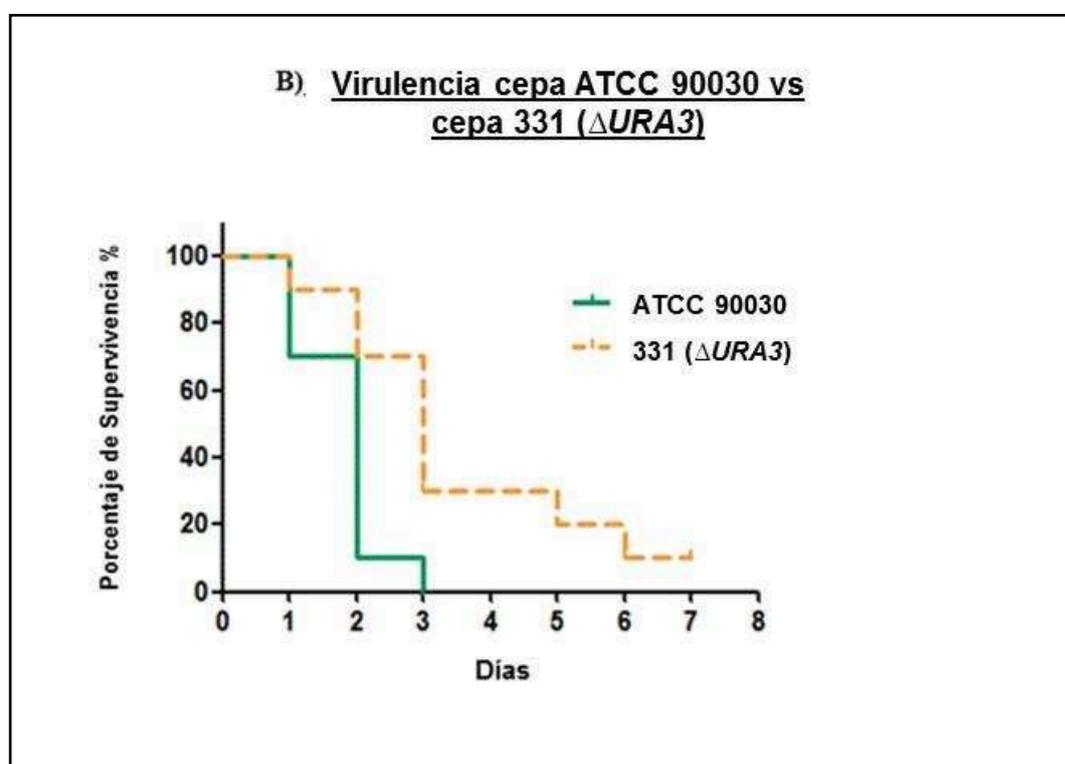
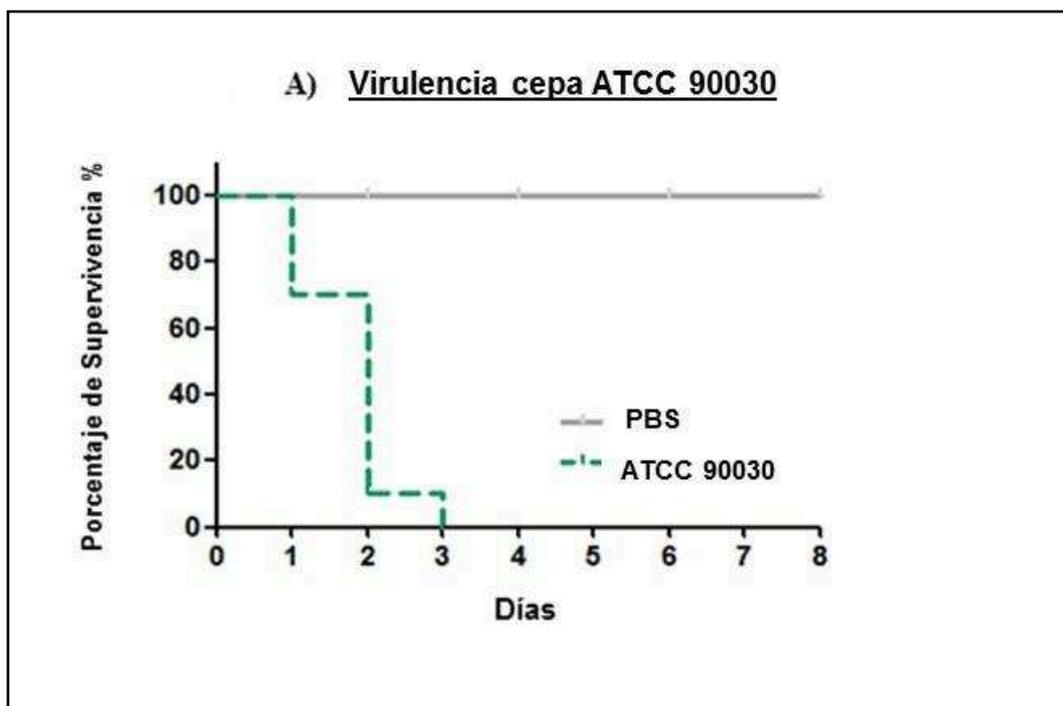
❖ Optimización del modelo

Se realizaron pruebas con diferentes inóculos, con el objetivo de definir uno como ideal. Entendiéndose por inóculo ideal a aquel que permita evaluar la supervivencia de las larvas por al menos 7 días. Para determinar un inóculo fúngico adecuado, se utilizó la cepa ATCC 90030 de *C. glabrata* y se ensayó un rango de inóculos incluyendo: 1×10^9 , 5×10^8 y 1×10^8 CFU/ml. Las larvas de *G. mellonella* sufrieron una reacción de melanización, propio de la infección, a los 10 min. luego de ser infectadas. Se observó que la inoculación con *C. glabrata* resultó en la muerte de las larvas, y que dicha mortalidad dependía de la carga fúngica. Por esta razón se eligió el inóculo de 5×10^8 CFU/ml, el cual causó 50% de mortalidad 2 días después de la inoculación y resultó en 100% de mortalidad dentro de los 4 días (Li *et al.*, 2013).

❖ Infección de las larvas y evaluación de virulencia

Las larvas de *G. mellonella* fueron infectadas con un inóculo de 5×10^8 CFU/ml (5×10^6 CFU/larva) de todas las cepas de *C. glabrata sensu stricto* estudiadas: ATCC 90030, 331($\Delta URA3$) y los mutantes defectivos en los genes *FKS*: $\Delta FKS1::URA3$, $\Delta FKS2::URA3$ y $\Delta FKS3::URA3$. En todos los casos, el 100% de las larvas infectadas, murieron entre el segundo y tercer día. La excepción estuvo dada por la cepa 331 ($\Delta URA3$), la cual presentó una muy baja virulencia debido a la delección del gen *URA3*, lo cual es comparable con la bibliografía publicada. No se observó muerte de larvas en el grupo control (PBS+Ampicilina), ni en el untouched (**Figura 34**).

Los resultados obtenidos muestran que no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) entre las cepas mutantes y la cepa WT (ATCC90030), por lo que la deficiencia individual de cada uno de los genes *FKS* no afectaría la capacidad de *C. glabrata* para infectar a *G. mellonella*.



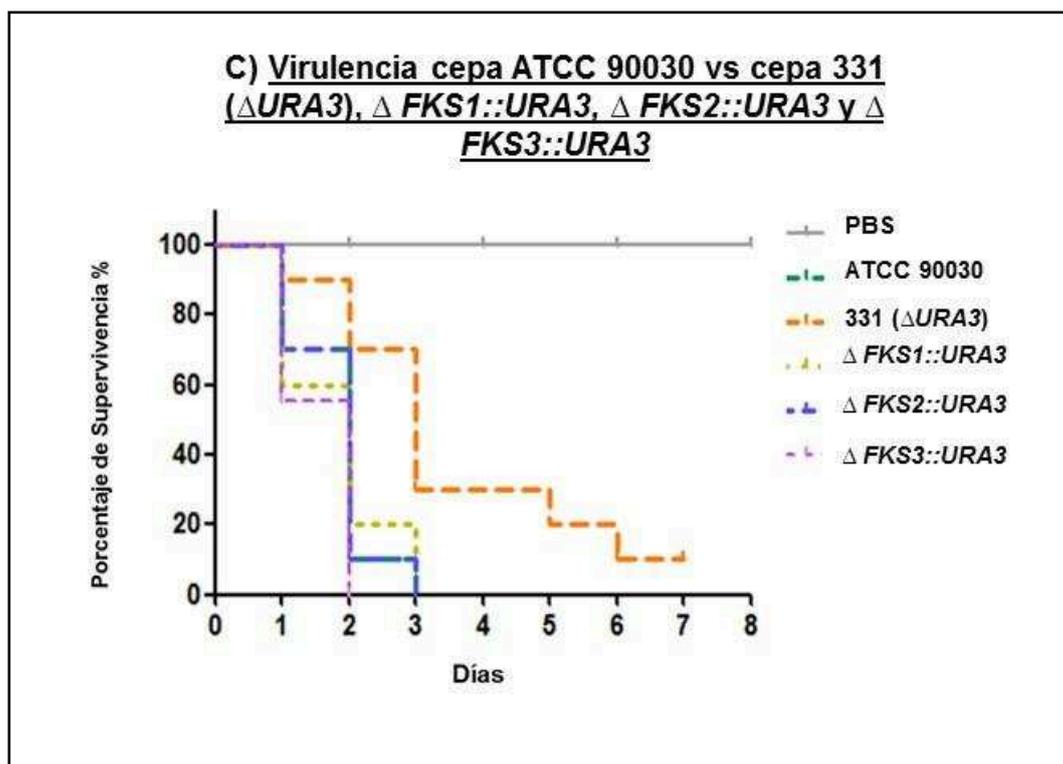


Figura 34.- Curvas de Kaplan-Meier utilizando el modelo invertebrado *G. mellonella*. A) Virulencia de la cepa ATCC 90030 vs grupo control PBS+Ampicilina B) Comparación de la virulencia de la cepa ATCC 90030 vs la cepa 331($\Delta URA3$) utilizada de base para la generación de los mutantes defectivos en los genes *FKS*. C) ATCC90030 vs 331($\Delta URA3$), $\Delta FKS1::URA3$, $\Delta FKS2::URA3$ y $\Delta FKS3::URA3$.

4.2.6 Evaluación de vías de compensación de déficit de β -glucanos: cuantificación relativa de la expresión de genes de la vía de síntesis de quitina.

Se utilizó PCR real time para evaluar los niveles de expresión relativa de los genes *CHS3A* y *CHS3B*, que codifican para quitina sintasas en *C. glabrata sensu stricto*. Los estudios de expresión se realizaron en las cepas: ATCC 90030, 331 ($\Delta URA3$), $\Delta FKS1::URA3$, $\Delta FKS2::URA3$ y $\Delta FKS3::URA3$, evaluándose dicha expresión a distintos tiempos (4 h, 8 h, 12 h y 16 h), los Ct y los ratios de cada gen y para cada cepa se detallan en la **Tabla 22**. Los ratios fueron obtenidos mediante la aplicación de la fórmula descrita en el punto 3.5.8.5 de materiales y métodos. Estos cálculos se realizaron utilizando el gen *ACT1* como gen de referencia (housekeeping gene) y se compararon con los valores de Ct para la cepa 331 ($\Delta URA3$).

Se observaron variaciones en los niveles de expresión de ambos genes (cantidad relativa de mRNA de *CHS3A* y *CHS3B*) entre las cepas estudiadas y a los distintos tiempos. Sin

embargo, la expresión de ambos genes se comportó de manera equivalente, es decir, aumentando o disminuyendo su expresión al mismo tiempo. En el caso de las cepas mutantes, se evidenció una marcada caída en la expresión de ambos genes a las 12 h en la cepa $\Delta FKS2::URA3$, mientras que su expresión aumentó a las 8 h en la cepa defectiva en el gen *FKS3*, disminuyendo luego al igual que la cepa $\Delta FKS2::URA3$ a las 12 h. En el caso de la cepa $\Delta FKS1::URA3$ la expresión de ambos genes se mantuvieron relativamente constantes en los distintos tiempos, observándose una tendencia de aumento hacia las 12 h. La esquematización de estos resultados se observan en la **Figura 35**, donde se graficó el **ratio** versus los **distintos tiempos de evaluación**.

Tabla 22.- Expresión relativa de los genes *CHS3A* y *CHS3B*, en cepas de *C. glabrata sensu stricto* defectivas en genes *FKS*. Ct; Crossing threshold.

Tiempo de evaluación: 4 h					
Cepas	Ct ^a <i>ACT1</i>	Ct <i>CHS3A</i>	Ct <i>CHS3B</i>	Ratio <i>CHS3A</i>	Ratio <i>CHS3A</i>
ATCC 90030	18,463	22,540	28,468	10,636	2,214
331 (Δ <i>URA3</i>),	13,036	20,524	24,188		
Δ <i>FKS1::URA3</i>	13,714	21,307	24,929	0,929	0,957
Δ <i>FKS2::URA3</i>	12,297	19,356	23,451	1,34	0,998
Δ <i>FKS3::URA3</i>	14,178	21,963	25,513	0,813	0,880

Tiempo de evaluación: 8 h					
Cepas	Ct ^a <i>ACT1</i>	Ct <i>CHS3A</i>	Ct <i>CHS3B</i>	Ratio <i>CHS3A</i>	Ratio <i>CHS3A</i>
ATCC 90030	13,907	22,087	23,242	1,89010712	1,19201468
331 (Δ <i>URA3</i>),	14,387	23,486	23,975		
Δ <i>FKS1::URA3</i>	12,986	21,670	22,845	1,333385552	0,82867655
Δ <i>FKS2::URA3</i>	14,666	22,968	24,827	1,737436198	0,6721518
Δ <i>FKS3::URA3</i>	15,962	22,922	24,459	4,403284314	2,1306225

Tiempo de evaluación: 12 h					
Cepas	Ct ^a <i>ACT1</i>	Ct <i>CHS3A</i>	Ct <i>CHS3B</i>	Ratio <i>CHS3A</i>	Ratio <i>CHS3A</i>
ATCC 90030	20,165	24,306	28,703	1,311302014	1,14869835
331 (Δ <i>URA3</i>),	19,337	23,869	28,075		
Δ <i>FKS1::URA3</i>	17,564	20,758	26,057	2,528006197	1,18509277
Δ <i>FKS2::URA3</i>	12,043	18,270	25,838	0,308854659	0,0300394
Δ <i>FKS3::URA3</i>	19,749	24,090	28,472	1,141554707	1,01045145

Tiempo de evaluación: 16 h					
Cepas	Ct ^a <i>ACT1</i>	Ct <i>CHS3A</i>	Ct <i>CHS3B</i>	Ratio <i>CHS3A</i>	Ratio <i>CHS3A</i>
ATCC 90030	22,961	29,533	26,786	4,272261632	4,38020988
331 (Δ <i>URA3</i>),	20,887	29,554	26,843		
Δ <i>FKS1::URA3</i>	21,338	29,966	26,925	1,027401439	1,29145735
Δ <i>FKS2::URA3</i>	23,283	30,968	28,854	1,975201723	1,30585979
Δ <i>FKS3::URA3</i>	22,455	29,854	28,345	2,408274762	1,04681028

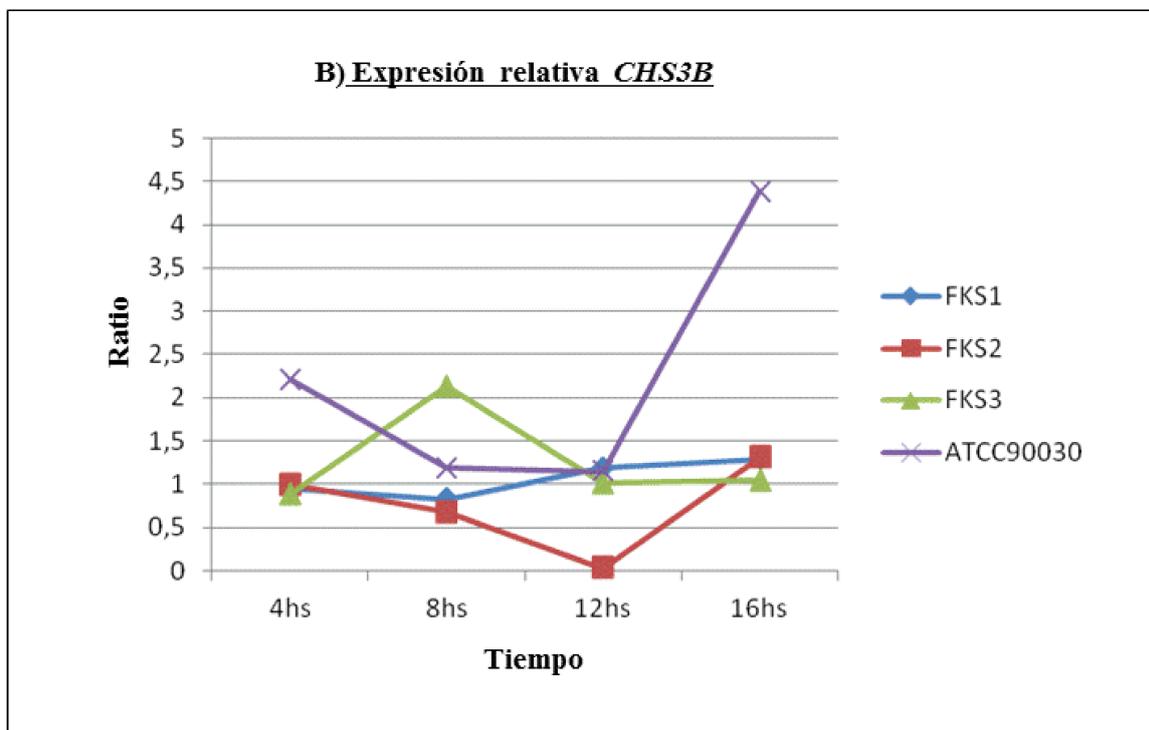
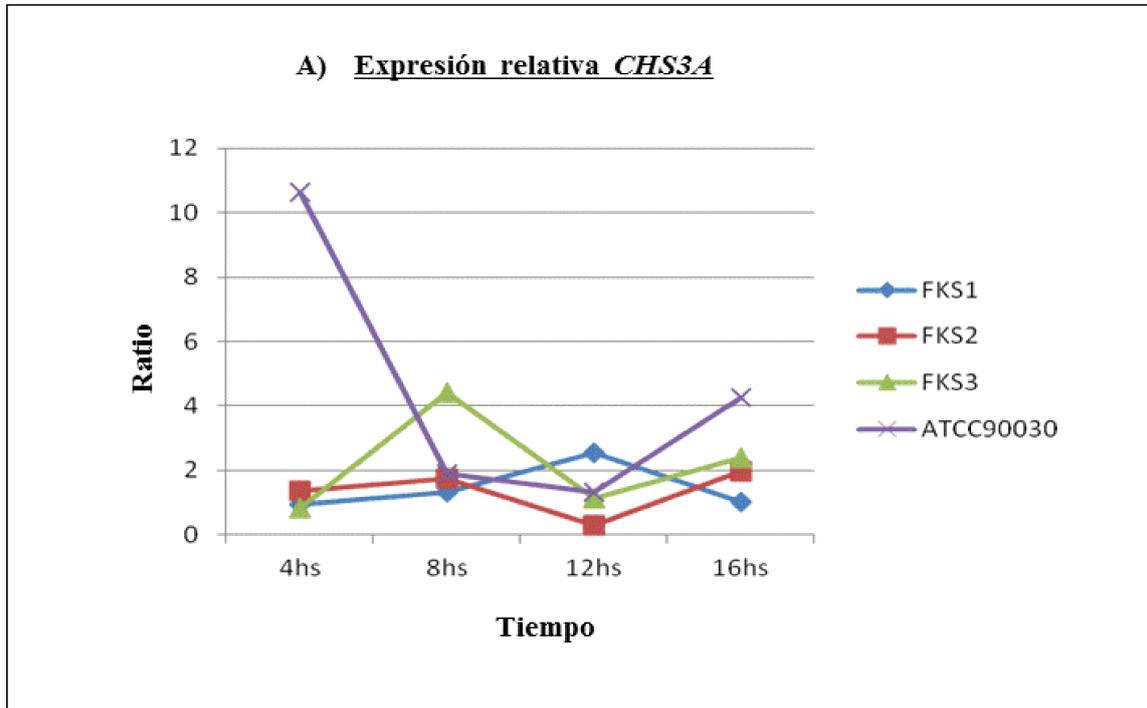


Figura 35.- Gráficas Ratio vs tiempo. Niveles de expresión relativa en las distintas cepas evaluadas, en todos los tiempos estudiados de los genes A) *CHS3A* y B) *CHS3B*.

4.3 IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES QUE CONFORMAN EL COMPLEJO *Candida glabrata*: *Candida glabrata sensu stricto*, *Candida nivariensis* y *Candida bracarensis* UTILIZANDO PCR MULTIPLEX.

La región genómica comprendida entre 18S-ITS1-5.8S-ITS2-26S, presenta regiones muy conservadas como son los genes ribosomales, y regiones muy variables con alta susceptibilidad a acumular mutaciones, como son los ITS1 e ITS2. Basándonos en estas características, diseñamos dos grupos de primers: primers de control y primers de detección de especie **Tabla 23**. Denominamos primers de control, a los primers universales ITS1F e ITS4R, los cuales fueron diseñados para hibridar en regiones conservadas de los genes ribosomales 18S y 26S, respectivamente (White, T.D.Bruns, S.B.Lee, y J.W.Taylor, 1990). La denominación “de control”, viene dada porque el fragmento de PCR producto de la amplificación con los primers universales, siempre debe estar presente en cada reacción de PCR multiplex. Esto permite utilizarlos para comprobar la calidad de las muestras de ADN y la presencia o ausencia de inhibidores en la reacción. Los primers de detección de especie: CgITS1F, CbITS1F y CnITS2F, fueron diseñados específicamente para hibridar la región variable ITS1 o ITS2. Los dos primeros, hibridan en la región ITS1 de *C. glabrata sensu stricto* y *C. bracarensis*, respectivamente. Mientras que CnITS2F lo hace en la región ITS2 de *C. nivariensis*. Cada uno de estos primers, genera un producto de amplificación, en conjunto con el primer ITS4R. Los primers específicos, se diseñaron donde existen diferencias que permiten la identificación individual de cada una de las especies del complejo, y cuyos productos de amplificación de PCR, también permitan diferenciarlas en un gel de agarosa por sus diferencias de tamaño (**Figura 36**).

Otras variables de reacción tales como temperaturas de ciclado, concentraciones de MgSO₄ y de los primers se tuvieron en consideración para el diseño de PCR con el fin de unificar todas las condiciones para así utilizar los 5 primers en un mismo tubo.

Para la identificación de cada una de las especies del complejo, se realizó un tubo de PCR multiplex compuesto por 5 primers: ITS1F, ITS4R, CgITS1F, CbITS1F y CnITS2F. Cuando el ADN utilizado como templado era de *C. glabrata sensu stricto* se observaron 2 amplicones: uno de 882pb y otro de 636 pb. En cambio si el ADN utilizado de molde era de *C. nivariensis* o *C. bracarensis*, los amplicones obtenidos fueron de: 760 pb/220 pb y 805/521 pb, respectivamente (**Figura 37**).

La utilidad de la PCR multiplex fue evaluada utilizando un estudio doble ciego. El estudio se realizó sobre una colección de 30 cepas pertenecientes al complejo *C. glabrata*, donde se incluyeron una *C. bracarensis* y dos *C. nivariensis*. Se identificaron 27 cepas como *C. glabrata sensu stricto*, 2 cepas como *C. nivariensis* y 1 cepa como *C. bracarensis*. Esta herramienta molecular fue capaz de clasificar correctamente a todas las cepas del estudio, al compararlo con el resultado de la secuenciación de ITS considerado como método gold estándar. La PCR multiplex presentó un 100% de especificidad y sensibilidad.

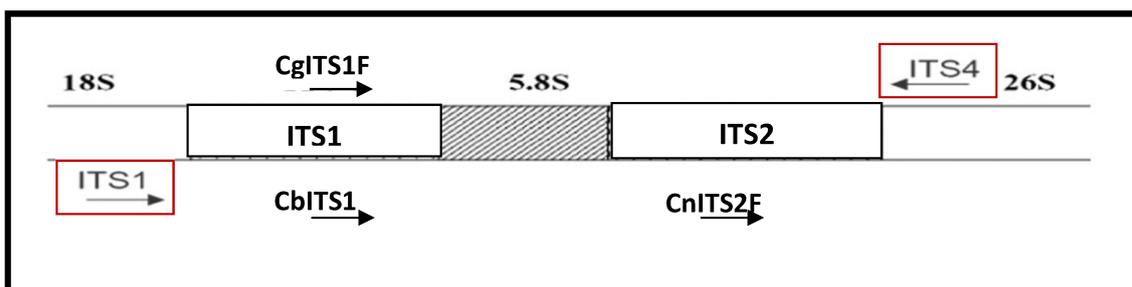


Figura 36.- Genes ribosomales fúngicos: Gen 18S ARNr, región ITS que incluye ITS-1, gen 5.8S ARNr y ITS-2 y gen 26S ARNr. Los recuadros rojos indican los primers panfúngicos: ITS1 e ITS4 utilizados para amplificar la región en estudio. Los recuadros verdes indican la ubicación de los primers forward específicos: CgITS1F, CbITS1F y CnITS2F que permiten la identificación de cada una de las especies del complejo.

Tabla 23.- Oligonucleótidos diseñados para este estudio.

Oligonucleótidos ^a	Secuencia (5'→3')	Propósito
ITS1F	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	Amplificación región ITS1-5.8S-ITS2. Control de reacción.
ITS4 R	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	Amplificación región ITS1-5.8S-ITS2. Control de reacción.
CgITS1F	5'-TTATCACACGACTCGACACT-3'	Identificación de <i>C. glabrata sensu stricto</i> .
CbITS1F	5'-TATTTACAACTTTGTCAGAAC-3'	Identificación de <i>C. bracarensis</i>
CnITS2F	5'-ATGCGGACGTGCATGGTG-3'	Identificación de <i>C. nivariensis</i>

a- F: forward; R: reverse

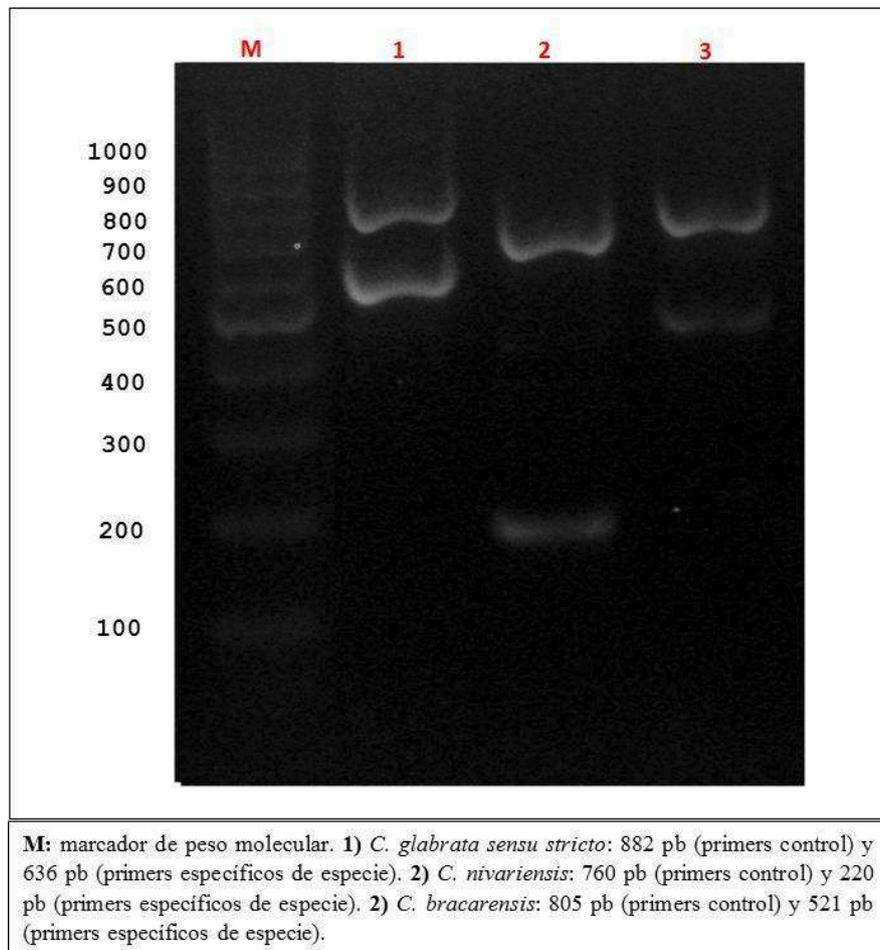


Figura 37.- Electroforesis de los productos de la PCR multiplex, en un gel de agarosa al 1.5%. Línea M, marcador de peso molecular que va desde 100 a 1000 pb, con incrementos de 100 pb. Línea 1: *C. glabrata sensu stricto*: 882 pb (primers control) y 636 pb (primers específicos de especie). Línea 2: *C. nivariensis*: 760 pb (primers control) y 220 pb (primers específicos de especie); Línea 3: *C. braccarensis*: 805 pb (primers control) y 521 pb (primers específicos de especie).

4.4 GENERACIÓN DE HERRAMIENTAS MOLECULARES DE DIAGNÓSTICO DE RESISTENCIA A EQUINOCANDINAS EN *Candida glabrata sensu stricto*.

4.4.1 Diseño de primers de control y de detección de mutaciones.

Los genes *FKS1* y *FKS2* de *C. glabrata* presentan regiones con una alta homología (> 73 %), porciones de muy baja homología (< 50 %) y otras prácticamente homologas (> 85 %) que se ubican en la región de los *hot spot* de ambos genes. Por esta razón, se diseñaron dos grupos de primers denominados: primers de control y primers de detección de mutaciones. Los primers de control fueron diseñados para hibridarse en regiones de baja homología entre los genes, con dos objetivos: dar especificidad de gen *FKS1* o *FKS2*

cuando se usan en combinación con los primers de detección de mutaciones y utilizarlos para controlar la calidad de las muestras de ADN y la presencia o ausencia de inhibidores, esto basándose en el hecho de que la presencia de mutaciones se representa como la ausencia de amplificación del producto de PCR. Los primers de detección de mutaciones 1-F625, 1-S629, 1-D632, 2-F659, y 2-S663 **Tabla 24** fueron diseñados para hibridar específicamente con las secuencias WT de los genes *FKS1* y *FKS2* (**Figura 38**). Esto se llevó a cabo de manera que el extremo 3' de los primers finalice en los nucleótidos que generalmente se mutan. Si hay mutaciones, el primer no se hibrida por falta de complementariedad, la ADN polimerasa no se une, y no se amplifica el producto de PCR.

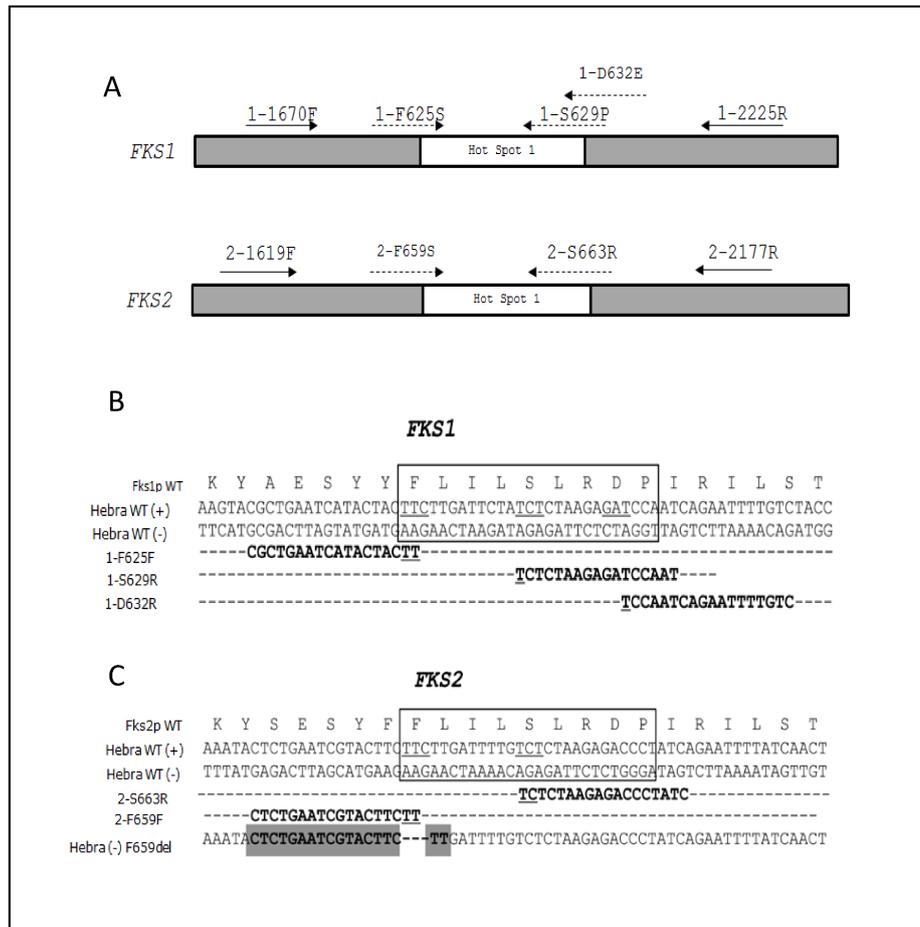


Figura 38.- (A) Representación de 1000 nucleótidos de los genes *FKS* de *C. glabrata sensu stricto*, los cuales incluyen la región *hot spot 1* (en blanco). Flechas continuas: oligonucleótidos incluidos en el grupo PCR control, utilizados como control de reacción y dan especificidad de gen. Flechas discontinuas: oligonucleótidos diseñados para detección de mutaciones en la región *hot spot 1* de los genes *FKS1* y *FKS2* de *C. glabrata sensu stricto*. (B) Hibridación de primers 1-F625F, 1-S629R y 1-D632R con el gen *FKS1* WT. (C) Hibridación de los primers 2-S663R y 2-F659F con el gen *FKS2* WT, y el primer 2-F659F con la región del gen *FKS2* con la delección de tres nucleótidos (sombreado en gris). Los nucleótidos subrayados muestran los codones donde tienen lugar las mutaciones y se hibridan los primers de detección de mutaciones. Los recuadros incluyen la región *hot spot 1* de Fks1p y Fks2p.

Tabla 24.- Secuencias de los primers diseñados para este estudio.

Oligonucleótido ^a	Genes Diana	Propósito (s) ^b	5' → 3' secuencia ^c
1-1670F	<i>FKS1</i>	<i>FKS1</i> HS1 AfS y CA	GTTGCTGCGGTCATGTTCTT
1-2225R	<i>FKS1</i>	<i>FKS1</i> HS1 AfS y CA	GCGTTCAGACTTGGGAAAT
2-1619F	<i>FKS2</i>	<i>FKS2</i> HS1 AfS y CA	GAATGGTGTTTCGTTCCAAG
2-2177R	<i>FKS2</i>	<i>FKS1</i> HS1 secuenciación y CA	TGTTGCTTCTCAGACTTTCACC
1-F625F	<i>FKS1</i>	Detección de Mutación	CGCTGAATCATACTACTT
1-S629R	<i>FKS1</i>	Detección de Mutación	GATTGGATCTCTTGAGA
1-D632R	<i>FKS1</i>	Detección de Mutación	GACAAAATTCTGATTGGA
2-F659F	<i>FKS2</i>	Detección de Mutación	CTCTGAATCGTACTTCTT
2-S663R	<i>FKS2</i>	Detección de Mutación	GATAGGGTCTCTTAGAGA
1-1776F	<i>FKS1</i>	<i>FKS1</i> HS1 Secuenciación	ACGTCGCTTCTCAAACCTTC
1-2008R	<i>FKS1</i>	<i>FKS1</i> HS1 Secuenciación	CGGTAGCAATCATCAAACCC
2-1881F	<i>FKS2</i>	<i>FKS2</i> HS1 Secuenciación	CGACGTTTCAGCTTCAGAGTTT
2-2513R	<i>FKS2</i>	<i>FKS2</i> HS1 AfS	CCAACAGAGAAGACAGTGTGA
ITS1 ^d	rDNA ^e	Identificación Molecular	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4 ^d	rDNA ^e	Identificación Molecular	TCCTCCGCTTATTGATATGC

^aF: forward;R: reverse.

^bAfS amplificación para secuenciación; CA, control de amplificación; HS1 *hot-spot* 1

^cNucleótidos en negrita muestra donde puede darse la mutación.

^dZimbeck AJ,2010.

^e DNA ribosomal

4.4.2. Diseño del set de PCR multiplex para la detección de resistencia a las equinocandinas en *C. glabrata sensu stricto*.

Para la detección de sustituciones en Fks1p: F625, S629 y D632, las PCR multiplex se realizaron en tres tubos, con tres primers en cada uno: primers 1-1670F, 1-2225R, y 1-F625; 1-1670F, 1-2225R, y 1-S629; 1-1670F, 1-2225R, y 1-D632, respectivamente. Estas PCR presentaron una banda de 555 pb en todos los tubos y bandas de 369 pb, 263 pb, y 252 bp cuando los aislamientos eran WT para los residuos F625, S629, and D632 de Fks1p, respectivamente. Por otro lado cuando existe una mutación en el codón que codifica para alguno de los tres aminoácidos enumerados anteriormente, solamente fue observada una única banda de 555 pb en la electroforesis (PCR control) (**Figura 39**).

La detección de la sustitución de los aminoácidos F659 y S663 en Fks2p se realizó de la misma manera que para Fks1p pero utilizando los primers: 2-1619F, 2-2177R, y 2-F659 y los primers 2-1619F, 2-2177R, y 2-S663, respectivamente. En este caso en los aislamientos WT se observaron dos bandas: una de 558 pb (PCR control) y otras de 219 pb o 400 pb, respectivamente. Para las cepas resistentes a las equinocandinas con

mutaciones en F659 y S663, se observó solo la banda de 558 pb (PCR control) en la electroforesis (**Figura 39**).

Otras variables de reacción tales como temperaturas de ciclado, concentraciones de $MgSO_4$ y de los primers se tuvieron en consideración para el diseño de PCR con el fin de unificar todas las condiciones para así utilizar el mismo programa de PCR cualquiera sea el grupo de primers utilizado.

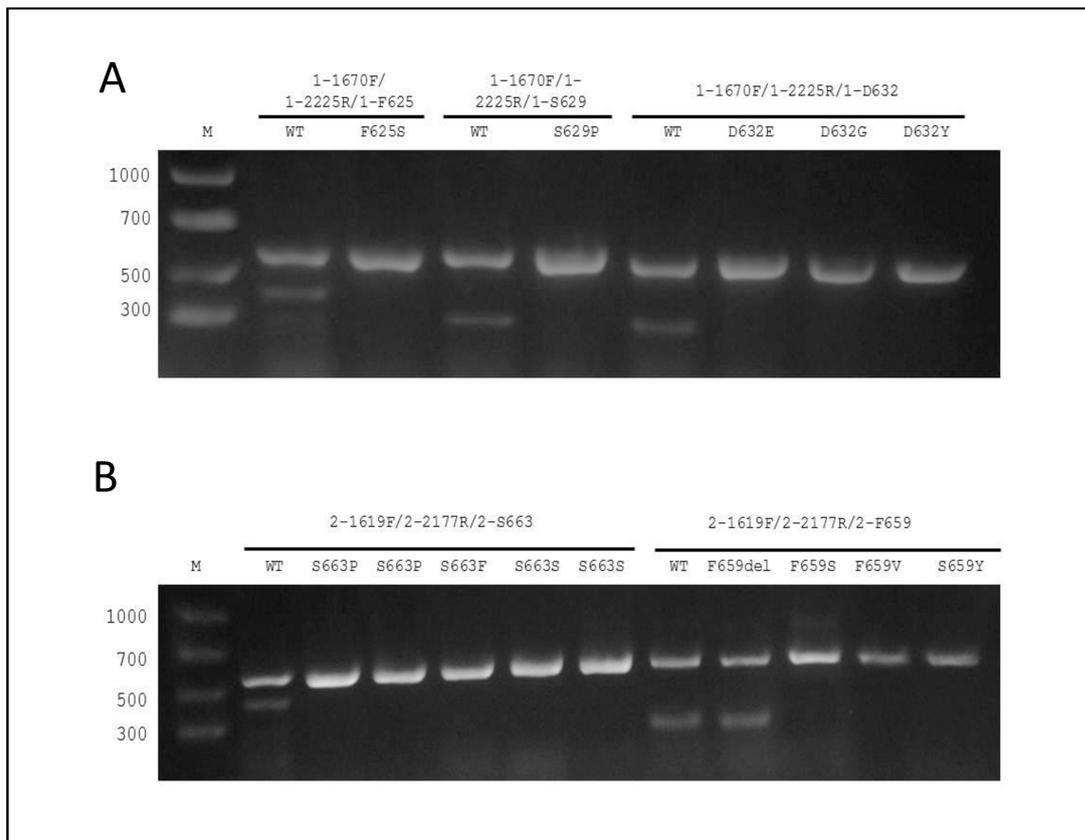


Figura 39.- Electroforesis de los productos de los set de PCR multiplex, en un gel de agarosa al 1.5%. Los tres primers utilizados en cada uno de los tubos están en la parte superior de cada imagen. **M:** marcador de peso molecular. **(A)** Set de PCRs diseñadas para detectar mutaciones en el gen *FKS1*. Calles 2,4 y 6 *C.glabrata* ATCC 90030 (cepa WT, sensible a las equinocandinas). Calle 3 cepa de *C.glabrata* 42997 (Fks1p-S625F). Calle 5, cepa 5847 (Fks1p-S629P). Calle 6, cepa LMFM37 (Fks1p-D632E). Calle 7, *C.glabrata* 21900 (Fks1p-D632G). Calle 8, aislamiento 42971 (Fks1p-D632Y). **(B)** Calles 2 y 8, *C.glabrata* ATCC 90030 (cepa WT, sensible a las equinocandinas). Calle 3, *C.glabrata* 3.830 (Fks2p-S663P). Calle 4, cepa 37178 (Fks2p-S663P). Calle 5, cepa M2791 (Fks2p-S663F). Calle 6, aislamiento 20.593.033 (Fks2p-S663P). Calle 7, cepa LMDM 34 (Fks2p-S663P). Calle 9, cepa 31498 (Fks2p-F659del). Calle 10, cepa 6183 (Fks2p-S659S). Calle 11, cepa M234 (Fks2p-S659V). Calle 12, aislamiento 20.551.099 (Fks2p-S659Y).

4.4.3. Validación del set de PCR multiplex a través de un estudio doble ciego.

La utilidad de los set de PCR fue evaluada realizando un estudio doble ciego, con una colección de 50 cepas de *C. glabrata*, incluyendo 16 cepas clínicas resistentes a las equinocandinas con diferentes sustituciones de aminoácidos en ambas. Tanto las cepas resistentes a las equinocandinas, como las WT se encuentran detalladas en la tabla 1 de la sección Materiales y Métodos.

De los 50 aislamientos testeados, 35 fueron considerados cepas WT por la metodología propuesta, es decir, los 5 tubos de PCR presentaron 2 bandas en la electroforesis. El resto fueron identificadas como portadoras de mutaciones en los *hot spot* de los genes *FKS1* y *FKS2*, con sustituciones de un aminoácido en los residuos Fks1p-F625 ($n = 1$), Fks1p-S629 ($n = 1$), Fks1p-D632 ($n = 4$), Fks2p-F659 ($n = 4$), y Fks2p-S663 ($n = 5$). Un total de 49 de las 50 cepas (98 %) fueron identificadas correctamente como sensible o resistente comparado con los resultados de los test de sensibilidad *in vitro* a las equinocandinas. Además, encontramos 98 % de concordancia entre la metodología propuesta y la secuenciación. Hubo un falso resultado, que comprende una cepa con una deleción en el residuo 629 (Fdel629) de Fks2p. Esta deleción no fue detectada por el primer 2-F659, porque si bien se perdieron tres nucleótidos, la secuencia se mantuvo sin cambios. Por esta razón el primer pudo hibridarse perfectamente, no detectando dicha deleción (**Figura 39**).

4.5 GENERACIÓN DE HERRAMIENTAS MOLECULARES DE DIAGNÓSTICO DE RESISTENCIA A EQUINOCANDINAS EN *Candida albicans*.

4.5.1 Diseño de primers de control y de detección de mutaciones

Se diseñaron dos set de primers a los cuales se denominó como primers de control y primers para detección de mutaciones. Estos primers fueron combinados para el diseño de un set de PCRs multiplex conformado por 5 tubos. Los primers de control fueron diseñados para hibridar específicamente en el gen *FKS1* de *C. albicans*, flanqueando las regiones *hot spot* 1 desde el nucleótido 1752 a 2232 (primers 1752-F y 2232-R) y la región *hot spot* 2 desde el nucleótido 3518 a 4266 (primers 3518-F y 4266-R). Estas regiones

fueron seleccionadas para el diseño de los primers control, como resultado de su baja homología con los genes *FKS2* y *FKS3* de *C. albicans*, lo cual asegura hibridación específica de gen. Estos pares de primers fueron utilizados como controles internos para verificar la calidad de las muestras de ADN y la presencia o ausencia de inhibidores, basándose en el hecho de que la presencia de mutaciones se representa como la ausencia de amplificación del producto de PCR. Los primers para la detección de mutaciones fueron diseñados para hibridar en las regiones *hot spot 1* y *hot spot 2* del gen *FKS1* de *C. albicans*, considerando que el extremo 3' de los primers finalice en los nucleótidos que generalmente se mutan. Si hay mutaciones, bajo las condiciones apropiadas de temperatura (astringencia), el primer no se hibrida por falta de complementariedad. Los primers para la detección de mutaciones en la región *hot spot 1* se denominaron: F641, S645, D648 y P649, mientras que para la región *hot spot 2* se llamó R1361 (**Figura 40**). En la **Tabla 25** se detallan las secuencias de todos los primers utilizados en este estudio.

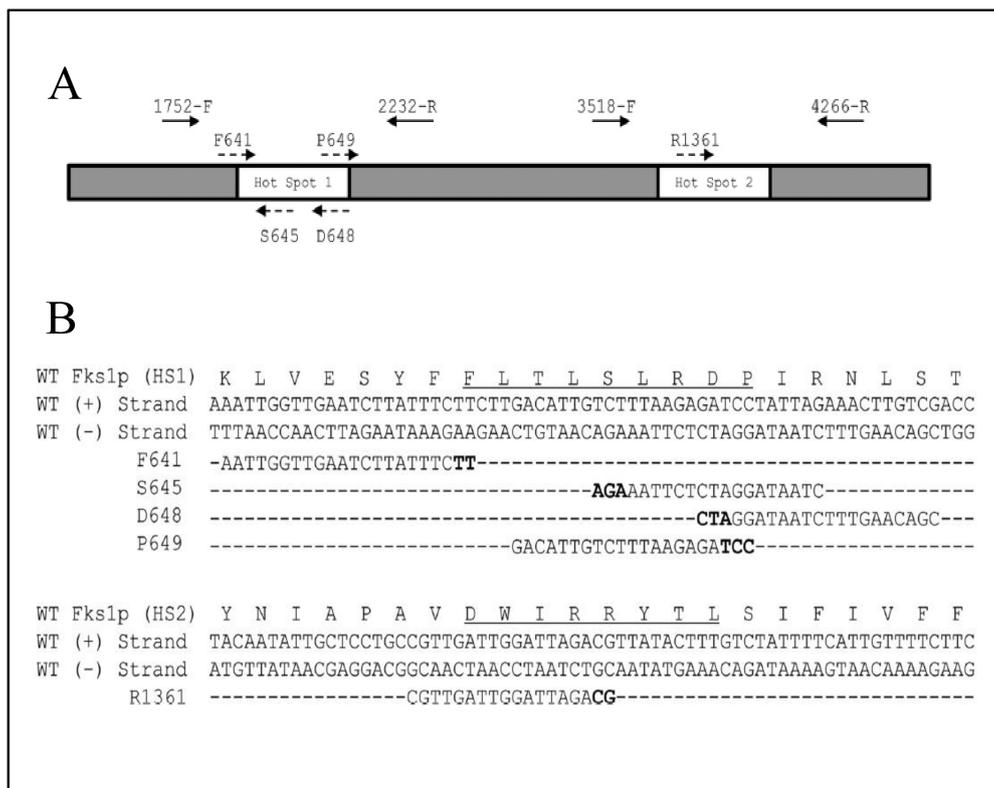


Figura 40.- (A) Representación del gen *FKS1* de *C. albicans*, donde se incluyen las regiones *hot spot* (en blanco). Flechas continuas: representan los primers del grupo control. Flechas punteadas: representan los primers de detección de mutaciones. (B) Alineación de los primers para la detección de mutaciones con el gen *FKS1* de tipo salvaje (WT). Los aminoácidos subrayados muestran las regiones del *hot spot*. Los nucleótidos en negrita muestran las mutaciones detectadas por el método propuesto.

Tabla 25.- Secuencias de los primers diseñados para este estudio de *C. albicans*.

Oligonucleótido ^a	Genes Diana	Propósito(s) ^b	5' → 3' secuencia
1752-F	<i>FKSI</i>	<i>FKSI</i> HS1 AfS y CA	GTTGCTGCGGTCATGTTCTT
2232-R	<i>FKSI</i>	<i>FKSI</i> HS1 secuenciación y CA	GCGTTCCAGACTTGGGAAAT
3518-F	<i>FKSI</i>	<i>FKSI</i> HS2 AfS y CA	CTGGTGTTTTGGGTGATGTTGC
4266-R	<i>FKSI</i>	<i>FKSI</i> HS2 secuenciación y CA	GGTCAAATCAGTGAAAACCG
F641	<i>FKSI</i>	Detección de Mutación	AATTGGTTGAATCTTATTTCTT
S645	<i>FKSI</i>	Detección de Mutación	CTAATAGGATCTCTTAAAGA
D648	<i>FKSI</i>	Detección de Mutación	CGACAAGTTTCTAATAGGATC
P649	<i>FKSI</i>	Detección de Mutación	GACATTGTCTTTAAGAGATCC
R1361	<i>FKSI</i>	Detección de Mutación	CGTTGATTGGATTAGACG
1892-F	<i>FKSI</i>	<i>FKSI</i> HS1 Secuenciación	CCTTGCCAAATTGGTTGAATC
3904-F	<i>FKSI</i>	<i>FKSI</i> HS2 Secuenciación	TACTATGGTCATCCAGTTTCCA

^a F: forward, R: reverse.

^b AfS, amplificación para la subsecuente secuenciación; CA, Control Amplificación; HS1, *hot spot 1*.

^c rDNA, ribosomal DNA.

^dWhite TJ *et al.*, 1990.

4.5.2. Diseño del set de PCR multiplex para la detección de resistencia a las equinocandinas en *C. albicans*.

Las variables de las reacciones de PCR multiplex, incluyendo la temperatura de annealing, se establecieron con el fin de utilizar el mismo programa de PCR independientemente del conjunto de primers utilizado. Para la detección de sustituciones de aminoácidos en el *hot spot 1* del Fks1p, se utilizaron 4 tubos de PCR. Cada uno de estos 4 tubos contenía un par de primers de control (1752-F y 2232-R) y uno de los primers para la detección de mutaciones denominados: F641, S645, D648 o P649. Las PCR dieron una banda de 481 pb en todos los tubos (correspondiente a la amplificación con los primers de control de PCR) y una segunda banda de 332 pb, 200 pb, 211 pb, o 307 pb cuando el ADN molde era WT para el codón que codificaba F641, S645, D648 o P649, respectivamente. De manera similar, para la detección de la sustitución en el residuo R1361 del *hot spot 2*, el último tubo de PCR del conjunto incluía los cebadores 3518-F, 4266-R y R1361. La PCR con ADN WT dio dos bandas: 769 pb y 202 pb correspondientes a la banda de control y la que surge de amplificar la región *hot spot 2* de una cepa WT, respectivamente. Por otra parte, cuando se utilizaron ADN mutantes, se

obtuvo una banda de PCR única en uno de los tubos correspondientes a la PCR de control (481pb cuando las cepas presentaban mutaciones en la región *hot spot 1* o 769 pb cuando las mutaciones estaban presentes en la región *hot spot 2* (**Figura 41**).

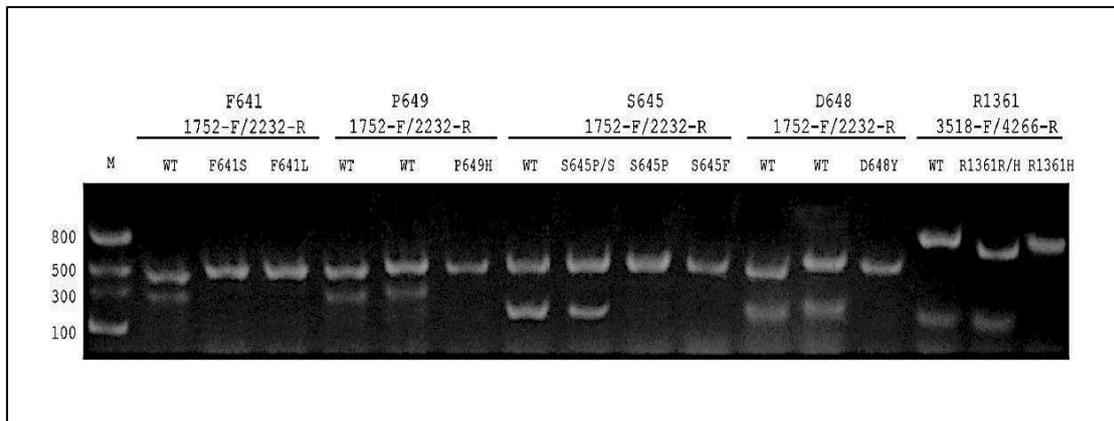


Figura 41.- Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Los primers utilizados para cada tubo PCR se encuentran descritos por encima de la imagen. Línea M: marcador de peso molecular. WT: cepas WT (sensibles a las equinocandinas). Línea 4: cepa de *C. albicans* M177 (Fks1p-F641S). Línea 5: cepa de *C. albicans* M119 (Fks1p-F641L). Línea 8: cepa de *C. albicans* M122 (Fks1p-P649H). Línea 10: cepa de *C. albicans* A15 (Fks1p-S645S/P- mutante heterocigoto). Línea 11: cepa de *C. albicans* A15-10 (Fks1p-S645P). Línea 12: cepa de *C. albicans* M85 (Fks1p-S645F). Línea 15: cepa de *C. albicans* M149 (Fks1p-D648Y). Línea 17: cepa de *C. albicans* M90 (Fks1p-R1361R/H mutante heterocigoto). Línea 12: cepa de *C. albicans* M121 (Fks1p-R1361H).

4.5.3. Validación del set de PCR multiplex a través de un estudio doble ciego.

La utilidad del set de PCR fue evaluada realizando un estudio doble ciego, con una colección de 50 cepas de *C. albicans*, incluyendo 13 cepas clínicas resistentes a las equinocandinas con diferentes sustituciones de aminoácidos en ambas regiones *hot spot* del gen *FKSI*. La mayoría de las cepas resistentes eran mutantes homocigotas, con excepción de 3 aislamientos que presentaban mutaciones heterocigotas. Usando el set de 5 tubos de PCRs multiplex, 39 cepas de *C. albicans* fueron consideradas WT (sensibles a equinocandinas y sin mutaciones en las regiones *hot spot*). Las 11 cepas restantes fueron clasificadas como resistentes a la equinocandinas, presentando sustituciones de aminoácidos en Fks1p, en los siguientes residuos: F641 ($n = 3$), S645 ($n = 5$), D648 ($n = 1$), P649 ($n = 1$) y R1361 ($n = 1$). Cuando estos resultados fueron comparados con los

obtenidos por los test de sensibilidad a antifungicos, se observó que 48 cepas (96 %) fueron correctamente clasificadas como sensibles o resistentes a las equinocandinas. Sin embargo, al comparar los mismos resultados con los obtenidos por secuenciación del *FKSI*, se observó que solamente 47 (94 %) aislamientos fueron correctamente clasificados. Los resultados falsos negativos descritos, se presentaron en su totalidad para los mutantes heterocigotos. Estos mutantes mostraron mutaciones heterocigóticas en S645S / P (cepa A15), en R1361R / H (cepa M90) y la tercera mostró una mutación homocigótica (S645F) en la región *hot spot* 1, junto con una mutación heterocigótica en R1361R / H (cepa M194) en la región *hot spot* 2.

Este último aislamiento fue clasificado por el set de PCR multiplex como si presentará solamente una mutación en el *hot spot* 1 (S645) y fuera WT para la región *hot spot* 2. Considerándose como resistente a las equinocandinas, al igual que por el método de CLSI. La detección genotípica correcta solo fue determinada por el método de secuenciación.

Tanto las cepas resistentes a las equinocandinas, como las WT se encuentran detalladas en la **Tabla 3** de la sección Materiales y Métodos.

DISCUSIÓN

5.- DISCUSIÓN

❖ OBTENCIÓN DE CEPAS DE *C. glabrata sensu stricto* DEFECTIVAS EN LOS GENES *FKS1*, *FKS2* Y *FKS3*.

La tecnología de knock-out génico tiene gran potencial en investigación básica. Permite responder interrogantes de manera indirecta sobre la función de un gen en particular al evaluar los fenotipos obtenidos por la pérdida física o funcional del gen en estudio.

Existen distintas formas de lograr la inactivación génica. Entre ellas destacan el knock-out de genes, la transgénesis, la mutagénesis química y la tecnología del ARN de interferencia (Capecchi, 1989).

Durante el desarrollo de esta tesis, se aplicó la metodología de Knock-out para estudiar la función de los genes *FKS1*, *FKS2* y *FKS3* en *C. glabrata sensu stricto*. Se logró obtener las cepas mutantes defectivas utilizando distintas técnicas con el fin de evaluar la eficiencia de cada una. Así se utilizó:

- Promoter-Dependant Disruption of Genes (PRODIGE) para la obtención del vector para generar la cepa defectiva en *FKS1*. Esta se basa en generar un knock-out total del gen en estudio (eliminación de todo el ORF) utilizando un cassette de selección que es gobernado por el promotor (5'UTR) y terminador (3'UTR) del gen en estudio. En esta tesis se utilizó el gen *URA3* de *S. cerevisiae* como cassette de selección sobre una cepa parental defectiva en *URA3* y por lo tanto auxótrofa en uracilo/uridina. La ventaja de esta metodología radica en que el gen selector puede ser de una especie alejada taxonómicamente de la estudiada ya que la expresión del gen selector se regula con la maquinaria de expresión génica del organismo receptor del vector (Edlind *et al.*, 2005). Además, esta metodología permite mejorar la tasa de recombinación. Por ejemplo, en *C. glabrata* esta tasa es de solo 2% cuando se usan regiones de homología de 100 pb (Cormack y Falkow, 1999, Weig *et al.*, 2001). Esta baja tasa de recombinación homóloga genera la necesidad de analizar un gran número de transformantes para lograr obtener los resultados deseados. En cambio con PRODIGE, las regiones regulatorias del marcador de selección pueden eliminarse reduciendo el tamaño del cassette de selección al ORF del gen de selección. Así, en nuestro caso,

podimos reducir el tamaño del cassette de selección de 1000 pb a menos de 800 pb aumentando el tamaño de las regiones de homología en más de 200 pb de cada lado sin alterar el tamaño del vector. Con esta modificación logramos una tasa de recombinación homóloga mayor al 10% y equivalente a la obtenida por los autores que originalmente diseñaron esta técnica (Edlind *et al.*, 2005). Una limitante de esta metodología es que se requiere un nivel basal de actividad del promotor para asegurar la expresión del gen selector. Así, se corre el riesgo de que si se quiere knockear un gen con expresión inducida por una condición ambiental determinada, no se logren conseguir transformantes homólogos si no se replican las condiciones de cultivo donde se observa dicha expresión. Esto se demostró cuando se intentó hacer la disrupción el gen *PDR5* con *URA3* en *S. cerevisiae*. El gen *PDR5* se expresa solo en presencia de agentes antifúngicos como el fluconazol y por lo tanto no se pudieron seleccionar mutantes por auxotrofia ya que eran sensibles a esta droga. Esto hizo que se clasificara al gen *PDR5* como PRODIGE-refractory (refractario a esta metodología) (Staab y Sundstrom, 2003). Los resultados obtenidos en esta tesis permiten clasificar al gen *FKS1* como PRODIGE positivo. Este resultado coincide con los datos de predicción de expresión génica publicado en <http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/expression/expressionConnection.pl> que predice que gen es potencialmente PRODIGE-refractory y cual no.

- PCR de fusión para generar el vector utilizado en la disrupción del gen *FKS2*. Esta metodología consistió en generar el vector por reacciones de PCR sucesivas. Se sabe que la condición ideal para obtener de manera más simple los productos de fusión consiste en utilizar primers con más de 15 nucleótidos de hibridación y con un % de GC mayor a 50% se logra una buena hibridación, pero esta depende de la temperatura de anealing utilizada. Para el caso del vector utilizado en esta tesis para knockear el gen *FKS2* se utilizaron secuencias solapantes (overlapping sequences) con las siguientes características: 25 nucleótidos de hibridación donde no se tuvieron en cuenta la cantidad de GC presentes. Este aumento en el tamaño de los primers de fusión, hizo que las PCRs pudieran tener amplios rangos de temperatura de anealing, asegurándonos la hibridación correcta de los primers. Con este cambio, logramos fusionar los fragmentos de PCR donde se necesitara sin tener en cuenta la cantidad de GC de las regiones de fusión. De esta manera logramos fusionar las regiones 5' y 3' flanqueantes al gen *FKS2* con el cassette

URA3 de *C. glabrata* (incluyendo el promotor, terminador y ORF del gen). El uso de este cassette de selección nos permitió anticipar la funcionalidad del mismo independientemente de que el *FKS2* sea o no PRODIGE-refractory ya que el *FKS2* en otras especies de levaduras (como *S. cerevisiae*) solo se expresa en ciertas condiciones puntuales de estrés celular y es considerado un gen de respaldo del *FKS1* (Staab y Sundstrom, 2003). En el presente trabajo de tesis, se logró obtener el vector de manera rápida y eficiente demostrando la eficacia de las modificaciones realizadas al protocolo de Harrison y cols.

- Generación de vectores por digestión con enzimas de restricción seguida de ligación. Esta metodología, es la forma clásica con la que se han obtenido vectores de disrupción para el estudio de genes fúngicos (Cullen *et al.*, 1987, Staab y Sundstrom, 2003). Para el caso del *FKS3*, se eligió esta metodología teniendo en cuenta que este gen es el menos estudiado de los tres parálogos y que no existen certeza sobre donde comienzan y terminan sus regiones 5' y 3' UTRs. Por este motivo, se procedió a generar una disrupción parcial del mismo eliminando la región codificante que incluye las regiones *hot spots* putativas del gen. Así, se pudo asegurar que la deleción no afectaba a los genes ubicados inmediatamente upstream y downstream en el cromosoma. Con esta metodología se tuvieron los inconvenientes previstos que incluyen la gran cantidad de pasos necesarios para la obtención del vector (amplificación por PCR, digestión doble de los productos de PCR y del vector, defosforilación con fosfatasa alcalina, ligación y clonación). Sin embargo, se obtuvo el vector relativamente rápido y pudo ser utilizado sin inconvenientes.

❖ PARTICIPACIÓN DE LOS GENES *FKS* EN EL DESARROLLO, ADQUISICIÓN DE RESISTENCIA Y/O TOLERANCIA A LOS ANTIFÚNGICOS, EN LA REGULACIÓN DE VÍAS CELULARES DE RESPUESTA A ESTRÉS Y EN LA VIRULENCIA DE *C. glabrata sensu stricto*.

Los genomas de levaduras ascomicetes, incluyendo *S. cerevisiae*, *C. albicans* y *C. glabrata*, codifican para tres proteínas Fksp parálogas. En *S. cerevisiae* ellos cumplen roles en el crecimiento vegetativo (Fks1p) y en la formación de la pared de las esporas (Fks2p y Fks3p). Sin embargo, se observó que al generar cepas mutantes $\Delta FKS1$ de *S. cerevisiae* y *C. albicans* se obtuvieron cepas con importantes diferencias. Para la primera

de las levaduras, los mutantes defectivos en *FKS1* fueron viables pero con crecimiento afectado (Ishihara *et al.*, 2007, Mazur *et al.*, 1995). Esto indica que los Fks1p y Fks2p son parcialmente redundantes para el crecimiento vegetativo. En cambio, en *C. albicans* esta redundancia parece no estar presente, ya que las cepas knock-out para el gen *FKS1*, no fueron viables (Douglas *et al.*, 1997b). En contraste con estas dos especies, los *FKS1* y *FKS2* de *C. glabrata* aparentan ser totalmente redundantes para el crecimiento ya que la delección de cada uno de ellos no altera significativamente el fenotipo que estamos describiendo (Katiyar *et al.*, 2012). Para explorar mejor la función, la regulación y el papel en la resistencia de estos genes en *C. glabrata sensu stricto* los 3 *FKS* fueron knockeados y los mutantes defectivos fueron estudiados para conocer su regulación diferencial.

Se comenzó evaluando diferencias en el crecimiento que pudieran asociarse con la deficiencia de un gen *FKS* en particular. Al igual que lo publicado por Katiyar *et al.*, el crecimiento no se vio afectado en los mutantes *FKS2::URA3*, *FKS3::URA3* con respecto a la cepa ATCC 90030 (WT) (Katiyar *et al.*, 2012). En el caso particular de la cepa *FKS1::URA3*, se observó un defecto parcial en el crecimiento con respecto a la cepa WT, al igual que lo evidenciado en mutantes $\Delta FKS1$ de *S. cerevisiae* (Ishihara *et al.*, 2007). Estos mismos autores, propusieron que la redundancia funcional respecto al crecimiento vegetativo observada en los genes *FKS1* y *FKS2* de *C. glabrata sensu stricto* refleja un cambio evolutivo en la función de Fks2p, en respuesta a una aparente pérdida de la esporulación en este organismo y al beneficio potencial de la redundancia Fks1p-Fks2p. Consistente con este cambio, es la evidencia de que las mutaciones que confieren resistencia a las equinocandinas en aislamientos clínicos ocurren mayoritariamente en el gen *FKS2* (Katiyar, Alastruey-Izquierdo, Healey, Johnson, Perlin, y Edlind, 2012). La presencia de mutaciones en el gen parálogo evolutivamente más moderno, también fue descrita en *Aspergillus fumigatus* y sus *CYP51s*. El gen *CYP51A*, es el que se duplicó más tarde y es el que presenta mutaciones que confieren resistencia a los azoles. Se especula que esto sucede así porque el parálogo más antiguo es el que tiene la función celular fisiológica más importante (Mellado *et al.*, 2005)

Pasando a la evaluación de la sensibilidad a los antifúngicos, la interrupción de los genes *FKS* en *C. glabrata* no alteró la sensibilidad a las equinocandinas. Tanto la cepa ATCC 90030, 331(ΔURA) como las cepas defectivas en los genes *FKS* presentaron un valor de CIM $\leq 0,25$ $\mu\text{g/ml}$ para CSF y $\leq 0,02$ $\mu\text{g/ml}$ para ANF y MCF. Los resultados de estos

ensayos fueron iguales a los obtenidos por otros autores para esta especie (Katiyar *et al.*, 2012) pero discrepan con lo observado en *S. cerevisiae*, donde los mutantes $\Delta FKS1$ mostraron un aumento de CIM de 16 diluciones a CSF con respecto a la cepa WT (Johnson *et al.*, 2011).

Para estudiar la influencia de los genes *FKS* de *C. glabrata* en la respuesta a distintas situaciones de estrés celular y comparar estos resultados con los datos publicados para otras especies de levaduras, se evaluó el impacto de distintas drogas, sustancias químicas y crecimiento a distintas temperaturas en el desarrollo de los mutantes delecionados. Se trabajó estudiando la respuesta al estrés celular siguiendo lo conocido en *S. cerevisiae* donde la respuesta a estrés se divide en dos grandes vías, la vía mTOR y la vía de la calcineurina (**Figura 42**).

Se observaron diferencias en las respuestas a los azoles (sobre todo FLC y VRC) cuando se knockearon los genes *FKS*. La cepa *FKS1::URA3* y la defectiva en *FKS2* presentaron pequeños pero consistentes cambios de CIM. La primera cepa presentó menor sensibilidad a los azoles mientras que *FKS2::URA3* fue más resistente. Tanto en *S. cerevisiae* como en *C. albicans* esta descrito que la tolerancia a los azoles esta mediada por la activación de la vía de la calcineurina a través de un factor de transcripción denominado Crz1p. Este factor de transcripción participa en la activación de varios genes de respuesta a estrés celular. Entre estos genes, se encuentra el gen *FKS2* que contribuye al establecimiento de la tolerancia a los azoles, manteniendo la integridad de la pared (Edlind *et al.*, 2002). En *C. glabrata*, estudios previos demostraron que la tolerancia a azoles estaría mediada por la vía de la calcineurina, pero no por el factor de transcripción Crz1p (Chen *et al.*, 2012). Estos resultados respaldan los nuestros ya que esto explicaría porque en los mutantes *FKS1::URA3*, que solo tienen activo el gen *FKS2*, presentan mayor tolerancia a los azoles que los mutantes defectivos en dicho gen (*FKS2::URA3*). Con el fin de hacer más evidente este fenotipo y confirmar la relación de Fks2p con la respuesta al estrés producido por azoles y la vía de la calcineurina, se estudió la respuesta de los mutantes defectivos frente a la combinación de FLC y un conocido inhibidor de la vía de la calcineurina, el FK506 (Cruz *et al.*, 2002). Esta combinación solo fue sinérgica para la cepa *FKS1::URA3* respaldando lo observado para FLC como única droga. Al generar una situación de estrés en la membrana en este caso por FLC, la respuesta de la levadura es activar la vía de la calcineurina que en este caso esta inhibida por el FK506. Se probó también la combinación de FLC con mevinolin, inhibidor competitivo de la 3-

hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa que participa en los pasos iniciales de la síntesis de esteroides (Gunde-Cimerman *et al.*, 1993). Esta combinación no presentó interacción en ninguno de los mutantes. Este resultado puede deberse a que esta droga se usa clínicamente para reducir la síntesis de colesterol en humanos y quizás esta droga no afecta a la isoenzima equivalente en *C. glabrata*.

La relación de los genes *FKS* de *C. glabrata* y la vía de la calcineurina como efectora de la compensación del estrés celular fue evaluada también enfrentando a los mutantes a medios de cultivo con SDS, NaCl, H₂O₂ y a distintas temperaturas (**Figura 42**). Solo se vio un efecto parcial de mayor inhibición cuando se utilizó ClNa sobre el mutante defectivo en *FKS1* y del H₂O₂ sobre los defectivos en *FKS2* y *FKS3*. Esto indicaría que Fks1p participaría en compensar el estrés osmótico y que Fks2p y Fks3p compensarían los efectos producidos por estrés oxidativo. Estos resultados demostrarían la única función conocida de Fks3p hasta la actualidad (**Figura 42**).

La relación entre los genes *FKS* y la respuesta a defectos en la síntesis de proteínas fue estudiada evaluando la respuesta de los mutantes defectivos en *FKS* a brefeldina A (afecta la secreción de proteínas) (Satiat-Jeunemaitre *et al.*, 1996), hygromicina B (inhibidor de la síntesis de polipéptidos) (Pittenger *et al.*, 1953) y tunicamicina (altera la síntesis de glicoproteínas) (Wyszynski *et al.*, 2012). En todos los casos, no se observaron diferencias fenotípicas entre los mutantes y la cepa parental, por lo que se pudo concluir que estos genes no tendrían relación con la respuesta a este tipo de estrés celular.

La vía de respuesta a estrés conocida como mTOR o PKC está muy bien estudiada en *S. cerevisiae* y en *C. albicans*. En esta última levadura, se comprobó que *TOR1* participa en la regulación de la expresión de genes relacionados con la pared celular (*FKS1*), la producción de hifas y la expresión de genes de adhesinas, todos indispensables para la patogenicidad de esta especie. En *S. cerevisiae* esta vía se encuentra relacionada con la activación de genes de quitina (*CSH3*) y genes de pared (*FKS1* y *FKS2*) en respuesta a la falta de nutrientes (Perez y Rincon, 2010) (**Figura 42**).

Para evaluar la relación entre los genes *FKS* de *C. glabrata* y la vía mTOR, se utilizó rapamicina que inhibe la vía en sus inicios (inhibidor de *TOR1* y *TOR2*) y calfofostín que la inhibe en una etapa más tardía (*PKC1*) (Hay y Sonenberg, 2004). Cuando se utilizó esta última droga no se observó alteración alguna en el desarrollo de ninguna de las cepas. Por el contrario, el efecto de la rapamicina (tanto como droga individual como combinada

con FLC) fue marcado para la cepa defectiva en *FKS1*. Así, ante un estrés, como el causado por FLC, la célula de *C. glabrata* responde a través de la vía mTOR la cual estaría relacionada de alguna manera aún no elucidada con *FKS2* (único activo en este mutante).

Los inhibidores de quitina evaluados frente a los mutantes delecionados fueron calcofluor white, rojo congo (Roncero y Duran, 1985), y nikkomicina Z (Gaughran *et al.*, 1994). El mutante defectivo en *FKS1* fue el que presentó mayores problemas para desarrollarse en presencia de estas drogas. La relación entre las vías de regulación de estrés en respuesta a defectos en la pared celular dada por drogas como las equinocandinas (déficit de β -1,3-D-glucanos) y por los inhibidores de quitina descritos anteriormente fue evaluada combinando estas drogas con inhibidores de la vía de calcineurina (FK506) y mTOR (rapamicina). Se registró que tres de las combinaciones probadas, produjeron sinergismo en todas las cepas. Una de ellas fue FK506-CSF, estos resultados demuestran que al igual que lo observado en *S. cerevisiae* y *C. albicans*, las vías de la calcineurina son necesarias para responder a las equinocandinas y también a azoles. Estos resultados son consistentes con la acción sinérgica observada en otros organismos fúngicos donde se utilizaron inhibidores de la calcineurina y azoles o CSF (Chen *et al.*, 2012, Singh-Babak *et al.*, 2012). Katiyar *et al.* demostraron que en pacientes tratados con FK506 como inmunosupresor y equinocandinas, existen menos probabilidades de que se desarrolle resistencia a esta droga, ya que la generación de mutaciones son más comunes en el gen *FKS2*, que bajo esas condiciones terapéuticas se encuentra regulado negativamente (Katiyar *et al.*, 2012). En el caso de las otras dos combinaciones: FLC-nikkomicina Z y Fk506-nikkomicina Z, donde se observó sinergismo para todas las cepas, se evidenció la importancia de la regulación de los genes de quitina en la compensación ante situaciones que generan estrés celular. En otras levaduras como por ejemplo *C. albicans* se vincularon los genes *CHS2* y *CHS8* como responsables de la disminución de la sensibilidad ante tratamiento con CSF, incrementando la síntesis de quitina para mantener la integridad de la pared (Walker *et al.*, 2013). Sin embargo, el mismo estudio con CSF para *C. glabrata* demostró que el contenido de quitina no se modificaba. Los resultados obtenidos en esta tesis permiten concluir que, la vía de compensación de quitina parece probablemente regulada por la vía de la calcineurina. Sin embargo, parece contradictorio que no se encontraran diferencias marcadas en las expresiones de la Chitin sintase 3 (*CHS3*) en los mutantes defectivos. Esto pudo deberse a que existen 8 genes de quitina sintasa (Ueno *et al.*, 2011) y quizás en *C. glabrata* el gen *CHS3* no sea el que principal participante en la

regulación por déficit de glucanos. Otra posible razón, es que como la expresión es un proceso dinámico que puede variar en minutos, no encontramos en los puntos de tiempo estudiados cambios importantes en la expresión como fuera descrito para otras levaduras del género (Cota *et al.*, 2008). Sin embargo, la participación de la quitina en la compensación del déficit de glucanos de pared parece evidente por los resultados obtenidos en las pruebas de sinergismo.

Los resultados obtenidos en esta tesis respecto a la participación de los genes *FKS* en diversas vías metabólicas confirman resultados previos que plantean la redundancia de los genes *FKS1* y *FKS2* durante el crecimiento normal en *C. glabrata sensu stricto* y ante la acción de las equinocandinas (Katiyar *et al.*, 2012). Sin embargo, es indudable que estos genes no serían redundantes en *C. glabrata* en cuanto a las respuestas a situaciones de estrés. Así, se puede concluir que el gen *FKS1* es más importante para la fisiología de *C. glabrata* ya que la mayoría de las drogas afectan más al mutante defectivo en *FKS1* que sería el que tiene funciones fisiológicas constitutivas, mientras que el gen *FKS2* presenta una innegable función efectora de respuesta ante situaciones de estrés celular.

❖ EVALUACIÓN DE LA VIRULENCIA DE CEPAS DE *C. GLABRATA* DEFECTIVAS EN LOS GENES *FKS* UTILIZANDO EL MODELO INVERTEBRADO *G. mellonella*.

Los modelos animales mamíferos (por ej. ratones) son habitualmente utilizados en Micología para el estudio de los mecanismos de virulencia, de la interacción hongo-huésped y de la evaluación de la eficacia de drogas. Sin embargo, la manutención de bioterios supone grandes costos y la necesidad de contar con grandes infraestructuras. A estos inconvenientes se les suman las reservas éticas que estos modelos implican. En un intento por reducir los costos, obviar las limitaciones éticas y como una forma de poder utilizar muchos individuos en modelos complejos, se ha propuesto el uso de modelos no-mamíferos. Dentro de estos, se han utilizado en Micología a *Drosophila melanogaster* y sobre todo *Galleria mellonella* (Lepidoptera) (Ben-Ami *et al.*, 2011, Favre-Godal *et al.*, 2014). El modelo invertebrado *G. mellonella* ha sido utilizado en numerosos estudios de virulencia demostrando que las conclusiones obtenidas en este modelo son equiparables a lo observado en modelos mamíferos (ratón), utilizando hongos filamentosos como *Aspergillus fumigatus*, levaduras del género *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*

y *C. parapsilosis sensu lato*) y *Cryptococcus neoformans* (Gago *et al.*, 2014, Garcia-Rodas *et al.*, 2011, Mesa-Arango *et al.*, 2013, Rueda *et al.*, 2014, Scorzoni *et al.*, 2013).

En nuestro trabajo utilizamos *G. mellonella* para la evaluación de la virulencia de cepas de *C. glabrata* defectivas en genes *FKS*. En base a los resultados obtenidos se pudo concluir que la deficiencia individual de cada uno de los genes *FKS* no afectaría la capacidad de *C. glabrata* para infectar a *G. mellonella*. Sin embargo, el método utilizado no permite establecer diferencias de virulencia sutiles. Se deberán realizar estudios de competitividad (*fitness cost*) con los mutantes y la cepa salvaje en este mismo modelo. Este tipo de estudios por competitividad demostró la reducción de la virulencia de mutantes de *C. albicans* en *FKS1* (Ben-Ami, *et al.*, 2011).

❖ CAPACIDAD FORMADORA DE BIOFILM

Los biofilms son comunidades tridimensionales de microorganismos que se desarrollan en superficies vivas o inertes, contenidas en una matriz extracelular autosintetizada y con propiedades biológicas distintivas (Costerton, 1999, Costerton, 2002). Las especies de *Candida*, especialmente *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. dubliniensis* y *C. tropicalis*, son responsables de diversas formas de infección que están asociadas con la formación de biofilm (Ramage *et al.*, 2014). En el caso de *C. albicans*, la caracterización bioquímica de la matriz de biofilm ha revelado que incluye proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos (Baillie y Douglas, 2000, Martins *et al.*, 2010, Zarnowski *et al.*, 2014). En particular, se ha demostrado que la β -1,3-D-glucan sintasa produce β -1,3-D-glucanos solubles, que son liberados e incorporados a la matriz. Se propone que la matriz así compuesta participaría en el secuestro de fármacos favoreciendo de esta la tolerancia a los antifúngicos (Martins *et al.*, 2010, Zarnowski *et al.*, 2014).

En el caso de *C. glabrata* estudios previos obtuvieron imágenes de biofilm, tanto de modelos *in vivo* como *in vitro*, donde se observa una red gruesa de células de levaduras contenidas en material extracelular (Iraqi *et al.*, 2005, Kucharikova *et al.*, 2015, Nett *et al.*, 2007, Paulitsch *et al.*, 2009). Poco se conoce sobre la composición de la matriz de biofilm de *C. glabrata sensu stricto*, excepto que incluye proteínas y carbohidratos, entre los que se incluyen β -1,3-D-glucanos (Nett *et al.*, 2007, Silva *et al.*, 2010).

Para completar los estudios de virulencia, se evaluó la capacidad formadora de biofilm de las cepas defectivas en los genes *FKS*. Esto se llevó a cabo con el objetivo de valorar la participación individual de los genes *FKS* en la producción de biofilm. La cepa que presentó mayor capacidad formadora de biofilm fue el mutante *FKS1::ΔURA3* lo que nos lleva a presumir, que a diferencia de lo observado en *C. albicans*, sería el gen *FKS2* el que contribuye en mayor medida con la producción de β-1,3-D-glucanos que conforman la matriz.

❖ DIAGNÓSTICO DE RESISTENCIA A EQUINOCANDINAS EN *C. glabrata* Y *C. albicans*

El diagnóstico rápido y la selección del tratamiento adecuado en candidiasis invasivas reduce significativamente la mortalidad (Morrell *et al.*, 2005). Numerosos estudios apuntan sus investigaciones a la búsqueda de biomarcadores o factores de riesgo de los pacientes, que permitan decidir de manera temprana de una terapia antifúngica empírica (Leon *et al.*, 2012, Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2011). Sin embargo, actualmente los métodos utilizados para evaluar la sensibilidad a los antifúngicos en *Candida* spp. presentan ciertas limitaciones (Leon *et al.*, 2012, Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2011). La metodología recomendada como gold estándar, son los métodos de microdilución propuestos por el CLSI y el EUCAST, utilizados para la determinación de la sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012, Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), 2008). Estos protocolos de referencia requieren de entre 24 y 48 h para la obtención de resultados confiables. En Argentina, como en la mayoría de los países de Latinoamérica, los test de sensibilidad *in vitro*, son enviados para realizarse en laboratorios de referencia debido a la complejidad de estas metodologías, aumentando aún más el tiempo necesario para obtener datos fiables de la sensibilidad. Además, en el caso de la evaluación de la sensibilidad a las equinocandinas existen fallas metodológicas. Se demostró que no existe una correlación entre los fallos terapéuticos *in vivo* y valores de CIM elevados (Kartsonis *et al.*, 2005). Ante este panorama y con el objetivo de disminuir los tiempos entre el diagnóstico y la aplicación de un tratamiento apropiado, se diseñó una herramienta molecular para la

detección de resistencia a estas drogas en *C. glabrata sensu stricto* y *C. albicans*. El diseño se basó en el hecho de que existe una relación estricta entre las mutaciones en las regiones *hot spots* de los *FKS1* y *FKS2* de *C. glabrata* y del gen *FKS1* de *C. albicans*. Para esto, se diseñaron dos sets de 5 PCR multiplex, que permiten la detección de las mutaciones más comunes. Las técnicas fueron evaluadas a través de dos estudios doble ciego en los que se utilizaron 50 cepas de cada especie (Tabla 1). Estos estudios confirmaron que los sets de PCR fueron capaces de detectar los mutantes de *C. glabrata* que presentan las siguientes sustituciones de aminoácidos: Fks1p-F625S, Fks1p-S629P, Fks1p-D632G, Fks1p-D632E, Fks1p-D632Y, Fks2p-S659S, Fks2p-S659V, Fks2p-S659L, Fks2p-S663P, and Fks2p-S663F. La principal limitación de la metodología propuesta para *C. glabrata* fue la incapacidad de la misma para detectar la delección de tres nucleótidos del codón que codifica la F659 de Fks2p. Este resultado falso negativo podría ser considerado como un discrepancia muy mayor (del inglés *very major error*) comparado con los test de sensibilidad *in vitro*, ya que estaríamos clasificando la cepa como sensible, cuando en realidad es resistente. Sin embargo, este tipo de mutación es muy poco común ya que solo se han publicado dos cepas en el mundo con una delección de este tipo (Garcia-Effron *et al.*, 2009a).

En el caso de *C. albicans* se describen 4 mutaciones en la región *hot spot* 1 (F641, S645, D648 y P649) y 1 en la región *hot spot* 2 (R1361) (Arendrup y Perlin, 2014, Perlin, 2014a). Debido a que *C. albicans* es un organismo diploide, las mutaciones descritas pueden darse de manera homo o heterocigota (Balashov *et al.*, 2006, Garcia-Effron *et al.*, 2009b). Estas mutaciones son genéticamente dominantes y confieren resistencias a todas las equinocandinas (Balashov *et al.*, 2006, Garcia-Effron *et al.*, 2009b, Perlin, 2007, Perlin, 2014b). Sin embargo, las mutaciones heterocigotas confieren valores de CIM más bajas y sus aislamientos son poco comunes. El estudio doble ciego, demostró que la herramienta molecular generada para detectar resistencia clínica a las equinocandinas en *C. albicans* es capaz de detectar sustituciones homocigotas en todos los aminoácidos descritos, incluyendo F641S, F641L, S645Y, S645F, D648Y, P649H y R1361H, lo cual representa el 98% de las mutaciones conocidas como responsables de las resistencias a las equinocandinas en *C. albicans*. Sin embargo, esta técnica presentó como limitación la imposibilidad de detectar mutante heterocigotos. Al igual que en *C. glabrata*, esto lleva a clasificar como sensible cepas que en realidad son resistentes (*very major error*).

Ambos set de PCRs multiplex, presentan como ventaja la posibilidad de detectar las mutaciones más comunes en *C. glabrata* y *C. albicans*, que generan resistencia a las equinocandinas y están estrictamente relacionadas con la falla terapéutica, en tan solo 4 h. La detección molecular está basada en una PCR clásica y como tan solo requiere de un termociclador común, lo que lo vuelve más accesible al ambiente hospitalario.

En cuanto a las desventajas además de las limitaciones descritas anteriormente para cada especie en particular, la técnica propuesta no permite detectar mecanismos nuevos. Este inconveniente es un denominador común en cualquier método molecular diseñado para la detección de mecanismos de resistencia (Balashov *et al.*, 2006, Perlin *et al.*, 2008). No obstante, la versatilidad de esta metodología permite modificarla mediante la adición o la eliminación de reacciones de PCR adaptándolo para detectar mecanismos emergentes de resistencia.

❖ **HERRAMIENTA MOLECULAR PARA LA DETECCIÓN DE ESPECIES DEL COMPLEJO *C. glabrata***

Sin lugar a dudas, *C. glabrata* es el patógeno de mayor prevalencia dentro del clado *Nakaseomyces*. Sin embargo, *C. nivariensis* y *C. bracarensis*, dos especies recientemente descritas como pertenecientes al mismo clado, imitan los rasgos patogénicos de *C. glabrata*. Estudios recientes demuestran que los dos patógenos emergentes, están más estrechamente relacionados con *N. delphensis*, y que descienden de un ancestro común, que también ha dado lugar a *C. glabrata*. La mayoría de las particularidades genómicas observadas en *C. glabrata*, también son compartidos por los dos nuevos patógenos incorporados al clado (Gabaldon *et al.*, 2013). Mientras que la verdadera prevalencia de estas especies queda por determinar, es evidente que existen diferencias en la virulencia y la sensibilidad a los antifúngicos entre ellas (Borman *et al.*, 2015, Kaur *et al.*, 2007, Swoboda-Kopec *et al.*, 2014). Al no existir métodos fenotípicos capaces de diferenciar inequívocamente estas especies (Bishop *et al.*, 2008) se publicaron diversas metodologías moleculares para identificarlos (Cornet *et al.*, 2011, Enache-Angoulvant *et al.*, 2011, Ghosh *et al.*, 2015, Gorton *et al.*, 2013, Mirhendi *et al.*, 2011, Pinto *et al.*, 2011, Telleria *et al.*, 2012). Cada uno de estos métodos tiene sus ventajas y desventajas, y ninguno es ideal en términos de costos y/o la velocidad del equipo. En esta tesis se diseñó una PCR múltiplex capaz de identificar las especies del complejo *C. glabrata*. Presentó un 100 %

de concordancia con el método de secuenciación considerado como gold estándar. Además, es rápida (4 h), de bajo costo, robusta y altamente reproducible. Esta técnica tiene las mismas desventajas que cualquier procedimiento clásico de PCR, que es la necesidad de realizar una electroforesis. Sin embargo, utiliza equipos de PCR estándar por lo que es accesible para un gran número de laboratorios. La principal diferencia entre este nuevo método propuesto y los otros publicados es que hemos demostrado su fiabilidad a través de un estudio doble ciego y su utilidad se confirmó usando una gran colección de cepas de *C. glabrata sensu lato*. La utilización en el laboratorio clínico de estas técnicas moleculares sería una ventaja a la hora de llegar a un diagnóstico certero y al momento de tomar decisiones sobre la aplicación de una terapéutica adecuada.

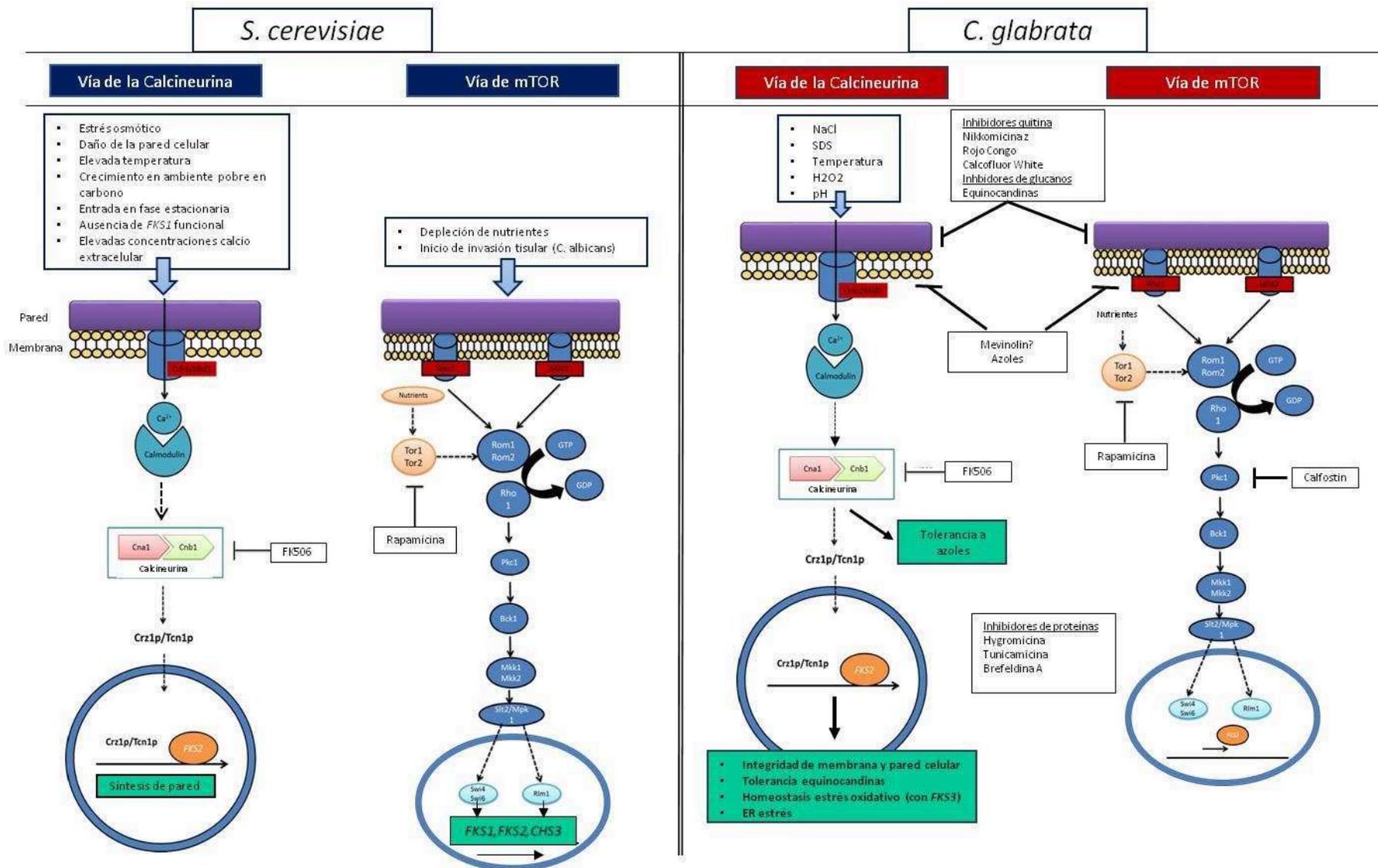


Figura 42.- Análisis comparativo de las vías de respuesta a estrés celular entre *S. cerevisiae* y *C. glabrata sensu stricto*.

CONCLUSIONES

6.- CONCLUSIONES

- Se obtuvieron las cepas de *C. glabrata sensu stricto* defectivas en los genes *FKS*. El método de PRODIGE y de PCR fusión presentaron la misma eficiencia en la generación de vectores que el método tradicional (enzimas de restricción), pero con una mayor rapidez y flexibilidad. La metodología utilizada para la obtención de cada vector, no afectó la eficiencia de transformación, que fue semejante en cada caso.
- Se demostró que la función de los genes *FKS* es redundante en el crecimiento normal en *C. glabrata sensu stricto* y ante la acción de las equinocandinas. Sin embargo en base a los resultados obtenidos, es indudable que estos genes no serían redundantes en *C. glabrata* en cuanto a las respuestas a situaciones de estrés. Así, se puede concluir que el gen *FKS1* es más importante para la fisiología de *C. glabrata* ya que la mayoría de las drogas afectan más al mutante defectivo en *FKS1* que sería el que tiene funciones fisiológicas constitutivas, mientras que el gen *FKS2* presenta una innegable función efectora de respuesta ante situaciones de estrés celular.
- La vía de compensación de quitina parece probablemente regulada por la vía de la calcineurina. Sin embargo, no se encontraron diferencias marcadas en las expresiones de la Chitin sintase 3 (*CHS3*) en los mutantes defectivos en *FKS*. Esto pudo deberse a que quizás en *C. glabrata* el gen *CHS3* no sea el principal participante en la regulación por déficit de glucanos ya que existen 8 genes de quitina sintasa, o bien en los tiempos estudiados no hay modificaciones importantes en la expresión, ya que este es un proceso dinámico que puede variar en minutos. En contraste, en los resultados obtenidos en las pruebas de sinergismo la participación de la quitina en la compensación del déficit de glucanos de pared resulta evidente.
- La deficiencia individual de cada uno de los genes *FKS* no afectaría la capacidad de *C. glabrata* para infectar a *G. mellonella*. Sin embargo, el método utilizado no permite establecer diferencias de virulencia sutiles. Se deberán realizar estudios

de competitividad (*fitness cost*) con los mutantes y la cepa salvaje en este mismo modelo.

- En cuanto a la evaluación de la participación individual de los genes *FKS* de *C. glabrata sensu stricto* en la producción de biofilm, se observó que el gen *FKS2* contribuye en mayor medida con la producción de β -1,3-D-glucanos, que conforman la matriz de biofilm.
- Se desarrolló una herramienta de diagnóstico molecular que permite detectar en solo 4 h, los mecanismos más comunes de resistencia a equinocandinas que se relacionan con falla terapéutica, en *C. glabrata* y *C. albicans*. Además como la detección molecular está basada en una PCR clásica solo requiere de un termociclador común, lo que lo vuelve más accesible para el ambiente hospitalario. En cuanto a las desventajas, la técnica propuesta no permite detectar mecanismos de resistencia nuevos. Este inconveniente es un denominador común en cualquier método molecular diseñado para la detección de mecanismos de resistencia. No obstante, la versatilidad de esta metodología permite modificarla mediante la adición o la eliminación de reacciones de PCR adaptándolo para detectar mecanismos emergentes de resistencia.
- La PCR múltiple diseñada es capaz de identificar las especies del complejo *C. glabrata*, con un 100 % de concordancia con el método de secuenciación considerado como gold estándar. Además, es rápida (4 h), de bajo costo, robusta y altamente reproducible.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

Alcoba-Florez, J., Mendez-Alvarez, S., Cano, J., Guarro, J., Perez-Roth, E., & del Pilar, A. M. (2005). Phenotypic and molecular characterization of *Candida nivariensis* sp. nov., a possible new opportunistic fungus. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4107-4111, doi:43/8/4107 [pii];10.1128/JCM.43.8.4107-4111.2005 [doi].

Alexander, B. D., Johnson, M. D., Pfeiffer, C. D., Jimenez-Ortigosa, C., Catania, J., Booker, R., Castanheira, M., Messer, S. A., Perlin, D. S., & Pfaller, M. A. (2013). Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. *Clin. Infect. Dis.* 56, 1724-1732, doi:cit136 [pii];10.1093/cid/cit136 [doi].

Anderson HW (1917). Yeast-like fungi of the human intestinal tract. *Journal of infectious diseases.*

Angoulvant, A., Guitard, J., & Hennequin, C. (2016). Old and new pathogenic *Nakaseomyces* species: epidemiology, biology, identification, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Yeast Res.* 16, fov114, doi:fov114 [pii];10.1093/femsyr/fov114 [doi].

Arenas, R. (2011). *Micología Médica Ilustrada*, 3rd ed. Mexico DF: McGraw-Hill.

Arendrup, M. C. & Perlin, D. S. (2014). Echinocandin resistance: an emerging clinical problem? *Curr. Opin. Infect. Dis.* 27, 484-492, doi:10.1097/QCO.000000000000111 [doi].

Baillie, G. S. & Douglas, L. J. (2000). Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J. Antimicrob. Chemother.* 46, 397-403.

Balashov, S. V., Park, S., & Perlin, D. S. (2006). Assessing resistance to the echinocandin antifungal drug caspofungin in *Candida albicans* by profiling mutations in FKS1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 2058-2063, doi:50/6/2058 [pii];10.1128/AAC.01653-05 [doi].

Bard, M., Lees, N. D., Turi, T., Craft, D., Cofrin, L., Barbuch, R., Koegel, C., & Loper, J. C. (1993). Sterol synthesis and viability of *erg11* (cytochrome P450 lanosterol demethylase) mutations in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Lipids* 28, 963-967.

Beauvais, A. & Latge, J. P. (2001). Membrane and cell wall targets in *Aspergillus fumigatus*. *Drug Resist. Updat.* 4, 38-49.

Ben-Ami, R., Garcia-Effron, G., Lewis, R. E., Gamarra, S., Leventakos, K., Perlin, D. S., & Kontoyiannis, D. P. (2011). Fitness and virulence costs of *Candida albicans* FKS1 hot spot mutations associated with echinocandin resistance. *J. Infect. Dis.* 204, 626-635, doi:jir351 [pii];10.1093/infdis/jir351 [doi].

Bernard, M. & Latge, J. P. (2001). *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis. *Med. Mycol.* 39 Suppl 1, 9-17.

- Bishop, J. A., Chase, N., Lee, R., Kurtzman, C. P., & Merz, W. G. (2008). Production of white colonies on CHROMagar Candida medium by members of the *Candida glabrata* clade and other species with overlapping phenotypic traits. *J. Clin. Microbiol.* *46*, 3498-3500, doi:JCM.00982-08 [pii];10.1128/JCM.00982-08 [doi].
- Blum, G., Perkhofner, S., Haas, H., Schrettl, M., Wurzner, R., Dierich, M. P., & Lass-Flörl, C. (2008). Potential basis for amphotericin B resistance in *Aspergillus terreus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *52*, 1553-1555.
- Bonifaz, J. A. (2012). *Micología Médica Básica*, 4th ed. Mexico DF: McGraw-Hill.
- Borman, A. M., Petch, R., Linton, C. J., Palmer, M. D., Bridge, P. D., & Johnson, E. M. (2008). *Candida nivariensis*, an emerging pathogenic fungus with multidrug resistance to antifungal agents. *J. Clin. Microbiol.* *46*, 933-938, doi:JCM.02116-07 [pii];10.1128/JCM.02116-07 [doi].
- Bowman, J. C., Hicks, P. S., Kurtz, M. B., Rosen, H., Schmatz, D. M., Liberator, P. A., & Douglas, C. M. (2002). The antifungal echinocandin caspofungin acetate kills growing cells of *Aspergillus fumigatus* in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* *46*, 3001-3012.
- Bowman, S. M. & Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays* *28*, 799-808, doi:10.1002/bies.20441 [doi].
- Brockert, P. J., Lachke, S. A., Srikantha, T., Pujol, C., Galask, R., & Soll, D. R. (2003). Phenotypic switching and mating type switching of *Candida glabrata* at sites of colonization. *Infect. Immun.* *71*, 7109-7118.
- Butler, G., Kenny, C., Fagan, A., Kurischko, C., Gaillardin, C., & Wolfe, K. H. (2004). Evolution of the MAT locus and its Ho endonuclease in yeast species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 1632-1637, doi:10.1073/pnas.0304170101 [doi];0304170101 [pii].
- Byrne, K. P. & Wolfe, K. H. (2007). Consistent patterns of rate asymmetry and gene loss indicate widespread neofunctionalization of yeast genes after whole-genome duplication. *Genetics* *175*, 1341-1350, doi:genetics.106.066951 [pii];10.1534/genetics.106.066951 [doi].
- Cabello, M. A., Platas, G., Collado, J., Diez, M. T., Martín, I., Vicente, F., Meinz, M., Onishi, J. C., Douglas, C., Thompson, J., Kurtz, M. B., Schwartz, R. E., Bills, G. F., Giacobbe, R. A., Abruzzo, G. K., Flattery, A. M., Kong, L., & Pelaez, F. (2001). Arundifungin, a novel antifungal compound produced by fungi: biological activity and taxonomy of the producing organisms. *Int. Microbiol.* *4*, 93-102.
- Capecchi, M. R. (1989). Altering the genome by homologous recombination. *Science* *244*, 1288-1292.
- Chen, Y. L., Konieczka, J. H., Springer, D. J., Bowen, S. E., Zhang, J., Silao, F. G., Bungay, A. A., Bigol, U. G., Nicolas, M. G., Abraham, S. N., Thompson, D. A., Regev, A., & Heitman, J. (2012). Convergent Evolution of Calcineurin Pathway Roles in Thermotolerance and Virulence in *Candida glabrata*. *G3. (Bethesda.)* *2*, 675-691, doi:10.1534/g3.112.002279 [doi];GGG_002279 [pii].

- Chowdhary, A., Randhawa, H. S., Khan, Z. U., Ahmad, S., Juneja, S., Sharma, B., Roy, P., Sundar, G., & Joseph, L. (2010). First isolations in India of *Candida nivariensis*, a globally emerging opportunistic pathogen. *Med. Mycol.* 48, 416-420, doi:913268183 [pii];10.1080/13693780903114231 [doi].
- Chowdhary, A., Voss, A., & Meis, J. F. (2016). Multidrug-resistant *Candida auris*: 'new kid on the block' in hospital-associated infections? *J. Hosp. Infect.* 94, 209-212, doi:S0195-6701(16)30318-8 [pii];10.1016/j.jhin.2016.08.004 [doi].
- Cid, V. J., Duran, A., del Rey, F., Snyder, M. P., Nombela, C., & Sanchez, M. (1995). Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 59, 345-386.
- Cleary, J. D., Garcia-Effron, G., Chapman, S. W., & Perlin, D. S. (2008). Reduced *Candida glabrata* susceptibility secondary to an FKS1 mutation developed during candidemia treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 2263-2265.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2008). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Third Edition. Document M27-A3.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2012). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Third Edition. Document M27-S4.
- Cordoba, S., Vivot, W., Bosco-Borgeat, M. E., Taverna, C., Szusz, W., Murisengo, O., Isla, G., & Davel, G. (2011). Species distribution and susceptibility profile of yeasts isolated from blood cultures: results of a multicenter active laboratory-based surveillance study in Argentina. *Rev. Argent Microbiol.* 43, 176-185, doi:S0325-75412011000300003 [pii];10.1590/S0325-75412011000300003 [doi].
- Cormack, B. P. & Falkow, S. (1999). Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics* 151, 979-987.
- Cormack, B. P., Ghori, N., & Falkow, S. (1999). An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. *Science* 285, 578-582, doi:7617 [pii].
- Cornet, M., Sendid, B., Fradin, C., Gaillardin, C., Poulain, D., & Nguyen, H. V. (2011). Molecular identification of closely related *Candida* species using two ribosomal intergenic spacer fingerprinting methods. *J. Mol. Diagn.* 13, 12-22, doi:S1525-1578(10)00028-0 [pii];10.1016/j.jmoldx.2010.11.014 [doi].
- Correia, A., Sampaio, P., James, S., & Pais, C. (2006). *Candida bracarensis* sp. nov., a novel anamorphic yeast species phenotypically similar to *Candida glabrata*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 313-317, doi:56/1/313 [pii];10.1099/ijs.0.64076-0 [doi].
- Costerton, J. W. (1999). Introduction to biofilm. *Int. J. Antimicrob. Agents* 11, 217-221.
- Costerton, J. W. (2002). Anaerobic biofilm infections in cystic fibrosis. *Mol. Cell* 10, 699-700, doi:S1097276502006986 [pii].

- Cota, J. M., Grabinski, J. L., Talbert, R. L., Burgess, D. S., Rogers, P. D., Edlind, T. D., & Wiederhold, N. P. (2008). Increases in SLT2 expression and chitin content are associated with incomplete killing of *Candida glabrata* by caspofungin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 1144-1146, doi:AAC.01542-07 [pii];10.1128/AAC.01542-07 [doi].
- Cruz, M. C., Goldstein, A. L., Blankenship, J. R., Del, P. M., Davis, D., Cardenas, M. E., Perfect, J. R., McCusker, J. H., & Heitman, J. (2002). Calcineurin is essential for survival during membrane stress in *Candida albicans*. *EMBO J.* 21, 546-559.
- Cullen, D., Leong, S. A., Wilson, L. J., & Henner, D. J. (1987). Transformation of *Aspergillus nidulans* with the hygromycin-resistance gene, hph. *Gene* 57, 21-26, doi:0378-1119(87)90172-7 [pii].
- d'Enfert, C. & Janbon, G. (2016). Biofilm formation in *Candida glabrata*: What have we learnt from functional genomics approaches? *FEMS Yeast Res.* 16, fov111, doi:fov111 [pii];10.1093/femsyr/fov111 [doi].
- Datta, M. S., Korolev, K. S., Cvijovic, I., Dudley, C., & Gore, J. (2013). Range expansion promotes cooperation in an experimental microbial metapopulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 110, 7354-7359, doi:1217517110 [pii];10.1073/pnas.1217517110 [doi].
- David A Fitzpatrick, Mary E Logue, Jason E Stajich, & Geraldine Butler (2006). A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *BMC Evolutionary Biology*.
- De Las Penas A., Pan, S. J., Castano, I., Alder, J., Cregg, R., & Cormack, B. P. (2003). Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to. *Genes Dev.* 17, 2245-2258, doi:10.1101/gad.1121003 [doi];1121003 [pii].
- Denning, D. W. (2003). Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* 362, 1142-1151.
- Denning, D. W., Ribaud, P., Milpied, N., Caillot, D., Herbrecht, R., Thiel, E., Haas, A., Ruhnke, M., & Lode, H. (2002). Efficacy and safety of voriconazole in the treatment of acute invasive aspergillosis. *Clin. Infect. Dis.* 34, 563-571.
- Diekema, D., Arbefeville, S., Boyken, L., Kroeger, J., & Pfaller, M. (2012). The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 73, 45-48, doi:S0732-8893(12)00066-1 [pii];10.1016/j.diagmicrobio.2012.02.001 [doi].
- Diekema, D. J., Messer, S. A., Hollis, R. J., Jones, R. N., & Pfaller, M. A. (2003). Activities of caspofungin, itraconazole, posaconazole, ravuconazole, voriconazole, and amphotericin B against 448 recent clinical isolates of filamentous fungi. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3623-3626.
- Domergue, R., Castano, I., De Las, P. A., Zupancic, M., Lockatell, V., Hebel, J. R., Johnson, D., & Cormack, B. P. (2005). Nicotinic acid limitation regulates silencing of *Candida* adhesins during UTI. *Science* 308, 866-870, doi:1108640 [pii];10.1126/science.1108640 [doi].

Douglas, C. M. (2001). Fungal beta(1,3)-D-glucan synthesis. *Med. Mycol.* 39 Suppl 1, 55-66.

Douglas, C. M., D'Ippolito, J. A., Shei, G. J., Meinz, M., Onishi, J., Marrinan, J. A., Li, W., Abruzzo, G. K., Flattery, A., Bartizal, K., Mitchell, A., & Kurtz, M. B. (1997a). Identification of the FKS1 gene of *Candida albicans* as the essential target of 1,3-beta-D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 2471-2479.

Douglas, C. M., D'Ippolito, J. A., Shei, G. J., Meinz, M., Onishi, J., Marrinan, J. A., Li, W., Abruzzo, G. K., Flattery, A., Bartizal, K., Mitchell, A., & Kurtz, M. B. (1997b). Identification of the FKS1 gene of *Candida albicans* as the essential target of 1,3-beta-D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 2471-2479.

Douglas, C. M., Foor, F., Marrinan, J. A., Morin, N., Nielsen, J. B., Dahl, A. M., Mazur, P., Baginsky, W., Li, W., el Sherbeini, M., & . (1994). The *Saccharomyces cerevisiae* FKS1 (ETG1) gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of 1,3-beta-D-glucan synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 12907-12911.

Dudiuk, C., Gamarra, S., Leonardeli, F., Jimenez-Ortigosa, C., Vitale, R. G., Afeltra, J., Perlin, D. S., & Garcia-Effron, G. (2014). Set of classical PCRs for detection of mutations in *Candida glabrata* FKS genes linked with echinocandin resistance. *J. Clin. Microbiol.* 52, 2609-2614, doi:JCM.01038-14 [pii];10.1128/JCM.01038-14 [doi].

Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., De, M. J., Marck, C., Neuveglise, C., Talla, E., Goffard, N., Frangeul, L., Aigle, M., Anthouard, V., Babour, A., Barbe, V., Barnay, S., Blanchin, S., Beckerich, J. M., Beyne, E., Bleykasten, C., Boisrame, A., Boyer, J., Cattolico, L., Confanioleri, F., De, D. A., Despons, L., Fabre, E., Fairhead, C., Ferry-Dumazet, H., Groppi, A., Hantraye, F., Hennequin, C., Jauniaux, N., Joyet, P., Kachouri, R., Kerrest, A., Koszul, R., Lemaire, M., Lesur, I., Ma, L., Muller, H., Nicaud, J. M., Nikolski, M., Oztas, S., Ozier-Kalogeropoulos, O., Pellenz, S., Potier, S., Richard, G. F., Straub, M. L., Suleau, A., Swennen, D., Tekaia, F., Wesolowski-Louvel, M., Westhof, E., Wirth, B., Zeniou-Meyer, M., Zivanovic, I., Bolotin-Fukuhara, M., Thierry, A., Bouchier, C., Caudron, B., Scarpelli, C., Gaillardin, C., Weissenbach, J., Wincker, P., & Souciet, J. L. (2004). Genome evolution in yeasts. *Nature* 430, 35-44, doi:10.1038/nature02579 [doi];nature02579 [pii].

Edlind, T., Smith, L., Henry, K., Katiyar, S., & Nickels, J. (2002). Antifungal activity in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated by calcium signalling. *Mol. Microbiol.* 46, 257-268, doi:3165 [pii].

Edlind, T. D., Henry, K. W., Vermitsky, J. P., Edlind, M. P., Raj, S., & Katiyar, S. K. (2005). Promoter-dependent disruption of genes: simple, rapid, and specific PCR-based method with application to three different yeast. *Curr. Genet.* 48, 117-125, doi:10.1007/s00294-005-0008-3 [doi].

Edskes, H. K. & Wickner, R. B. (2013). The [URE3] prion in *Candida*. *Eukaryot. Cell* 12, 551-558, doi:EC.00015-13 [pii];10.1128/EC.00015-13 [doi].

Enache-Angoulvant, A., Guitard, J., Grenouillet, F., Martin, T., Durrens, P., Fairhead, C., & Hennequin, C. (2011). Rapid discrimination between *Candida glabrata*, *Candida*

- nivariensis, and *Candida bracarensis* by use of a singleplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* *49*, 3375-3379, doi:JCM.00688-11 [pii];10.1128/JCM.00688-11 [doi].
- Favre-Godal, Q., Dorsaz, S., Queiroz, E. F., Conan, C., Marcourt, L., Wardojo, B. P., Voinesco, F., Buchwalder, A., Gindro, K., Sanglard, D., & Wolfender, J. L. (2014). Comprehensive approach for the detection of antifungal compounds using a susceptible strain of *Candida albicans* and confirmation of in vivo activity with the *Galleria mellonella* model. *Phytochemistry* *105*, 68-78, doi:S0031-9422(14)00255-6 [pii];10.1016/j.phytochem.2014.06.004 [doi].
- Ferroni, A., Suarez, S., Beretti, J. L., Dauphin, B., Bille, E., Meyer, J., Bougnoux, M. E., Alanio, A., Berche, P., & Nassif, X. (2010). Real-time identification of bacteria and *Candida* species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* *48*, 1542-1548, doi:JCM.02485-09 [pii];10.1128/JCM.02485-09 [doi].
- Fidel, P. L., Jr., Vazquez, J. A., & Sobel, J. D. (1999). *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin. Microbiol. Rev.* *12*, 80-96.
- Fitzpatrick, D. A., Logue, M. E., Stajich, J. E., & Butler, G. (2006). A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *BMC. Evol. Biol.* *6*, 99, doi:1471-2148-6-99 [pii];10.1186/1471-2148-6-99 [doi].
- Fraser, M., Borman, A. M., & Johnson, E. M. (2012). Evaluation of the commercial rapid trehalose test (GLABRATA RTT) for the point of isolation identification of *Candida glabrata* isolates in primary cultures. *Mycopathologia* *173*, 259-264, doi:10.1007/s11046-011-9508-5 [doi].
- Fujita, S., Senda, Y., Okusi, T., Ota, Y., Takada, H., Yamada, K., & Kawano, M. (2007). Catheter-related fungemia due to fluconazole-resistant *Candida nivariensis*. *J. Clin. Microbiol.* *45*, 3459-3461, doi:JCM.00727-07 [pii];10.1128/JCM.00727-07 [doi].
- Gabaldon, T. & Carrete, L. (2016). The birth of a deadly yeast: tracing the evolutionary emergence of virulence traits in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res.* *16*, fov110, doi:fov110 [pii];10.1093/femsyr/fov110 [doi].
- Gabaldon, T., Martin, T., Marcet-Houben, M., Durrens, P., Bolotin-Fukuhara, M., Lespinet, O., Arnaise, S., Boissard, S., Aguilera, G., Atanasova, R., Bouchier, C., Couloux, A., Creno, S., Almeida, C. J., Devillers, H., Enache-Angoulvant, A., Guitard, J., Jaouen, L., Ma, L., Marck, C., Neuveglise, C., Pelletier, E., Pinard, A., Poulain, J., Recoquillay, J., Westhof, E., Wincker, P., Dujon, B., Hennequin, C., & Fairhead, C. (2013). Comparative genomics of emerging pathogens in the *Candida glabrata* clade. *BMC. Genomics* *14*, 623, doi:1471-2164-14-623 [pii];10.1186/1471-2164-14-623 [doi].
- Gago, S., Garcia-Rodas, R., Cuesta, I., Mellado, E., & Alastruey-Izquierdo, A. (2014). *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* virulence in the non-conventional host *Galleria mellonella*. *Virulence.* *5*, 278-285, doi:26973 [pii];10.4161/viru.26973 [doi].
- Garcia-Effron, G., Katiyar, S. K., Park, S., Edlind, T. D., & Perlin, D. S. (2008a). A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in Fks1p in *Candida*

parapsilosis, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 2305-2312.

Garcia-Effron, G., Kontoyiannis, D. P., Lewis, R. E., & Perlin, D. S. (2008b). Caspofungin-resistant *Candida tropicalis* strains causing breakthrough fungemia in patients at high risk for hematologic malignancies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 4181-4183.

Garcia-Effron, G., Lee, S., Park, S., Cleary, J. D., & Perlin, D. S. (2009a). Effect of *Candida glabrata* FKS1 and FKS2 mutations on echinocandin sensitivity and kinetics of 1,3-beta-D-glucan synthase: implication for the existing susceptibility breakpoint. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 3690-3699.

Garcia-Effron, G., Park, S., & Perlin, D. S. (2009b). Correlating echinocandin MIC and kinetic inhibition of *fks1* mutant glucan synthases for *Candida albicans*: implications for interpretive breakpoints. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 112-122.

Garcia-Rodas, R., Casadevall, A., Rodriguez-Tudela, J. L., Cuenca-Estrella, M., & Zaragoza, O. (2011). *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement and cellular gigantism during *Galleria mellonella* infection. *PLoS. One.* 6, e24485, doi:10.1371/journal.pone.0024485 [doi];PONE-D-11-11169 [pii].

Gaughran, J. P., Lai, M. H., Kirsch, D. R., & Silverman, S. J. (1994). Nikkomycin Z is a specific inhibitor of *Saccharomyces cerevisiae* chitin synthase isozyme Chs3 in vitro and in vivo. *J. Bacteriol.* 176, 5857-5860.

Ghannoum, M. A. & Rice, L. B. (1999). Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* 12, 501-517.

Ghosh, A. K., Paul, S., Sood, P., Rudramurthy, S. M., Rajbanshi, A., Jillwin, T. J., & Chakrabarti, A. (2015). Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for the rapid identification of yeasts causing bloodstream infections. *Clin. Microbiol. Infect.* 21, 372-378, doi:S1198-743X(14)00095-0 [pii];10.1016/j.cmi.2014.11.009 [doi].

Gil-Alonso, S., Jauregizar, N., Canton, E., Eraso, E., & Quindos, G. (2015). In vitro fungicidal activities of anidulafungin, caspofungin, and micafungin against *Candida glabrata*, *Candida bracarensis*, and *Candida nivariensis* evaluated by time-kill studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 3615-3618, doi:AAC.04474-14 [pii];10.1128/AAC.04474-14 [doi].

Gorton, R. L., Jones, G. L., Kibbler, C. C., & Collier, S. (2013). *Candida nivariensis* isolated from a renal transplant patient with persistent candiduria-Molecular identification using ITS PCR and MALDI-TOF. *Med. Mycol. Case. Rep.* 2, 156-158, doi:10.1016/j.mmcr.2013.10.001 [doi];S2211-7539(13)00048-1 [pii].

Guldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J., & Hegemann, J. H. (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* 24, 2519-2524, doi:6w0051 [pii].

- Gunde-Cimerman, N., Plemenitas, A., & Cimerman, A. (1993). Pleurotus fungi produce mevinolin, an inhibitor of HMG CoA reductase. *FEMS Microbiol. Lett.* 113, 333-337.
- Ha, Y. S., Covert, S. F., & Momany, M. (2006). FsFKS1, the 1,3-beta-glucan synthase from the caspofungin-resistant fungus *Fusarium solani*. *Eukaryot. Cell* 5, 1036-1042, doi:5/7/1036 [pii];10.1128/EC.00030-06 [doi].
- Hay, N. & Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 18, 1926-1945, doi:10.1101/gad.1212704 [doi];18/16/1926 [pii].
- Heinisch, J. J., Lorberg, A., Schmitz, H. P., & Jacoby, J. J. (1999). The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol* 32, 671-680.
- Hochstenbach, F., Klis, F. M., Van Den, E. H., van Donselaar, E., Peters, P. J., & Klausner, R. D. (1998). Identification of a putative alpha-glucan synthase essential for cell wall construction and morphogenesis in fission yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 9161-9166.
- Horton, R. M., Hunt, H. D., Ho, S. N., Pullen, J. K., & Pease, L. R. (1989). Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* 77, 61-68, doi:0378-1119(89)90359-4 [pii].
- Iraqi, I., Garcia-Sanchez, S., Aubert, S., Dromer, F., Ghigo, J. M., d'Enfert, C., & Janbon, G. (2005). The Yak1p kinase controls expression of adhesins and biofilm formation in *Candida glabrata* in a Sir4p-dependent pathway. *Mol. Microbiol.* 55, 1259-1271, doi:MMI4475 [pii];10.1111/j.1365-2958.2004.04475.x [doi].
- Ishihara, S., Hirata, A., Nogami, S., Beauvais, A., Latge, J. P., & Ohya, Y. (2007). Homologous subunits of 1,3-beta-glucan synthase are important for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 6, 143-156, doi:EC.00200-06 [pii];10.1128/EC.00200-06 [doi].
- Jayatilake, J. A., Samaranayake, Y. H., Cheung, L. K., & Samaranayake, L. P. (2006). Quantitative evaluation of tissue invasion by wild type, hyphal and SAP mutants of *Candida albicans*, and non-albicans *Candida* species in reconstituted human oral epithelium. *J. Oral Pathol. Med.* 35, 484-491, doi:JOP435 [pii];10.1111/j.1600-0714.2006.00435.x [doi].
- Jin, Y., Samaranayake, L. P., Samaranayake, Y., & Yip, H. K. (2004). Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. *Arch. Oral Biol.* 49, 789-798, doi:10.1016/j.archoralbio.2004.04.011 [doi];S0003996904001001 [pii].
- Johnson, M. D., MacDougall, C., Ostrosky-Zeichner, L., Perfect, J. R., & Rex, J. H. (2004). Combination antifungal therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 693-715.
- Johnson, M. E. & Edlind, T. D. (2012). Topological and mutational analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Fks1. *Eukaryot. Cell* 11, 952-960, doi:EC.00082-12 [pii];10.1128/EC.00082-12 [doi].
- Johnson, M. E., Katiyar, S. K., & Edlind, T. D. (2011). New Fks hot spot for acquired echinocandin resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and its contribution to intrinsic

- resistance of *Scedosporium* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 3774-3781, doi:AAC.01811-10 [pii];10.1128/AAC.01811-10 [doi].
- Kartsonis, N., Killar, J., Mixson, L., Hoe, C. M., Sable, C., Bartizal, K., & Motyl, M. (2005). Caspofungin susceptibility testing of isolates from patients with esophageal candidiasis or invasive candidiasis: relationship of MIC to treatment outcome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 3616-3623.
- Katiyar, S. K., Alastruey-Izquierdo, A., Healey, K. R., Johnson, M. E., Perlin, D. S., & Edlind, T. D. (2012). Fks1 and Fks2 are functionally redundant but differentially regulated in *Candida glabrata*: implications for echinocandin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 6304-6309, doi:AAC.00813-12 [pii];10.1128/AAC.00813-12 [doi].
- Kaur, R., Ma, B., & Cormack, B. P. (2007). A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 7628-7633, doi:0611195104 [pii];10.1073/pnas.0611195104 [doi].
- Klingspor, L., Tortorano, A. M., Peman, J., Willinger, B., Hamal, P., Sendid, B., Velegraki, A., Kibbler, C., Meis, J. F., Sabino, R., Ruhnke, M., Arikan-Akdagli, S., Salonen, J., & Doczi, I. (2015). Invasive *Candida* infections in surgical patients in intensive care units: a prospective, multicentre survey initiated by the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) (2006-2008). *Clin. Microbiol. Infect.* 21, 87, doi:S1198-743X(14)00018-4 [pii];10.1016/j.cmi.2014.08.011 [doi].
- Kondoh, O., Tachibana, Y., Ohya, Y., Arisawa, M., & Watanabe, T. (1997). Cloning of the RHO1 gene from *Candida albicans* and its regulation of beta-1,3-glucan synthesis. *J. Bacteriol.* 179, 7734-7741.
- Kucharikova, S., Vande, V. G., Himmelreich, U., & Van, D. P. (2015). *Candida albicans* biofilm development on medically-relevant foreign bodies in a mouse subcutaneous model followed by bioluminescence imaging. *J. Vis. Exp.* 52239, doi:10.3791/52239 [doi].
- Kurtz, M. B. & Douglas, C. M. (1997). Lipopeptide inhibitors of fungal glucan synthase. *J. Med. Vet. Mycol.* 35, 79-86.
- Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (2011). *The Yeasts A taxonomic Study. Elsevier Science.* Fifth Edition. Elsevier. EEUU.
- Kurtzman, C. P. (2003). Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorhynchus*. *FEMS Yeast Res.* 4, 233-245, doi:S1567135603001752 [pii].
- Lacroix, C., Gicquel, A., Sendid, B., Meyer, J., Accoceberry, I., Francois, N., Morio, F., Desoubreaux, G., Chandenier, J., Kauffmann-Lacroix, C., Hennequin, C., Guitard, J., Nassif, X., & Bougnoux, M. E. (2014). Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of *Candida* species. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 153-158, doi:10.1111/1469-0691.12210 [doi];S1198-743X(14)60049-5 [pii].

- Lass-Flörl, C. (2009). The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses* 52, 197-205.
- Leon, C., Ruiz-Santana, S., Saavedra, P., Castro, C., Ubeda, A., Loza, A., Martín-Mazuelos, E., Blanco, A., Jerez, V., Ballus, J., Álvarez-Rocha, L., Utande-Vázquez, A., & Farinas, O. (2012). Value of beta-D-glucan and *Candida albicans* germ tube antibody for discriminating between *Candida* colonization and invasive candidiasis in patients with severe abdominal conditions. *Intensive Care Med.* 38, 1315-1325, doi:10.1007/s00134-012-2616-y [doi].
- Li, D. D., Deng, L., Hu, G. H., Zhao, L. X., Hu, D. D., Jiang, Y. Y., & Wang, Y. (2013). Using *Galleria mellonella*-*Candida albicans* infection model to evaluate antifungal agents. *Biol. Pharm. Bull.* 36, 1482-1487, doi:DN/JST.JSTAGE/bpb/b13-00270 [pii].
- Liu, J. & Balasubramanian, M. K. (2001). 1,3-beta-Glucan synthase: a useful target for antifungal drugs. *Curr. Drug Targets. Infect. Disord.* 1, 159-169.
- Lockhart, S. R., Messer, S. A., Gherna, M., Bishop, J. A., Merz, W. G., Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. (2009). Identification of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in a large global collection of *Candida glabrata* isolates: comparison to the literature. *J. Clin. Microbiol.* 47, 1216-1217, doi:JCM.02315-08 [pii];10.1128/JCM.02315-08 [doi].
- Lodder J & De Vries NF (1983). Some notes on *Torulopsis glabrata*. *Mycopathologia* 98-103.
- Maertens, J., Meersseman, W., & Van Bleyenbergh, P. (2009). New therapies for fungal pneumonia. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 22, 183-190.
- Maguire, S. L., O'Heigeartaigh, S. S., Byrne, K. P., Schroder, M. S., O'Gaora, P., Wolfe, K. H., & Butler, G. (2013). Comparative genome analysis and gene finding in *Candida* species using CGOB. *Mol. Biol. Evol.* 30, 1281-1291, doi:mst042 [pii];10.1093/molbev/mst042 [doi].
- Marcos-Arias, C., Eraso, E., Madariaga, L., Aguirre, J. M., & Quindós, G. (2011). Phospholipase and proteinase activities of *Candida* isolates from denture wearers. *Mycoses* 54, e10-e16, doi:MYC1812 [pii];10.1111/j.1439-0507.2009.01812.x [doi].
- Markovich, S., Yekutieli, A., Shalit, I., Shadkchan, Y., & Osherov, N. (2004). Genomic approach to identification of mutations affecting caspofungin susceptibility in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 3871-3876, doi:10.1128/AAC.48.10.3871-3876.2004 [doi];48/10/3871 [pii].
- Martins, M., Uppuluri, P., Thomas, D. P., Cleary, I. A., Henriques, M., Lopez-Ribot, J. L., & Oliveira, R. (2010). Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. *Mycopathologia* 169, 323-331, doi:10.1007/s11046-009-9264-y [doi].
- Masuoka, J. (2004). Surface glycans of *Candida albicans* and other pathogenic fungi: physiological roles, clinical uses, and experimental challenges. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 281-310.

- Mazur, P., Morin, N., Baginsky, W., el-Sherbeini, M., Clemas, J. A., Nielsen, J. B., & Foor, F. (1995). Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. *Mol. Cell Biol.* *15*, 5671-5681.
- Mellado, E., Garcia-Effron, G., Buitrago, M. J., Alcazar-Fuoli, L., Cuenca-Estrella, M., & Rodriguez-Tudela, J. L. (2005). Targeted gene disruption of the 14-alpha sterol demethylase (cyp51A) in *Aspergillus fumigatus* and its role in azole drug susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* *49*, 2536-2538, doi:49/6/2536 [pii];10.1128/AAC.49.6.2536-2538.2005 [doi].
- Mesa-Arango, A. C., Forastiero, A., Bernal-Martinez, L., Cuenca-Estrella, M., Mellado, E., & Zaragoza, O. (2013). The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the virulence of the fungal pathogen *Candida tropicalis* and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast. *Med Mycol.* *51*, 461-472, doi:10.3109/13693786.2012.737031 [doi].
- Mirhendi, H., Bruun, B., Schonheyder, H. C., Christensen, J. J., Fuursted, K., Gahrn-Hansen, B., Johansen, H. K., Nielsen, L., Knudsen, J. D., & Arendrup, M. C. (2011). Differentiation of *Candida glabrata*, *C. nivariensis* and *C. bracarensis* based on fragment length polymorphism of ITS1 and ITS2 and restriction fragment length polymorphism of ITS and D1/D2 regions in rDNA. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *30*, 1409-1416, doi:10.1007/s10096-011-1235-9 [doi].
- Moen, M. D., Lyseng-Williamson, K. A., & Scott, L. J. (2009). Liposomal amphotericin B: a review of its use as empirical therapy in febrile neutropenia and in the treatment of invasive fungal infections. *Drugs* *69*, 361-392.
- Moreira, A., Silva, S., Botelho, C., Sampaio, P., Pais, C., & Henriques, M. (2015). *Candida bracarensis*: Evaluation of Virulence Factors and its Tolerance to Amphotericin B and Fluconazole. *Mycopathologia* *180*, 305-315, doi:10.1007/s11046-015-9925-y [doi];10.1007/s11046-015-9925-y [pii].
- Morrell, M., Fraser, V. J., & Kollef, M. H. (2005). Delaying the empiric treatment of candida bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob. Agents Chemother.* *49*, 3640-3645, doi:49/9/3640 [pii];10.1128/AAC.49.9.3640-3645.2005 [doi].
- Munro, C. A., Selvaggini, S., de, B., I, Walker, L., Lenardon, M. D., Gerssen, B., Milne, S., Brown, A. J., & Gow, N. A. (2007). The PKC, HOG and Ca²⁺ signalling pathways co-ordinately regulate chitin synthesis in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* *63*, 1399-1413, doi:MMI5588 [pii];10.1111/j.1365-2958.2007.05588.x [doi].
- Nett, J., Lincoln, L., Marchillo, K., Massey, R., Holoyda, K., Hoff, B., VanHandel, M., & Andes, D. (2007). Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* *51*, 510-520, doi:AAC.01056-06 [pii];10.1128/AAC.01056-06 [doi].
- Norman, A. W., Demel, R. A., de Kruffy, B., Geurts van Kessel, W. S., & van Deenen, L. L. (1972). Studies on the biological properties of polyene antibiotics: comparison of other polyenes with filipin in their ability to interact specifically with sterol. *Biochim. Biophys. Acta* *290*, 1-14.

- Odds, F. C. (2003). Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 1, doi:10.1093/jac/dkg301 [doi];dkg301 [pii].
- Odds, F. C., Rinaldi, M. G., Cooper, C. R., Jr., Fothergill, A., Pasarell, L., & McGinnis, M. R. (1997). Candida and Torulopsis: a blinded evaluation of use of pseudohypha formation as basis for identification of medically important yeasts. *J. Clin. Microbiol.* 35, 313-316.
- Ostrosky-Zeichner, L., Kullberg, B. J., Bow, E. J., Hadley, S., Leon, C., Nucci, M., Patterson, T. F., & Perfect, J. R. (2011). Early treatment of candidemia in adults: a review. *Med. Mycol.* 49, 113-120, doi:10.3109/13693786.2010.512300 [doi].
- Pacetti, S. A. & Gelone, S. P. (2003). Caspofungin acetate for treatment of invasive fungal infections. *Ann. Pharmacother.* 37, 90-98.
- Parks, L. W., Bottema, C. D., Rodriguez, R. J., & Lewis, T. A. (1985). Yeast sterols: yeast mutants as tools for the study of sterol metabolism. *Methods Enzymol.* 111, 333-346.
- Paulitsch, A. H., Willinger, B., Zsalatz, B., Stabentheiner, E., Marth, E., & Buzina, W. (2009). In-vivo Candida biofilms in scanning electron microscopy. *Med. Mycol.* 47, 690-696, doi:10.3109/13693780802635237 [pii];10.3109/13693780802635237 [doi].
- Perez, P. & Rincon, S. A. (2010). Rho GTPases: regulation of cell polarity and growth in yeasts. *Biochem. J.* 426, 243-253, doi:BJ20091823 [pii];10.1042/BJ20091823 [doi].
- Perlin, D. S. (2007). Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist. Updat.* 10, 121-130.
- Perlin, D. S. (2014a). Echinocandin resistance, susceptibility testing and prophylaxis: implications for patient management. *Drugs* 74, 1573-1585, doi:10.1007/s40265-014-0286-5 [doi].
- Perlin, D. S. (2014b). Echinocandin resistance, susceptibility testing and prophylaxis: implications for patient management. *Drugs* 74, 1573-1585, doi:10.1007/s40265-014-0286-5 [doi].
- Perlin, D. S. (2015). Mechanisms of echinocandin antifungal drug resistance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1354, 1-11, doi:10.1111/nyas.12831 [doi].
- Perlin, D. S., Balashov, S., & Park, S. (2008). Multiplex detection of mutations. *Methods Mol. Biol.* 429, 23-31, doi:10.1007/978-1-60327-040-3_2 [doi].
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., & Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* 26, 509-515.
- Pfaller, M. A., Boyken, L., Hollis, R. J., Messer, S. A., Tendolkar, S., & Diekema, D. J. (2005). In vitro activities of anidulafungin against more than 2,500 clinical isolates of Candida spp., including 315 isolates resistant to fluconazole. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5425-5427.

- Pfaller, M. A. & Diekema, D. J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 133-163.
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Andes, D., Arendrup, M. C., Brown, S. D., Motyl, M., & Perlin, D. S. (2010). Clinical Breakpoints for the Echinocandins and *Candida*, Revisited.
- Pfaller, M. A., Messer, S. A., Boyken, L., Rice, C., Tendolkar, S., Hollis, R. J., & Diekema, D. J. (2003). Caspofungin activity against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida*. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5729-5731.
- Pfaller, M. A., Messer, S. A., Boyken, L., Tendolkar, S., Hollis, R. J., & Diekema, D. J. (2004). Geographic variation in the susceptibilities of invasive isolates of *Candida glabrata* to seven systemically active antifungal agents: a global assessment from the ARTEMIS Antifungal Surveillance Program conducted in 2001 and 2002. *J. Clin. Microbiol.* 42, 3142-3146, doi:10.1128/JCM.42.7.3142-3146.2004 [doi];42/7/3142 [pii].
- Pinto, A., Halliday, C., Zahra, M., van, H. S., Olma, T., Maszewska, K., Iredell, J. R., Meyer, W., & Chen, S. C. (2011). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identification of yeasts is contingent on robust reference spectra. *PLoS. One.* 6, e25712, doi:10.1371/journal.pone.0025712 [doi];PONE-D-11-16017 [pii].
- PITTENGER, R. C., WOLFE, R. N., HOEHN, M. M., MARKS, P. N., DAILY, W. A., & McGUIRE, J. M. (1953). Hygromycin. I. Preliminary studies on the production and biologic activity of a new antibiotic. *Antibiot. Chemother. (Northfield.)* 3, 1268-1278.
- Podust, L. M., Poulos, T. L., & Waterman, M. R. (2001). Crystal structure of cytochrome P450 14alpha-sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 3068-3073.
- Ponton, J. (2008). [The fungal cell wall and the mechanism of action of anidulafungin]. *Rev. Iberoam. Micol.* 25, 78-82, doi:20082578 [pii].
- Ramage, G., Robertson, S. N., & Williams, C. (2014). Strength in numbers: antifungal strategies against fungal biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* 43, 114-120, doi:S0924-8579(13)00381-6 [pii];10.1016/j.ijantimicag.2013.10.023 [doi].
- Reinoso-Martin, C., Schuller, C., Schuetzer-Muehlbauer, M., & Kuchler, K. (2003). The yeast protein kinase C cell integrity pathway mediates tolerance to the antifungal drug caspofungin through activation of Slt2p mitogen-activated protein kinase signaling. *Eukaryot. Cell* 2, 1200-1210.
- Rodero, L., Davel, G., Soria, M., Vivot, W., Cordoba, S., Canteros, C. E., & Saporiti, A. (2005). [Multicenter study of fungemia due to yeasts in Argentina]. *Rev. Argent Microbiol.* 37, 189-195.
- Rodrigues, C. F., Silva, S., & Henriques, M. (2014). *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 33, 673-688, doi:10.1007/s10096-013-2009-3 [doi].
- Roh, D. H., Bowers, B., Riezman, H., & Cabib, E. (2002). Rho1p mutations specific for regulation of beta(1-->3)glucan synthesis and the order of assembly of the yeast cell wall. *Mol. Microbiol* 44, 1167-1183.

- Romeo, O., Scordino, F., Pernice, I., Lo, P. C., & Criseo, G. (2009). A multiplex PCR protocol for rapid identification of *Candida glabrata* and its phylogenetically related species *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis*. *J. Microbiol. Methods* 79, 117-120, doi:S0167-7012(09)00229-2 [pii];10.1016/j.mimet.2009.07.016 [doi].
- Roncero, C. & Duran, A. (1985). Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: in vivo activation of chitin polymerization. *J. Bacteriol.* 163, 1180-1185.
- 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, doi:AAC.00946-13 [pii];10.1128/AAC.00946-13 [doi].
- Sabra, R. & Branch, R. A. (1990). Amphotericin B nephrotoxicity. *Drug Saf* 5, 94-108.
- Sambrook J., F. E. F., & Maniatis, T. (1998). *Molecular cloning: a laboratory manual*. (2nd. ed.) . Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanati, H., Belanger, P., Fratti, R., & Ghannoum, M. (1997). A new triazole, voriconazole (UK-109,496), blocks sterol biosynthesis in *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 2492-2496.
- 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.
- Siatat-Jeunemaitre, B., Cole, L., Bourett, T., Howard, R., & Hawes, C. (1996). Brefeldin A effects in plant and fungal cells: something new about vesicle trafficking? *J. Microsc.* 181, 162-177.
- Sawistowska-Schroder, E. T., Kerridge, D., & Perry, H. (1984). Echinocandin inhibition of 1,3-beta-D-glucan synthase from *Candida albicans*. *FEBS Lett.* 173, 134-138.
- Scorzoni, L., de Lucas, M. P., Mesa-Arango, A. C., Fusco-Almeida, A. M., Lozano, E., Cuenca-Estrella, M., Mendes-Giannini, M. J., & Zaragoza, O. (2013). Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile. *PLoS. One.* 8, e60047, doi:10.1371/journal.pone.0060047 [doi];PONE-D-12-30572 [pii].
- Sharma, C., Wankhede, S., Muralidhar, S., Prakash, A., Singh, P. K., Kathuria, S., Kumar, D. A., Khan, N., Randhawa, H. S., Meis, J. F., & Chowdhary, A. (2013). *Candida nivariensis* as an etiologic agent of vulvovaginal candidiasis in a tertiary care hospital of New Delhi, India. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 76, 46-50, doi:S0732-8893(13)00119-3 [pii];10.1016/j.diagmicrobio.2013.02.023 [doi].
- Sheehan, D. J., Hitchcock, C. A., & Sibley, C. M. (1999). Current and emerging azole antifungal agents. *Clin Microbiol Rev.* 12, 40-79.
- Silva, S., Henriques, M., Martins, A., Oliveira, R., Williams, D., & Azeredo, J. (2009). Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix

- composition. *Med. Mycol.* 47, 681-689, doi:10.3109/13693780802549594 [pii];10.3109/13693780802549594 [doi].
- Silva, S., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D., & Azeredo, J. (2010). In vitro biofilm activity of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Curr. Microbiol.* 61, 534-540, doi:10.1007/s00284-010-9649-7 [doi].
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W., & Azeredo, J. (2012). *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 288-305, doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x [doi].
- Singh, S. D., Robbins, N., Zaas, A. K., Schell, W. A., Perfect, J. R., & Cowen, L. E. (2009). Hsp90 governs echinocandin resistance in the pathogenic yeast *Candida albicans* via calcineurin. *PLoS. Pathog.* 5, e1000532, doi:10.1371/journal.ppat.1000532 [doi].
- Singh-Babak, S. D., Babak, T., Diezmann, S., Hill, J. A., Xie, J. L., Chen, Y. L., Poutanen, S. M., Rennie, R. P., Heitman, J., & Cowen, L. E. (2012). Global analysis of the evolution and mechanism of echinocandin resistance in *Candida glabrata*. *PLoS. Pathog.* 8, e1002718, doi:10.1371/journal.ppat.1002718 [doi];PPATHOGENS-D-11-02529 [pii].
- Staab, J. F. & Sundstrom, P. (2003). URA3 as a selectable marker for disruption and virulence assessment of *Candida albicans* genes. *Trends Microbiol.* 11, 69-73, doi:S0966842X0200029X [pii].
- Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2008). EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 9.1: Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds.
- Swoboda-Kopec, E., Sikora, M., Golas, M., Piskorska, K., Gozdowski, D., & Netsvyetayeva, I. (2014). *Candida nivariensis* in comparison to different phenotypes of *Candida glabrata*. *Mycoses* 57, 747-753, doi:10.1111/myc.12264 [doi].
- Tamura, N. K., Negri, M. F., Bonassoli, L. A., & Svidzinski, T. I. (2007). [Virulence factors for *Candida* spp recovered from intravascular catheters and hospital workers hands]. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 40, 91-93, doi:S0037-86822007000100021 [pii].
- Tang, J. & Parr, T. R., Jr. (1991). W-1 solubilization and kinetics of inhibition by cilofungin of *Candida albicans* (1,3)-beta-D-glucan synthase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35, 99-103.
- Telleria, O., Ezpeleta, G., Herrero, O., Miranda-Zapico, I., Quindos, G., & Cisterna, R. (2012). Validation of the PCR-dHPLC method for rapid identification of *Candida glabrata* phylogenetically related species in different biological matrices. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 893-894, 150-156, doi:S1570-0232(12)00156-0 [pii];10.1016/j.jchromb.2012.03.007 [doi].
- Thompson, J. R., Douglas, C. M., Li, W., Jue, C. K., Pramanik, B., Yuan, X., Rude, T. H., Toffaletti, D. L., Perfect, J. R., & Kurtz, M. (1999). A glucan synthase FKS1 homolog in *Cryptococcus neoformans* is single copy and encodes an essential function. *J. Bacteriol.* 181, 444-453.

- Tietz, H. J., Hopp, M., Schmalreck, A., Sterry, W., & Czaika, V. (2001). *Candida africana* sp. nov., a new human pathogen or a variant of *Candida albicans*? *Mycoses* *44*, 437-445.
- Turner, S. A. & Butler, G. (2014). The *Candida* pathogenic species complex. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *4*, a019778, doi:4/9/a019778 [pii];10.1101/cshperspect.a019778 [doi].
- Ueno, K., Namiki, Y., Mitani, H., Yamaguchi, M., & Chibana, H. (2011). Differential cell wall remodeling of two chitin synthase deletants Deltachs3A and Deltachs3B in the pathogenic yeast *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res.* *11*, 398-407, doi:10.1111/j.1567-1364.2011.00728.x [doi].
- van Nistelrooy, J. G., van den Brink, J. M., van Kan, J. A., van Gorcom, R. F., & De Waard, M. A. (1996). Isolation and molecular characterisation of the gene encoding eburicol 14 alpha-demethylase (cYP51) from *Penicillium italicum*. *Mol. Gen. Genet.* *250*, 725-733.
- Vanden Bossche, H. (1997). Mechanisms of antifungal resistance. *Rev. Iberoam. Micol.* *14*, 44-49.
- Vandeputte, P., Tronchin, G., Larcher, G., Ernoult, E., Berges, T., Chabasse, D., & Bouchara, J. P. (2008). A nonsense mutation in the ERG6 gene leads to reduced susceptibility to polyenes in a clinical isolate of *Candida glabrata*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *52*, 3701-3709, doi:AAC.00423-08 [pii];10.1128/AAC.00423-08 [doi].
- Vermitsky, J. P. & Edlind, T. D. (2004). Azole resistance in *Candida glabrata*: coordinate upregulation of multidrug transporters and evidence for a Pdr1-like transcription factor. *Antimicrob. Agents Chemother.* *48*, 3773-3781, doi:10.1128/AAC.48.10.3773-3781.2004 [doi];48/10/3773 [pii].
- Wahyuningsih, R., SahBandar, I. N., Theelen, B., Hagen, F., Poot, G., Meis, J. F., Rozalyani, A., Sjam, R., Widodo, D., Djauzi, S., & Boekhout, T. (2008). *Candida nivariensis* isolated from an Indonesian human immunodeficiency virus-infected patient suffering from oropharyngeal candidiasis. *J. Clin. Microbiol.* *46*, 388-391, doi:JCM.01660-07 [pii];10.1128/JCM.01660-07 [doi].
- Walker, L. A., Gow, N. A., & Munro, C. A. (2013). Elevated chitin content reduces the susceptibility of *Candida* species to caspofungin. *Antimicrob. Agents Chemother.* *57*, 146-154, doi:AAC.01486-12 [pii];10.1128/AAC.01486-12 [doi].
- Warren, T. A., McTaggart, L., Richardson, S. E., & Zhang, S. X. (2010). *Candida bracarensis* bloodstream infection in an immunocompromised patient. *J. Clin. Microbiol.* *48*, 4677-4679, doi:JCM.01447-10 [pii];10.1128/JCM.01447-10 [doi].
- Weig, M., Haynes, K., Rogers, T. R., Kurzai, O., Frosch, M., & Muhlschlegel, F. A. (2001). A GAS-like gene family in the pathogenic fungus *Candida glabrata*. *Microbiology* *147*, 2007-2019, doi:10.1099/00221287-147-8-2007 [doi].
- White, T. C. (1997). Increased mRNA levels of ERG16, CDR, and MDR1 correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* *41*, 1482-1487.

White, T. J., T.D.Bruns, S.B.Lee, & J.W.Taylor (1990). *PCR protocols: a guide to methods and applications*, edited by M.A.Innis, D.H.Gelfand, J.J.Sninsky, & T.J.White, pp. 315-322. San Diego, Calif: Academic Press, Inc.

Wisplinghoff, H., Seifert, H., Wenzel, R. P., & Edmond, M. B. (2006). Inflammatory response and clinical course of adult patients with nosocomial bloodstream infections caused by *Candida* spp. *Clin. Microbiol. Infect.* 12, 170-177, doi:S1198-743X(14)63402-9 [pii];10.1111/j.1469-0691.2005.01318.x [doi].

Wong, S., Fares, M. A., Zimmermann, W., Butler, G., & Wolfe, K. H. (2003). Evidence from comparative genomics for a complete sexual cycle in the 'asexual' pathogenic yeast *Candida glabrata*. *Genome Biol.* 4, R10.

Wyszynski, F. J., Lee, S. S., Yabe, T., Wang, H., Gomez-Escribano, J. P., Bibb, M. J., Lee, S. J., Davies, G. J., & Davis, B. G. (2012). Biosynthesis of the tunicamycin antibiotics proceeds via unique exo-glycal intermediates. *Nat. Chem.* 4, 539-546, doi:nchem.1351 [pii];10.1038/nchem.1351 [doi].

Zarnowski, R., Westler, W. M., Lacmbouh, G. A., Marita, J. M., Bothe, J. R., Bernhardt, J., Lounes-Hadj, S. A., Fontaine, J., Sanchez, H., Hatfield, R. D., Ntambi, J. M., Nett, J. E., Mitchell, A. P., & Andes, D. R. (2014). Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. *MBio.* 5, e01333-14, doi:mBio.01333-14 [pii];10.1128/mBio.01333-14 [doi].