

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**

**Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**



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

**“14 alfa Esterol Demetilasa de *Rhizopus arrhizus*  
(syn. *Rhizopus oryzae*): Participación en la  
Resistencia Natural a Voriconazol”**

Daiana Macedo

Director de Tesis: Dr. Guillermo García-Effron

Laboratorio de Micología y Diagnóstico Molecular

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas – UNL – CONICET

**-2019-**

## AGRADECIMIENTOS

*Esta Tesis me permitirá obtener el Título de Doctora en Ciencias Biológicas. Hoy, después de haber recorrido este largo camino, puedo decir que la realización de la tesis requiere de esfuerzo y superación constante, de nunca darse por vencido, del planteo diario de interrogantes y una búsqueda creativa de respuestas. Llegar a esta etapa final no hubiese sido posible, sin la compañía, apoyo y participación de muchas personas a las que quiero agradecer.*

*A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), por otorgarme las becas doctorales que me permitieron llevar a cabo este trabajo de Tesis.*

*A la Universidad Nacional del Litoral, a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, por la excelente formación académica recibida, por las oportunidades brindadas, por aportar el espacio físico e institucional para desarrollar esta tesis.*

*A Guille, mi director, por apoyarme todos estos años en cada paso que voy dando, por compartir todas sus experiencias conmigo, científicas, y ... no tanto! Por su confianza, por las oportunidades brindadas, y por sobre todo, por su buena onda diaria, su bondad y su generosidad, gracias totales!*

*A mis compañeros de laboratorio, por sus consejos y su colaboración diaria, por todos los buenos momentos compartidos, los almuerzos, los mates, y todas esas horas que pasamos juntos, gracias por hacerme reír tanto cada día!*

*A mi familia, mis papas, mis hermanos, mis abuelos, ustedes están siempre para mí, firmes, gracias por ese apoyo incondicional, por confiar siempre en mí, por toda la alegría y el amor que me dan, por compartir no solo los momentos felices, sino también aquellos más difíciles, gracias! Los quiero con todo mi corazón.*

*A Lorenzo, mi gran compañero de vida, gracias por estar codo a codo, en cada paso de mi carrera, en cada momento que nos toca vivir, en cada aventura que emprendemos, siempre con tu energía contagiosa. Por escucharme todo este tiempo hablando de las cosas que no me salían en el laboratorio, las que sí, la escritura de la tesis, las ideas...que aguante! Por entenderme y por cuidarme con el amor que lo haces! Te amo y no hay nada como ir juntos a la par!*

## PUBLICACIONES

- **D Macedo**, F Leonardelli, C Dudiuk, RG Vitale, E Del Valle, G Giusiano, S Gamarra, G Garcia-Effron (2019). *In Vitro* and *In Vivo* Evaluation of Voriconazole-Containing Antifungal Combinations against Mucorales Using a *Galleria mellonella* Model of Mucormycosis. *Journal of Fungi*. 2019. 5(1): 5.
- **D Macedo**, F Leonardelli, C Dudiuk, L Theill L, Cabeza MS, Gamarra S, Garcia-Effron G. Molecular confirmation of the linkage between the *Rhizopus oryzae* CYP51A gene coding region and its intrinsic voriconazole and fluconazole resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018. 62 (8): e00224-18.



# INDICE

# INDICE

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS .....	11
RESUMEN.....	15
SUMMARY .....	19
1.- INTRODUCCION.....	23
1.1. Mucormicosis .....	23
1.1.1. Concepto.....	23
1.1.2. Etiología y Epidemiología: hongos del orden Mucorales y <i>Rhizopus oryzae</i> . ....	23
1.1.3. Patogenia.....	26
1.1.4. Clasificación clínica de las mucormicosis.....	27
1.1.4.1. Mucormicosis Rinocerebral.....	28
1.1.4.2. Mucormicosis Pulmonar.....	29
1.1.4.3. Mucormicosis Cutánea .....	29
1.1.4.4. Mucormicosis Gastrointestinal .....	29
1.1.4.5. Mucormicosis Diseminada.....	29
1.1.4.6. Otras presentaciones.....	30
1.2. Sensibilidad <i>in vitro</i> de <i>R. oryzae</i> a los antifúngicos .....	31
1.3. Tratamiento .....	31
1.4. Principal diana de las drogas antifúngicas disponibles: Vía de síntesis del ergosterol .....	33
1.4.1. Demetilación de esteroides en el C-14.....	39
1.5. Genes que codifican las 14- $\alpha$ esterol demetilinas ( <i>CYP51/ERG11</i> ).....	40
1.6. 14- $\alpha$ esterol demetilasa (Cyp51p): la diana de los antifúngicos azólicos.....	41
1.6.1. Homología de los Erg11p/Cyp51p de levaduras y hongos filamentosos .....	41
1.6.2. Cyp51s: Estructura primaria, secundaria y tridimensional. ....	41
1.7. Inhibidores de la 14- $\alpha$ esterol demetilinas: los antifúngicos azólicos.....	43
1.8. Interacción de los azoles con su diana .....	44
1.9. Mecanismos de resistencia a los azoles .....	46
1.9.1. Activación y/o sobreexpresión de bombas de flujo .....	48
1.9.2. Modificaciones de la diana .....	49
1.9.3. Sobreexpresión de la diana.....	50
2.- OBJETIVOS.....	54
3.- MATERIALES Y METODOS.....	56
3.1. Materiales y reactivos químicos.....	56
3.2. Hongos filamentosos utilizados y procedimientos de cultivo .....	56

3.2.1. Cepas de Mucorales .....	56
3.2.2. Cepas de <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	56
3.2.3. Cultivo de hongos filamentosos.....	57
3.2.3.1 Preparación de stock de esporas para conservación de cepas .....	57
3.2.3.2. Preparación de inóculos .....	58
3.3. Cepas bacterianas y de levaduras, plásmidos y procedimiento de cultivo. ....	58
3.3.1. Cepas .....	58
3.3.1.1. Cepas de <i>Escherichia coli</i> .....	58
3.3.1.2. Cepas control y de la colección Americana de Cultivos Tipo ATCC (American Type Culture Collection). ....	59
3.3.2. Plásmidos utilizados.....	59
3.3.2.1. Plásmido pGEM-T® easy vector.....	59
3.3.2.2. Vectores Fúngicos .....	60
3.3.3. Cultivo de <i>Escherichia coli</i> .....	62
3.3.4. Cultivo de levaduras.....	63
3.4. Técnicas de biología molecular .....	63
3.4.1. Extracción de ADN de hongos filamentosos.....	63
3.4.2. Extracción de ARN de <i>R. oryzae</i> .....	64
3.4.3. Cuantificación de ácidos nucleicos.....	65
3.4.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	65
3.4.4.1. Método general.....	65
3.4.4.2. Transcripción reversa (síntesis de ADNc).....	66
3.4.4.3. Generación de vectores de fúngicos por metodología PRODIGE y PCR de fusión .....	67
3.4.4.4. Generación de vectores de fúngicos por mutagénesis dirigida. ....	70
3.4.4.5. PCR real time .....	73
3.4.5. Oligonucleótidos.....	74
3.4.6. Bioinformática .....	74
3.4.7. Electroforesis en geles de agarosa. ....	75
3.4.8. Purificación de ADN desde geles de agarosa. ....	75
3.4.9. Ligación de fragmentos de ADN.....	75
3.4.10. Transformación de <i>E. coli</i> por método de shock térmico (Método de Hanahan) .....	76
3.4.11. Minipreparación de ADN plasmídico. ....	76
3.4.11.1. Método artesanal .....	76
3.4.11.2. Soluciones de Isopropyl B-D-Thiogalacto-Pyranoside 200mg/ml (IPTG) y 5-Bromo-4-Cloro-3-Indol- $\beta$ -D-galactopiranosido (X-Gal) de 20mg/ml. ....	77

3.4.11.3. Método comercial (Promega).....	78
3.4.12. Digestión enzimática de ADN.....	78
3.4.13. Secuenciación de ADN. ....	78
3.4.14. Transformación de <i>A. fumigatus</i> por electroporación .....	78
3.4.15. Estandarización de un protocolo de Transformación de <i>R. oryzae</i> por electroporación .....	82
3.5. Evaluación de la sensibilidad a drogas individuales y combinadas, <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> . 83	
3.5.1. Pruebas de sensibilidad <i>in vitro</i> .....	83
3.5.1.1. Técnica de microdilución en caldo utilizando como método de referencia CLSI protocolo M38-Ed3 para establecer la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)83	
3.5.1.1.1 Antifúngicos, .....	83
3.5.1.1.2. Soluciones madres e intervalos de concentraciones probadas .....	83
3.5.1.1.3. Caldo RPMI1640.....	84
3.5.1.1.4. Controles de crecimiento.....	84
3.5.1.1.5. Preparación de las placas de microdilución para determinar CIM .....	84
3.5.1.1.6. Preparación del inóculo e inoculación de las placas.....	85
3.5.1.1.7. Lectura e interpretación de resultados .....	85
3.5.1.2. Método de difusión en medio sólido utilizando como método de referencia CLSI protocolo M51-A .....	85
3.5.1.2.1. Discos de antimicrobianos .....	85
3.5.1.2.2. Medio Mueller-Hinton Agar.....	85
3.5.1.2.3. Preparación del inóculo y siembra de las placas.....	85
3.5.1.2.4. Aplicación de los discos de antimicrobianos en las placas inoculadas ..	86
3.5.1.2.5. Lectura e interpretación de resultados .....	86
3.5.1.3. Evaluación de la combinación de Antifúngicos por microdilución (método del tablero de ajedrez o checkerboard) .....	86
3.5.1.3.1. Antifúngicos .....	86
3.5.1.3.2. Soluciones madres de antifúngicos y rango de concentraciones probadas.....	86
3.5.1.3.3. Preparación de placas de combinaciones .....	87
3.5.1.3.4. Evaluación de la interacción entre antifúngicos.....	88
3.5.1.3.5. Modelo de interacción entre antifúngicos .....	88
3.5.2. Pruebas de sensibilidad <i>in vivo</i> utilizando el modelo invertebrado <i>Galleria mellonella</i> .....	89
3.5.2.1. Puesta a punto del modelo de infección .....	90
3.5.2.2. Puesta a punto de la dosificación de drogas individuales y en combinación 90	

3.5.2.3. Evaluación del efecto de drogas individuales y combinadas en <i>G. mellonella</i> infectadas con Mucorales.....	91
3.5.3. Análisis de datos.....	92
4.-RESULTADOS .....	94
4.1. Análisis de las secuencias nucleotídicas de los genes <i>CYP51</i> de <i>R. oryzae</i> y su relación con los distintos patrones de resistencia.....	94
4.1.1. Estudio <i>in silico</i> de la secuencia nucleotídica de los genes <i>CYP51</i> de <i>R. oryzae</i> . .....	94
4.1.2. Cuantificación del número de copias de los genes <i>CYP51</i> de <i>R. oryzae</i> .....	97
4.1.3. Mutaciones en el <i>RoCYP51A</i> y resistencia de <i>R. oryzae</i> a los antifúngicos azólicos.....	98
4.2. Obtención de una cepa de <i>A. fumigatus</i> con su gen <i>CYP51A</i> reemplazado por el gen ortólogo <i>wild-type</i> de <i>R. oryzae</i> . .....	99
4.2.1. Obtención del vector de transformación LMDM-p134.....	100
4.2.2. Reemplazo del gen <i>CYP51A</i> de <i>A. fumigatus</i> por el gen <i>CYP51A</i> de <i>R. oryzae</i> . .....	101
4.2.3. Análisis del fenotipo de los transformantes .....	104
4.2.3.1. Análisis macroscópico y microscópico .....	104
4.2.3.2. Sensibilidad a antifúngicos .....	104
4.2.3.2.1. Método de microdilución .....	104
4.2.3.2.2. Método de difusión en medio solido .....	105
4.3. Obtención de una cepa de <i>A. fumigatus</i> con su gen <i>CYP51A</i> reemplazado por el <i>CYP51A</i> de <i>R. oryzae</i> con las mutaciones Y121F, T289A y Y121F+T289A.....	106
4.3.1 Obtención de los vectores de transformación LMDM-p148, LMDM-p149 y LMDM-p150.....	106
4.3.2. Reemplazo del <i>CYP51A</i> de <i>A. fumigatus</i> por el gen <i>RoCYP51A</i> mutado.....	108
4.3.3. Análisis del fenotipo de los transformantes. ....	110
4.3.3.1. Análisis macroscópico y microscópico.....	110
4.3.3.2. Sensibilidad a antifúngicos .....	110
4.3.3.2.1. Método de microdilución .....	110
4.3.3.2.2. Método de difusión en agar.....	111
4.4. Obtención de una cepa de <i>R. oryzae</i> defectiva en <i>CYP51A</i> .....	112
4.4.1. Obtención del vector de disrupción LMDM-p124.....	112
4.4.2. Estandarización de un protocolo de transformación para <i>R. oryzae</i> .....	113
4.4.2.1. Velocidad de germinación.....	113
4.4.2.2. Obtención de colonias aisladas .....	114
4.4.2.3. Condiciones de electroporación.....	116
4.5. Evaluación de combinaciones de antifúngicos.....	116

4.5.1. Combinación de drogas utilizando método de microdilución (placas de checkerboard) .....	116
4.5.2. Estudio <i>in vivo</i> utilizando el invertebrado <i>G. mellonella</i> para evaluar combinaciones de drogas .....	120
5.- DISCUSION.....	125
6.- CONCLUSIONES .....	133
7.- BIBLIOGRAFIA.....	136



# **ABREVIATURAS Y SIMBOLOS**

## ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

$\mu\text{F}$	Microfaradio
$\mu\text{g}$	Microgramo
$\mu\text{l}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micromolar
$\mu\text{m}$	Micrometro
$\Omega$	Ohmio
A.	<i>Aspergillus</i>
ABLC	Complejo lipídico de AMB
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMB	Anfotericina B
AMD	Amiodarona
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosín trifosfato
ARN	Ácido ribonucleico
BAL	Lavado broncoalveolar
C.	<i>Candida</i>
°C	Grado centigrado
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
CEM	Concentración Efectiva Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
cm	Centimetro
Cols.	Colaboradores
CSF	Caspofungina
DC	Dicloran
DIS	Disulfiran
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Ej.	Ejemplo
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
$\Sigma\text{FIC}$	Sumatoria de las concentraciones inhibitorias fraccionales
FLC	Fluconazol
g	Gramos
G.	<i>Galleria</i>

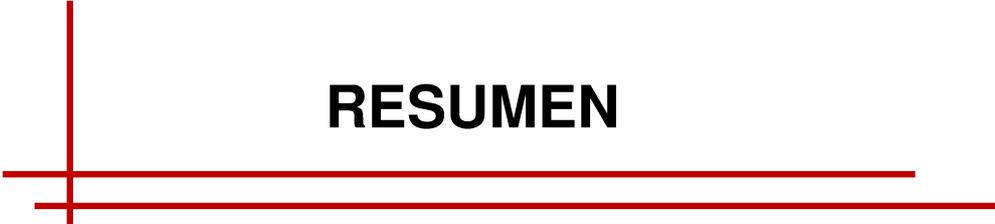
h	horas
HYGB	Higromicina B
ISAV	Isavuconazol
ITC	Itraconazol
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>
kb	Kilobases
kg	Kilogramos
LAMB	Anfotericina B liposomal
LAN	Lansoprazol
LMDM	Laboratorio de Micología y Diagnóstico Molecular
M	Molar
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mm	Milimetro
mM	Milimolar
NADH	Nicotiamida-adenina dinucleotido reducido
NADPH	Nicotiamida-adenina dinucleotido fosfato reducido
NIF	Nifedipina
nt	Nucleótido
ORF	<i>Open reading frame</i>
<i>P.</i>	<i>Penicillium</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pb	Pares de base
PSC	Posaconazol
p/v	Peso en volumen
<i>R.</i>	<i>Rhizopus</i>
RAPD	Amplificación aleatoria de ADN polimórfico
RB	Rosa de Bengala
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
Rpm	Revoluciones por minuto
<i>S.</i>	<i>Saccharomyces</i>
sp.	Especie
spp.	Especies
UTR	<i>Untranslated region</i>
V	Voltio

VRC

Voriconazol

WT

*Wild Type* (Salvaje)



# **RESUMEN**

## RESUMEN

Las mucormicosis son infecciones fúngicas angioinvasivas, de rápida progresión con alta morbilidad y mortalidad que se presentan en pacientes inmunocomprometidos como casos aislados o como brotes intrahospitalarios. A pesar de los mejores esfuerzos de la comunidad médica, la mortalidad asociada a ésta micosis invasiva sigue siendo elevada, llegando a ser letal en el 95% de los casos. Estas micosis son causadas por hongos del orden Mucorales, dentro de los que destacan los géneros *Rhizopus*, *Mucor* y *Lichtheimia*, siendo *Rhizopus arrhizus* (syn: *Rhizopus. oryzae*) el principal agente causal a nivel mundial.

Actualmente, la mucormicosis emerge como uno de los mayores problemas terapéuticos de la Micología médica moderna, ya que no existe un tratamiento totalmente efectivo. Esto se debe por un lado, a que estos hongos son resistentes a la mayoría de los antifúngicos disponibles (equinocandinas y a varios de los antifúngicos azólicos como fluconazol (FLC), voriconazol (VRC) e itraconazol (ITC). A esto se suma la toxicidad del principal tratamiento disponible, anfotericina B (AMB). La guía internacional para el tratamiento de la mucormicosis sugiere el desbridamiento quirúrgico seguido del tratamiento con anfotericina B (lípidica o complejo liposomal) junto con la reversión de las condiciones predisponentes. Además, el posaconazol (PSC) se puede usar como un tratamiento de rescate y / o desescalamiento, ya que es uno de los pocos antifúngicos azólicos activos contra estos hongos. Más recientemente, el isavuconazol se incluyó en el arsenal antifúngico para el tratamiento de la mucormicosis invasiva (especialmente para pacientes intolerantes al AMB).

Los antifúngicos azólicos actúan inhibiendo la síntesis de ergosterol mediante interacción con las enzimas 14- $\alpha$  esterol demetilasa, codificadas en hongos filamentosos por los genes *CYP51*. Los mecanismos moleculares de resistencia de los Mucorales al voriconazol no se conocen. Por el contrario, los mecanismos de resistencia a los azoles reportados en otros hongos filamentosos patógenos humanos, como *Aspergillus* spp., incluyen la sobreexpresión del *CYP51A* y / o mutaciones puntuales en el gen *CYP51A*.

Por estos motivos y como un intento de resolver esta problemática, nos planteamos en este trabajo estudiar los mecanismos moleculares de resistencia de *R. oryzae* al voriconazol y evaluar nuevas opciones terapéuticas. Para cumplir con estos objetivos generales nos propusimos:

Estudiar las secuencias nucleotídicas de los genes *CYP51* de *R. oryzae* (*RoCYP51*).

Evaluar si la resistencia natural de *R. oryzae* a voriconazol está asociada a la amplificación del número de copias de los genes *CYP51*.

Probar que la resistencia intrínseca al voriconazol en *R. oryzae* se debe exclusivamente al gen *CYP51* obteniendo cepas de *R. oryzae* defectivas en dicho gen y reemplazando el gen *CYP51A* de *A. fumigatus* (*AfCYP51A*) por su gen homólogo de *R. oryzae*.

Evaluar combinaciones de drogas antifúngicas y no convencionales frente a diferentes cepas de Mucorales, *in vitro* e *in vivo*.

Se identificaron y caracterizaron dos genes *CYP51* parálogos en el genoma de *R. oryzae*. Se los clasificó como *CYP51A* y *CYP51B* en base a la similitud de secuencias que presentaron con otros genes *CYP51* fúngicos ya conocidos. Se decidió estudiar el gen *RoCYP51A* como potencial causante de la resistencia intrínseca a VRC y FLC.

Se realizó la cuantificación relativa de ambos genes *RoCYP51* mediante qPCR utilizando el gen actina (*ACT1*) de *R. oryzae* como gen de referencia. No se observaron variaciones en la cuantificación génica entre el gen *RoCYP51A* y *ACT1* ni tampoco entre el gen *RoCYP51B* y *ACT1*. Se comprobó que los genes *CYP51* se encuentran en igual cantidad que el gen de referencia. Por lo tanto, la resistencia *R. oryzae* a voriconazol no estaría asociada a la amplificación del número de copias de los genes *CYP51*.

No fue posible transformar *R. oryzae* por electroporación pero se estableció un nuevo método de selección de mutantes del *CYP51* en hongos filamentosos, basado en el uso de una cepa de *A. fumigatus* deficiente en los genes *KU80* y *CYP51A* y fluconazol como agente selector. Esta metodología fue utilizada para obtener una cepa quimérica de *A. fumigatus*, con el gen *CYP51A* de *R. oryzae* funcional, expresado bajo la regulación del promotor y terminador del *AfCYP51A* wild type. Los mutantes resistentes a FLC fueron seleccionados, luego de la transformación, con un nuevo procedimiento aprovechando la hipersensibilidad de la cepa de *A. fumigatus* receptora al FLC. Los patrones de sensibilidad a azoles de los mutantes de *A. fumigatus* con el *RoCYP51A* imitaron exactamente los mismos valores de sensibilidad a azoles que el mucoral. Esta información demostró que la secuencia codificante del gen *RoCYP51A* es la única responsable de los patrones de sensibilidad a azoles de *R. oryzae*.

Luego se procedió con la búsqueda de residuos aminoacídicos puntuales que puedan estar implicados en el fenotipo de resistencia. Las comparaciones entre las secuencias de las proteínas Cyp51Ap de *R. oryzae* y *A. fumigatus* mostraron diferencias en residuos de aminoácidos que ya estaban asociados con la resistencia a voriconazol en *A. fumigatus*. Se

decidió estudiar dichos aminoácidos, para lo cual se generaron mutantes de *A. fumigatus* con el *RoCYP51A* albergando las diferentes sustituciones. Se demostró que la sustitución natural F129Y tiene implicancia en la resistencia a VRC y en la sensibilidad reducida a PSC.

En cuanto a la búsqueda de alternativas terapéuticas para determinar si se podrían alcanzar mejores resultados en el tratamiento de las mucormicosis, se evaluó la actividad *in vitro* de ocho drogas, solas y en combinación con VRC, frente a 25 cepas de Mucorales. Las drogas no convencionales como amiodarona, nifedipina, lansoprazol y disulfiram no presentaron actividad antifúngica frente a ninguna de las cepas ensayadas. Para los antifungicos clásicos, AMB y PSC fueron las drogas más activas cuando se evaluaron solas. Además, se observaron diferencias específicas de especie. En cuanto a la interacción de drogas, los resultados obtenidos variaron según la combinación ensayada. Solo cinco cepas mostraron sinergismo cuando se combinó VRC con PSC y tres cepas cuando se combinó con AMB. Sin embargo, para algunos aislamientos se observó al microscopio alteraciones en el desarrollo de la hifa (AH) cuando se enfrentaron a las combinaciones VRC + PSC, VRC + AMB y VRC + CSF. Para evaluar si las AH microscópica observadas tenían impacto *in vivo*, se usó un modelo de mucormicosis en *G. mellonella*. Se observó una mejor supervivencia en los tratamientos combinados de voriconazol con anfotericina B y con caspofungina, en comparación con AMB sola para *R. microsporus*. Esa mayor supervivencia se obtuvo utilizando una dosis de AMB 32 veces menor cuando se combinó con VRC que cuando se usó sola. Estas dosis antifungicas más bajas emulan las concentraciones antifúngicas donde se observaron las alteraciones microscópicas de las hifas. Con lo cual, se pudo establecer una relación de los resultados *in vitro* (AH) – *in vivo*.

A decorative graphic consisting of a vertical red line on the left, a horizontal red line extending to the right from the vertical line, and a second horizontal red line below the first one, both extending further to the right.

## **SUMMARY**

## SUMMARY

Mucormycosis are angioinvasive, fast-progressing fungal infections with high morbidity and mortality that occur in immunocompromised patients as isolated cases or as in-hospital outbreaks. Despite the best efforts of the medical community, the mortality associated with this invasive mycosis remains high, becoming lethal in 95% of cases. These mycoses are caused by fungi of the order Mucorales, among which *Rhizopus* spp., *Mucor* spp. and *Lichtheimia* spp. stand out, with *Rhizopus arrhizus* (Syn: *Rhizopus oryzae*) being the main causal agent worldwide.

Currently, mucormycosis emerges as one of the major therapeutic problems of modern medical mycology, since there is no fully effective treatment. This is due to the fact that these fungi are resistant to most of the available antifungals (echinocandins and several of the azolic antifungals such as fluconazole, voriconazole and itraconazole). Adding to these treatment limitations, the toxicity of the main available treatment (amphotericin B) is another important problem. International guide for the treatment of mucormycosis suggests surgical debridement followed by treatment with amphotericin B (lipid or liposomal complex) together with the reversal of predisposing conditions. In addition, posaconazole can be used as a rescue and/or deescalation treatment, since it is one of the few active azole antifungals against these fungi. More recently, isavuconazole was included in the antifungal arsenal for the treatment of invasive mucormycosis (especially for patients intolerant to amphotericin B).

Azole antifungals act by inhibiting the synthesis of ergosterol by interacting with the 14- $\alpha$  sterol demethylases, encoded in filamentous fungi by the *CYP51* genes. The molecular mechanisms of resistance of Mucorales to voriconazole are not known. In contrast, the mechanisms of azole resistance reported in other human pathogenic filamentous fungi, such as *Aspergillus* spp., include the overexpression of *CYP51A* and/or point mutations in the *CYP51A* gene.

For these reasons and as an attempt to solve this problem, we propose to study the molecular mechanisms of resistance of *R. oryzae* to voriconazole and evaluate new therapeutic options. To meet these general objectives we set out to:

Study the nucleotide sequences of the *CYP51* genes of *R. oryzae* (*RoCYP51*).

Assess whether the natural resistance of *R. oryzae* to voriconazole is associated with the amplification of the copy number of the *CYP51* genes.

Prove that intrinsic resistance to voriconazole in *R. oryzae* is exclusively due to the *CYP51* gene by obtaining defective strains of *R. oryzae* in the named gene and replacing the *CYP51A* gene of *A. fumigatus* (*AfCYP51A*) with its homologous *R. oryzae* gene.

Evaluate combinations of antifungal and unconventional drugs against different strains of Mucorales, in vitro and in vivo.

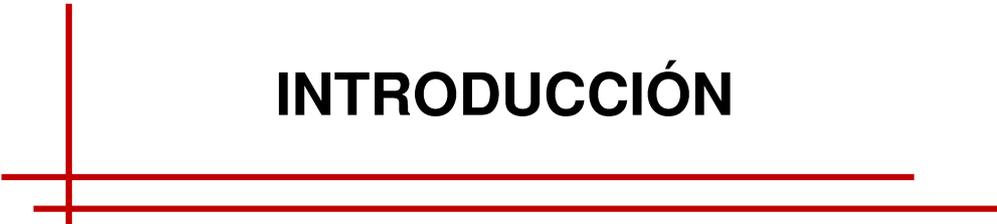
Two paralogous *CYP51* genes were identified and characterized in the *R. oryzae* genome. They were classified as *CYP51A* and *CYP51B* based on the similarity of sequences they presented with other known fungal *CYP51* genes. We also studied the *RoCYP51A* gene as a potential cause of intrinsic resistance to voriconazole and fluconazole.

The relative quantification of both *RoCYP51* genes was performed by qPCR using the actin gene (*ACT1*) of *R. oryzae* as the reference gene. No variation in gene quantification was observed between the *RoCYP51A* and *ACT1* gene nor between the *RoCYP51B* and *ACT1* gene. Therefore, *R. oryzae* resistance to voriconazole would not be associated with amplification of the copy number of *CYP51* genes.

It was not possible to transform *R. oryzae* by electroporation but a novel method of mutant selection in *CYP51* was established in filamentous fungi based on the use of a strain of *A. fumigatus* deficient in the *KU80* and *CYP51A* genes and fluconazole as a selector agent. This methodology was used to obtain a chimeric *A. fumigatus* strain, with a functional *R. oryzae CYP51A* gene, expressed under the regulation of the promoter and terminator of wild *AfCYP51A*. Fluconazole resistant mutants were selected, after transformation, with a new procedure taking advantage of the hypersensitivity of the fluconazole receptor *A. fumigatus* strain. The azole sensitivity patterns of *A. fumigatus* mutants with *RoCYP51A* exactly mimicked the same azole sensitivity values as the Mucoral under study. This information demonstrated that the coding sequence of the *RoCYP51A* gene is solely responsible for the azole sensitivity patterns of *R. oryzae*.

Then we proceeded with the search for specific amino acid residues that may be involved in the resistance phenotype. Comparisons between the sequences of the Cyp51Ap proteins of *R. oryzae* and *A. fumigatus* showed differences in amino acid residues that were already associated with voriconazole resistance in *A. fumigatus*. It was decided to study these amino acids, for which *A. fumigatus* mutants were generated with *RoCYP51A* harboring the different substitutions. The natural substitution F129Y was shown to have an implication in resistance to voriconazole and in reduced sensitivity to posaconazole.

Regarding the search for therapeutic alternatives to determine if better results could be achieved in the treatment of mucormycosis, the *in vitro* activity of eight drugs, alone and in combination with voriconazole, was evaluated against 25 Mucoral strains. Unconventional drugs such as amiodarone, nifedipine, lansoprazole and disulfiram had no antifungal activity against any of the strains tested. For classic antifungals, amphotericin B and posaconazole were the most active drugs when evaluated alone. In addition, species-specific differences were observed. Regarding drug interaction, the results obtained varied according to the combination tested. Few strains showed synergism when faced with combinations of voriconazole with posaconazole and / or amphotericin B. However, microscopic alterations in the development of hypha were observed for some isolates when these Mucorales faced the combinations of voriconazole with posaconazole, amphoteric B and caspofungin. To assess whether microscopic alterations of hyphae had an impact *in vivo*, a *G. mellanolla* mucormycosis model was used. A better survival was observed in the combined treatments of voriconazole with amphotericin B and with caspofungin, compared to amphotericin B alone for *R. microsporus*. This greater survival was obtained using a 32 times lower dose of amphotericin B when combined with voriconazole than when used alone. These lower antifungal doses emulate the antifungal concentrations where microscopic alterations of hyphae were observed. Thus, a relationship of the results could be established *in vitro* (microscopic alterations of hyphae) - *in vivo*.



# **INTRODUCCIÓN**

# 1.- INTRODUCCION

## 1.1. Mucormicosis

### 1.1.1. Concepto

Las mucormicosis son un grupo de micosis oportunistas causadas por hongos del orden Mucorales. Estas infecciones fúngicas son de rápida progresión, con alta morbilidad y mortalidad y se presentan en pacientes inmunocomprometidos como casos aislados o como brotes intrahospitalarios. Las formas clínicas son variadas pero en todos los casos son graves. Los pacientes con mayor riesgo de sufrir mucormicosis son en general, diabéticos mal controlados, traumatizados, dializados con tratamientos quelantes del hierro, inmunocomprometidos (pacientes trasplantados, oncohematológicos, quemados, tratados con corticoides, etc.) aunque existen casos en los que no existe un factor predisponente claro [1], [2], [3].

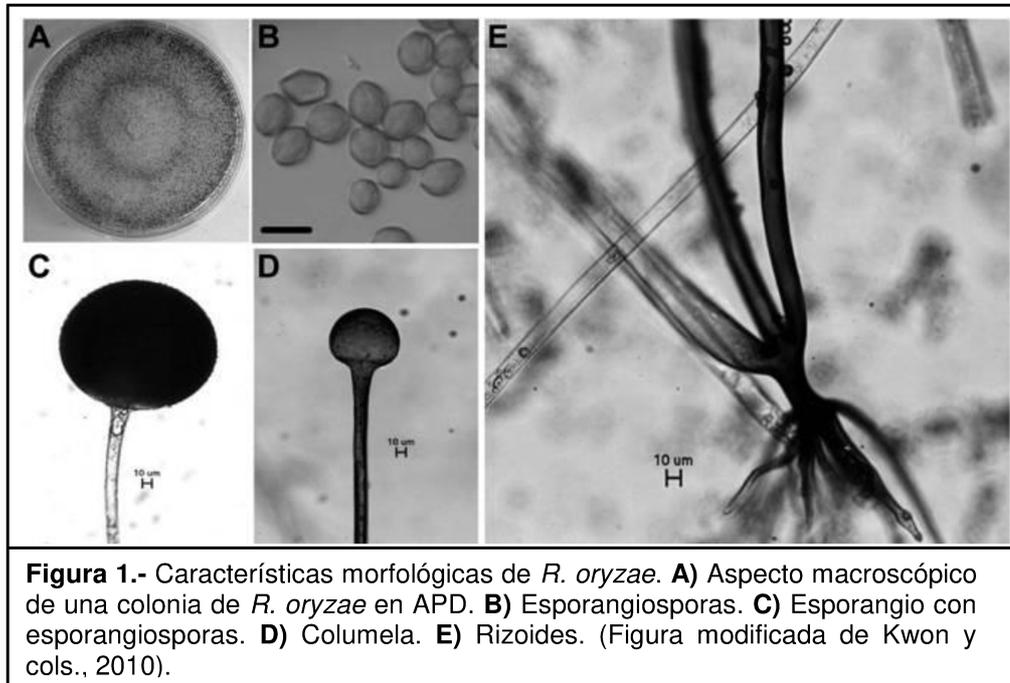
### 1.1.2. Etiología y Epidemiología: hongos del orden Mucorales y *Rhizopus oryzae*.

Los Mucorales son hongos termotolerantes, cosmopolitas y ubicuos en la naturaleza. En general, son considerados saprofitos del suelo, las plantas, la materia orgánica en descomposición y el medio ambiente [4].

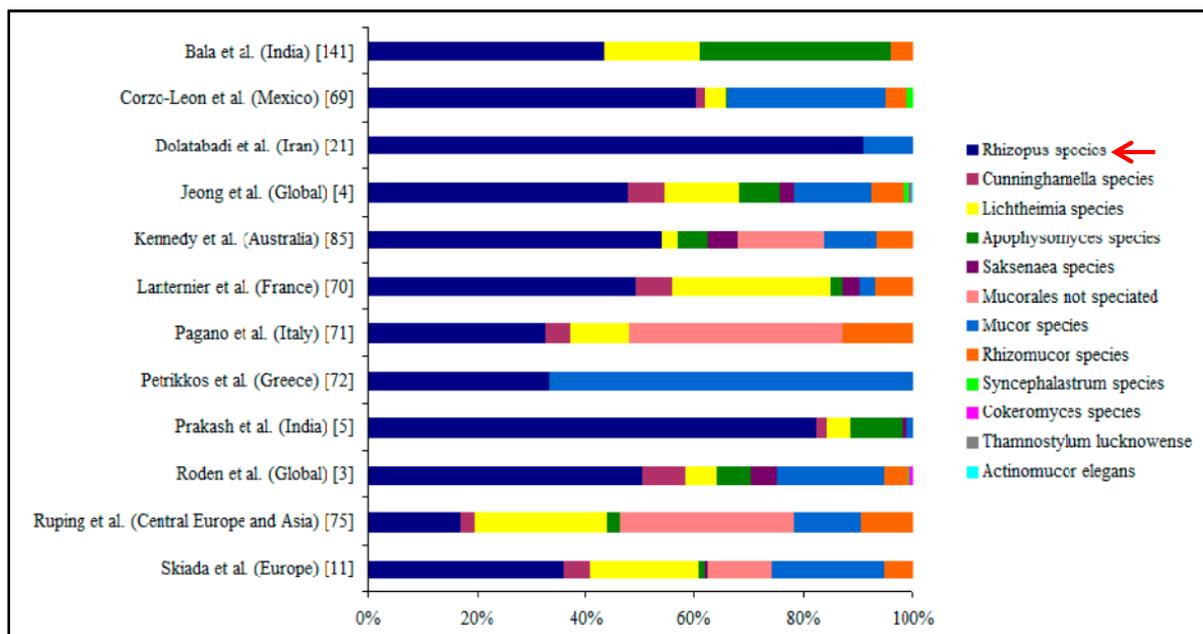
El número de géneros de Mucorales patógenos humanos va aumentando año a año a medida que se mejoran los métodos de diagnósticos y de taxonomía. En la actualidad, once géneros y más de 27 especies de Mucorales se han asociados con infecciones humanas. Dentro de los agentes etiológicos de mucormicosis destacan por su prevalencia *Rhizopus* spp., *Mucor* spp. y *Lichtheimia* spp. (*Absidia* spp.), seguidos por *Rhizomucor* spp., *Cunninghamella* spp. (*Cunninghamella bertholletiae*), *Syncephalastrum* spp. y *Saksanaea* spp. (*Saksanaea vasiformis*).

Los hongos del género *Rhizopus* se caracterizan por un rápido crecimiento y germinación. En el laboratorio se desarrollan con facilidad en medios de cultivo comunes, como Agar Papa Dextrosa (APD). Forman colonias vellosas, de color blanco al principio y con el envejecimiento se tornan de color gris oscuro, debido a la aparición de las endosporas. Presentan un micelio ramificado formado por tres tipos de hifas anchas y no tabicadas: estolones, esporangiofóros y rizoides. En el punto donde se conecta el esporangioforo y el estolón se forma el rizoide. Las endosporas o esporangiosporas se encuentran dentro del

esporangio, una estructura membranosa y globulosa. El mismo está sostenido por el esporangioforo, hifa larga y no ramificada, que presenta una prolongación dentro de la cavidad del esporangio denominada columela [5] (**Figura 1**).

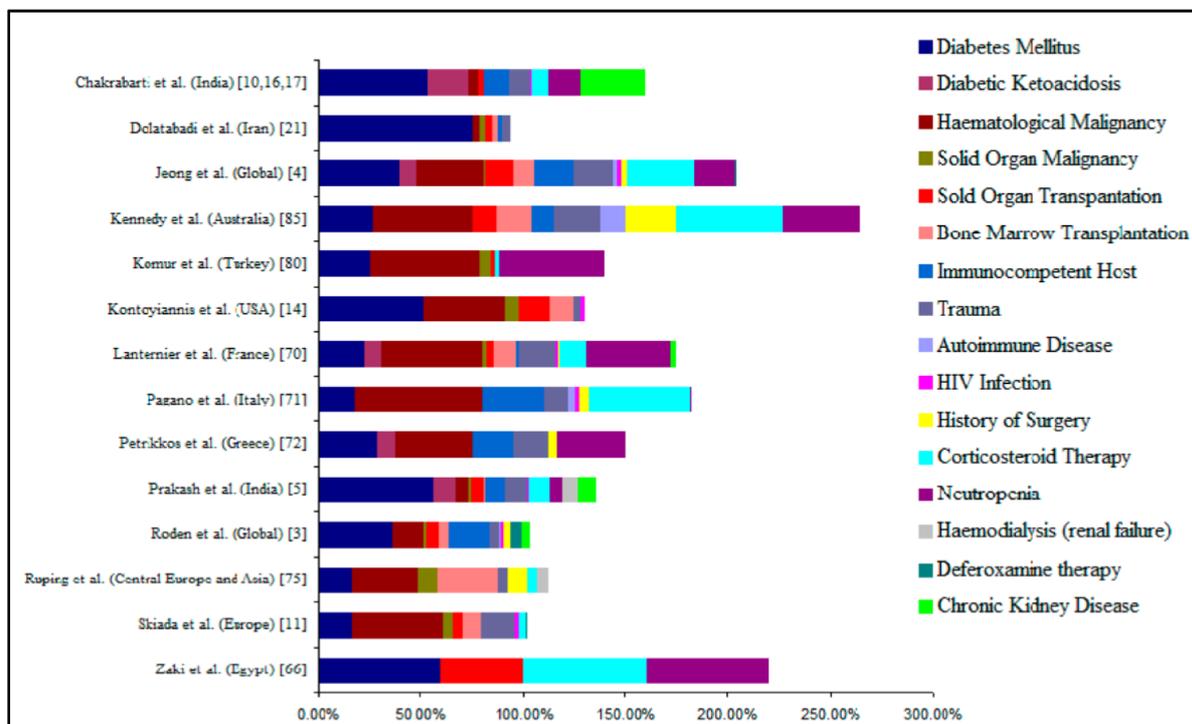


La especie de mayor interés médico dentro del género *Rhizopus* es *Rhizopus arrhizus* (Syn: *R. oryzae*), ya que es el organismo más comúnmente aislado de pacientes con mucormicosis y es responsable del 70% de los casos mundiales [6], [7], [8], [9]. Por su parte, *Rhizopus microsporus* es el principal agente causal de mucormicosis en Argentina [10], [11], [12]. Actualmente el nombre de *R. oryzae* está en discusión por parte de taxónomos. *Rhizopus arrhizus* fue descrita tres años antes que *R. oryzae*. Esta descripción, a diferencia de la de *R. oryzae*, fue breve, sin figuras, y no se mencionó ningún tipo nomenclatural, por lo cual muchos los autores prefirieron usar el nombre *R. oryzae*. Más tarde, se designó una cepa ex-neotipo para *R. arrhizus*, legitimando así el nombre *R. arrhizus* y teniendo prioridad. Debido a que la cepa ex-tipo de *R. oryzae* se agrupa en el mismo *cluster* que la cepa ex-neotipo de *R. arrhizus*, *R. oryzae* debe tratarse como sinónimo de *R. arrhizus* [13]. Durante esta tesis, decidimos utilizar el nombre *R. oryzae* ya que es el de mayor uso a nivel clínico. A partir de este punto, utilizaremos solamente el nombre *R. oryzae*. En la **Figura 2** se muestran especies de Mucorales en varios trabajos alrededor del mundo.



**Figura 2.-** Agentes causales de mucormicosis. (Figura modificada de Prakash y cols., 2019)

Además, en la bibliografía se ha reportado la existencia de diferencias epidemiológicas entre países desarrollados y en desarrollo, tanto en los factores predisponentes como en la frecuencia [14] (**Figura 3**). También se vio que las variaciones estacionales afectan la incidencia de mucormicosis, y la mayoría de las infecciones ocurren durante el otoño [15].



**Figura 3.-** Enfermedad subyacente / factores de riesgo asociados con mucormicosis. (Figura modificada Prakash y cols., 2019)

En varios estudios epidemiológicos de la década de 1980 sobre la frecuencia de las mucormicosis, se llegó a la conclusión de que estas micosis representaban solo el 5-12% del total de las infecciones fúngicas invasoras (aproximadamente 0,5 casos por millón de habitantes/año en EEUU) [16], [17]. En la década de 1990, y debido al aumento del número de pacientes inmunocomprometidos, la incidencia de esta micosis en países desarrollados llegó a ser de 1,2 y 1,7 casos por millón de habitantes/año [18], [19], [20]. Actualmente, se considera que esta proporción es mayor debido sobre todo al aumento del uso de voriconazol (VRC) como terapia antifúngica profiláctica (antifúngico activo contra la mayoría de los Ascomicetes e inactivo frente a Mucorales) [21], [22], [23], [24], [25], [26], [27]. En Argentina, existen pocos datos epidemiológicos sobre la prevalencia/incidencia de las mucormicosis. En 2007 el Instituto Malbrán publicó una encuesta nacional donde se observó una muy baja frecuencia de estas micosis (0,78% del total de las micosis profundas). Este trabajo, y tal como lo sugieren los propios autores, no se refleja la incidencia real de esta patología debido al bajo número de muestras estudiadas [23]. Posteriormente, Tiraboschi y cols. demostraron que la frecuencia de estas infecciones aumentó 11 veces cuando se compararon los períodos 1980-2004 y 2005-2010 [28]. En los últimos años, se han publicado varios trabajos de casos clínicos de mucormicosis humanas en Argentina [11], [12], incluyendo casos aislados [29], [30], [31], brotes [10], [29], [32] , y la descripción de una especie de Mucorales nunca antes considerada patógena [33].

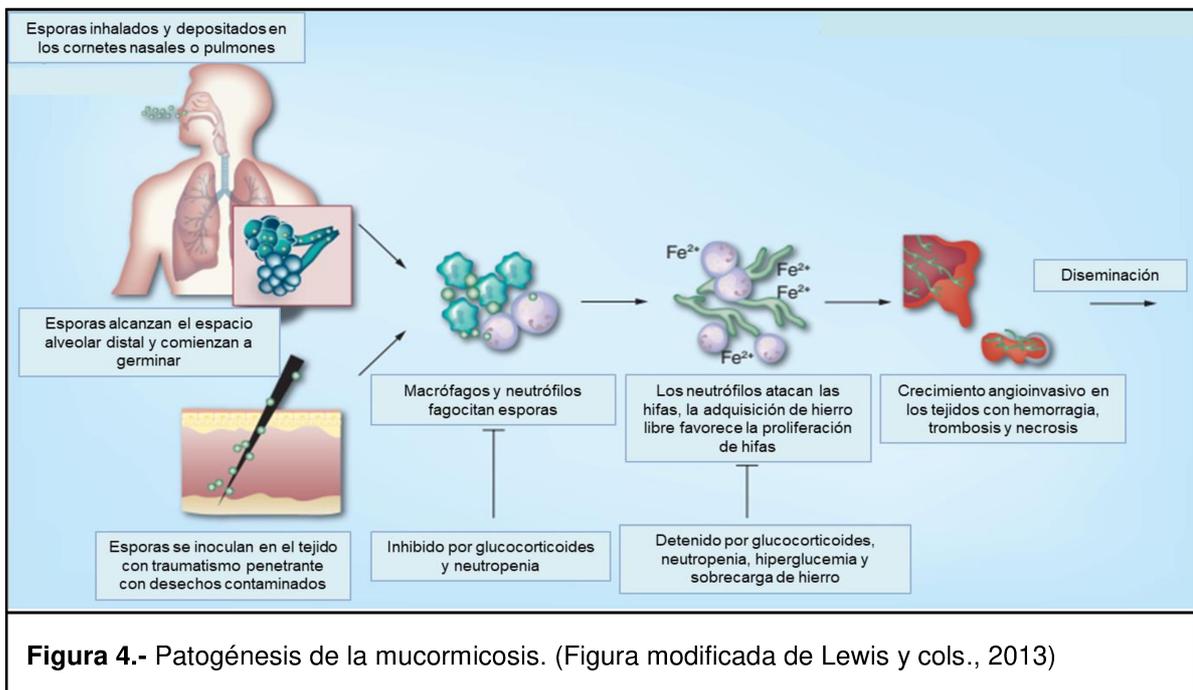
### 1.1.3. Patogenia

Los Mucorales se consideran patógenos oportunistas, es decir, requieren una deficiencia en el sistema inmunitario del huésped para causar la infección. En la **figura 3** se puede ver las enfermedades subyacentes y factores de riesgo asociados con mucormicosis.

Los Mucorales forman esporas pequeñas (3–11  $\mu\text{m}$ ) que se aerosolizan fácilmente y pueden ingresar al organismo humano por inhalación, inoculación local (por ej., lesión cutánea) o ingestión a través del tracto gastrointestinal. Las esporas de Mucorales inhaladas o inoculadas provocan una respuesta inflamatoria robusta en huéspedes sanos. Para establecer la infección se requieren ciertos pasos críticos, incluidos:

- Inoculación de esporas en el tejido del huésped (ej., piel o alvéolos, según el sitio de entrada). Evasión de la fagocitosis por macrófagos y neutrófilos.
- Germinación de los esporos transformándose en hifas (la forma angioinvasiva del hongo).

- Aumento de su crecimiento y virulencia aprovechando las condiciones individuales del huésped (por ejemplo, hiperglucemia, cetoacidosis, sobrecarga de hierro, neutropenia funcional o cuantitativa).
- Adhesión al endotelio a través de receptores específicos, induciendo posteriormente endocitosis y causando la enfermedad clínicamente aparente a través del daño endotelial, hemorragia, trombosis y necrosis tisular; y finalmente ingresando a la circulación y diseminándose de manera hematológica, lo que lleva a una enfermedad sistemática con compromiso multiorgánico (**Figura 4**) [34].



#### 1.1.4. Clasificación clínica de las mucormicosis

La principal característica clínica de la mucormicosis invasiva es la necrosis tisular resultante de la angioinvasión y la posterior trombosis. En el 95% de los casos, la infección progresa rápidamente y produce la muerte a menos que se corrijan los factores de riesgo subyacentes, se instituya un tratamiento agresivo con agentes antifúngicos y se extirpe quirúrgicamente la mayor cantidad de tejido afectado. Según su presentación clínica y el sitio anatómico afectado, las mucormicosis invasivas se clasifican como una de las siguientes 6 formas clínicas principales [2], [5], [7], [14], [35] :

1. Rinocerebral.
2. Pulmonar.
3. Cutánea.

4. Gastrointestinal.
5. Diseminada.
6. Formas raras poco frecuentes, como endocarditis, osteomielitis, peritonitis e infección renal.

Cualquiera de las especies de los Mucorales puede causar infección en estos sitios. En la **Tabla 1** se detalla la relación entre factor predisponente, vía de entrada y sitio de infección.

**Tabla 1.** Principales factores de predisposición y vía de entrada de las distintas formas clínicas de la mucormicosis.

<b>Forma clínica</b>	<b>Factores de predisposición</b>	<b>Vía de entrada</b>
Rinocerebral	Cetoacidosis diabética Corticosteroides	Inhalación
Pulmonar	Neutropenia Corticosteroides	Inhalación
Cutánea	Traumatismos, catéteres, sitios de inyección, piel macerada.	Inoculación local
Gastrointestinal	Malnutrición	Ingesta
Diseminada	Deferoxamina Neutropenia Corticosteroides	Hematógena

#### 1.1.4.1. Mucormicosis Rinocerebral

Es la forma clínica más común de la mucormicosis. Tras la germinación, el hongo puede invadir el paladar, el seno esfenoidal, el seno cavernoso involucrando las órbitas oculares o atravesar el hueso del cráneo para invadir el cerebro. Ocasionalmente, la invasión vascular cerebral puede conducir a la diseminación hematógena de la infección con o sin desarrollo de aneurismas micóticos que generan una escara necrótica negra (sello distintivo de la mucormicosis). Sin embargo, la ausencia de este hallazgo no debe excluir la posibilidad de mucormicosis. Los estudios de imágenes pueden ayudar a delinear el alcance de la invasión de tejidos. La tomografía computada y la resonancia magnética nuclear de

pacientes con mucormicosis del seno paranasal demuestran engrosamiento de la mucosa, erosión ósea, sinusitis con lesiones hipo a hiperintensas y destrucción de huesos en los tabiques nasales, órbita ocular, maxilar y mandíbula.

#### 1.1.4.2. Mucormicosis Pulmonar

El tipo pulmonar es el segundo en prevalencia. El hongo invade las paredes bronquiales y tejido peribronquial, provocando trombosis e infarto pulmonar. En general, el padecimiento se presenta como bronquitis o neumonía inespecífica o atípica. La sintomatología más común es fiebre moderada, tos con expectoración, hemoptisis, disnea y dolor torácico. A partir del foco pulmonar en raras ocasiones es posible que se disemine por vía hematógena a cerebro, intestino y piel. Los signos de mucormicosis pulmonar en las imágenes torácicas son inespecíficos e indistinguibles de los de la aspergilosis pulmonar. Los hallazgos más frecuentes incluyen infiltración, consolidación, nódulos, cavitaciones, derrame pleural y neumotórax.

#### 1.1.4.3. Mucormicosis Cutánea

Dependiendo de la extensión de la infección, la mucormicosis cutánea se clasifica como localizadas cuando afectan solo la piel o el tejido subcutáneo; profundas cuando se invade músculos, tendones o huesos; y diseminada cuando involucra otros órganos no contiguos al sitio inicial de la infección. La presentación típica de la mucormicosis cutánea es una escara necrótica acompañada de eritema circundante e induración.

#### 1.1.4.4. Mucormicosis Gastrointestinal

La mucormicosis gastrointestinal es poco frecuente y rara vez se diagnostica en pacientes vivos. Solo el 25% de los casos de mucormicosis gastrointestinal se diagnostican antemortem. Esta forma clínica puede ocurrir en cualquier parte del sistema alimentario, pero el estómago se ve afectado con mayor frecuencia, seguido por el colon y el íleon. Los pacientes suelen presentar dolor abdominal, sangrado gastrointestinal, distensión abdominal y diarrea.

#### 1.1.4.5. Mucormicosis Diseminada

El órgano más comúnmente asociado con la diseminación es el pulmón. La diseminación también ocurre desde el tracto alimentario, quemaduras y lesiones cutáneas extensas. Aunque el cerebro es un sitio común de diseminación, también se pueden encontrar lesiones metastásicas en el hígado, el bazo, el corazón y otros órganos. Sin el tratamiento adecuado, la mucormicosis diseminada siempre es mortal.

#### 1.1.4.6. Otras presentaciones

Otras formas menos comunes o inusuales de mucormicosis incluyen endocarditis, osteomielitis, peritonitis y pielonefritis. Específicamente, la mucormicosis es una causa rara de endocarditis protésica o valvular nativa. El uso intravenoso de drogas es el factor de riesgo típico. Aunque es raro, se debe sospechar mucormicosis renal en cualquier paciente inmunocomprometido que se presente con hematuria, dolor en el costado e insuficiencia renal anúrica inexplicada por otra causa.

#### 1.1.5. **Diagnóstico**

El diagnóstico temprano de la mucormicosis invasiva es de crucial importancia para realizar una intervención terapéutica a tiempo, mejorar la supervivencia y reducir la morbilidad. Esto va a depender de la disponibilidad de técnicas de imagen, personal capacitado y estudios micológicos e histológicos.

El diagnóstico de esta micosis comienza con un alto índice de sospecha, basado en el reconocimiento de los factores del huésped, la evaluación cuidadosa de las manifestaciones clínicas y el uso temprano de las técnicas de imagen (tomografía computada y resonancia magnética nuclear). Sin embargo, los síntomas, signos y manifestaciones radiográficas de la mucormicosis son inespecíficos, y el diagnóstico definitivo requiere la identificación directa de las hifas características de los Mucorales (por microscopia directa y/o histopatológica) y la recuperación del hongo en cultivos a partir de muestras obtenidas del sitio de infección (lavado broncoalveolar (BAL), fluidos corporales estériles, biopsia del órgano afectado) [36].

Por otro lado, la identificación exacta del Mucoral a nivel de género y especie es importante no solo desde el punto de vista epidemiológico, sino también terapéutico, ya que los Mucorales presentan distintos perfiles de sensibilidad antifúngica. Ésta identificación se basa en el cultivo, evaluando la morfología de la colonia, la morfología microscópica y la temperatura de crecimiento [9], [37].

Con respecto a las herramientas moleculares para la detección e identificación de Mucorales, las técnicas utilizadas incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), secuenciación de regiones específicas de ADN (ITS), espectrometría de masas (MALDI-TOF MS), entre otras [9], [37], [38], [39].

## 1.2. Sensibilidad *in vitro* de *R. oryzae* a los antifúngicos

Los métodos de referencia (CLSI y EUCAST) actualmente implementados para las pruebas de sensibilidad *in vitro* de hongos filamentosos a los antifúngicos [40], [41] han sido validados y se recomiendan para evaluar los aislamientos de Mucorales [42]. En ambos documentos de referencia se describen los métodos de determinación *in vitro* de las concentraciones inhibitorias mínimas (CIMs) de los antifúngicos que se emplean en el tratamiento de las infecciones por hongos filamentosos. Estos documentos definen el medio de cultivo, las concentraciones y el solvente a utilizar para cada tipo de antifúngico, la forma de preparar el inóculo, la temperatura y el tiempo de incubación, así como criterios de lectura y de interpretación de resultados. Métodos comerciales como el E-test<sup>®</sup> (AB-Biodisk) utilizados para otros hongos filamentosos, como *Aspergillus*, no están recomendados para usarse en Mucorales [43].

Los resultados obtenidos en distintos trabajos mostraron que *R. oryzae* es resistente a la mayoría de los antifúngicos. Por un lado, el grupo de antifúngicos pertenecientes a las equinocandinas no presentan actividad *in vitro* frente a los Mucorales en general. Por otro lado, entre los antifúngicos triazólicos, *R. oryzae* presenta resistencia intrínseca a fluconazol (FLC) y VRC. Por su parte, itraconazol (ITC) tienen poca o ninguna actividad contra los *R. oryzae*. Los triazoles más nuevos, posaconazol (PSC) e isavuconazol (ISAV), tienen una mejor actividad *in vitro* contra este Mucoral. El antifúngico poliénico Anfotericina B (AMB) es la droga más activa contra *R. oryzae* y el tratamiento de elección para estas micosis. [44], [45], [46], [47], [48], [49] [50].

Cabe aclarar que los datos de sensibilidad *in vitro* ayudan a elegir el tratamiento antifúngico adecuado, aunque el éxito o el fracaso terapéutico dependen de otros factores.

## 1.3. Tratamiento

El tratamiento de las mucormicosis representa un reto clínico debido a la escasez de opciones terapéuticas, a la limitada efectividad de los fármacos antifúngicos y a la toxicidad de algunos antifúngicos que limita su dosificación [6], [14], [51], [52]. En una guía global publicada recientemente [53], se han establecido pautas para el tratamiento de la mucormicosis. En la misma se describe que el manejo exitoso de la mucormicosis se basa en un enfoque multimodal, que incluye diagnóstico temprano, clínico y de laboratorio, inicio oportuno de una terapia antifúngica efectiva (monoterapia o terapia combinada) junto con un desbridamiento quirúrgico agresivo de lesiones necróticas; reversión de la

inmunosupresión (interrupción de la quimioterapia y aumento de neutrófilos), y cuando sea factible, control de la afección médica subyacente.

Con respecto a la terapia antifúngica, AMB se considera el fármaco de elección para el tratamiento primario de la mucormicosis. La eficacia de AMB se ha demostrado tanto en laboratorio (*in vitro* e *in vivo*) como en estudios clínicos. Las formulaciones lipídicas de anfotericina B (AMB liposomal, LAMB; y complejo lipídico de AMB, ABLC) tienen un mejor índice terapéutico que la AMB desoxicolato. En varios casos, el uso de AMB liposomal trató con éxito la mucormicosis con diversos patrones de afectación de órganos, utilizando dosis diarias que variaron entre 1 mg/kg por día a 10 mg/kg por día. Con respecto a la AMB desoxicolato, si bien ha sido el fármaco de elección por décadas y es efectivo, su uso está limitado por su toxicidad sustancial, específicamente en las dosis y duraciones de tratamiento necesarias para tratar las mucormicosis. Por lo cual, el uso de AMB desoxicolato debería restringirse a entornos en los que no hay otra terapia antimicótica disponible [52], [53]. Los nuevos triazoles, PSC e ISAV, se utilizan como terapia de desescalamiento (step-down) posterior al tratamiento con AMB o como terapia de salvataje [9], [54], [55], [56]. A pesar de estos avances, la mortalidad sigue siendo inaceptable y, claramente, se necesitan nuevos enfoques [57].

### **Combinaciones de antifúngicos**

Como se ha descrito anteriormente, la mucormicosis sigue siendo una infección oportunista de mal pronóstico y con escasas alternativas terapéuticas. Esto ha estimulado el interés en el estudio de nuevas combinaciones de agentes antifúngicos, para determinar si se podrían alcanzar mejores resultados. Spellberg y cols. describieron las razones para estudiar una terapia de combinación particular para la mucormicosis [58]. Dentro de estas razones se incluye que: los agentes ya estén aprobados para su uso en humanos, esté comprobada la mejoría de la supervivencia en modelos animales y sean efectivos y seguros. Siguiendo estas premisas, se publicaron varios trabajos con resultados variables. La mayoría de ellos, describiendo la efectividad de diferentes combinaciones evaluadas empíricamente (probadas *in vivo*, sin una evaluación previa *in vitro*) utilizando modelos murinos de infección. Estos estudios incluyeron combinaciones de AMB con diferentes equinocandinas y / o quelantes de hierro y la combinación de un azol (activo *in vitro* contra Mucorales como ISAV y PSC), con equinocandinas y con inhibidores de la vía de la calcineurina [59], [60], [61], [62], [63], [64], [65].

En general, el uso de una combinación de drogas antimicrobianas comienza con pruebas *in vitro* que muestran interacciones positivas en cuanto a la inhibición del crecimiento de los microorganismos en estudio. Existen muchos modelos de diseños experimentales para

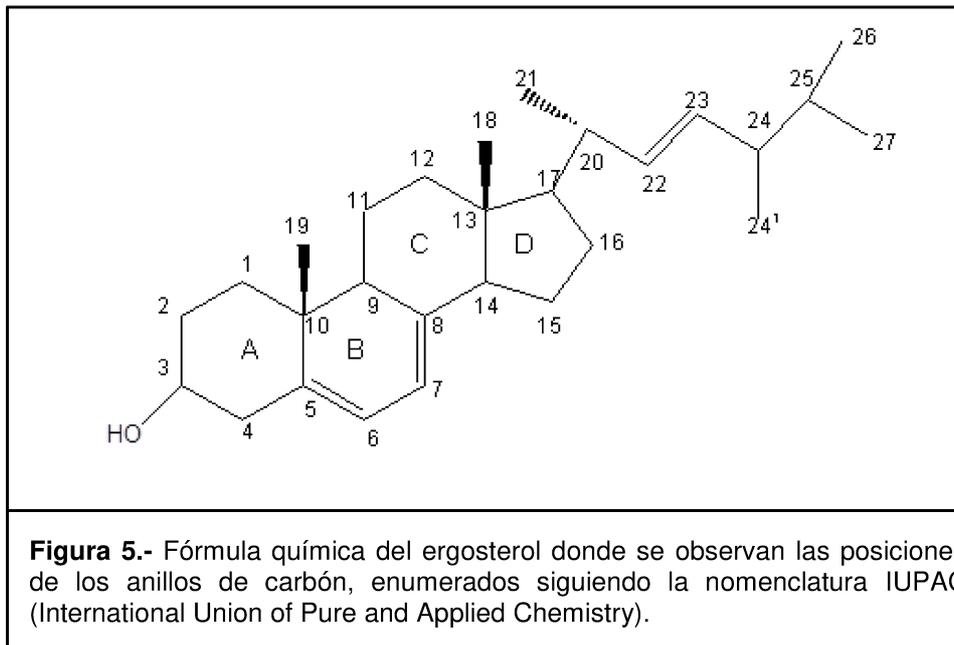
medir tales efectos de combinación. Una de las formas más conocidas y simples de estas pruebas es el experimento *Chequerboard* o tablero de ajedrez [66], en el cual la naturaleza e intensidad de la interacción se mide mediante el cálculo de una concentración inhibitoria fraccional (Índice FIC). El índice FIC se interpreta como: “efecto sinérgico” ( $FIC \leq 0.5$ ), “no interacción” ( $FIC > 0.5$  pero  $< 4$ ) y “efecto antagónico” ( $FIC > 4$ ). En la práctica, la sinergia o antagonismo calculado de esta manera es equivalente a una reducción o un aumento, respectivamente, de al menos 2 escalones de dilución en la CIM de la combinación en comparación con las CIMs de las drogas solas [66].

A pesar de todo lo expuesto anteriormente, se considera que una de las falencias de la Micología clínica actual es la inexistencia de un tratamiento totalmente efectivo para la mucormicosis.

#### **1.4. Principal diana de las drogas antifúngicas disponibles: Vía de síntesis del ergosterol**

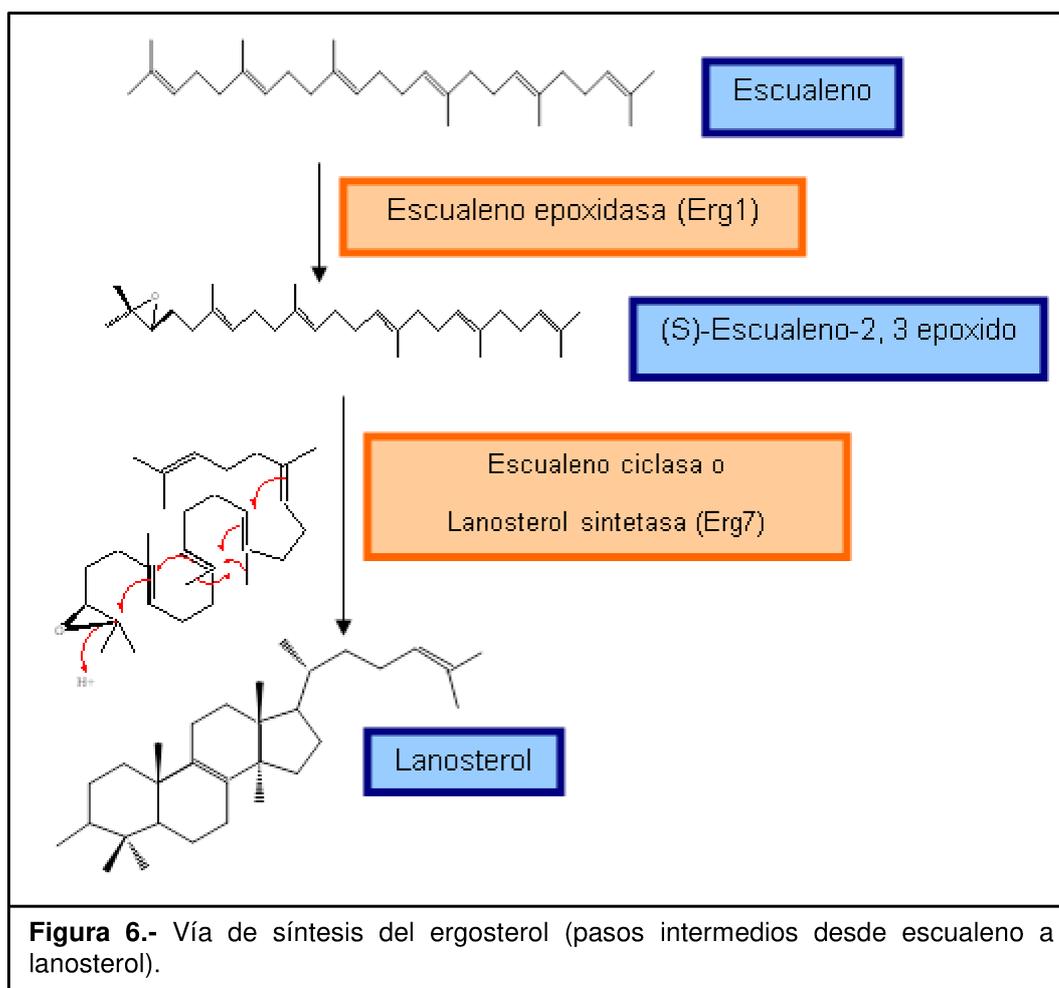
El ergosterol es el esteroide de membrana más abundante en la mayoría de las especies fúngicas. Su función es regular la fluidez y asimetría de la membrana y por tanto, la integridad de la misma [67].

El ergosterol, también participa en la regulación hormonal del ciclo celular [68]. Es la diana de la mayoría de los antifúngicos, ya sea directamente o disminuyendo su síntesis. Así, las alilaminas inhiben la escualeno epoxidasa, los azoles inhiben la 14-alfa esteroide demetilasa, las morfolinas que inhiben la C-14 esteroide reductasa y los polienos que actúan uniéndose a la molécula del ergosterol [67], [69], [70] (**Figura 5**).



La vía de síntesis del ergosterol, está relativamente bien estudiada en *Saccharomyces cerevisiae*, y ha sido tomada como modelo para el estudio de las vías metabólicas de los hongos y eucariotas en general.

La biosíntesis del ergosterol puede dividirse en dos bloques fundamentales. Una primera parte, hasta la síntesis del escualeno y una segunda parte hasta la síntesis de ergosterol. La síntesis de escualeno se produce por la sucesión de pasos enzimáticos, que comienzan con acetil-coA y que es común para los reinos animal, vegetal y *Fungi* [71]. A partir de esta molécula y con la acción catalítica de la escualeno epoxidasa (Erg1p en *S. cerevisiae*) y la oxido escualeno ciclasa o lanosterol sintasa (Erg7p), se produce la primera molécula cíclica de la vía, el lanosterol (Nombre IUPAC: 5 $\alpha$ -lanosta-o, 24-en-3 $\beta$ -ol) (**Figura 6**).



Desde lanosterol a ergosterol se producen, al menos, nueve reacciones enzimáticas en *S. cerevisiae* [72]. De estas reacciones, tres son demetilaciones esenciales para la producción del esteroide de membrana correspondiente, colesterol en mamíferos, sitosterol en plantas o ergosterol en hongos.

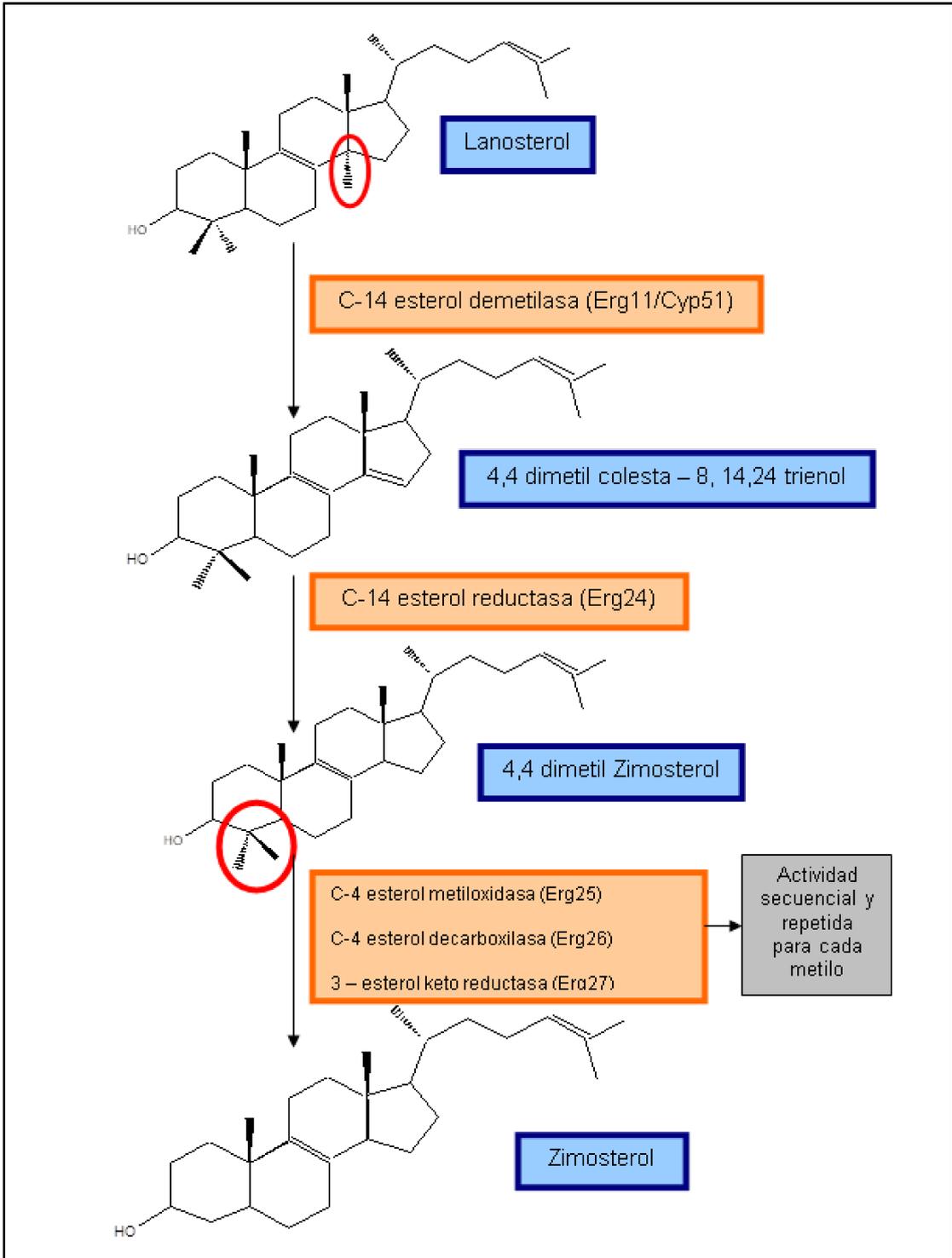
La primera de estas reacciones se produce directamente sobre el lanosterol con la eliminación del grupo metilo de la posición C-14. La demetilación del lanosterol se produce con ayuda de la 14- $\alpha$  esteroide demetilasa (Erg11p/Cyp51p), producto del gen *ERG11* en levaduras o sus ortólogos en hongos filamentosos llamados *CYP51*. Este paso se describirá en profundidad más adelante.

El resultado de esta reacción es la generación de 4,4 dimetil colesta-8,14,24 trieno, que tiene como característica determinante la presencia de un doble enlace en la posición C-14, que impide las demetilaciones en posición C-4. Por lo tanto, como paso previo a las siguientes demetilaciones, se produce una reducción del C-14 que permite la actividad de la primera demetilasa. Este enzima, la C-14 esteroide reductasa, está codificada por el gen

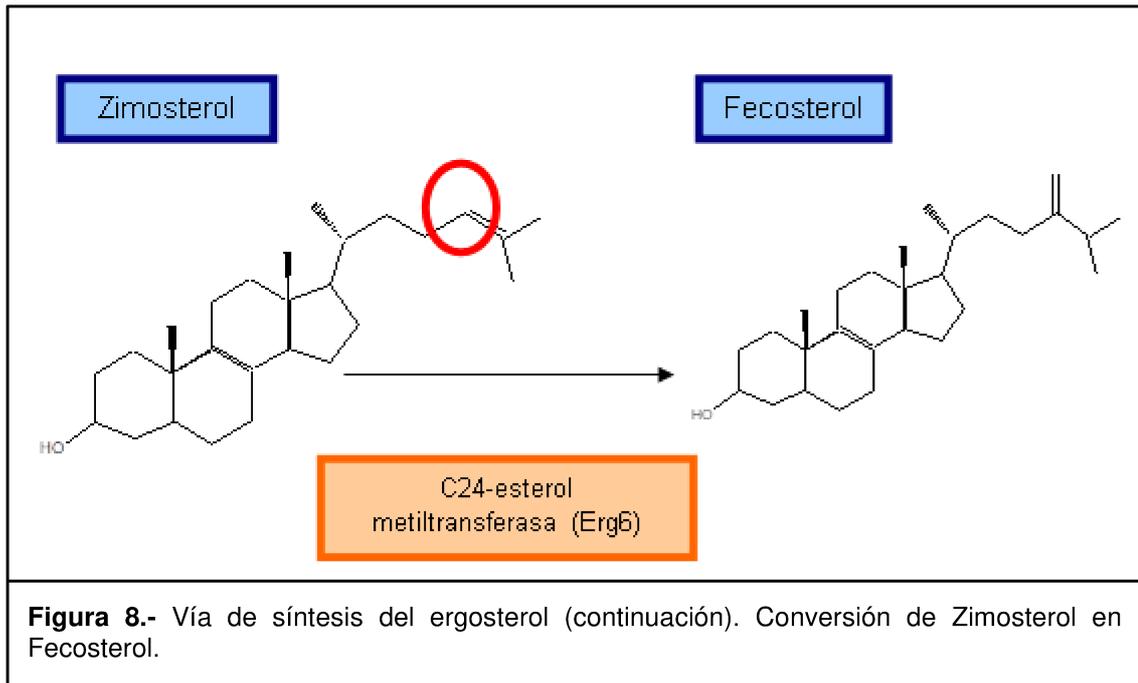
*erg24* en *S. cerevisiae*, es la diana de las morfolinás, y paso esencial para la supervivencia de la levadura en presencia de oxígeno [73], [74], [75] (**Figura 7**).

Las demetilaciones restantes se producen en forma secuencial y dan como resultado, la formación de zimosterol (nombre IUPAC: colestá-8,24-dien-3 $\beta$ -ol) que se produce por la pérdida de los dos grupos metilos de la posición C-4 [76]. Estos pasos de demetilaciones sucesivas son los que peor se conocen en la vía de síntesis del ergosterol en hongos (**Figura 7**). Aun así, se ha podido saber, que la demetilación es específica para cada grupo metilo y que se produce por una oxidación secuencial que requiere NADH, oxígeno y citocromo B como donador de electrones. En esta reacción participarían una C-4 esteroil metiloxidasa (Erg25p), una C-4 esteroil decarboxilasa (Erg26p) y una 3-keto reductasa (Erg27p) [76], [77], [78], [79], [80], [81], [82].

Una vez que la parte cíclica de la molécula ha sido completamente demetilada, el paso siguiente es la metilación en el carbono C-24 de la cadena lateral, para obtener fecosterol (nombre IUPAC: ergosta-8,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol), un esteroil de 28 carbonos (número de carbonos característicos del ergosterol y que diferencia los precursores del ergosterol de los del colesterol) (**Figura 8**). En *C. albicans* y *S. cerevisiae*, la enzima que realiza esta demetilación es la C-24 esteroil metiltransferasa, codificada por el gen *erg6* [83], [84]. Además, se ha demostrado que en *S. cerevisiae* el producto de este gen es esencial para el funcionamiento normal de la membrana plasmática [85].

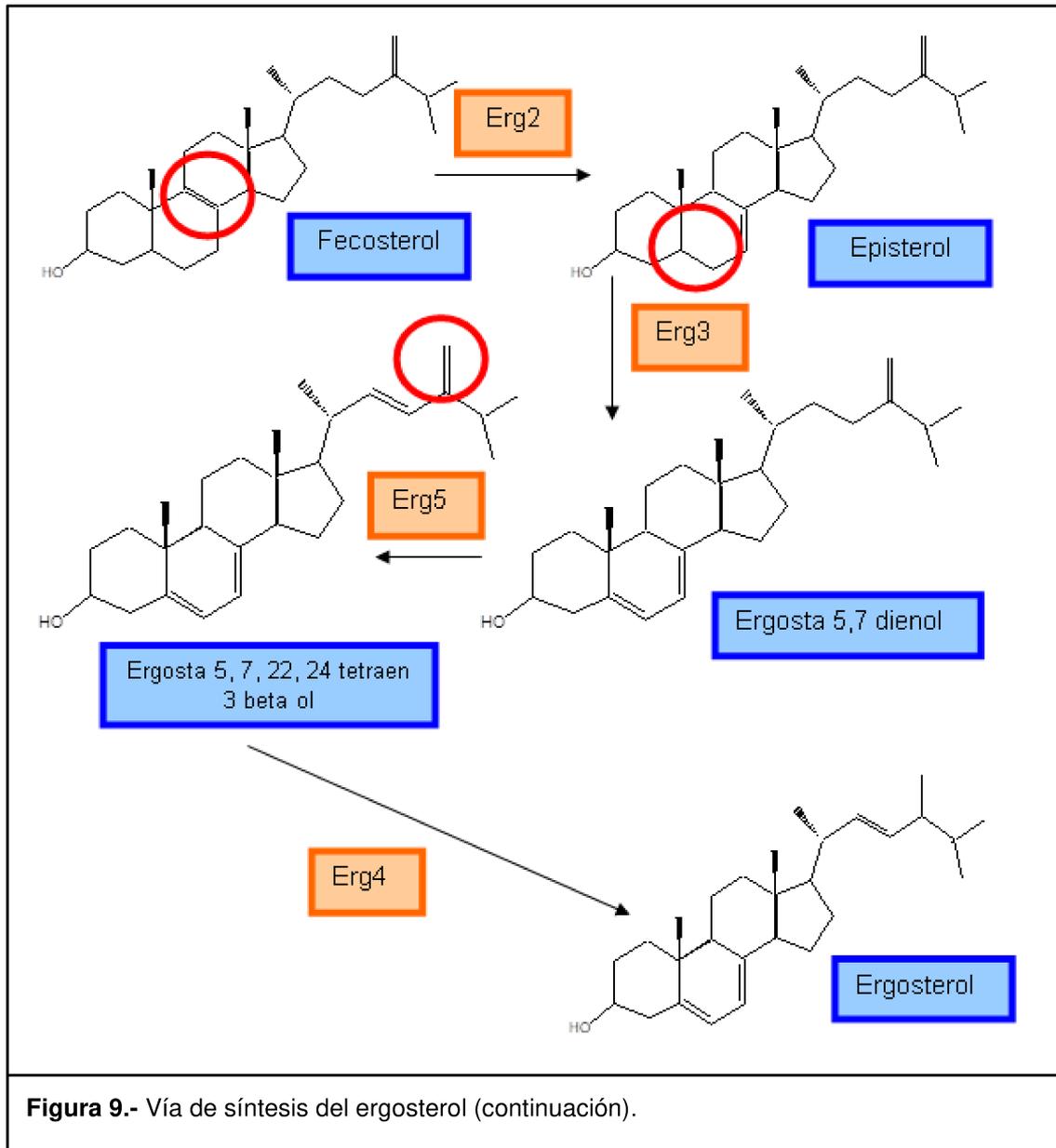


**Figura 7.-** Vía de síntesis del ergosterol (continuación).



Los dos pasos siguientes en la biosíntesis del ergosterol tienen la función de desaturar el ciclo B (Figura 5), en el C-8 y C-5. Los enzimas encargados de estos pasos son la C-8 esterol isomerasa (Erg2p) [86], [87] y la C-5 esterol desaturasa (Erg3p). La primera cambia el doble enlace entre los carbonos 8 y 9 por uno entre los carbonos 7 y 8, mientras que la segunda genera un doble enlace nuevo entre los carbonos 5 y 6. La C-5 esterol desaturasa ha sido caracterizada en varias especies de *Candida* y en *S. cereviceae*, además se ha sugerido la posible relación con la resistencia a la AMB y/o a diversos antifúngicos azólicos [70], [88], [89], [90], [91], [92].

Los últimos pasos hasta el ergosterol son modificaciones de la cadena lateral del ergosta 5,7–dienol. Estas transformaciones incluyen una desaturación en el C-22 catalizada por el enzima C–22 esterol desaturasa (Erg5p) y una reducción en el C-24 realizada por la C-24 esterol reductasa (Erg4p) [83], [93], [94] (**Figura 9**).

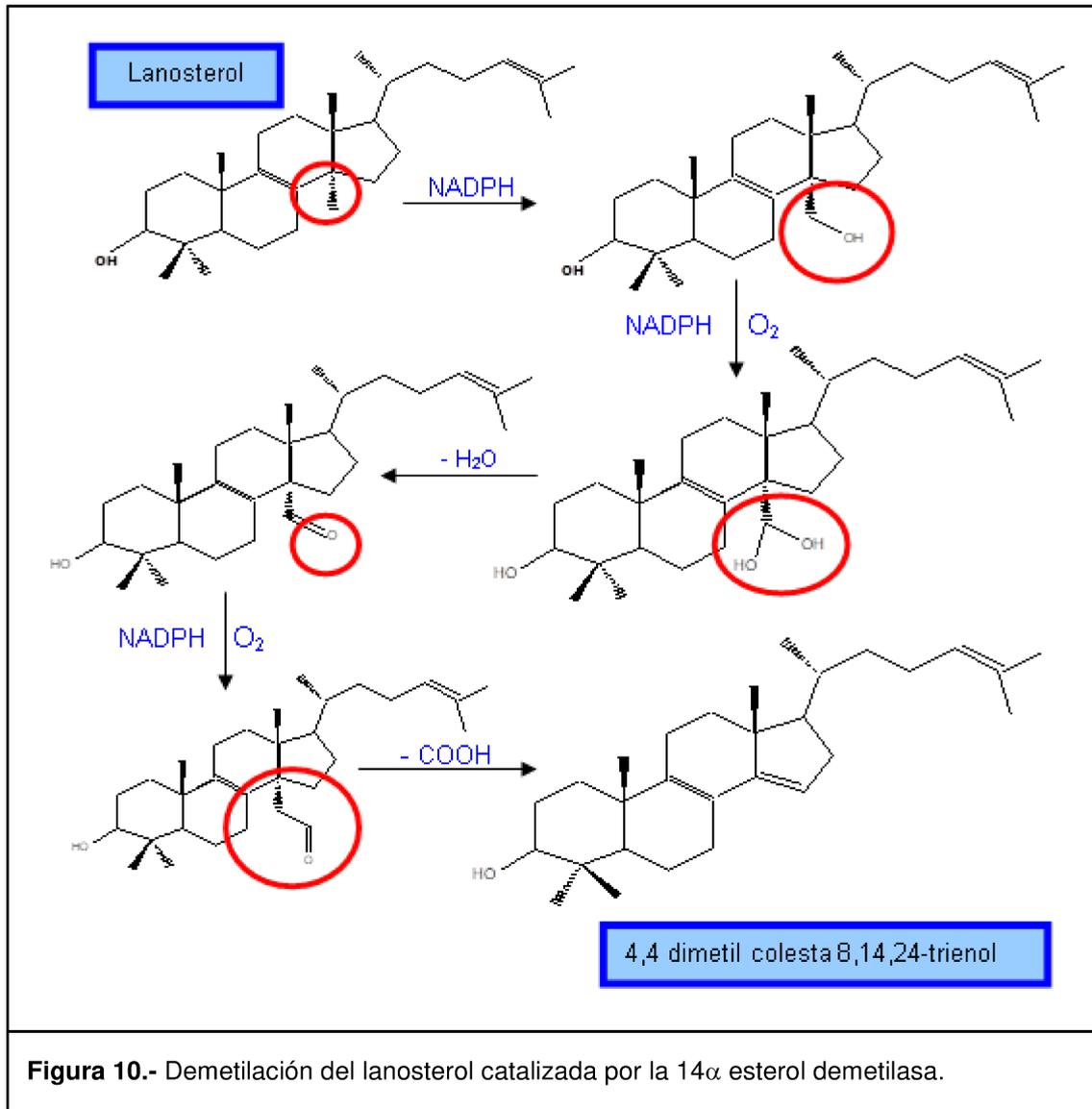


#### 1.4.1. Demetilación de esteroides en el C-14

Las  $14\text{-}\alpha$  esteroides demetiladas (Erg11p/Cyp51p) son enzimas clave en la biosíntesis del ergosterol. El Cyp51 es un citocromo P450, perteneciente a la superfamilia de las monoxigenasas, que presenta un sitio activo con el grupo hemo [95].

En los hongos, las  $14\text{-}\alpha$  esteroides demetiladas son codificadas por los genes *ERG11/CYP51*, según se trate de levaduras o hongos filamentosos, respectivamente [96].

Durante el ciclo catalítico, el lanosterol sufre tres reacciones de monooxigenación sucesivas, que dan como resultado la formación de los derivados 14 hidroximetil, 14 carboxaldehído y 14 formil, seguidos de la eliminación de ácido fórmico, con la introducción de un doble enlace entre los carbonos 14 y 15. Durante estas reacciones se consume oxígeno y NADPH [97], [98] (**Figura 10**).



### 1.5. Genes que codifican las 14- $\alpha$ esterol demetilinas (*CYP51/ERG11*)

Los genes *ERG11/CYP51* de muchas especies fúngicas (levaduras y filamentosas) patógenas humanas y de plantas han sido clonados y caracterizados [99], [100], [101], [102], [103], [104]. Estas proteínas son los blancos moleculares de los antifúngicos azólicos [67].

En levaduras, estas enzimas son codificadas por un único gen (*ERG11*) y cuyo sustrato es el lanosterol [105]. En cambio, en *Aspergillus* spp. se han identificado dos genes (*CYP51A* y *CYP51B*) que codifican distintas enzimas 14 alfa esterol demetilasa que utilizan como sustrato al lanosterol (Cyp51Ap) y al lanosterol y eburicol (Cyp51Bp) [99]. Se planteó que *AfCYP51B* se expresa constitutivamente y participa en la tasa de crecimiento y el mantenimiento de la célula fúngica [106], mientras que la expresión de *AfCYP51A* es inducida por la presencia de azoles. Diferentes estudios clínicos han sugerido que *AfCYP51B* es un gen redundante cuya expresión se vuelve importante cuando *AfCYP51A* está ausente [107], [108].

En Mucorales se conoce poco sobre estas enzimas y la vía de síntesis en la que participan. Recientemente se secuenció una cepa clínica de *R. oryzae* [109]. Este hongo tendría un importante número de familias génicas repetidas. Esta duplicación genómica podría alcanzar a la vía de síntesis del ergosterol, donde varios de sus genes (incluyendo el *CYP51*) estarían presente en copias múltiples [109].

## **1.6. 14- $\alpha$ esterol demetilasa (Cyp51p): la diana de los antifúngicos azólicos.**

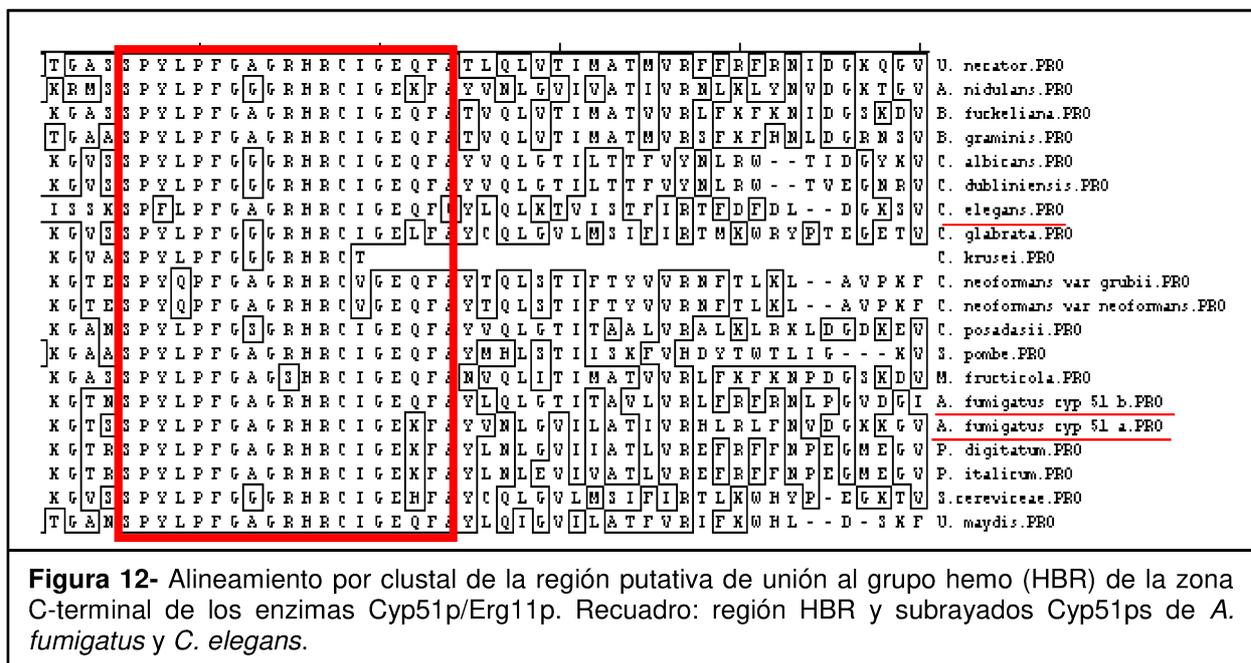
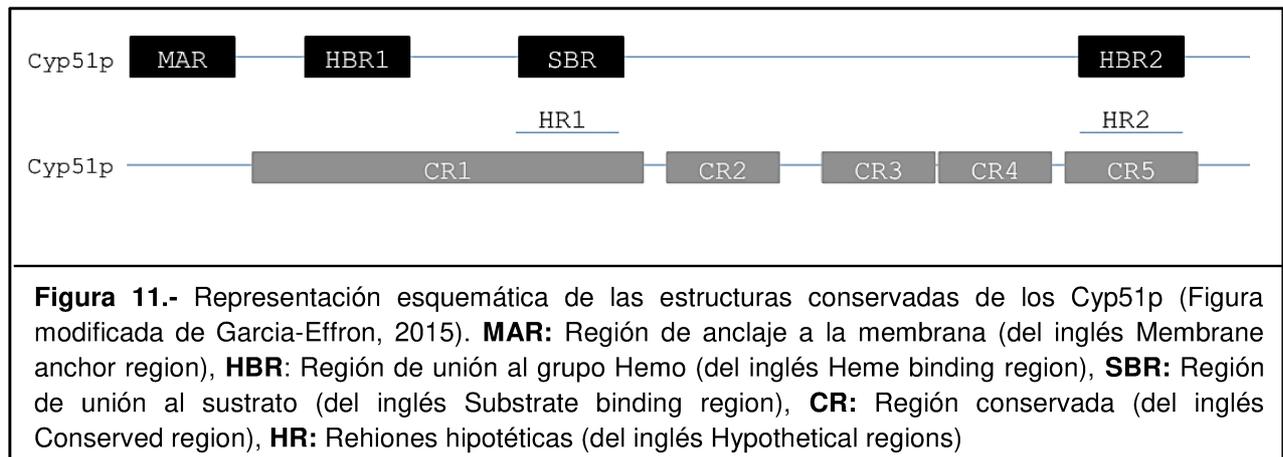
### **1.6.1. Homología de los Erg11p/Cyp51p de levaduras y hongos filamentosos**

La homología entre las secuencias de los Cyp51ps de especies de *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* y de *Mucormycetes* (Mucorales) ronda el 50% (tal es el caso de los Cyp51p de *Cunninghamella elegans* y *R. oryzae* con el Cyp51Ap y Cyp51Bp de *A. fumigatus*) [99].

### **1.6.2. Cyp51s: Estructura primaria, secundaria y tridimensional.**

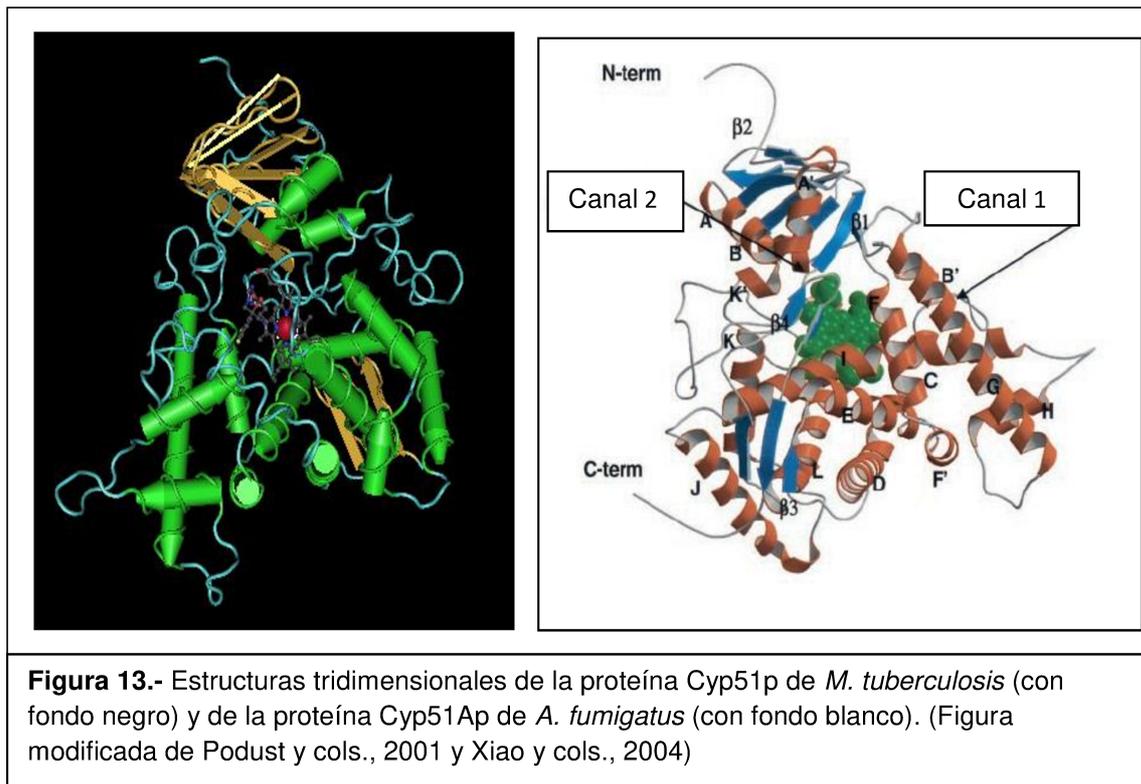
Las 14- $\alpha$  esterol demetilasa (Cyp51ps) son enzimas que desempeñan funciones metabólicas trascendentales para los seres vivos. La homología entre estos enzimas demuestra el origen común de las mismas y la necesidad de conservar una estructura básica para realizar sus funciones. Sin embargo, esta homología tiene una implicación terapéutica negativa, ya que cuando se diseñan inhibidores de las enzimas fúngicas, estos compuestos suelen inhibir también los enzimas humanas, animales y vegetales, causando efectos secundarios graves. Con el fin de conseguir fármacos selectivos de las enzimas fúngicas, se han realizado estudios con la intención de conocer su estructura.

Los Cyp51p de los Mucorales presentan todos los dominios, plegamientos, regiones y hélices putativos propios de una 14  $\alpha$  esteroles demetilasa, siguiendo la nomenclatura propuesta por Podust et al. para el Cyp51p de *Mycobacterium tuberculosis* (MtCyp51p), y por van Nistelrooy et al. para *Penicillium italicum*. Acorde a estas nomenclaturas se pueden distinguir 4 regiones y 5 *clusters* conservados (**Figuras 11 y 12**) [103], [110].



Por otro lado, analizando la estructura tridimensional de los Cyp51p cristalizados y la estructura tridimensional teórica del Cyp51Ap de *A. fumigatus* se puede concluir, que existen dos canales posibles de entrada para el sustrato y los antifúngicos [111], [112], [113], [114], [115], [116]. Estos canales son capaces acomodar las largas cadenas laterales de algunos azoles como el ITC y el PSC.

El canal 1 es paralelo al plano del grupo hemo, y está formado por una curvatura de la hélice I, las hélices B y G y el bucle entre ambas denominado BC. Esta conformación se encuentra en el Cyp51p de *M. tuberculosis* [110]. El canal 2 es perpendicular al plano del grupo hemo y su superficie estaría formada por el bucle FG, la hélice A' y las cadenas que unen los plegamientos  $\beta$ 4-1 y  $\beta$ 4-2. Éste último canal es el lugar donde los azoles interactúan con las Cyp51p (**Figura 13**).

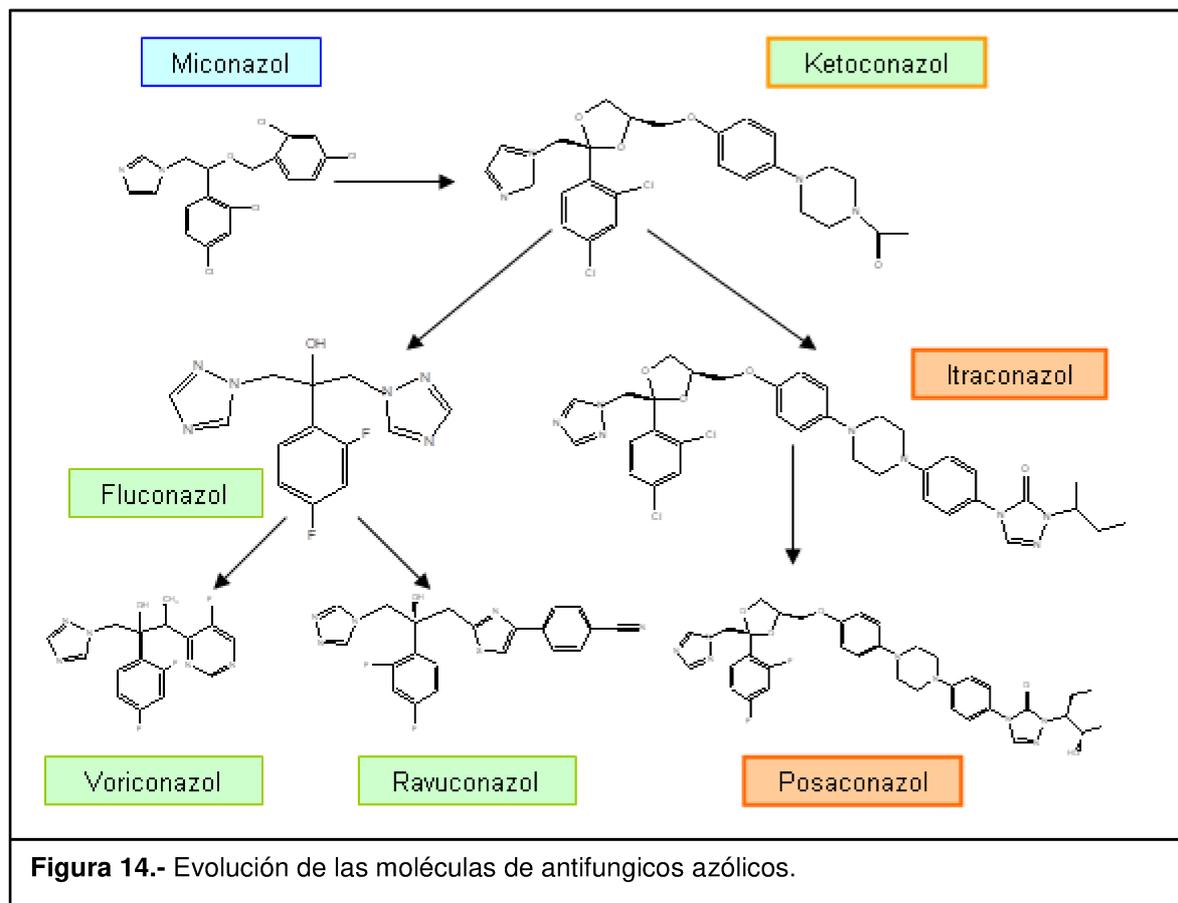


### 1.7. Inhibidores de la 14- $\alpha$ esterol demetilasa: los antifúngicos azólicos

Durante muchos años, la AMB y la fluorocitosina fueron los únicos antifúngicos disponibles para tratar micosis sistémicas. A finales de la década de los 80 y principio de los 90, se aprobaron para el tratamiento de las micosis los imidazoles y triazoles, pertenecientes a la familia de los azoles. Los primeros antifúngicos azólicos denominados imidazoles (clotrimazol y miconazol y posteriormente ketoconazol) comenzaron a ser utilizados al final de la década de 1960 [117]. 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.

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 [118]. [119].

En la **Figura 14** se aprecia un resumen de la evolución de las moléculas de los antifúngicos azólicos, desde miconazol, considerada la molécula inicial hasta el PSC.



**Figura 14.-** Evolución de las moléculas de antifúngicos azólicos.

Recientemente, se desarrolló una nueva droga azólica llamada ISAV que es activa frente a algunos hongos emergentes resistentes a PSC y VRC. El perfil de seguridad de este agente y sus excelentes características farmacocinéticas hacen del ISAV una opción atractiva para el tratamiento de infecciones fúngicas invasivas [54].

### 1.8. Interacción de los azoles con su diana

Como se mencionó anteriormente, los antifúngicos azólicos actúan inhibiendo las enzimas 14- $\alpha$  esterol demetilinas fúngicas. Estas enzimas tienen un grupo hemo que conforma su

centro catalítico. 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 [103], [110], [120].

Más específicamente, los átomos de nitrógeno de los grupos imidazólicos y triazólicos son los que interaccionan con el hierro del grupo hemo de las enzimas Cyp51p/Erg11p. Por otro lado, los grupos hidrófobos que se unen al carbono asimétrico son los encargados de anclarse al sitio de reconocimiento del sustrato de las 14- $\alpha$  esteroles demetilases fúngicas. Por lo tanto, las estructuras que rodean este carbono central son las que realmente tienen alguna función en el momento de la unión inhibidor-enzima.

El sitio hemo es accesible tanto por el sustrato como por los antifúngicos a través del canal 2. Esta cavidad presenta en su superficie residuos hidrófobos que son indispensables, para el reconocimiento del sustrato y de los inhibidores de las enzimas. En los azoles, el átomo halógeno es el que interacciona con estos residuos hidrófobos, por lo que todo radical que se encuentre en las posiciones 2 ó 6 del anillo bencénico, donde se asientan los átomos de flúor o cloro, disminuyen la afinidad y actividad del antifúngico. Las cadenas laterales de los antifúngicos de moléculas largas como el ketoconazol, ITC y PSC son demasiado grandes para entrar totalmente en el canal, pero juegan un papel importante en las propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas de estos antibióticos. Cabe destacar que Xiao et al. sugirieron que parte de la cadena nitrofuránica-triazolónica del PSC penetra por el canal 2 e interacciona con algunos residuos hidrófobos, aumentando la estabilidad de unión antifúngico-enzima y la afinidad [111]. Por otro lado, se ha demostrado que cambios de aminoácidos en este canal son responsables de la resistencia a los azoles de cadena larga por lo que la entrada de las mismas en dicho canal se considera un hecho [121].

Los átomos N4 y N3 de los anillos triazólicos e imidazólicos se unen al grupo hemo, mientras que el grupo fenilo, se ubica en una cavidad hidrófoba del canal 2. El átomo N4 se une covalentemente al grupo hemo, quedando a unos 2,3 Å de distancia del hierro. Esta interacción se favorece si el carbono asimétrico tiene como sustituyente un hidroxilo o un metilo en posición C-3 [111], [112], [122].

Por lo tanto, la afinidad y selectividad de los distintos azoles por las enzimas dependen de la geometría molecular y de ahí, la existencia de diferencias entre los distintos enantiómeros y entre los distintos antifúngicos azólicos [123], [124].

## 1.9. Mecanismos de resistencia a los azoles

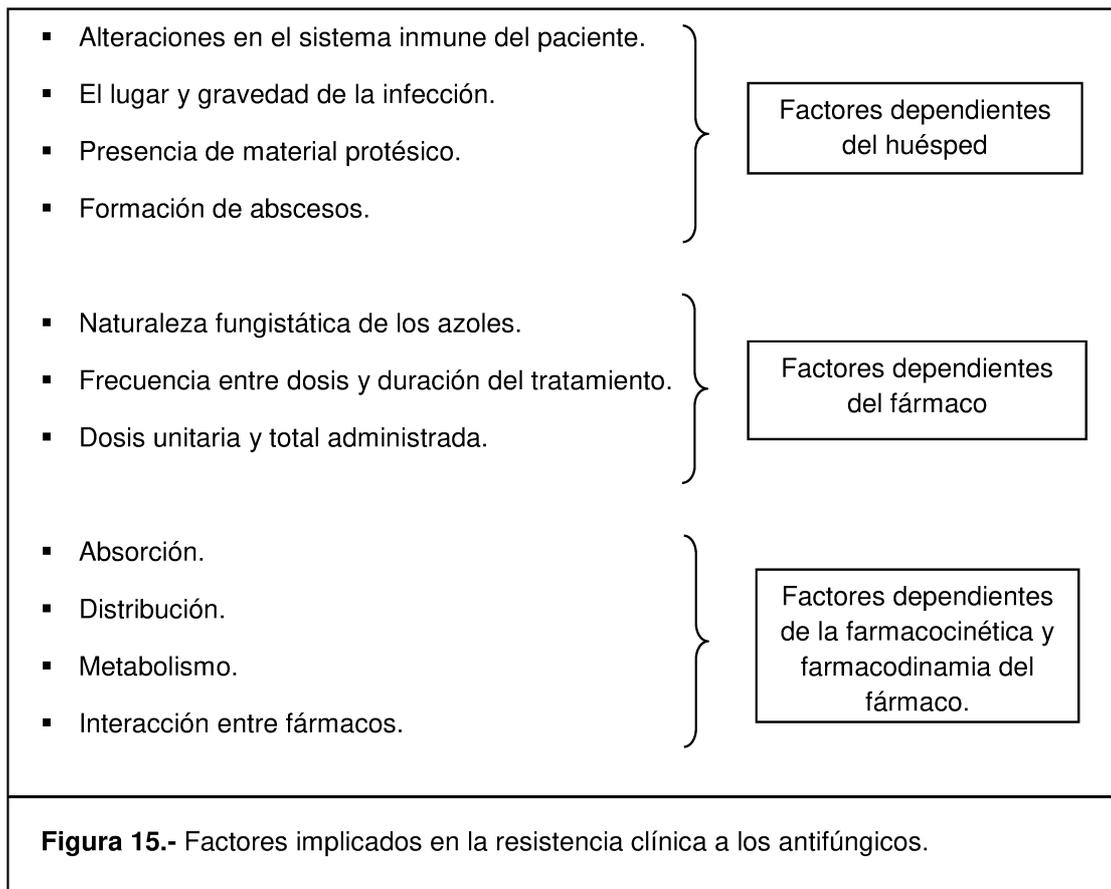
Como con otros microorganismos, la resistencia de los hongos filamentosos frente a los antifúngicos es un concepto amplio que se puede clasificar en resistencia clínica y resistencia microbiológica.

La resistencia clínica se puede definir como crecimiento o falta de inhibición de un microorganismo en el foco de infección, aunque en el mismo existan concentraciones terapéuticas del fármaco en cuestión. Esta resistencia está relacionada con distintos factores dependientes del fármaco o del paciente, o de ambos, más que con el microorganismo que produce la infección.

En el caso de las micosis, la resistencia clínica a los antifúngicos tiene relación con los factores que se muestran en la **Figura 15** [69].

La resistencia microbiológica depende de las características particulares del microorganismo. Los resultados obtenidos en las pruebas de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos dan una idea de esta resistencia. Por lo tanto esta resistencia en micología puede deberse a la CIM inicial, tipo de célula fúngica, presencia de hifas, factores genéticos del microorganismo, tamaño de la población inoculada y presencia de biopelículas [125].

La resistencia microbiológica se puede subdividir en: (i) resistencia intrínseca que es aquella que presentan todas las cepas de una misma especie de un hongo y no tiene relación con la exposición al antifúngico, como en *R. oryzae* y su resistencia al VRC; (ii) resistencia primaria que es la que ocurre cuando en una especie normalmente sensible a un antifúngico aparecen espontáneamente cepas resistentes, sin haber estado en contacto previo con el antifúngico; y (iii) resistencia secundaria o adquirida que es la que se desarrolla después de la exposición a los antifúngicos y que puede ser debida a alteraciones fenotípicas o genotípicas que se manifiestan de forma estable o transitoria. El concepto de resistencia primaria está en discusión ya que muchos autores sostienen que la “aparición espontánea” de cepas resistentes es en realidad un desconocimiento del origen de la misma y debería incluirse dentro de las resistencias secundarias (quizás llamadas con origen desconocido).



La resistencia adquirida es actualmente un problema preocupante en bacterias. En hongos filamentosos la bibliografía evidencia un incremento en cepas clínicas resistentes a los azoles y además, se ha visto que puede existir resistencia cruzada para otros azoles [126], [127], [128], [129], [130], [131], [132], [133], [134].

El uso de antifúngicos en forma masiva, tanto en tratamientos empíricos y en profilaxis de infecciones humanas como en la agricultura, contribuye a que continúen apareciendo cepas resistentes [135], [136].

Además, se ha postulado que el uso del FLC, aunque ineficaz con los hongos filamentosos, podría inducir una regulación positiva en la expresión de algunos genes y esto implicaría cambios en su patrón de resistencia o tolerancia frente a otros antifúngicos que son activos en condiciones normales. Esta hipótesis ha sido demostrada *in vitro* con *A. fumigatus* [137].

En términos generales, los mecanismos por medio de los cuales los microorganismos son resistentes o desarrollan resistencia a los antifúngicos son los que se describen a

continuación. En primer lugar, la incapacidad del fármaco para alcanzar la diana dentro de la célula, que puede ser debida a la existencia de barreras de permeabilidad o a sistemas de bombeo activo que expulsan el compuesto. Los sistemas de bombeo suelen ser bombas de flujo dependientes de protones o de ATP, que en el caso de cepas resistentes se activan o se sobre-expresan.

Otro mecanismo de resistencia son los cambios en la interacción fármaco-diana, por aumento del número de copias de la diana o modificaciones de la misma, debido a mutaciones, por lo que el antimicrobiano no puede unirse a la diana. En ocasiones se producen modificaciones en los enzimas de las vías metabólicas, lo que crea una vía alternativa de biosíntesis que compensa la pérdida de función de un enzima por su inhibición. En bacterias también se ha descrito la degradación o alteración de fármaco como mecanismos de resistencia, pero este mecanismo aún no se han detectado en células fúngicas.

Por lo tanto, las cepas resistentes a los antifúngicos azólicos tienen enzimas diana modificadas en calidad o cantidad o son capaces de reducir la concentración intracelular del azol, o muestran alguna combinación de estos mecanismos [96]. Asimismo, se ha comprobado que la resistencia a los antifúngicos azólicos en fitopatógenos es un proceso gradual y posiblemente, controlado por diferentes genes [138], [139].

### **1.9.1. Activación y/o sobreexpresión de bombas de flujo**

El mecanismo de resistencia más frecuente en *C. albicans* está relacionado con la activación o el aumento de expresión de los genes que codifican bombas de flujo, lo que provoca una disminución de las concentraciones intracelulares del fármaco. Los productos de estos genes se agrupan en tres clases diferentes [96], [140], [141]. Los primeros son los transportadores ABC (del inglés ATP binding cassette), que son proteínas de membrana, pertenecientes a la familia de transportadores que consumen ATP y que son codificados por los genes *pdr5/CDR*, *MRP/CFTR* y *MDR*. Los segundos son los transportadores MFS (del inglés "Major Facilitators Superfamily"), codificados por el gen *CaMDR1*. Y los terceros, son factores reguladores de la transcripción de los genes antes descritos (*PDR1*, *PDR3*).

En levaduras se ha relacionado la resistencia secundaria a los azoles, con el aumento de expresión de dos tipos de transportadores, los transportadores ABC (*CDR1* y *CDR2*), responsables de la resistencia cruzada a los azoles, y los transportadores denominados MFS (*MDR1*), que serían los responsables de la resistencia específica a FLC [142], [143]. Los transportadores ABC han sido descritos en varias especies de levaduras, entre las que

se cuentan *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* y *C. neoformans* [89], [140], [144], [145], [146], [147], [148], [149], [150], [151], [152]. Además, se ha comprobado que la inactivación de los mismos convierte a las levaduras en hipersensibles a estos antifúngicos. En algunos hongos filamentosos, se han descrito genes homólogos a los de las levaduras. Así, en *A. fumigatus* se ha comunicado la existencia del gen *AtrF1*, equivalente al *CDR1* de *C. albicans* [153] y *AfuMDR* (*MDR1* y *MDR2*) [129], en *A. nidulans* los genes *atrA*, *atrB* y *atrC* y en *Penicillium digitatum* los genes *pmr1* y *pmr5* [154]. El aumento de su expresión se relaciona con la resistencia a diversos compuestos con actividad antifúngica, pero no directamente con la resistencia a azoles de uso clínico [155].

### 1.9.2. Modificaciones de la diana

Las mutaciones del gen *ERG11/CYP51* que afectan a la diana de los azoles constituyen el segundo mecanismo en frecuencia, de la resistencia de levaduras a los azoles [70], [156].

En cambio, en *Aspergillus* spp. los mecanismos moleculares de resistencia clínica a los azoles se limitan casi exclusivamente a mutaciones puntuales en el gen *CYP51A* (homólogo del gen *ERG11* de levaduras) [107], [126], [127], [129], [131], [132], [134], [157] [158], [159], [160], [161], [162]. Las sustituciones en el *CYP51B* no contribuyen a la resistencia.

La resistencia intrínseca a FLC (o sensibilidad reducida) se encuentra con frecuencia en varios hongos patógenos humanos (por ejemplo, *C. krusei*, *C. glabrata*, *A. fumigatus* y Mucorales) [44], [163], [164], [165], [166] mientras que la resistencia intrínseca a VRC es rara. La resistencia intrínseca a FLC en *A. fumigatus* se ha atribuido al residuo natural de isoleucina 301 (I301) en el *CYP51A* [158].

Por su parte, los mecanismos moleculares implicados en la resistencia de los Mucorales al VRC no se conocen. Sin embargo, cuando se analizan los valores de CIMs de los Mucorales a los azoles y se los compara con estos valores en *A. fumigatus*, se puede observar que:

- Las CIM para ITC y PSC son entre 2 y 4 veces mayores que para *A. fumigatus* [130], [167], [46].
- Los valores de CIM para VRC son entre 16 y 32 veces mayores que para *A. fumigatus*, [130], [167], [46].

Las diferencias de CIM para los azoles observadas entre Mucorales y *A. fumigatus* podrían deberse a la divergencia evolutiva de los genes duplicados (existencia de genes homólogos

similares a los observados en *A. fumigatus*) [99]. Por otro lado, los patrones de sensibilidad *in vitro* de los Mucorales a los azóles se asemejan a los observados en aislamientos de *A. fumigatus* con sustituciones de aminoácidos en la proteína Cyp51Ap [133], [160], [168], [169], [170], [171], [172], [173], [174]. Así, se vió que cepas clínicas de *A. fumigatus* que presentaron un alto nivel de resistencia a VRC y elevada CIM a otros azoles albergaban la sustitución Y121F asociada con una segunda sustitución de aminoácidos en la misma proteína (T289A) y una repetición de 46 nucleótidos en el promotor de *CYP51A* (denominada TR46/Y121F/T289A) [173], [175], [176].

Con estos datos de sensibilidad y teniendo en cuenta que las enzimas Cyp51Ap de *A. fumigatus*, *C. elegans* y *R. oryzae* tienen una homología superior al 50%, se podría pensar que la resistencia de los hongos del orden Mucorales al voriconazol está relacionada con los genes *CYP51*.

### 1.9.3. Sobreexpresión de la diana

El aumento del número de copias del *CYP51/ERG11* o de su expresión puede originar resistencia a los azoles. Kontoyanis y cols. [177], han utilizado mutantes de *S. cerevisiae*, cuya 14- $\alpha$  esterol demetilasa está regulada por un promotor GAL1, para demostrar que la sobre-expresión de este gen está relacionada con la resistencia de azoles [177]. En *C. albicans* se ha demostrado un aumento de la transcripción del gen *ERG11* durante la exposición a los azoles, incluso en las células sensibles. Se piensa que este aumento es debido a la respuesta de la célula a la disminución de ergosterol o a la acumulación de esteroides tóxicos [178].

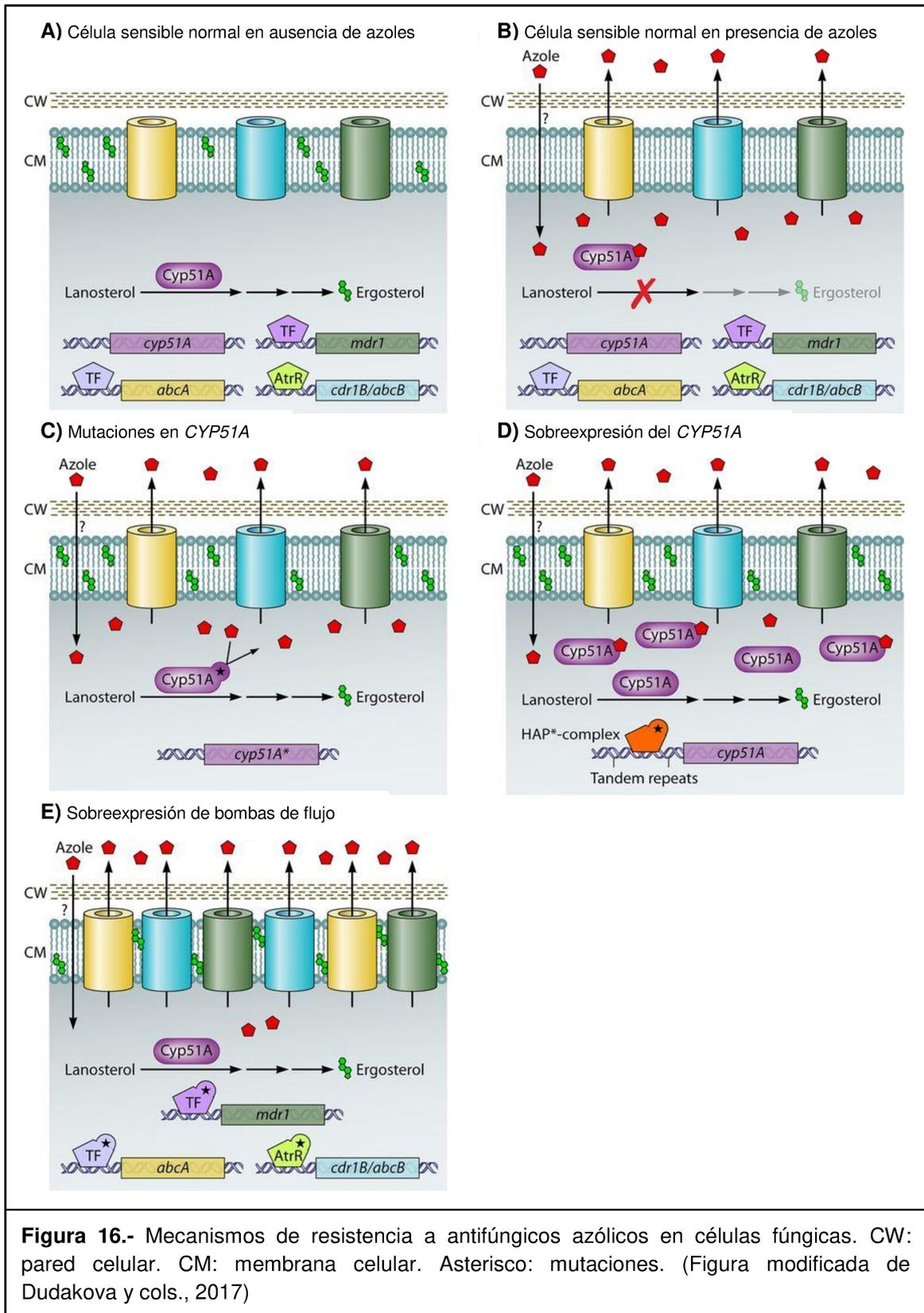
En *P. italicum* se ha demostrado que el desarrollo progresivo de resistencia a los azoles puede relacionarse con los cambios en los niveles de expresión de *cyp51*, en respuesta a triflumizol, un azol utilizado en agricultura. En este trabajo se ha demostrado, además, la existencia de un activador de la transcripción en el promotor del *cyp51*, y que el número de copias de esta secuencia repetida en tándem se correlaciona directamente con la CIM a triflumizol [179].

En el caso de *Aspergillus*, se han realizado experimentos *in vitro* y utilizando ingeniería genética, que han demostrado que la introducción de un plásmido que contenga el gen *cyp51* de *A. nidulans*, confiere resistencia a ITC en *A. fumigatus* [180]. Otro estudio obtuvo resultados similares al integrar el gen *cyp51* de *P. italicum* en una cepa de *A. Níger* [180], [181].

Además, en *A. fumigatus* se describieron tres variaciones diferentes en el promotor del *CYP51A* asociadas con la resistencia a los azoles [121]. Las repeticiones en tándem, de 34 y 46 pb, son las que ocurren con mayor frecuencia [157], [171]. El TR34 se ha encontrado solo con la sustitución L98H confiriendo alta resistencia a ITC, mientras que TR46 se ha encontrado junto con las sustituciones Y121F/T289A en aislamientos altamente resistentes a VRC. Además, se ha encontrado una repetición de 53 pb en aislamientos que presentan resistencia cruzada a VRC e ITC, sin alteraciones en Cyp51Ap [182], [183]. Estos cambios en la región promotora deben interpretarse en el contexto de los niveles de expresión génica [121]. Para el promotor con el TR34, se vio un aumento de 8 veces en el nivel de expresión del gen *CYP51A* [157].

En *Rhizopus* spp., los altos valores de CIM para todos los azóles podrían deberse a un aumento en el número de copias de *CYP51* (como se ha descrito en algunos aislamientos de *C. albicans* resistentes) [184], [185]. En un trabajo publicado por Ma, y cols. [167] se sugirió que *R. oryzae* tiene una duplicación genómica completa. Esto podría explicar la menor sensibilidad de los Mucorales a todos los azóles.

En la **figura 16** se muestran graficados los mecanismos de resistencia a azoles en células de hongos filamentosos [121].





# **OBJETIVOS**

## 2.- OBJETIVOS

### OBJETIVOS GENERALES (OG)

OG1- Estudiar los mecanismos moleculares de resistencia natural de los Mucorales al voriconazol utilizando como modelo de estudio al hongo *R. oryzae*.

OG2- Evaluar la actividad de drogas antifúngicas no convencionales solas y en combinación con antifúngicos frente a distintas especies de Mucorales tanto *in vitro* como *in vivo*.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS (OE)

OE1- Estudiar las secuencias nucleotídicas de los genes *CYP51* de *R. oryzae*.

OE2- Estandarizar un protocolo de transformación para *R. oryzae*.

OE3- Evaluar si la resistencia natural de los *R. oryzae* a voriconazol está asociada a la amplificación del número de copias de los genes *CYP51*.

OE4- Probar que la resistencia intrínseca al voriconazol en *R. oryzae* se debe exclusivamente al gen *CYP51* obteniendo cepas de *R. oryzae* defectivas en dicho gen y reemplazando el gen *CYP51A* de *A. fumigatus* por su gen homólogo de *R. oryzae*.

OE5- Demostrar que existen blancos terapéuticos alternativos y con posibilidades de ser explotados como tratamientos antifúngicos de infecciones producidas por *R. oryzae*.

OE6- Realizar infecciones experimentales para evaluar la acción de agentes antifúngicos no convencionales con blancos terapéuticos alternativos.



## **MATERIALES Y METODOS**

## 3.- MATERIALES Y METODOS

### 3.1. Materiales y reactivos químicos

Los componentes de los medios bacteriológicos fueron obtenidos de Laboratorios Britania (Argentina). Los reactivos para biología molecular fueron adquiridos de los representantes en Argentina de las firmas: Promega, Invitrogen y Thermo Scientific y de la empresa Argentina PBL-EmbioTec (Buenos Aires). Todos los demás reactivos químicos empleados fueron de la más alta calidad comercialmente disponible (Sigma-Adrich, Merck, BD o similares).

### 3.2. Hongos filamentosos utilizados y procedimientos de cultivo

#### 3.2.1. Cepas de Mucorales

En este trabajo se utilizaron 25 cepas del género Mucorales, de las cuales, 4 fueron cedidas por el Laboratorio de Micología del Hospital Ramos Mejía (Buenos Aires), 4 fueron aportadas por el Departamento de Micología del Instituto Dr. Carlos Malbrán (Buenos Aires), 8 fueron suministradas por el Instituto de Medicina Regional de la Universidad Nacional del Nordeste (Resistencia) y las 9 restantes por el Sanatorio La Entrerriana (Paraná). Dentro de las cepas estudiadas se incluyen 15 *Rhizopus microsporus* (12 anteriormente considerados como var. *rhizopodiformis* y 3 como var. *microsporus*) [186], 3 *Rhizopus oryzae*, 4 *Syncephalastrum racemosum*, 1 *Lichthemia corymbifera*, 1 *Lichthemia blakesleeana* y 1 *Lichthemia ramosa*. Dentro de ésta colección, 19 cepas tienen un origen clínico que incluye mucormicosis rinocerebral (n = 9), osteomielitis (n = 5), infección de herida quirúrgica (n = 3), úlcera cutánea (n = 1) y una sin datos de sitio de aislamiento (**Tabla 2**). Las 6 cepas restantes fueron aisladas del ambiente hospitalario de hospitales pertenecientes a la ciudad de Paraná (Entre Ríos) y Resistencia (Chaco).

#### 3.2.2. Cepas de *Aspergillus fumigatus*

En este estudio se utilizaron 2 cepas de *Aspergillus fumigatus*, las cepas LMDM-31 deficiente en el gen  $akuB^{KU80}$  ( $\Delta KU80$ ) que mejora la frecuencia de recombinación homóloga y la cepa LMDM-32, deficiente en el gen *KU80* y *CYP51A* ( $\Delta KU80/\Delta CYP51A$ ). Este último mutante defectivo doble tiene la característica de ser resistente a Higromicina B (HYGB) (por el casete de resistencia utilizado para delecionar el gen *CYP51A*) y ser 8 veces más

sensible al fluconazol que la cepa *wild type* (debido a que el gen *CYP51B*, única 14 alfa esterol demetilasa que tiene activa, es más sensible a este antifúngico). La cepa LMDM-31 fue gentilmente cedida por el Dr. David Perlin del Public Health Research Institute (PHRI; Rutgers University, NJ, EEUU) y la cepa LMDM-32 fue generada en nuestro laboratorio [158].

**Tabla 2.** Cepas de Mucorales utilizadas en este estudio.

Aislamiento N°	Organismo	Sitio de aislamiento
LMDM-165	<i>R. microsporus</i>	Osteomielitis
LMDM-156	<i>R. microsporus</i>	Osteomielitis
LMDM-157	<i>R. microsporus</i>	Herida quirúrgica
LMDM-158	<i>R. microsporus</i>	Herida quirúrgica
LMDM-159	<i>R. microsporus</i>	Herida quirúrgica
LMDM-164	<i>R. microsporus</i>	Osteomielitis
LMDM-167	<i>R. microsporus</i>	Ambiente hospitalario
LMDM-168	<i>R. microsporus</i>	Ambiente hospitalario
LMDM-176	<i>R. microsporus</i>	Osteomielitis
LMDM-184	<i>R. microsporus</i>	Osteomielitis
LMDM-379	<i>R. microsporus</i>	Rinocerebral
LMDM-596	<i>R. microsporus</i>	Rinocerebral
LMDM-1073	<i>R. microsporus</i>	Rinocerebral
LMDM-1074	<i>R. microsporus</i>	Rinocerebral
LMDM-1127	<i>R. microsporus</i>	Ambiente hospitalario
<b>n = 15</b>	<b><i>R. microsporus</i></b>	
LMDM-597	<i>R. oryzae</i>	Rinocerebral
LMDM-1126	<i>R. oryzae</i>	Rinocerebral
LMDM-1075	<i>R. oryzae</i>	Rinocerebral
<b>n = 3</b>	<b><i>R. oryzae</i></b>	
LMDM-1122	<i>S. racemosum</i>	Rinocerebral
LMDM-1123	<i>S. racemosum</i>	Ambiente hospitalario
LMDM-1124	<i>S. racemosum</i>	Ambiente hospitalario
LMDM-576	<i>S. racemosum</i>	Rinocerebral
<b>n = 4</b>	<b><i>S. racemosum</i></b>	
LMDM-1128	<i>L. blakesleeana</i>	Úlcera cutánea
LMDM-1121	<i>L. corymbifera</i>	Ambiente hospitalario
LMDM-1125	<i>L. ramosa</i>	Clínica
<b>n = 3</b>	<b><i>Lichtheimia spp.</i></b>	

### 3.2.3. Cultivo de hongos filamentosos

#### 3.2.3.1 Preparación de stock de esporas para conservación de cepas

El crecimiento de las cepas para su procesamiento y conservación, se llevó a cabo en medio agar papa dextrosa (APD), incubándolas a 37°C durante 72hs. Los esporos se recolectaron añadiendo una solución de Tween 20 (0.1%) estéril directamente al tubo de

APD. Para obtener una suspensión de esporas, se agitó el tubo suavemente y se fraccionó en tubos eppendorf, se lavaron tres veces con agua destilada estéril y finalmente se resuspendieron en agua. Para su conservación, la suspensión de conidios fue adicionada diluida en glicerol (50:50) y se almacenaron a -80°C.

- Agar Papa Dextrosa (APD)

Pulpa de papa	250 g
Glucosa	20 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

### 3.2.3.2. Preparación de inóculos

Para preparar inóculos, se procedió de igual manera que en la preparación de stock de esporas 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 esporos mediante diluciones en agua destilada estéril.

## 3.3. Cepas bacterianas y de levaduras, plásmidos y procedimiento de cultivo.

### 3.3.1. Cepas

#### 3.3.1.1. 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.

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

Las cepas *Candida krusei* ATCC-6258 y *Candida parapsilosis sensu stricto* ATCC-22019 fueron utilizadas como controles de calidad para las pruebas de sensibilidad [40].

### **3.3.2. Plásmidos utilizados.**

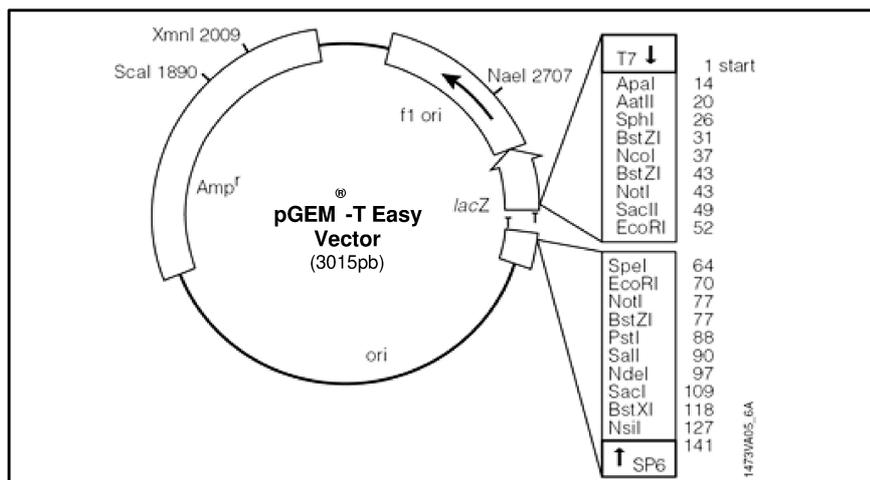
Para el desarrollo de este trabajo se utilizó como base el plásmido pGEM-T® easy vector para el clonado en células de *E. coli* y seis vectores fúngicos que se construyeron para la transformación de hongos filamentosos. Los mismos se detallan a continuación.

#### 3.3.2.1. 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 EcoRV 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  $\alpha$  de la enzima  $\beta$ -galactosidasa (**Figura 17**). 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  $\beta$ -lactamasa que proporciona resistencia a ampicilina que se utiliza como antibiótico para la selección de colonias.

### 3.3.2.2. Vectores Fúngicos

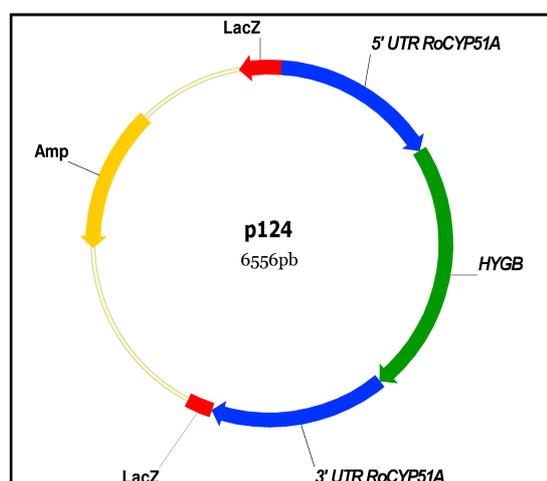
Se construyeron seis vectores para las modificaciones genéticas de hongos filamentosos, los cuales contienen el ADN de interés clonado en el plásmido descrito anteriormente. Estos vectores se conservaron hasta su posterior utilización, como plásmidos incorporados a cepas bacterianas (*E. coli* Top 10).



**Figura 17.-** Mapa del pGEM-T® easy vector y puntos de referencia en la secuencia. (Figura modificada del inserto del vector de Promega).

### Plásmido LMDM P-124

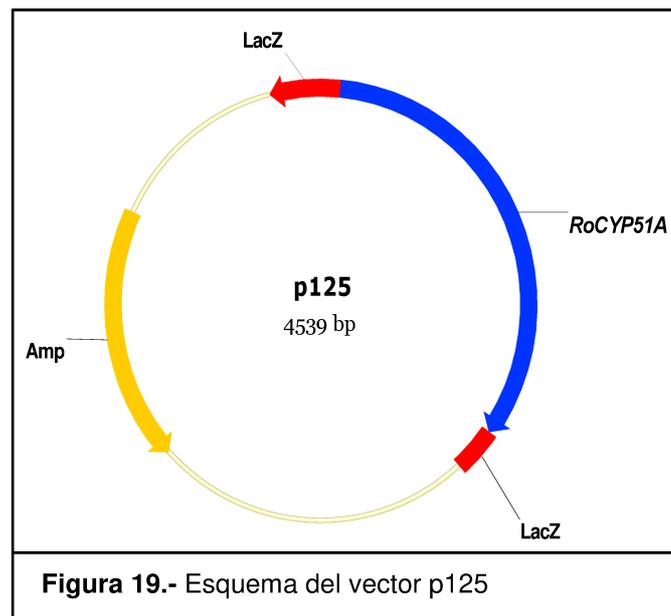
Es un vector derivado de la clonación en PGEMT-easy® de una construcción génica formada por las regiones no codificantes 5' y 3'UTRs (1000 nt cada una) del *CYP51A* de *R. oryzae* y un casete de resistencia a Hygromicina B (HYGB) como marcador de selección. Este vector se construyó con el objetivo de lograr la disrupción del gen *CYP51A* de *R. oryzae* y se obtuvo utilizando la técnica de PCR de fusión, descrita más adelante en el punto 3.4.5.3. (**Figura 18**).



**Figura 18.-** Esquema del vector p124

### Plásmido LMDM-p125

Vector derivado de la clonación del gen *RoCYP51A* (1,5 kb) sin intrones, amplificado del cDNA de *R. oryzae*, en el plásmido PGEMT-easy®. (Figura 19).

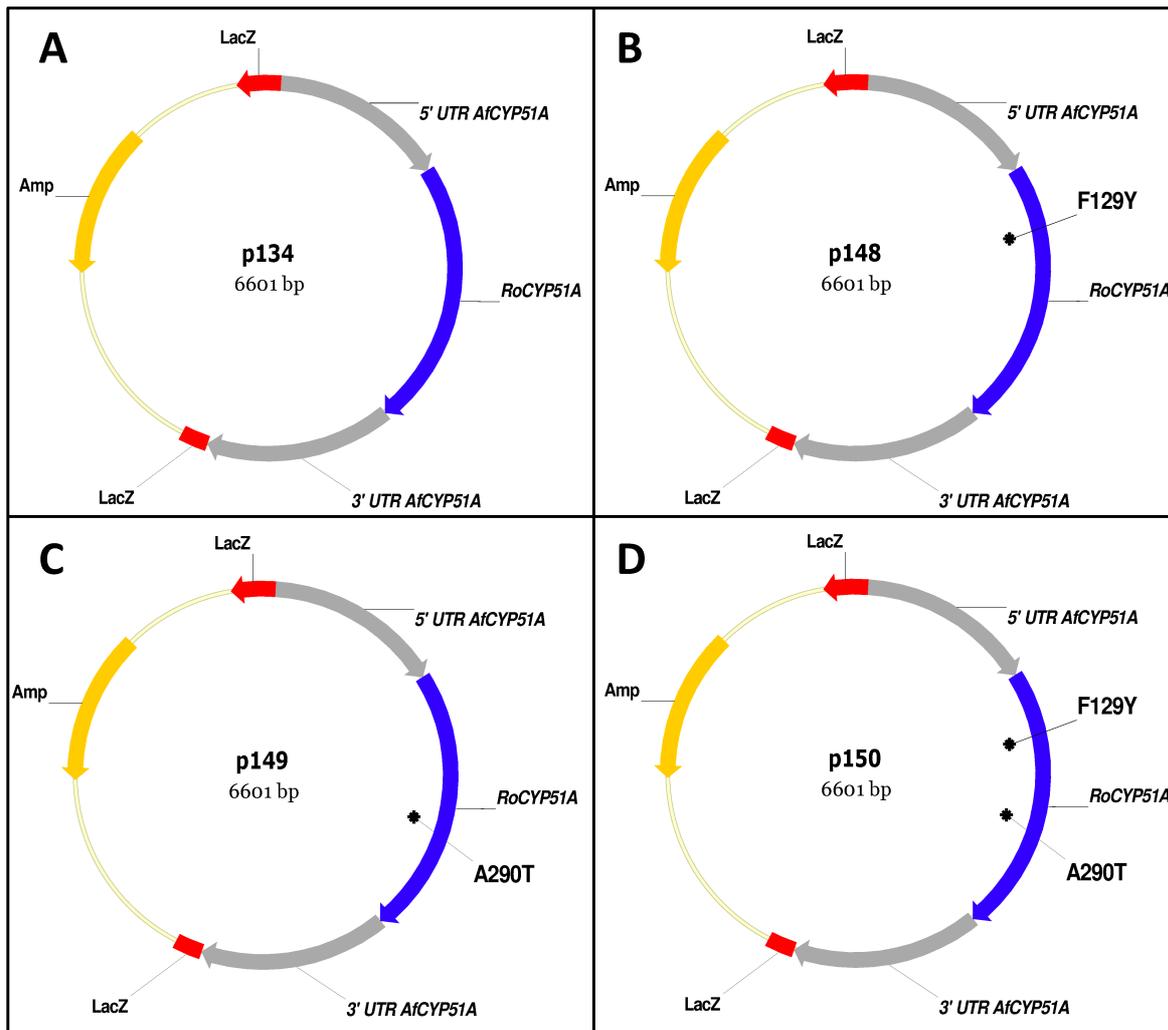


### Plásmido LMDM P-134

Es un plásmido PGEMT-easy® que contiene en su polilinker una construcción génica formada por el gen *CYP51A* de *R. oryzae* sin su promotor, flanqueado por las regiones 5'UTR (-1000 nt a -1 upstream del codón de inicio) y 3'UTR (+1 a +1000 downstream del codón STOP de *CYP51A*) del gen *CYP51A* de *A. fumigatus*. Este vector de transformación fue utilizado para incorporar el gen *CYP51A* de *R. oryzae* en el genoma de *A. fumigatus*. Esta construcción se obtuvo utilizando la técnica PRODIGE, y sus detalles están descritos más adelante en el punto 3.4.5.3. (Figura 20-A).

### Plásmidos LMDM P-148, LMDM P-149 y LMDM P-150

Son vectores derivados del vector LMDM-p134, al cual se le han insertado las mutaciones t386a, g868a y t386a/g868a en el gen *RoCYP51A* que dieron lugar a las sustituciones de aminoácidos F129Y, A290T y F129Y/A290T, respectivamente. Las tres construcciones con los cambios de nucleótidos antes mencionados se generaron mediante mutagénesis dirigida y dieron lugar a los vectores LMDM P-148, LMDM P-149 y LMDM P-150, respectivamente. (Figura 20-B, C, D). En el punto 3.4.5.4. se encuentra la técnica explicada detalladamente.



**Figura 20.-** Esquema de vectores fúngicos utilizados en este trabajo para la transformación de *A. fumigatus* con (A) el gen *RoCYP51A*, (B) *RoCYP51A-F129Y* (C) *RoCYP51A-A290T* (D) *RoCYP51A-F129Y/A290T*.

### 3.3.3. Cultivo de *Escherichia coli*

Las células de *E. coli* TOP10 fueron utilizadas para mantenimiento y replicación de plásmidos. Las células fueron cultivadas a 37 °C en medio Lysogeny broth de Luria-Bertani (LB), con agitación a 180 rpm. Para la selección de bacterias portadoras de plásmidos, se utilizó ampicilina 100 µg/ml. Para conservar las cepas de *E. coli* Top 10 portadoras de plásmidos, 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, y se almacenaron a -80 °C. Cada cepa con plásmido se nombró como “P” y el número correlativo que correspondiera.

La composición de los medios de cultivo empleados se detalla a continuación:

- Lysogeny broth de Luria-Bertani (LB).

Tripteina Bacteriológica	1,0 g
Extracto de Levadura	0,5 g
Cloruro de sodio	0,5 g
Agua destilada	100 ml
pH	7,0

- LB solido: medio LB adicionado con agar a una concentración final de 1,8% (p/v).
- LB-GLUCOSA: medio LB adicionado con glucosa al 2% (p/v).

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

- Solución stock de Ampicilina

Ampicilina	1 g
Agua destilada estéril	5 ml

### 3.3.4. Cultivo de levaduras

El crecimiento de las cepas de *C. krusei* y *C. parapsilosis* se llevó a cabo en medio Agar Sabouraud Glucosado (Laboratorios Britania S.A, Buenos Aires, Argentina), incubándolas a 37 °C durante 18h. Para la preparación se siguieron las instrucciones del fabricante (65 g/litro agua destilada).

## 3.4. Técnicas de biología molecular

### 3.4.1. Extracción de ADN de hongos filamentosos

El ADN genómico de los hongos filamentosos utilizadas en este estudio, fue extraído por el método de Fenol-Cloroformo [187] adaptada para hongos filamentosos [188]. Las cepas fueron crecidas en medio GYEP líquido a 37°C hasta observar desarrollo de micelio (24-48hs según la cepa). Con la ayuda de una punta de pipeta de plástico se recogió el micelio y se dejó secar sobre papel Whatman. El micelio seco se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5mL con 0,4 ml de buffer de lisis (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 100 mM EDTA pH 8, 1% SDS) y un volumen de perlas de vidrio. Se procedió a vortexear a máxima

velocidad por 1 min, intercalando con incubaciones en hielo también de 1 min, repitiendo esta operación 3 veces. A éste tubo se le agregó 0,4 ml de Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (FCI) 25:24:1 (Invitrogen, Bueno Aires. Argentina), se agitó suavemente y se centrifugó 15 min a 13000 rpm, recogiénose el sobrenadante. A éste 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 µl 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°C.

- Glucosa – Extracto de Levadura - Peptona (GYEP)

Glucosa	2,0 g
Extracto de Levadura	0,30 g
Peptona	1,0 g
Agua destilada	100 mL

### 3.4.2. Extracción de ARN de *R. oryzae*

Para aislar el ARN total de *R. oryzae* se sembraron 20µl del stock conservado a -80°C en una placa de GYEP líquido. La incubación se realizó a 37°C durante 16 hs. Se recogió el micelio y se dejó secar sobre papel de filtro estéril. Se colocó el micelio seco en un tubo eppendorf de 1.5mL, se le añadió un volumen de perlas de vidrio y se incubó 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 frío (Molecular Research Center, Inc. Genbiotech, Buenos Aires. Argentina). Posteriormente, se procedió a vortexear por 10 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 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 *RNAsa-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. Se agregó 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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$ ) y se mezcló con vórtex a temperatura ambiente durante 2-5 min.

### **3.4.3. 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.

### **3.4.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).**

#### **3.4.4.1. Método general**

Se realizó la amplificación de los genes de interés mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se emplearon los siguientes reactivos: 1,25U ADN Polimerasa Taq Pegasus (PBL; EmbioTec, Buenos Aires, Argentina) o 1U de PFU ADN polimerasa (Genbiotech, Buenos Aires, Argentina), 2,5mM de  $\text{MgCl}_2$ , PCR *buffer* 1X, 0,4 mM de cada uno de los dNTP (Promega), 0,2  $\mu\text{M}$  de primer, 5-50 ng totales de ADN genómico o ADN plasmídico (según sea el caso) y agua estéril, para completar un volumen de reacción de 20-50  $\mu\text{l}$  finales.

El termociclador (Applied Biosystems 2720 thermocycler) fue programado para el caso de Taq Pegasus con: un ciclo de 2 min a 94  $^{\circ}\text{C}$ , luego 30 ciclos de 15 seg a 92  $^{\circ}\text{C}$ , 30 seg a la temperatura de acoplamiento adecuada para cada reacción en particular y entre 1 y 2 min a 72  $^{\circ}\text{C}$  dependiendo del tamaño del fragmento a amplificar (1 min. por kb), seguidos por un ciclo final de 5 min a 72  $^{\circ}\text{C}$ . Mientras que para la enzima PFU las condiciones de ciclado fueron las siguientes: un ciclo de 2,30 min a 94  $^{\circ}\text{C}$ , luego 30 ciclos de 45 seg a 94  $^{\circ}\text{C}$ , 1 min a la temperatura de acoplamiento adecuada para cada reacción en particular y entre 1 y 4 min a 72  $^{\circ}\text{C}$  dependiendo del tamaño del fragmento a amplificar, seguidos por un ciclo final de 10 min a 72  $^{\circ}\text{C}$ . Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa.

### 3.4.4.2. Trascricpci3n reversa (sntesis de ADNc)

La trascricpci3n reversa se realiz3 utilizando la enzima AMV RT (Promega). Este procedimiento consta de dos partes. La primera etapa de la t3cnica se realiz3 en un volumen final de 5  $\mu$ l con 2  $\mu$ g de ARN y 1  $\mu$ g de Oligo (dT), llevando a volumen con agua libre de nucleasas. Estos tubos se incubaron a 70  $^{\circ}$ 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 t3cnica se realiz3 en un volumen final de 15  $\mu$ l. Se prepar3 una mezcla conteniendo 4  $\mu$ l de buffer AMV-RT 5 X, 2  $\mu$ l de la mezcla de deoxinucle3tidos trifosfato, 10  $\mu$ l de inhibidor de RNasa (rRNasin $^{\circ}$ ), 1,5  $\mu$ l de transcriptasa reversa AMVRT. A esta mezcla se a $\acute$ adieron los 5  $\mu$ l de la primera etapa para obtener un volumen total de 20  $\mu$ l. Posteriormente, se realiz3 una reacci3n en el termociclador con las siguientes condiciones: 25  $^{\circ}$ C durante 5 min, 42  $^{\circ}$ C durante 60 min y 70  $^{\circ}$ C durante 15 min. Se incluy3 un tubo de control negativo conteniendo todos los componentes de las reacciones excepto la transcriptasa reversa para comprobar si exist3a ADN contaminante. El ADNc obtenido se guard3 a - 20  $^{\circ}$ C hasta su utilizaci3n.

#### Construcci3n del vector LMDM-p125

El vector LMDM-p125 fue construido con el objetivo de conservar y propagar la secuencia codificante del gen *RoCYP51A*. Dicho gen fue amplificado en una reacci3n de PCR de punto final, utilizando el ADNc de *R. oryzae* como molde y los primers P-RoCYP51F1 y P-RoCYP51R3 (**Tabla 3**). Estos primers poseen los sitios de restricci3n para la enzima *Nde*I y para las enzimas *Hind*III y *Sal*I, respectivamente. El producto de PCR de 1,5 kb se analiz3 mediante una corrida electrofor3tica. Posteriormente se clon3 en un vector pGEMT-easy, y se obtuvo as3 el pl3smido LMDM-p125.

**Tabla 3.** Primers utilizados en la construcci3n del vector LMDM-p125. Subrayados se encuentran los sitios de restricci3n.

Primer	Sequencia (5' $\rightarrow$ 3')	Uso
P-RoCYP51F1	CCCC <u>CATATG</u> GCCATCATATCCACCTTACTT	<i>CYP51A Ro</i>
P-RoCYP51R3	GGGGT <u>CGACTTAAAGCTTT</u> TGCTTTCTAGCTCTATAACGA	<i>CYP51A Ro</i>

#### 3.4.4.3. Generación de vectores de fúngicos por metodología PRODIGE y PCR de fusión

Los vectores fúngicos p124 y p134 se construyeron mediante PCR de fusión para ser utilizados en técnicas de interrupción génica denominada PRODIGE (del inglés *Promoter-dependent disruption of genes*) [189]. Para la interrupción o reemplazo de un gen, se emplea convencionalmente un casete que contiene dos regiones de homología con el gen diana. Estas regiones se encuentran flanqueando un gen marcador seleccionable (resistencia a alguna droga) o al gen de interés que se desea incorporar. La metodología PRODIGE, se basa en la eliminación del promotor del gen que se desea incorporar o 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 o reemplazar.

La PCR de fusión es un método utilizado para ligar cadenas de ADN, sin utilizar enzimas de restricción o ligasas [190]. 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 homologas 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.

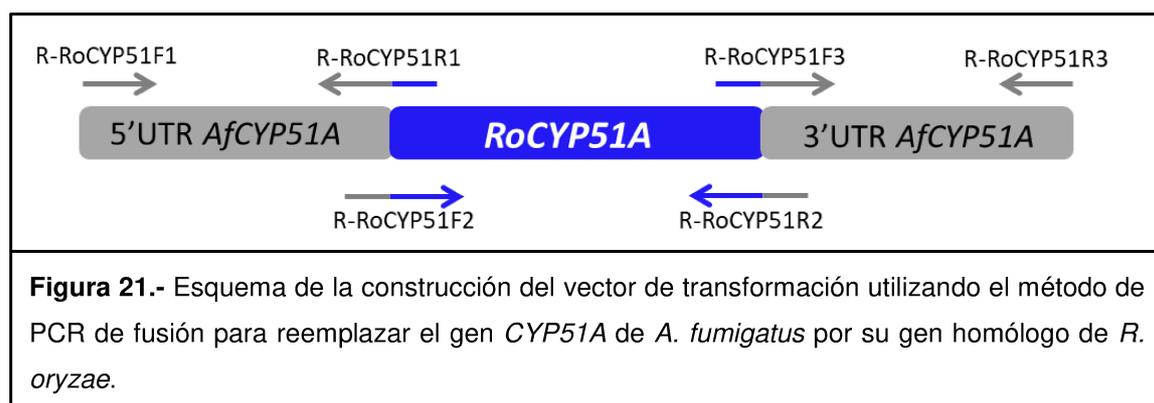
#### Construcción del vector de transformación p134

El vector de transformación p134 fue diseñado para reemplazar el gen *CYP51A* de *A. fumigatus* por su gen homólogo de *R. oryzae*.

La generación de este vector se llevó a cabo utilizando como base la secuencia del gen *CYP51A* de *R. oryzae* (GenBank MG872961.1) y la secuencia del gen *CYP51A* de *Aspergillus fumigatus* (GenBank AF338659.1). Se realizaron tres reacciones de PCR de punto final. Las dos primeras PCR se realizaron para obtener los fragmentos 5'UTR (1000pb inmediatamente corriente arriba del codón del inicio del gen *CYP51A* de *A. fumigatus*) y 3'UTR (1000 pb inmediatamente corriente abajo del codón stop del mismo gen). Ambos fragmentos se amplificaron utilizando como templado el ADN genómico de *A. fumigatus* LMDM-32 y los primers R-RoCYP51F1 / R-RoCYP51R1 y R-RoCYP51F3 / R-RoCYP51R3, respectivamente (**Tabla 4, Figura 21**).

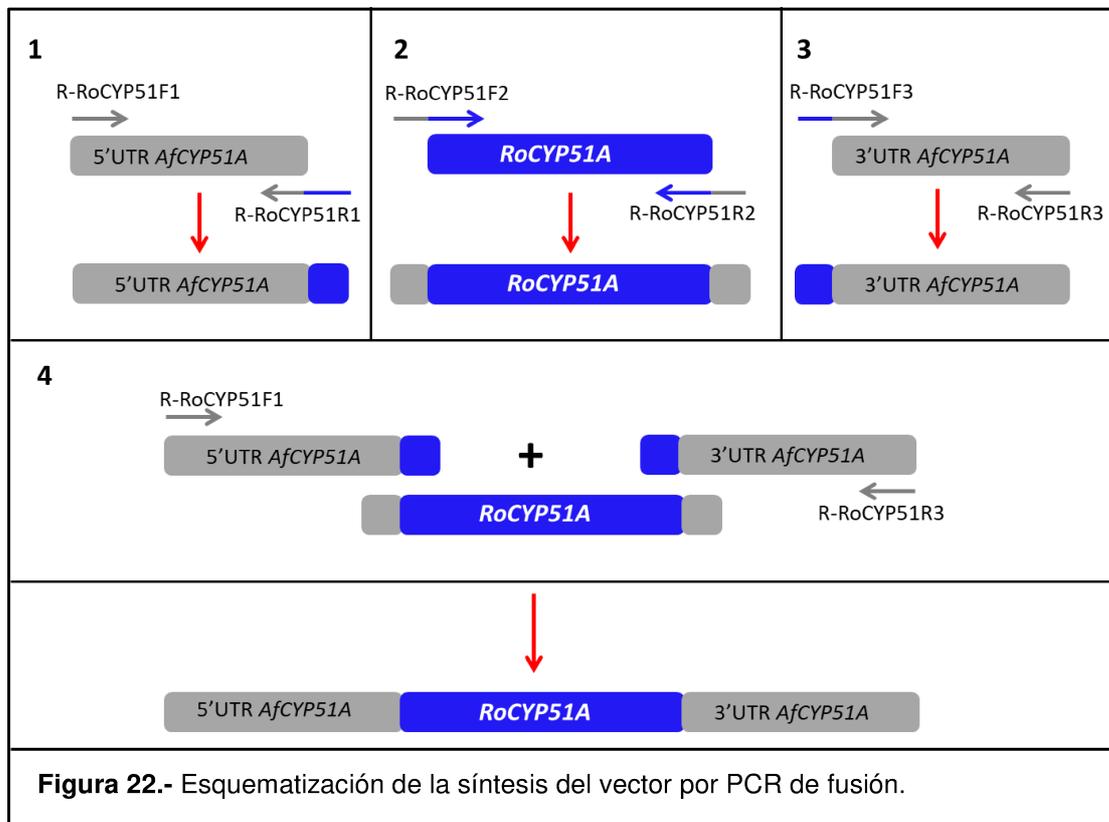
**Tabla 4.** Primers utilizados en la construcción del vector p134. <sup>a</sup> *A. fumigatus*, <sup>b</sup> *R. oryzae*, <sup>c</sup> Letras en negrita indican el codón de inicio y de terminación del gen *CYP51A* de *R. oryzae*.

Primer	Secuencia (5'→3')	Uso
R-RoCYP51F1	GAATATATACGTCGATCTGTGTG	5'UTR <i>CYP51A Af</i> <sup>a</sup>
R-RoCYP51R1	GTAAGGTGGATATGATGGCCATTTTCGAGGAGACACAG GGAGG	5'UTR <i>CYP51A Af</i> <sup>a</sup>
R-RoCYP51F2 <sup>c</sup>	CCCTCCCTGTGTCTCCTCGAA <b>ATG</b> GCCATCATATCCA CCTTAC	<i>CYP51A Ro</i> <sup>b</sup>
R-RoCYP51R2 <sup>c</sup>	GTCCTCGATGGTTACAACAGT <b>CTT</b> ATTGCTTTCTAGCT CTATAACG	<i>CYP51A Ro</i> <sup>b</sup>
R-RoCYP51F3	CGTTATAGAGCTAGAAAGCAATAAGACTGTTGTAACC ATCGAGGAC	3'UTR <i>CYP51A Af</i> <sup>a</sup>
R-RoCYP51R3	ATCCCAGCAGATACGCTGGTC	3'UTR <i>CYP51A Af</i> <sup>a</sup>



La tercera PCR tuvo como objetivo amplificar la secuencia codificante del *RoCYP51A* con los primers R-RoCYP51F2 / R-RoCYP51R2 y utilizando como templado el plásmido LMDM-p125 (vector pGEM-T Easy con el *RoCYP51A* sin intrones amplificado del cDNA de *R. oryzae*) (**Tabla 4**). La purificación de cada uno de los fragmentos obtenidos se llevó a cabo con el kit AccuPrep® (BIONNER, Buenos Aires, Argentina). Estos tres fragmentos de PCR purificados se ligaron mediante PCR de fusión, utilizando los primers R-RoCYP51F1 y R-RoCYP51R3. Cada uno de los primers utilizados en la PCR de fusión fue diseñado con aproximadamente 25 pb de bases de homología con la región a fusionar consecutiva. La secuencia de todos los primers utilizados se encuentran descritos en la **Tabla 4**. La manera en que tiene lugar la reacción de fusión se esquematiza en la **Figura 22**. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis. La construcción resultante (3.5 kb) se ligó al

vector comercial pGEM-T easy vector (Promega) y se clonó en *E. coli* TopTen por el método del shock térmico.

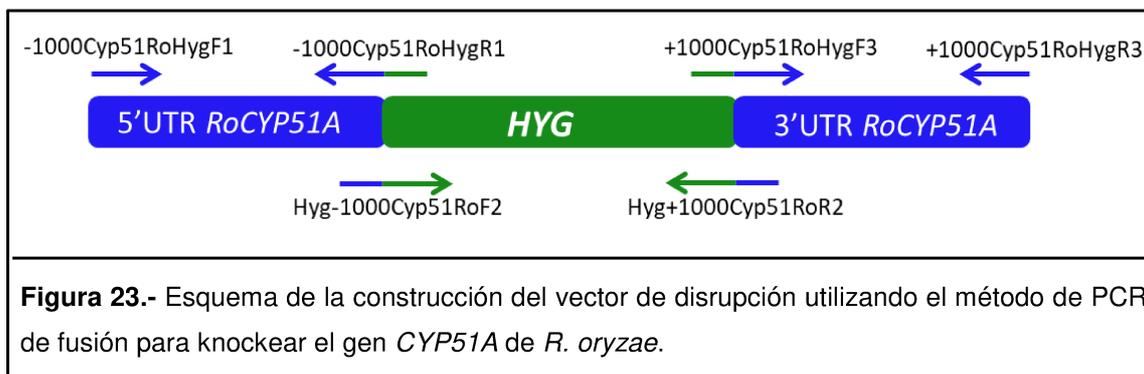


#### Construcción del vector de interrupción p124

El plásmido p124 fue diseñado para generar la interrupción del *CYP51A* de *R. oryzae*, utilizando las regiones no codificantes (5' y 3'UTRs) de este gen y un casete de resistencia a HYGB (droga utilizada como marcador de selección).

Mediante reacciones de PCR de punto final, se generó el casete de interrupción amplificando por un lado el gen de resistencia a HYGB (HYGB fosfotransferasa) utilizando como molde el plásmido LMDM-p20 (vector pGEM-T Easy con el casete de resistencia a HYGB). Por otro lado, se amplificaron las regiones inmediatamente corriente arriba del codón del inicio del gen *CYP51A* y la inmediatamente corriente abajo del codón de stop del mismo gen, utilizando como molde el ADN genómico de *R. oryzae* (**Figura 23**). Los oligonucleótidos que fueron utilizados se describen en la **Tabla 5**. 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 los primers descritos en la **Tabla 5**. El producto de PCR de fusión se analizó mediante una corrida electroforética. Para su almacenamiento se clonó en un pGEM-T® easy vector almacenándose en bacterias *E. coli* TopTen.



**Tabla 5.** Primers utilizados en la construcción del vector p124. <sup>a</sup> *R. oryzae*.

Primer	Secuencia (5'→3')	Uso
-1000Cyp51RoHygF1	AGGTTACTGCACCCATTTGTC	5'UTR <i>CYP51A</i> <i>Ro</i> <sup>a</sup>
-1000Cyp51RoHygR1	GTTGACCTCCACTAGCTCCAGGAAGAGAATGTA ACAAAGGATAG	5'UTR <i>CYP51A</i> <i>Ro</i> <sup>a</sup>
Hyg-1000Cyp51RoF2	ATCCTTTGTTACATTCTCTTCCTGGAGCTAGTGG AGGTCAAC	Hygromicina
Hyg+1000Cyp51RoR2	ATTATTAATAGATAATAGGTTTAACTGGTTCCCG GTCGGCA	Hygromicina
+1000Cyp51RoHygF3	TGCCGACCGGGAACCAGTTAAACCTATTATCTAT TTAATAATAAACTA	3'UTR <i>CYP51A</i> <i>Ro</i> <sup>a</sup>
+1000Cyp51RoHygR3	AGAAGACGTGCAGAGAATGAG	3'UTR <i>CYP51A</i> <i>Ro</i> <sup>a</sup>

#### 3.4.4.4. Generación de vectores de fúngicos por mutagénesis dirigida.

Los vectores fúngicos LMDM-p148, LMDM-p149 y LMDM-p150 utilizados en este trabajo para evaluar mutaciones puntuales en el *RoCYP51A* se construyeron mediante mutagénesis dirigida por PCR. Así, para obtener las sustituciones de aminoácidos F129Y,

A290T y F129Y/A290T las mutaciones puntuales a introducir en el gen *CYP51A* fueron t386a, g868a y t386a/g868a, respectivamente. Se diseñaron primers con la mutación deseada en el centro del mismo, de esta manera se forzó el alineamiento de los oligonucleótidos y la incorporación de la base deseada a la secuencia del DNA.

Para obtener los fragmentos deseados para cada vector, se realizaron tres reacciones de PCR individuales y secuenciales.

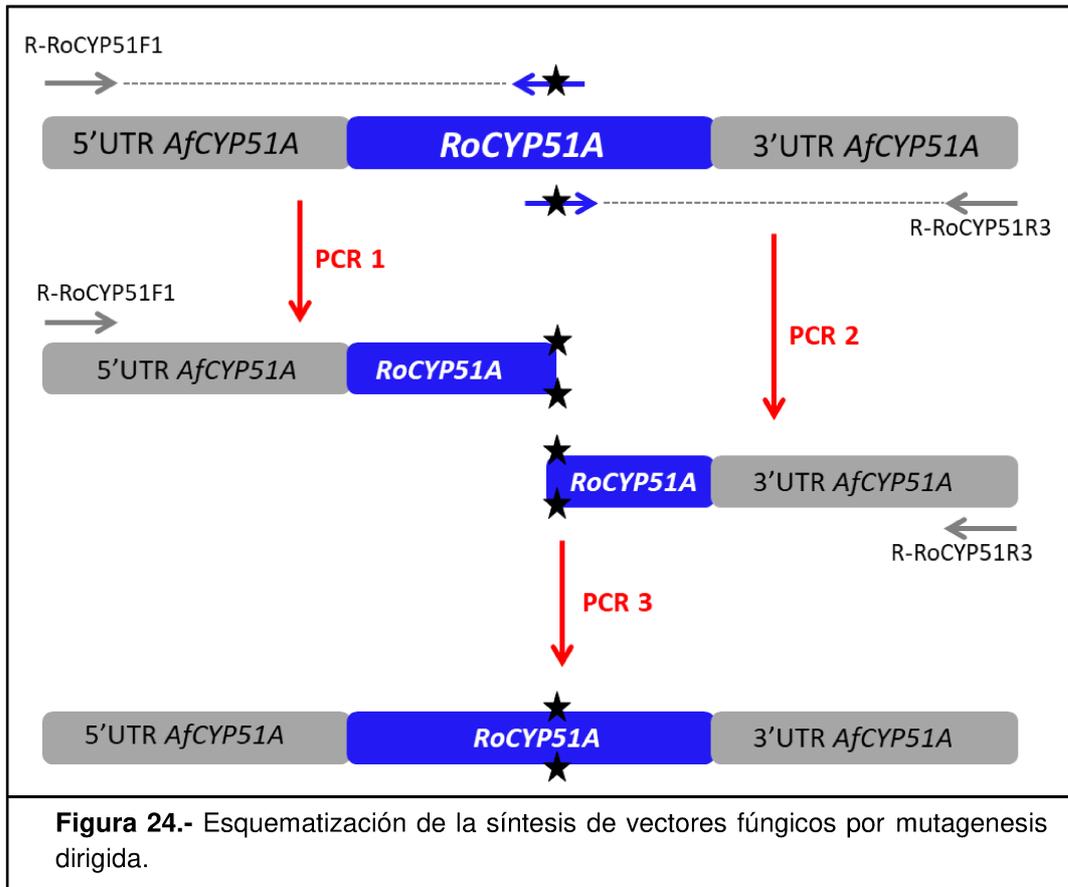
Para la construcción del vector LMDM-p148, en la primera y segunda reacción de PCR se utilizó como DNA molde 25 ng del plásmido LMDM-p134 con el par de oligonucleótidos R-RoCYP51F1/R-RoCYP51F129Y y el par F-RoCYP51F129Y / R-RoCYP51R3, respectivamente. (**Figura 24 y Tabla 6**). Los productos de estas reacciones incorporaron en uno de sus extremos la mutación deseada.

En la tercera reacción de PCR se utilizaron los iniciadores R-RoCYP51F1 y R-RoCYP51R3 y 12,5 ng de DNA de cada uno de los fragmentos obtenidos en las dos reacciones anteriores.

**Tabla 6.** Oligonucleótidos empleados en la técnica de mutagénesis dirigida.

Primer	Secuencia	Uso
F-RoCYP51F129Y	GAAATGACATCGTGT <u>A</u> CGACACGGCCACAG	Introducir mutación F129Y
R-RoCYP51F129Y	CTGTGGGCCGTGTCG <u>T</u> ACACGATGTCATTTTC	Introducir mutación F129Y
F-RoCYP51A290T	GTGGTATCTTGACG <u>A</u> CTGCGCTCTTTGGC	Introducir mutación A290T
R-RoCYP51A290T	GCCAAAGAGCGCAG <u>T</u> CGTCAAGATACCAC	Introducir mutación A290T
R-RoCYP51F1	GAATATATACGTTCGATCTGTGTG	5'UTR <i>CYP51A Af</i> <sup>a</sup>
R-RoCYP51R3	ATCCAGCAGATACGCTGGTC	3'UTR <i>CYP51A Af</i> <sup>a</sup>

De esta manera, se obtuvo el gen *RoCYP51A* completo con la mutación deseada en la posición 386. Este producto final de 1,5 kb se clonó en un vector pGEMT-easy y se obtuvo así el plásmido LMDM-p148 (**Figura 24**).



De la misma forma se construyó el plásmido LMDM-p149, pero utilizando los primers R-RoCYP51F1/ R-RoCYP51A290T y el par F-RoCYP51A290T/R-RoCYP51R3 en las PCR 1 y 2 respectivamente. Luego de una tercer PCR de fusión, el fragmento obtenido, que incluye el gen *CYP51A* con la mutación g868a, se clonó en un vector pGEMT-easy para obtener el plásmido LMDM-p149.

En el caso del *RoCYP51A* con la doble sustitución F129Y/A290T, se utilizó el plásmido p148 como DNA molde para la primera y segunda reacción de PCR y los primers R-RoCYP51F1/R-RoCYP51A290T y el par F-RoCYP51A290T/R-RoCYP51R3, respectivamente. Los fragmentos así obtenidos se fusionaron en una tercer PCR de fusión con los primers R-RoCYP51F1y R-RoCYP51R3. De esta forma, al fragmento de ADN que ya tenía incorporado la mutación t386a se le añadió la segunda mutación g868a y se clonó la construcción completa en el vector pGEMT-easy, obteniéndose así el vector LMDM-P150.

### 3.4.4.5. PCR real time

Se realizaron reacciones de PCR-real time (qPCR) para evaluar si existe una amplificación del número de copias de los genes *CYP51A* y *CYP51B* de *R. oryzae*, respecto a un gen de referencia, como es el gen de expresión constitutiva *ACT1* (Actina1).

El diseño de los 3 pares de primers se realizó utilizando la herramienta “Primer Quest” disponible en la página web de Integrated DNA Technologies ([www.idtdna.com](http://www.idtdna.com)). La secuencia de los mismos se detalla en la **Tabla 7**.

**Tabla 7.** Oligonucleótidos utilizados en la qPCR para el ensayo de cuantificación génica.

Gen target	Primers	Secuencia 5' → 3'	Fragmento (pb)
<i>CYP51A</i>	RoCYP51A-F2-RT	CATCGTGTTCTAGCGACTTAC	128
	RoCYP51A-R2-RT	GGTACCGCCTTTGGATCTTT	
<i>CYP51B</i>	RoCYP51B-F2-RT	GACCCGACCTTATTCGTGATTT	116
	RoCYP51B-R2-RT	GCGAACGCAGCTGTCTAATA	
<i>ACT1</i>	RoACT1-F2	TGGTGTTACCCACACTGTTC	110
	RoACT1-R2	CGAGGATACGCATCAAGTAGTC	

Los ensayos de qPCR se realizaron en el equipo Step One Real Time PCR system (Applied Biosystem, Buenos Aires, Argentina). Cada reacción se realizó en un volumen final de 10 µl conteniendo 2 µl de 5X HOT FIREPo<sup>®</sup>EvaGreen<sup>®</sup> qPCR Mix Plus (ROX) (Solis BioDyne, Tartu, Estonia), 0,25 µM de cada oligonucleótido forward y reverse, 2,5 µl de ADNg y 5 µl de agua destilada estéril. Para establecer la concentración óptima de ADNg, se utilizaron como templado 5 diluciones seriadas al medio del ADNg, partiendo de 100 ng/µL hasta 6,25 ng/µL. Además, en cada experimento y para cada par de primers, se corrió un tubo control, sin templado, para evitar la detección de productos de PCR inespecíficos.

Una vez establecida la concentración óptima de ADNg, se realizaron por duplicado las reacciones de qPCR para cada gen. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 15 min a 95 °C, 40 ciclos de: 15 seg a 95 °C, 15 seg a 52°C, 15 seg a 72°C y 10 seg a 74°C (lectura). La especificidad de los amplicones fue verificada mediante el análisis de la curva de melting, realizada después de los 40 ciclos de PCR, en las siguientes condiciones: 15 seg a 95°C, realizando la lectura 1 min/grado de 70-95°C, 15 seg a 95°C.

El punto final cuantitativo para la PCR en tiempo real es el valor Ct (del inglés *cycle threshold*). El Ct se define como el ciclo de PCR en el cual la señal de fluorescencia cruza un umbral colocado arbitrariamente (threshold line). El valor numérico del Ct está inversamente

relacionado con la cantidad de amplicón en la reacción (es decir, cuanto más bajo es el Ct, mayor es la cantidad de amplicón) [191]. Los valores de Ct obtenidos para los genes *CYP51* se normalizaron utilizando los datos obtenidos para el gen de referencia *ACT1* [191–194].

### 3.4.5. 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  $\mu\text{M}$  en la solución madre de los primers. A partir de esta solución madre se prepararon diluciones de 10  $\mu\text{M}$  o 5  $\mu\text{M}$  en función de si los oligonucleótidos iban a ser utilizados en PCR o para secuenciación, respectivamente. Estas soluciones se conservaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . En la **Tabla 3** se detallan las secuencias de los mismos.

### 3.4.6. Bioinformática

Los software empleados en el procesamiento informático de las secuencias de DNA y proteínas fueron BioEdit (version 7.2.5) software y Vector NTI Advance (versión 11.5.4) software.

- 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>))
- Fungi Data Base( <https://fungidb.org/fungidb/> )  
En éste portal, se utilizó la herramienta *sinteny* para para evaluar la localización física de cada uno de los genes *RoCYP51* utilizando las herramientas synteny de FungiBD
- AII-I ONE SEQ-ANALYZER Versión 1.36 (<http://wwwpersonal.umich.edu/~ino/blast.html>)  
Este portal se utilizó para generar secuencias FASTA y eliminar errores en las secuencias.

### 3.4.7. Electroforesis en geles de agarosa.

El análisis de fragmentos de ADN obtenidos se llevó a cabo mediante la técnica de electroforesis utilizando geles de agarosa al 1 - 1,5% (p/v) en buffer de electroforesis TAE, con la adición de gel-*Green Biotium®* (Genbiotech, Argentina) a una concentración final de 0,3 µg/ml. Cada muestra se sembró en el gel adicionando previamente *buffer* de siembra de ADN. Los geles se corrieron en *buffer* TAE a 100 V utilizando el sistema *Mini-Sub Cell GT* (Bio-Rad, Argentina). La visualización de cada fragmento de ADN retenido en el gel se realizó bajo luz azul pura (310 nm) con ayuda de un transiluminador DR- 46B (*Clare Chemical Research Dark Reade*, Biodynamics Argentina). En todos los casos, las muestras se corrieron junto con un marcador de peso molecular de referencia.

- **Buffer de electroforesis: tris acetato EDTA (TAE)**

Tris	40 mM
Ácido Acético	40 mM
EDTA	1 mM
pH	8,0

- **Buffer de siembra de ADN**

Azul de algodón	0,25 %
Glicerol	30 %
Agua destilada	69,75 %

### 3.4.8. Purificación de ADN desde geles de agarosa.

Los fragmentos de ADN obtenidos a partir de las reacciones de PCR o de las digestiones enzimáticas se corrieron en geles de agarosa al 1 - 1,5%, como se explicó en el inciso anterior. Una vez identificado cada segmento de interés, se recortó la porción del gel que lo contenía con bisturí, y se purificó con el sistema comercial *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante.

### 3.4.9. Ligación de fragmentos de ADN.

Para realizar las reacciones de ligación se mezclaron volúmenes de inserto y vector en una relación molar de 3 a 1 respectivamente, y se siguieron las instrucciones del fabricante. La

reacción se mezcló y se incubó a 4°C durante toda la noche para aumentar el rendimiento de la ligación.

#### **3.4.10. Transformación de *E. coli* por método de shock térmico (Método de Hanahan) [187]**

- Preparación de células competentes:

Las células de *E. coli* TOP 10 se hicieron crecer en medio LB líquido, a 37 °C y con agitación de 180 rpm durante 16-18 horas. Una vez conseguido un cultivo saturado, se realizó una dilución 1/20 del mismo en medio LB fresco y se incubó en iguales condiciones hasta alcanzar una  $DO_{600} = 0,5 - 0,6$  característica de la fase de crecimiento logarítmica. 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, CaCl<sub>2</sub> 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 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 y nuevamente se incubó 2 min en hielo. Inmediatamente 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). Las placas se incubaron en estufa a 37 °C hasta la visualización de colonias.

#### **3.4.11. Minipreparación de ADN plasmídico.**

##### **3.4.11.1. 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 impregnadas con 4 µl de Isopropyl B-D-Thiogalacto-Pyranoside (IPTG) 200 mg/ml y con 40 µl de 5-Bromo-4-Cloro-3-Indol-β-D-galactopiranosido (X-Gal) 20 mg/ml. Las placas 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 seque. Posteriormente, el pellet celular se resuspendió en 100 µl de la solución 1 (50 mM Glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM EDTA pH 8), se incubó 5 min a temperatura ambiente y se añadieron 200 µl de la solución 2 (0,2N NaOH y 1% SDS). 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 (3M Acetato de potasio, 2M ácido acético) fría.

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 hs a 37°C.

#### 3.4.11.2. Soluciones de Isopropyl B-D-Thiogalacto-Pyranoside 200mg/ml (IPTG) y 5-Bromo-4-Cloro-3-Indol-β-D-galactopiranosido (X-Gal) de 20mg/ml.

El IPTG (Sigma-59740) y el 5-Bromo-4-Cloro-3-Indol-β-D-galactósido (X-Gal) (Sigma-B4252), se utilizaron como indicadores de la integración de un fragmento de DNA en los plásmidos de pGEM-T Vector Systems®. La solución de IPTG se preparó de la siguiente manera: 250 mg de IPTG 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 repartieron en tubos eppendorf estériles con 25 µl cada uno y se guardaron a – 20 °C.

#### 3.4.11.3. 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. Finalmente se realizó la extracción del ADN plasmídico con el *kit* comercial *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los plásmidos obtenidos se examinaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% y se almacenaron a - 20 °C.

#### **3.4.12. Digestión enzimática de ADN.**

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

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

Las reacciones de digestión del ADN se realizaron a 37 °C, durante 2 h y en un volumen final de 20 µl utilizando enzimas de restricción Promega o Thermo Scientific, según las indicaciones del fabricante. Los productos obtenidos se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, se identificaron por comparación con un marcador de peso molecular de referencia y se purificaron a partir del gel como se explicó anteriormente.

#### **3.4.13. Secuenciación de ADN.**

La secuenciación nucleotídica automática del ADN fue llevada a cabo por la empresa Genbiotech (Buenos Aires, Argentina).

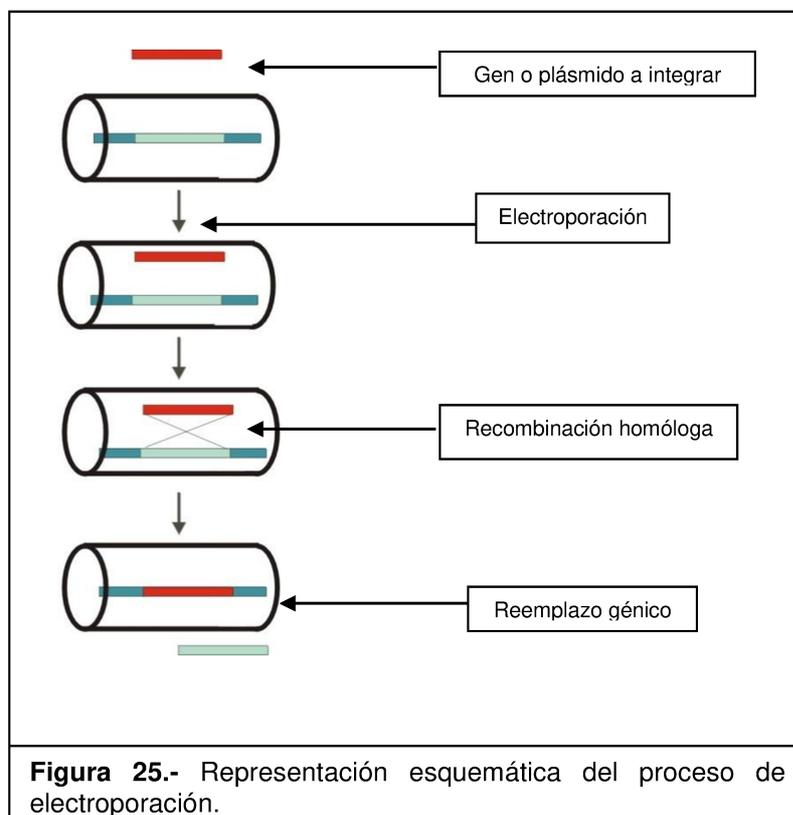
#### **3.4.14. Transformación de *A. fumigatus* por electroporación**

El procedimiento por el cual se incorpora ADN exógeno a una célula se denomina transformación. Para realizar las transformaciones de *A. fumigatus* se utilizó

la técnica de electroporación. Esta técnica se fundamenta en el uso de electricidad para generar poros en los conidios para que el DNA exógeno se introduzca a través de los mismos (**Figura 25**). Como ADNs exógenos se utilizaron fragmentos de PCR purificados.

La cepa LMDM-32 ( $\Delta KU80$  y  $\Delta CYP51A$ ) de *A. fumigatus* se utilizó como cepa parental. La misma fue obtenida por nuestro grupo en un trabajo previo [158] y tiene la característica de ser resistente a HYGB.

La cepa a transformar se cultivó en tubos de PDA, a 37°C durante 72 horas. Los conidios de *A. fumigatus* recolectados y lavados 3 veces con agua destilada estéril se utilizaron para inocular 25 ml de medio YG a una densidad final de  $10^7$  conidios / ml. El cultivo se incubó a 37°C en agitación (300rpm) durante 4 horas. Los conidios hinchados se cosecharon por centrifugación, se lavaron una vez con agua estéril fría, se resuspendieron en 12,5 ml de YED pH 8,0 y se incubaron durante 60 minutos a 30°C en agitación a 100rpm. Tras una centrifugación a 9000 g (5 min), los conidios se lavaron 2 veces con buffer de electroporación (BE) y posteriormente se resuspendieron en 1mL del mismo BE frío. De esta suspensión de células competentes se tomaron 50  $\mu$ l, se mezclaron con 0,3  $\mu$ g de ADN en 10 $\mu$ l de agua y se incubaron en hielo durante 15 minutos. La mezcla de transformación se transfirió a una cubeta de electroporación de 0,2 cm (BioRad) y se sometió a un pulso de 1500 V, 25  $\mu$ F y 400  $\Omega$ , utilizando el electroporador [Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems](#) (BioRad). Inmediatamente después de la electroporación, se agregó 1mL de medio YED frío a la



cubeta, se transfirió la suspensión celular a un tubo Falcon estéril de 15mL, se mantuvo en hielo durante 15 minutos y se incubó a 30°C durante 90 minutos en agitación a 100rpm. Cada tubo con la suspensión de esporas se sembró en cuatro placas de 15 ml de MM sólido (0,25 ml por placa) y se incubó toda la noche a temperatura ambiente. Finalmente, para la selección antibiótica de transformantes se volcó sobre cada placa 15 ml de MM (0,6 % de agarosa) fundido con el antibiótico utilizado como marcador de selección, FLC (100 µg/ml). Estas placas se incubaron boca arriba a 37 °C y se observaron diariamente hasta la aparición de colonias.

La composición de los medios de cultivos y soluciones empleadas se detalla a continuación:

- **Glucosa – Extracto de Levadura (YG)**

Glucosa	2,0 g
Extracto de Levadura	0,5 g
Agua destilada	100 mL

- **Dextrosa – Extracto de Levadura (YED)**

Extracto de Levadura	1,0 g
Glucosa	1,0 g
Hepes	0,47 g
Agua destilada	100 mL
pH	8,0

- **Medio Mínimo (MM)**

Tartrato de Amonio	0,92 g
Glucosa	10 g
Solución sales de Aspergillus 50x *1	0,47 g
Agua destilada	100 mL

- **MM-agar:** MM adicionado con agar al 1,5% (p/v).

- **MM-agarosa:** MM adicionado con agarosa al 0.6% (p/v).

**\*1 Solución sales de Aspergillus 50x**

Cloruro de potasio (KCl)	26 g
Sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	26 g
Dihidrógeno fosfato potásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	76 g
Solución de elementos traza 20X * <sup>2</sup>	50 ml
Agua destilada	CSP 1000 mL
pH	6,5

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

**\*2 Solución de elementos traza 20X**

Sulfato de zinc heptahidratado (ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	2,20 g
Ácido bórico (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	1,10 g
Cloruro de manganeso (II) tetrahidratado (MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O)	0,5 g
Sulfato de hierro (II) heptahidratado (FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	0,5 g
Cloruro de Cobalto (II) hexahidratado (CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O)	0,16 g
Sulfato de cobre (II) heptahidratado (CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O)	0,16 g
Molibdato de amonio tetrahidratado ((NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O)	0,11 g
EDTA tetra sodico (Na <sub>4</sub> EDTA.4H <sub>2</sub> O)	6,00 g
Agua destilada	CSP 100 mL
pH	6,5

• Buffer de Electroporación (BE)

Tris-HCl (1M) pH 7.5	1 ml
Sacarosa	9,24 g
Acetato de litio (1M)	100 µL
Agua destilada estéril	CSP 100 ml

### **3.4.15. Estandarización de un protocolo de Transformación de *R. oryzae* por electroporación**

Para realizar las transformaciones de *R. oryzae* se estandarizó la técnica de electroporación, adaptando lo descrito para *A. fumigatus*.

#### Velocidad de germinación

En primera instancia se evaluó la velocidad de germinación de la cepa *R. oryzae* LMDM-597 a utilizar. Los esporos de la cepa crecida en PDA se cosecharon y lavaron con agua destilada y se utilizaron para inocular un Erlenmeyer conteniendo 25ml de medio YG, a una densidad de  $2 \times 10^8$  esporos/mL. El cultivo se incubó en agitación rápida a 30° y 37°C y se evaluó por microscopía el grado de germinación de los esporos cada hora de incubación.

#### Condiciones de electroporación

Una vez establecida la mejor condición de germinación, se evaluaron las condiciones de electroporación con un casete de resistencia a la HYGB [195]. Se probaron condiciones de voltaje de 1000 a 3000v y de resistencia de 200 a 400  $\Omega$ , utilizando el electroporador Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems, BioRad.

#### Obtención de colonias de aisladas

La selección de transformantes en medio yeast peptone dextrose (YPD) con HYGB se realizó con la adición de dicloran (DC) y rosa de bengala (RB) que limitan el tamaño de las colonias de Mucorales evitando la invasión completa de las placas. Para evaluar el crecimiento diferenciado de *R. oryzae*, se sembraron concentraciones de  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^2$  y  $1 \times 10^1$  esporas/mL en placas de YPD con y sin RB y DC, y se incubó a 30°C hasta aparición de colonias. Una vez confirmada la acción de RB y DC, se determinó la inhibición del crecimiento de *R. oryzae* frente a HYGB, sembrando una concentración de  $2 \times 10^3$  esporas/mL en placas de YPD suplementadas con HYGB en concentraciones de 0, 20, 40, 60, 80, 100 y 200  $\mu\text{g/mL}$ , en presencia de 3  $\mu\text{g/mL}$  de DC y 100  $\mu\text{g/mL}$  de RB.

#### Generación de cepas de *R. oryzae* defectivas en el *CYP51A*

A partir de las condiciones de transformación establecidas, se transformó *R. oryzae* con el vector de disrupción LMDM-p124, utilizando diferentes concentraciones del plásmido cerrado, linealizado y digerido con enzimas de restricción. La electroporación se realizó a 200 $\Omega$ , 25 $\mu\text{F}$  y con condiciones de voltaje de 1000 a 3000v. La selección de transformantes se realizó en medio YPD, con 100  $\mu\text{g/mL}$  de HYGB, 3  $\mu\text{g/mL}$  de DC y 100  $\mu\text{g/mL}$  de RB.

- **Dextrosa -Peptona- Extracto de Levaduras (YPD)**

Peptona de Carne o Pluripeptona	20g
Extracto de Levadura	10g
Glucosa	20g
Agua destilada	1000ml

- **YPD-agar:** YPD adicionado con agar al 1,5% (p/v).

### **3.5. Evaluación de la sensibilidad a drogas individuales y combinadas, *in vitro* e *in vivo*.**

#### **3.5.1. Pruebas de sensibilidad *in vitro***

##### 3.5.1.1. Técnica de microdilución en caldo utilizando como método de referencia CLSI protocolo M38-Ed3 para establecer la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

###### 3.5.1.1.1 Antifúngicos,

En este trabajo se utilizaron los siguientes antifúngicos: anfotericina B (AMB), fluconazol (FLC), voriconazol (VRC), itraconazol (ITC), posaconazol (PSC), isavuconazol (ISAV) y Caspofungina (CSF). Todos los antifúngicos utilizados fueron adquiridos de SIGMA Aldrich, Argentina con la excepción de ISAV que fue cedido por el laboratorio Grupo BioToscana (GBT) quien es el productor original del mismo. Todos los antifúngicos fueron obtenidos como polvo y disueltos en DMSO y se conservaron a – 80 °C hasta su uso.

###### 3.5.1.1.2. Soluciones madres e intervalos de concentraciones probadas

Para la preparación de las soluciones madres de los antifúngicos se siguió el documento M-38-ED3 de CLSI [40] con las siguientes modificaciones:

El rango de concentraciones a evaluar para CSF e ITC fueron de 0,0157 a 8 µg/ml en vez de 0,03 a 16 µg/ml (dada la baja solubilidad que presentó sobre todo el itraconazol de Sigma a 16 µg/ml).

Se evaluó FLC en un rango de 0,125 a 64 µg/ml. Esta droga no está incluida en el documento M38 de CLSI ya que es inactiva frente a aislamientos clínicos de hongos

filamentosos. En nuestro caso la utilizamos porque evaluamos mutantes de laboratorio hipersensibles a fluconazol.

Las concentraciones de las soluciones madres fueron de 1600  $\mu\text{g/ml}$ , 3200  $\mu\text{g/ml}$  y de 12800  $\mu\text{g/ml}$  para aquellos antifúngicos cuyos rangos de concentración a evaluar fueran hasta 8  $\mu\text{g/ml}$ , 16  $\mu\text{g/ml}$  y 64  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente.

#### 3.5.1.1.3. Caldo RPMI1640

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 20,8 g de RPMI1640 comercial en polvo y 69,06 g 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  $\mu\text{m}$  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. Se conservó a 4°C por no más de 45 días.

#### 3.5.1.1.4. Controles de crecimiento

Para los controles de crecimiento del caldo RPMI 1640, se utilizó un inóculo de  $2 \times 10^3$  UFC/ml de *Candida krusei* ATCC-6258 en RPMI del que se dispensaron 100  $\mu\text{l}$  en placas de microdilución con fondo en U que contenían 100  $\mu\text{l}$  de RPMI. Se incubó a 37 °C durante 48 h. La lectura se determinó a las 24 y 48 hs visualmente utilizando como blanco otros pocillos de la misma placa inoculados con 100  $\mu\text{l}$  RPMI (control de esterilidad).

#### 3.5.1.1.5. Preparación de las placas de microdilución para determinar CIM

Para preparar las placas de microdilución se siguió el protocolo de determinación de la CIM para hongos filamentosos por el método de microdilución recomendado por la CLSI (Documento M38-ED3) [40].

#### 3.5.1.1.6. Preparación del inóculo e inoculación de las placas

Para la preparación del inóculo e inoculación de las placas se siguió el protocolo de determinación de la CIM para hongos filamentosos por el método de microdilución recomendado por la CLSI (Documento M38-ED3) [40] utilizando un inóculo final de trabajo de  $0,4 - 5,0 \times 10^4$  obtenido haciendo un recuento microscópico en una cámara hematocimétrica (Improved Neubauer Chamber) [196], [197], [198].

#### 3.5.1.1.7. Lectura e interpretación de resultados

Para la lectura e interpretación de los resultados se siguió el protocolo de determinación de la GMI para hongos filamentosos por el método de microdilución recomendado por la CLSI (Documento M38-ED3) [40].

#### 3.5.1.2. Método de difusión en medio sólido utilizando como método de referencia CLSI protocolo M51-A

##### 3.5.1.2.1. Discos de antimicrobianos

La difusión en agar con discos de papel es un método simple y rápido para la evaluación de la sensibilidad a los antifúngicos. Consta de un disco de papel embebido con el antimicrobiano que va difundiendo en el agar. La concentración dentro del reservorio de papel disminuye y va aumentando alrededor del mismo. Al final se produce un gradiente de concentración alrededor del disco que impide el crecimiento del microorganismo inoculado hasta una zona determinada. En este trabajo se utilizaron discos de papel de VRC y FLC (Oxoid, Argentina).

##### 3.5.1.2.2. Medio Mueller-Hinton Agar

Para la determinación de la sensibilidad a los antifúngicos se utilizó como medio de cultivo el Mueller-Hinton Agar (Laboratorios Britania S.A, Argentina). Para la elaboración del medio se pesaron 37 g del polvo y se disolvieron completamente en 1000 ml de agua destilada.

##### 3.5.1.2.3. Preparación del inóculo y siembra de las placas

Para la preparación del inóculo se siguió el protocolo de determinación de sensibilidad por difusión con disco de los hongos filamentosos recomendado por la CLSI (Documento M51-

A) [199] utilizando un inóculo final de trabajo de  $0,5 - 4,0 \times 10^6$  obtenido haciendo un recuento microscópico en una cámara hematocitométrica (Improved Neubauer Chamber) [196], [197], [198].

La inoculación de las placas se realizó por el método de dispersión con hisopo. Para esto, 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 y con este, se extiende el inóculo por toda la superficie de la placa en 3 direcciones diferentes para asegurar la distribución uniforme del mismo.

#### 3.5.1.2.4. Aplicación de los discos de antimicrobianos en las placas inoculadas

Los discos se colocaron dentro de los 15 minutos de inoculadas las placas, de esa forma la difusión y el crecimiento ocurren en simultáneo. Para asegurar el completo contacto se presionó suavemente el disco contra la superficie del agar. Las placas inoculadas se incubaron a 35 °C durante 24 hs.

#### 3.5.1.2.5. Lectura e interpretación de resultados

La lectura de los resultados se realizó a las 24hs, de manera visual. El diámetro del halo de inhibición se midió en la zona donde se observa una prominente reducción del crecimiento ( $\geq 80\%$ ).

#### 3.5.1.3. Evaluación de la combinación de Antifúngicos por microdilución (método del tablero de ajedrez o checkerboard)

##### 3.5.1.3.1. Antifúngicos

En este trabajo se utilizaron las siguientes drogas y antifúngicos en combinación: amidoarona (AMD), nifedipina (NIF), lanzoprazol (LAN), disulfiram (DIS), AMB, VRC, PSC y CSF obtenidos como polvos estándares de Sigma-Adrich. Todos los antifúngicos se disolvieron en dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma) y se conservaron a  $-80$  °C hasta su uso.

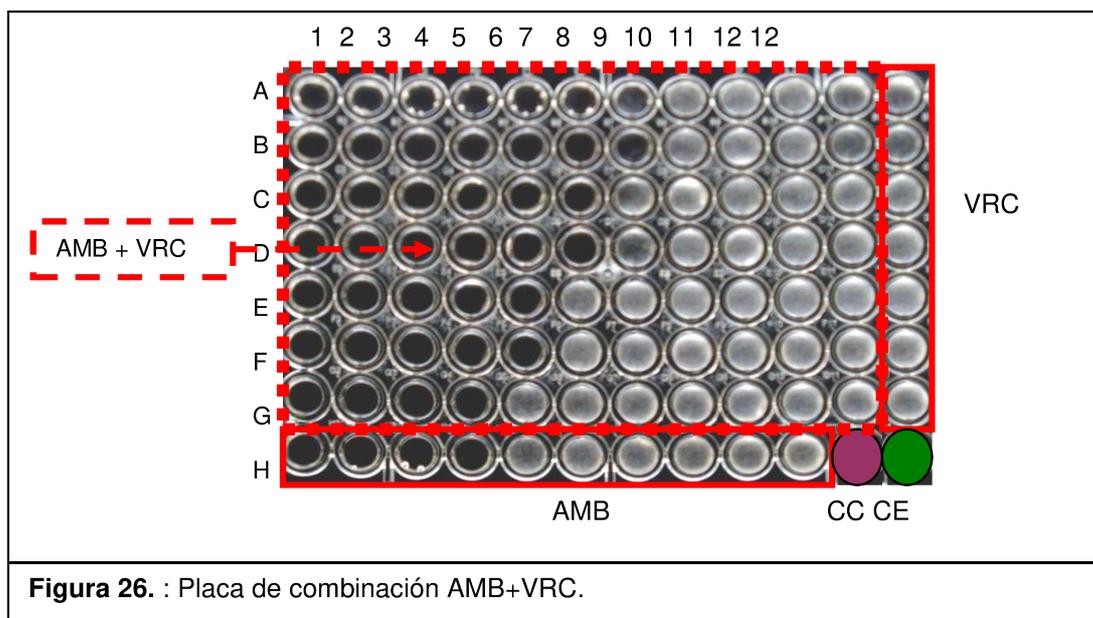
##### 3.5.1.3.2. Soluciones madres de antifúngicos y rango de concentraciones probadas.

Para la preparación de las soluciones madres de los antifúngicos se siguieron las recomendaciones del documento M38-ED3 de CLSI [40]. Las combinaciones que se ensayaron son VRC+AMD, VRC+NIF, VRC+LAN, VRC+DIS, VRC+AMB, VRC+PSC, VRC+CSF.

Para los estudios de combinaciones, cada solución madre de antifúngico se diluyó  $\frac{1}{2}$  en forma seriada en DMSO, y luego nuevamente  $\frac{1}{100}$  en RPMI 1640. De esta manera se debe partir de soluciones del antifúngico cuatrocientas veces más concentradas de la concentración final deseada.

### 3.5.1.3.3. Preparación de placas de combinaciones

Para explicar cómo se prepararon las placas de sinergismo, se tomará como ejemplo la preparación de una placa de VRC-AMB. Una alícuota de  $50 \mu\text{l}$  de cada dilución de AMB se dispuso 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  $50 \mu\text{l}$  de cada dilución de VRC desde la fila A hasta la G. De esta manera, se obtuvo un volumen final de  $100 \mu\text{l}$  con ambos antifúngicos al doble de la concentración final deseada. En los pocillos de la columna 12 y la fila H se dispensaron  $50 \mu\text{l}$  de RPMI 1640 con 1 % de DMSO. Así, la línea H entre los pocillos H1 y H10 solo contenía AMB y la columna 12 entre los pocillos A12 y G12 solo contenía VRC. En los pocillos 11 H y 12 H se añadieron  $100 \mu\text{l}$  de RPMI 1640 con 1 % de DMSO y fueron utilizados como controles de crecimiento y esterilidad, respectivamente (**Figura 26**). Se realizó el mismo protocolo para cada una de las combinaciones estudiadas.



### 3.5.1.3.4. 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.

### 3.5.1.3.5. 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.* [200] y Odds [66]. Para cada combinación se calculó la sumatoria de la concentración fraccional inhibitoria ( $\Sigma$ 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

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

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

CIM del agente B solo

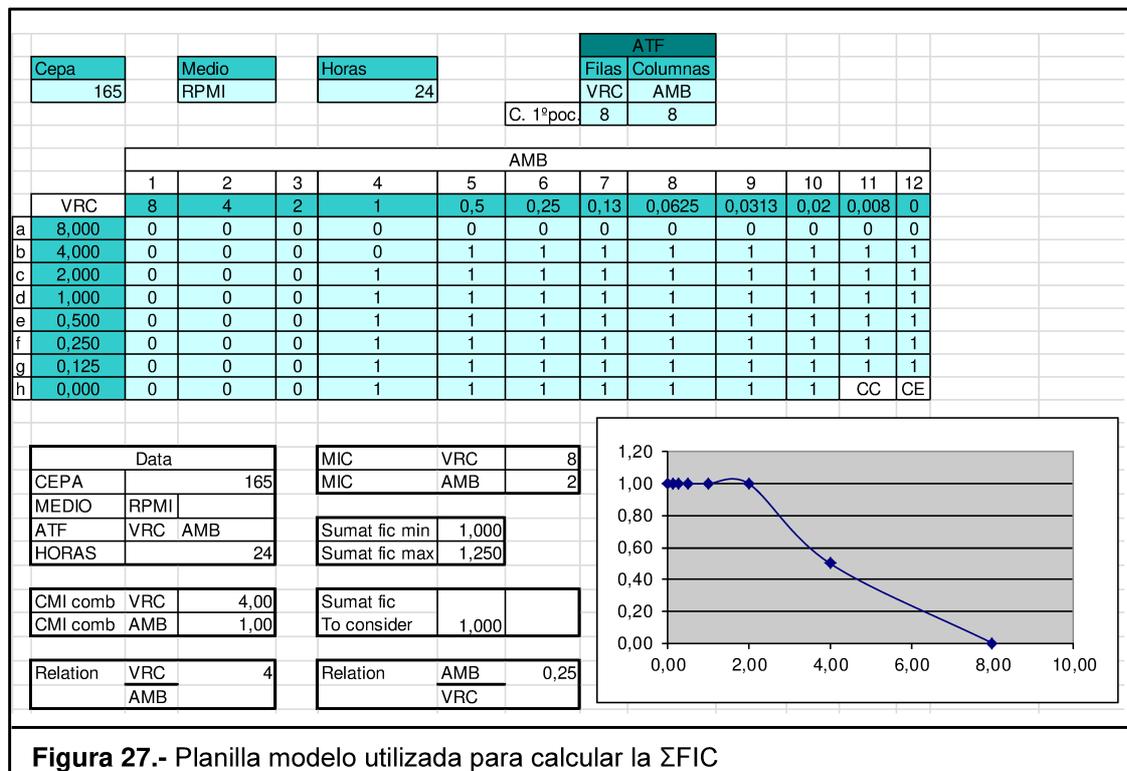


Figura 27.- Planilla modelo utilizada para calcular la  $\Sigma$ FIC

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 27**).

Se interpreta que hay “*sinergismo*” (la actividad de los dos antimicrobianos combinados, es mayor que la actividades separados de los mismos) cuando la  $\Sigma FIC \leq 0.5$ ; “*antagonismo*” (la actividad de los dos antimicrobianos combinados es menor, que la de cada uno individualmente) cuando la  $\Sigma FIC > 4$ , y “*no interacción*” (la actividad de los antimicrobianos combinados, no difiere de la actividad de cada uno por separado) cuando  $0.5 < \Sigma FIC \leq 4$ .

### **3.5.2. Pruebas de sensibilidad *in vivo* utilizando 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) [201].

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 [202], [203], [204], [205], [206].

Las combinaciones de antifúngicos y drogas con actividad fungicida que presentaron sinergismo evidente se evaluaron en un modelo animal de infección por Mucorales, utilizando el invertebrado *Galleria mellonella* como huésped de la infección.

### 3.5.2.1. Puesta a punto del modelo de infección

Para la implementación del modelo experimental invertebrado, se utilizaron larvas de *G. mellonella* en la etapa final del desarrollo (Proporcionado por la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Litoral, Argentina). Las larvas se clasificaron por peso corporal y se dividieron en grupos de 10 individuos que pesaban  $250 \pm 50$  mg (**Figura 27-A**). Para establecer el inóculo óptimo, capaz de causar al menos el 80% de mortalidad a las 48 h (de acuerdo con la mortalidad registrada en humanos) [6], se analizaron diferentes concentraciones de esporas de *R. microsporum* LMDM-165 y *R. oryzae* LMDM-597. Las concentraciones de inóculo se determinaron mediante el recuento de esporas en cámara hematocitómetrica (Improved Neubauer Chamber; Merck S.A.), se ajustaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se confirmaron mediante recuentos viables posteriores a la infección. Se infectaron grupos de 10 larvas con 10  $\mu$ L de las diferentes suspensiones de inóculo de cada cepa, lo que dio como resultado  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  y  $10^7$  esporas / larva. Se usaron jeringas Hamilton (Fisher Scientific, Buenos Aires, Argentina) para inyectar las suspensiones de esporas en el hemocoel de *G. mellonella* a través de la última propata izquierda (**Figura 27-B**). Se utilizaron diferentes grupos control de 10 larvas cada uno, incluido un grupo untouched (no fueron inyectadas), un grupo pinchado y un grupo inyectado con 10  $\mu$ L de PBS. Las larvas se incubaron hasta siete días a 37 °C y la supervivencia se registró diariamente. Se consideraron los puntos finales cuando las larvas no respondieron a la presión física.

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.

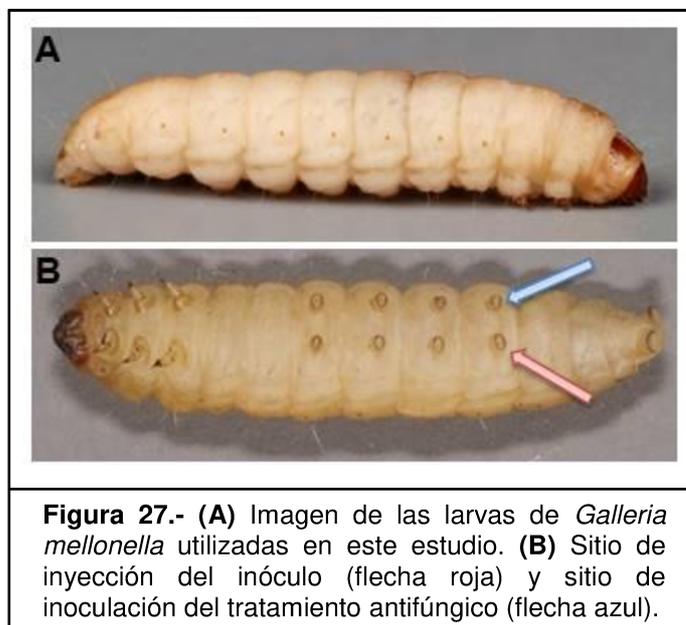
### 3.5.2.2. Puesta a punto de la dosificación de drogas individuales y en combinación

El modelo de tratamiento antifúngico se estableció replicando el experimento descrito anteriormente, pero modificando el número de dosis de AMB y agregando un grupo de control de toxicidad. Se eligió AMB para evaluar el aumento de supervivencia (en comparación con el control de la infección), ya que este polieno es uno de los antifungicos de elección para tratar la mucormicosis [207] y el más utilizado en Sudamérica para tratar estas micosis. La preparación de los agentes antifúngicos para la inyección, las dosis utilizadas y la tolerabilidad del tratamiento en larvas de *G. mellonella* se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Kloezen et al [208]. El número de dosis necesarias para mejorar la

supervivencia a las 96 h después de la infección se evaluó probando el efecto de una, dos o tres dosis de droga sobre la larva infectada dentro de las 2 h, 26 h y 50 h después de la infección, también siguiendo el procedimiento descrito por Kloezen et al [208].

### 3.5.2.3. Evaluación del efecto de drogas individuales y combinadas en *G. mellonella* infectadas con Mucorales

Se inocularon en la última propata derecha de cada larva diez  $\mu\text{L}$  de cada una de las soluciones de droga probadas, que dieron como resultado una concentración final de 1 mg/kg para AMB y CSF y 10 mg/kg para VRC y PSC (**Figura 27-B**). Las concentraciones utilizadas son equivalentes a las concentraciones terapéuticas [207].



**Figura 27.- (A)** Imagen de las larvas de *Galleria mellonella* utilizadas en este estudio. **(B)** Sitio de inyección del inóculo (flecha roja) y sitio de inoculación del tratamiento antifúngico (flecha azul).

Los grupos de *G. mellonella* que recibieron tratamientos combinados se inocularon con 10  $\mu\text{L}$  de una solución de drogas combinadas utilizando las dosis antifúngicas más bajas donde se observaron alteraciones de las hifas (AH) (más detalles en la sección de resultados). Estas dosis fueron utilizadas para evaluar el impacto de la AH en un modelo *in vivo*. La reducción en las concentraciones probadas se realizó de acuerdo con los resultados obtenidos para *R. microsporus* LMDM-165 en los experimentos de sinergismo *in vitro* (más detalles en la sección de Resultados). Los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron tres días diferentes con resultados similares usando 10 larvas de *G. mellonella* por condición probada (total  $n = 30$ ).

### 3.5.3. Análisis de datos.

La sensibilidad *in vitro* (CIM y  $\Sigma$ FIC) y los datos *in vivo* son el resultado de experimentos realizados por triplicado y en tres días separados. Las variables continuas (SFIC) se expresan como medias aritméticas, mientras que las medias geométricas (GM) se utilizaron para comparar estadísticamente los resultados de CIM. Las CIM fuera de escala se convirtieron en la siguiente concentración hacia arriba o hacia abajo y se incluyeron en el análisis.

Para establecer diferencias de sensibilidad entre las cepas, los valores de CIM se aproximaron a una distribución normal al transformarlos en valores  $\log_2$ . Los niveles de significación de las diferencias de susceptibilidad se determinaron mediante la prueba t de Student (varianza desigual no pareada). Los valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados significativos.

El análisis de supervivencia de Kaplan-Meier se utilizó para comparar el tiempo de muerte de cada grupo de larvas en los modelos de infección y tratamiento de *G. mellonella*.

Los valores de probabilidad (p) se calcularon mediante la prueba de log rank (Mantel-Cox). Un valor de  $P \leq 0.05$  se consideró significativo. Los análisis estadísticos fueron realizado con GraphPad Prism, versión 7.03 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EE. UU.).



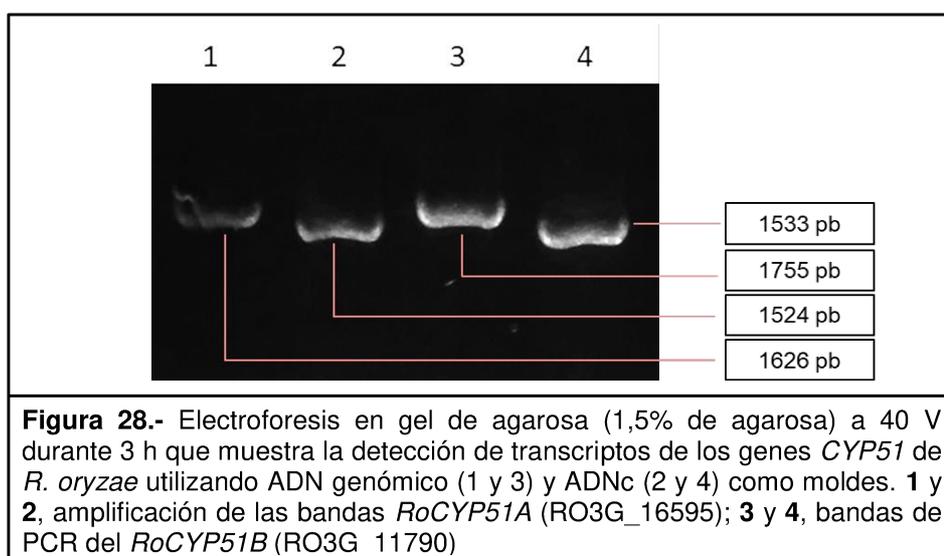
# **RESULTADOS**

## 4.-RESULTADOS

### 4.1. Análisis de las secuencias nucleotídicas de los genes *CYP51* de *R. oryzae* y su relación con los distintos patrones de resistencia.

#### 4.1.1. Estudio *in silico* de la secuencia nucleotídica de los genes *CYP51* de *R. oryzae*.

Dos genes *CYP51* parálogos fueron encontrados en el genoma de *R. oryzae*, donde fueron clasificados como ORF hipotéticos y se denominaron RO3G\_16595 y RO3G\_11790. La amplificación por transcripción reversa-PCR (RT-PCR) demostró que ambas *Cyp51ps* de *R. oryzae* se expresan durante el crecimiento en cultivo líquido (**Figura 28**). El primero de estos ORF posee 1.626 nucleótidos (nt), mientras que el segundo posee 1.755 nt, y los dos ORF están interrumpidos por 2 intrones (de 50 nt y 52 nt) y 4 intrones (de 56 nt, 58 nt, 58 nt, y 50 nt), respectivamente. Estos genes codifican dos proteínas de 508 aminoácidos (aa) y 511 aa, respectivamente, y ambas fueron identificadas como 14-esterol desmetilasas putativas en comparación con *CYP51ps* fúngicas conocidas, usando la herramienta BLAST para proteína. Empleando esta herramienta, el porcentaje de identidad más fuerte para la proteína hipotética RO3G\_16595 fue con el *Cyp51ps* de *Rhizopus microsporus var. microsporus*, *Parasitella parasitica* y *Mucor ambiguus* (con un rango de identidad de 78 a 74%).



Por otro lado, el ORF de la proteína RO3G\_11790 mostró un alto porcentaje de identidad con los diferentes Cyp51ps de *Rhizopus microsporus var. microsporus*, *Mucor circinelloides* y *Mucor ambiguus* (78 a 75%). Teniendo en cuenta que diferentes especies de Ascomycetes filamentosos poseen dos Cyp51ps diferentes y relacionados [99], se realizó un análisis de sintenia para identificar inequívocamente estos genes como *CYP51A* o *CYP51B* cuando las secuencias se comparan con las secuencias del genoma de *Aspergillus*. Sin embargo, utilizando diferentes software de sintenia, los genes *CYP51* de *R. oryzae* no pudieron clasificarse como *CYP51A* o *CYP51B* ya que los genes no se colocan dentro de los mismos cromosomas que en *Aspergillus* spp. Cuando las secuencias Cyp51p de *R. oryzae* se analizaron mediante el método UPGMA y se compararon con las secuencias de otros Cyp51p / Erg11p parálogos, se observaron cinco grupos. Dos de los grupos incluyeron los Cyp51Ap y Cyp51Bp ya conocidos de ascomycetes filamentosos. El tercer y cuarto grupo incluyeron los Erg11p de Ascomycetes y Basidiomycetes levaduriformes. Todos los Cyp51ps de Mucorales publicados se agruparon junto con los dos Cyp51ps estudiados en este trabajo (RO3G\_16595 y RO3G\_11790) en el quinto grupo (**Figura 29**). En este último grupo o cluster, se observaron dos subgrupos o subclusters en los cuales RO3G\_16595 se separó de RO3G\_11790.

Dado que no se pudo obtener una diferenciación clara, decidimos nombrar el gen RO3G\_11790 como *RoCYP51B*, basándonos en su baja, pero significativa, similitud de secuencia de aminoácidos con el *CYP51B* de *A. fumigatus* (46% de identidad) obtenida usando la herramienta BLASTP.

Por otro lado, hubo pocas 14-esterol desmetilasas no-mucorales que mostraron una similitud de secuencia de más del 40% con RO3G\_16595. Algunos ejemplos son el Erg11p del Basidiomycete *Malassezia pachydermatis* (número de acceso de GenBank XP\_017991977.1) y el Erg11p del Ascomycete *Pneumocystis jirovecii* (número de acceso de GenBank XP\_018230821.1), que mostró 44 y 45% de identidades con RO3G\_16595. Teniendo en cuenta el hecho de que *R. oryzae* tiene dos genes *CYP51* y que el RO3G\_11790 tiene homología con los genes *CYP51B*, decidimos nombrar arbitrariamente el gen RO3G\_16595 como *CYP51A* y estudiarlo como el gen potencialmente responsable de la resistencia intrínseca a VRC y FLC.

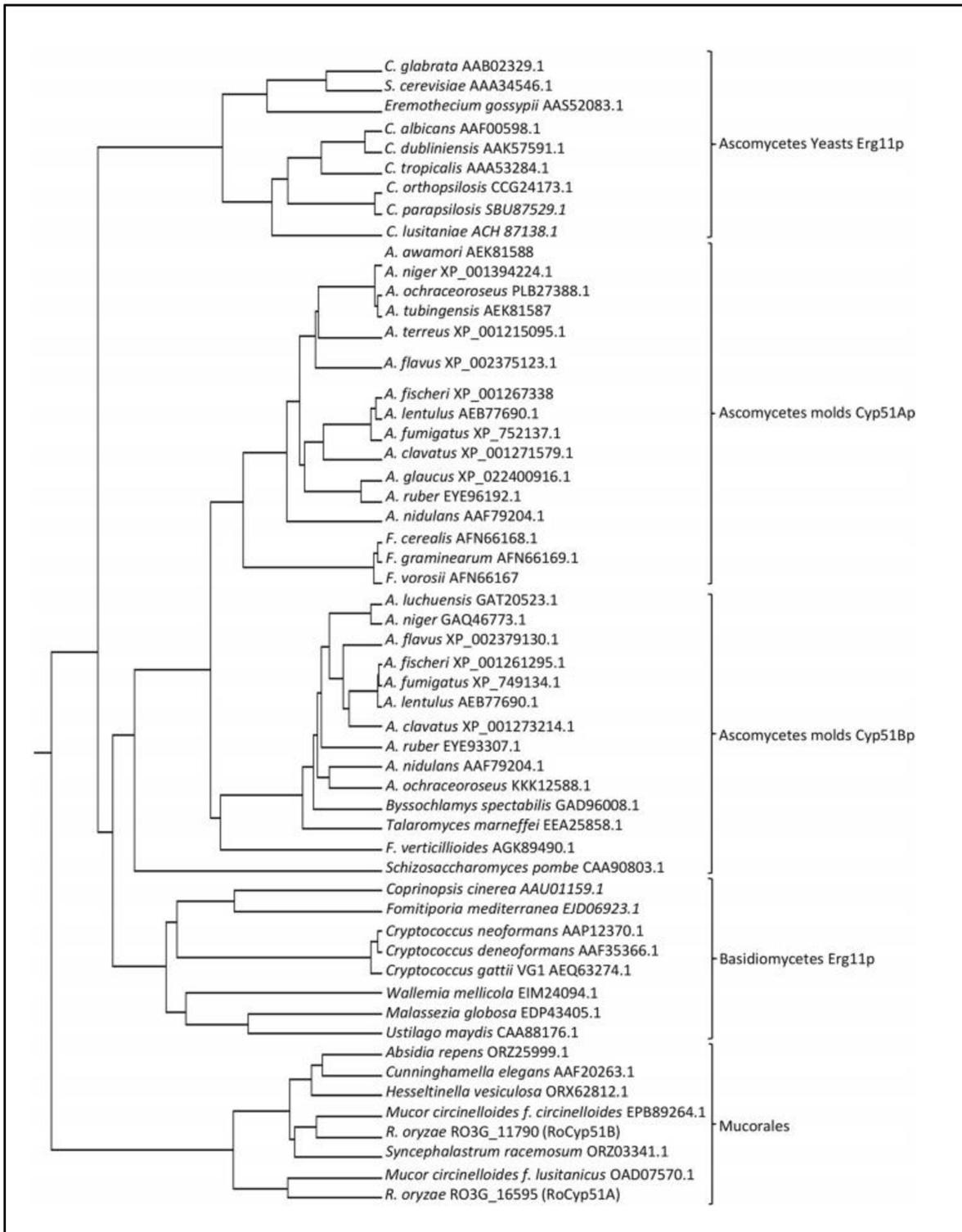
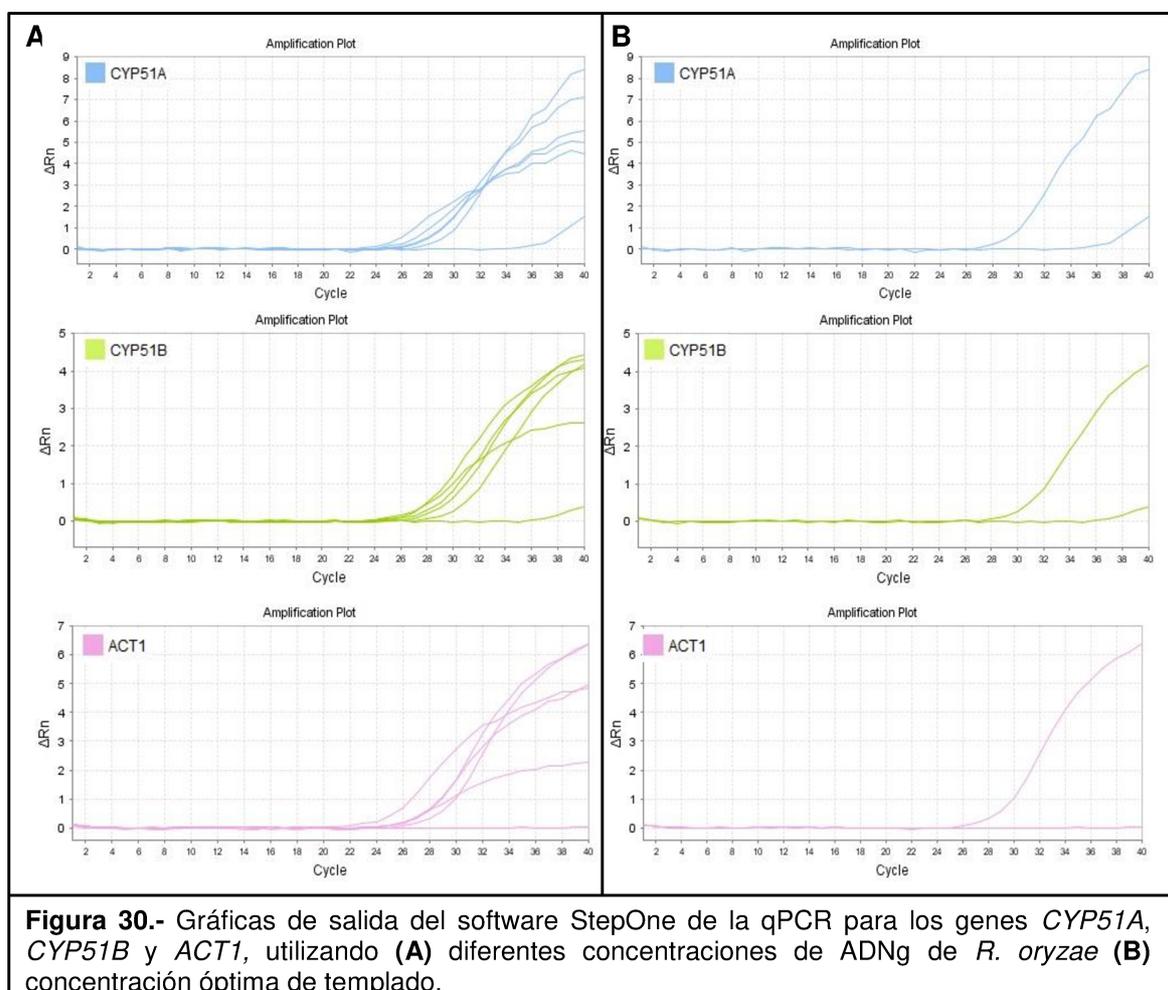


Figura 29.- Árbol filogenético de 55 14-esterol desmetilasas fúngicas diferentes.

#### 4.1.2. Cuantificación del número de copias de los genes *CYP51* de *R. oryzae*

Se realizó la cuantificación relativa de los genes *CYP51* mediante qPCR utilizando el gen *ACT1* como gen de referencia (gen *housekeeping*).

En la **Figura 30-A** se observan las gráficas obtenidas para la puesta a punto de la qPCR, utilizando como templado concentraciones finales de ADNg de 25, 12.5, 6.25, 3.12 y 1.56 ng/μL para cada gen. La concentración final de ADNg de 1.56 ng/μL fue considerada la concentración óptima de templado. En la **Figura 30-B** se muestran las curvas de amplificación correspondientes a dicha concentración y al control blanco de reacción para cada gen.



**Figura 30.-** Gráficas de salida del software StepOne de la qPCR para los genes *CYP51A*, *CYP51B* y *ACT1*, utilizando (A) diferentes concentraciones de ADNg de *R. oryzae* (B) concentración óptima de templado.

Los valores de Ct, los  $\Delta Ct$  y el  $\log_2 \Delta Ct$  para cada gen se detallan en la **Tabla 8**. Los mismos fueron calculados restando el valor del Ct del gen de referencia al valor del Ct de los genes target [191], [192] y luego se aplicó a ese  $\Delta Ct$  obtenido el logaritmo en base 2 [194].

No se observaron variaciones en la cuantificación génica entre el gen *CYP51A* y *ACT1* ni tampoco entre el gen *CYP51B* y *ACT1*. En ambos casos se obtuvieron valores de diferencias Ct y logaritmos de uno y cero, respectivamente, lo cual está indicando que los genes *CYP51* se encuentran en igual cantidad que el gen de referencia.

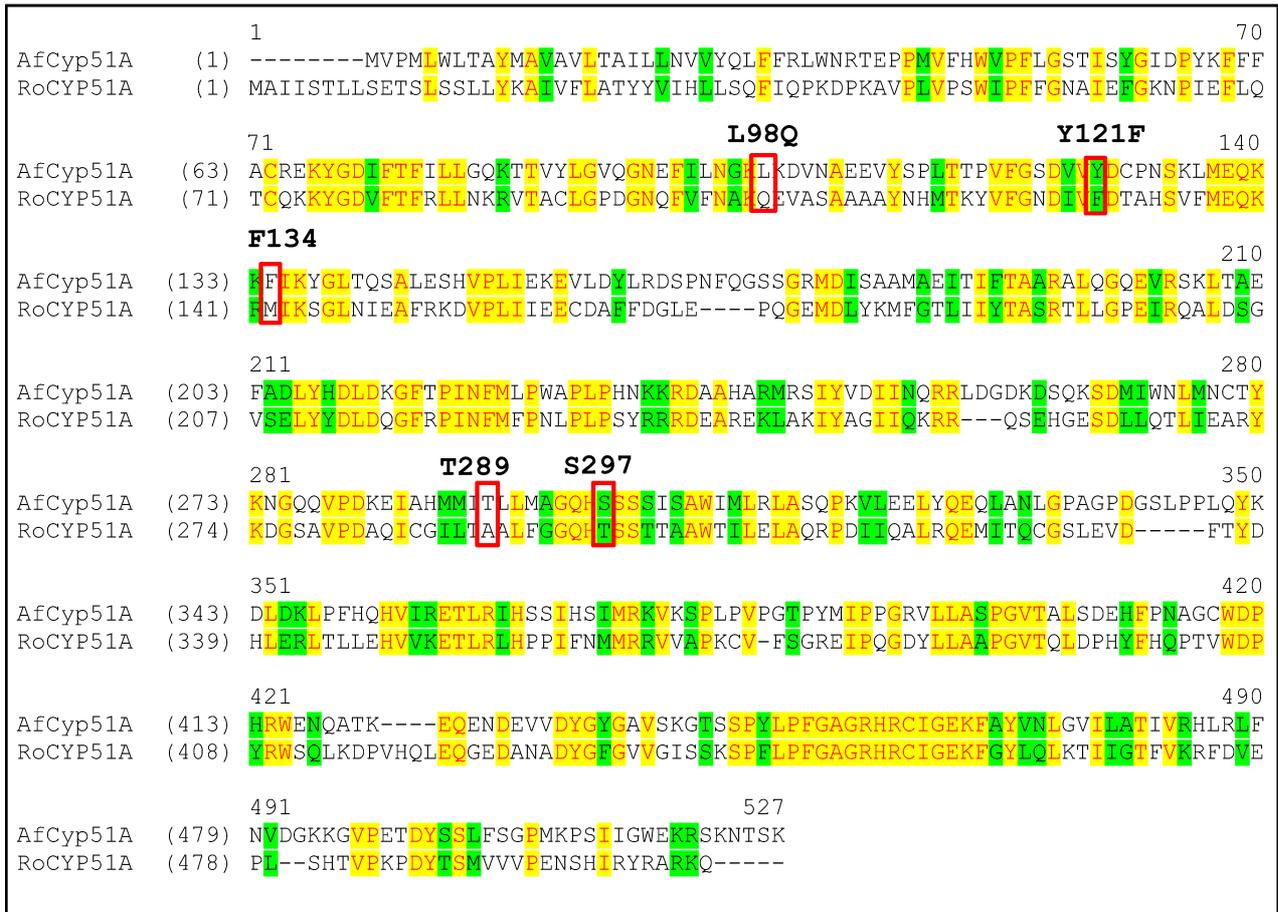
**Tabla 8.** Cuantificación relativa de los genes *CYP51A* y *CYP51B* en *R. oryzae*. Ct; threshold cycle.

<b>Muestra por duplicado</b>	<b>Ct ACT1</b>	<b>Ct CYP51A</b>	<b><math>\Delta Ct</math></b>	<b><math>\log_2 \Delta Ct</math></b>
<i>R. oryzae</i> (6.25 ng/ $\mu$ L)	31,00	29,86	1,14	0.18
<i>R. oryzae</i> (6.25 ng/ $\mu$ L)	30,01	29,27	0,75	0.42
<b>PROMEDIO</b>	<b>30,51</b>	<b>29,56</b>	<b>0,94</b>	<b>0.09</b>

<b>Muestra por duplicado</b>	<b>Ct ACT1</b>	<b>Ct CYP51B</b>	<b><math>\Delta Ct</math></b>	<b><math>\log_2 \Delta Ct</math></b>
<i>R. oryzae</i> (6.25 ng/ $\mu$ L)	26,12	26,41	0,29	1.79
<i>R. oryzae</i> (6.25 ng/ $\mu$ L)	25,25	26,90	1,65	0.72
<b>PROMEDIO</b>	<b>25,69</b>	<b>26,66</b>	<b>0,97</b>	<b>0.04</b>

#### 4.1.3. Mutaciones en el *RoCYP51A* y resistencia de *R. oryzae* a los antifúngicos azólicos.

Las secuencias aminoacídicas de las proteínas Cyp51Ap de *A. fumigatus* y *R. oryzae* fueron alineadas entre sí con el objetivo de detectar sustituciones de aminoácidos previamente descritas en AfCyp51Ap como causantes de resistencia a azoles [121] (Figura 31). Se identificaron 5 polimorfismos presentes en RoCyp51Ap con las características antes mencionadas: L98Q, Y121F, F134M, T289A, S297T. Las mutaciones Y121F y T289A (numeración de *A. fumigatus*) descritas en cepas de *A. fumigatus* son la que producen el patrón de sensibilidad a azoles que más se asemeja al de *R. oryzae* (CIM elevadas para los azoles con predominio de mayores valores de CIM a VRC que a ITC) [173], [171], [209].



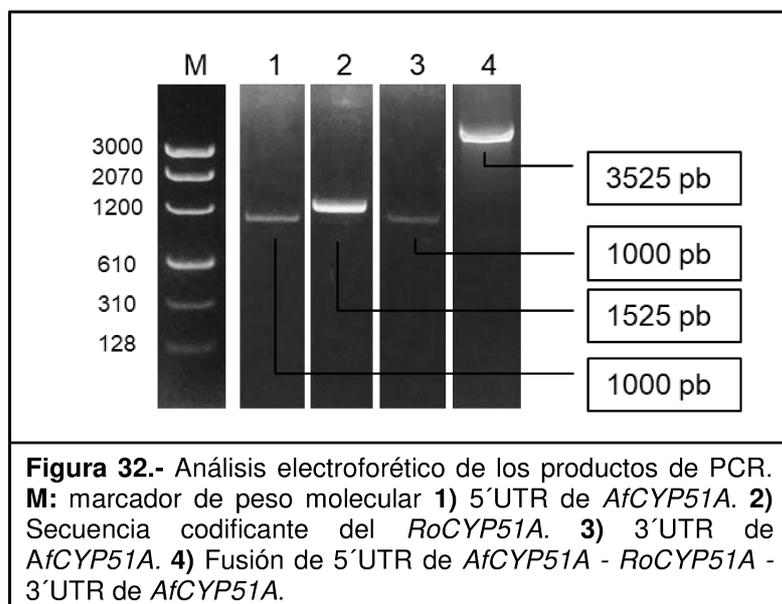
**Figura 31.-** Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las enzimas Cyp51Ap de *A. fumigatus* (XP\_752137.1) y *R. oryzae* (AWM98458.1). El recuadro rojo indica las sustituciones de aminoácidos relacionadas a resistencia a azoles en *A. fumigatus*.

#### 4.2. Obtención de una cepa de *A. fumigatus* con su gen *CYP51A* reemplazado por el gen ortólogo *wild-type* de *R. oryzae*.

Para establecer si la secuencia codificante del RoCYP51A es la única responsable del fenotipo de resistencia intrínseca a VRC, se transformó la cepa LMDM-32 de *A. fumigatus* ( $\Delta KU80$ ,  $\Delta CYP51A$ ) [210], [107] hipersensible a azoles (FLC MIC, 20  $\mu\text{g}$  / ml) con la región codificante del gen *CYP51A* de *R. oryzae* ATCC 11886 que llamaremos de aquí en adelante LMDM-597. Para ello se utilizó el vector LMDM-p134 (punto 4.2.1). Los transformantes obtenidos albergaron el gen *CYP51A* del Mucoral gobernado por las regiones promotoras y terminadoras salvajes del gen *AfCYP51A*.

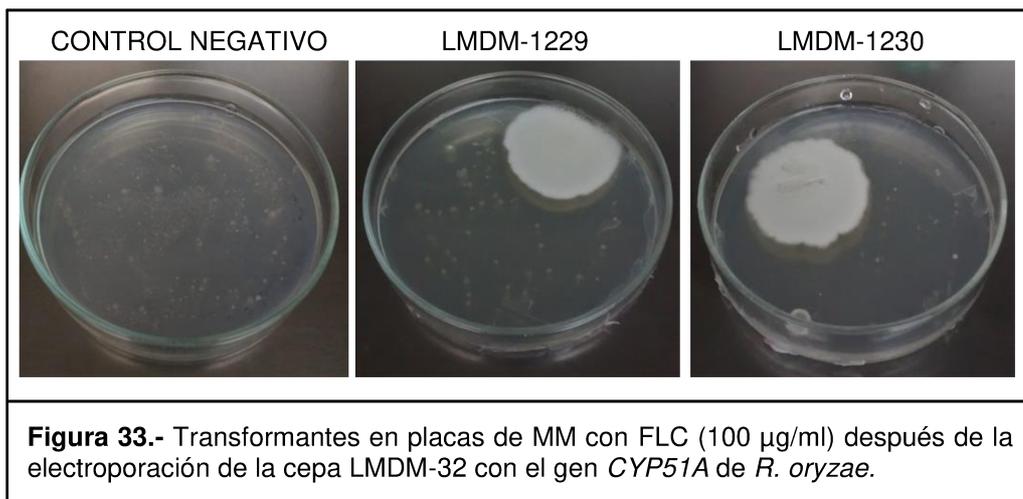
#### 4.2.1. Obtención del vector de transformación LMDM-p134

El vector de transformación se generó en dos pasos siguiendo el concepto de generación de vectores PRODIGE (PROMoter-dependent Disruption of Genes) [189]. El primero consistió en la realización de tres reacciones de PCR independientes. Se amplificó por un lado el gen *RoCYP51A* (GenBank MG872961.1) y por otro lado la región inmediatamente corriente arriba del codón del inicio del gen *CYP51A* (AF338659.1) de *A. fumigatus* (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 *AfCYP51A* fueron de 1000 pb cada uno para favorecer la recombinación homóloga [210], mientras que el gen *RoCYP51A* presentó 1525 pb. Los primers y sus respectivas secuencias, utilizados para la amplificación de cada uno de los fragmentos se detallan en la Tabla 3.3. del punto 3.4.5.3. Los tres fragmentos obtenidos fueron analizados por electroforesis. (**Figura 32**). En el segundo paso se fusionaron los tres fragmentos purificados, mediante PCR de fusión. La fusión fue posible ya que los fragmentos presentaron regiones de solapamiento que permiten la unión de los mismos de la manera buscada. La fusión de los tres fragmentos dio como resultado una construcción de 3545 pb, que se analizó por electroforesis (**Figura 32**). Una vez obtenido el fragmento de 3,5 kb purificado, se confirmó por secuenciación que no existían mutaciones o alteraciones en la secuencia del gen *RoCYP51A*.



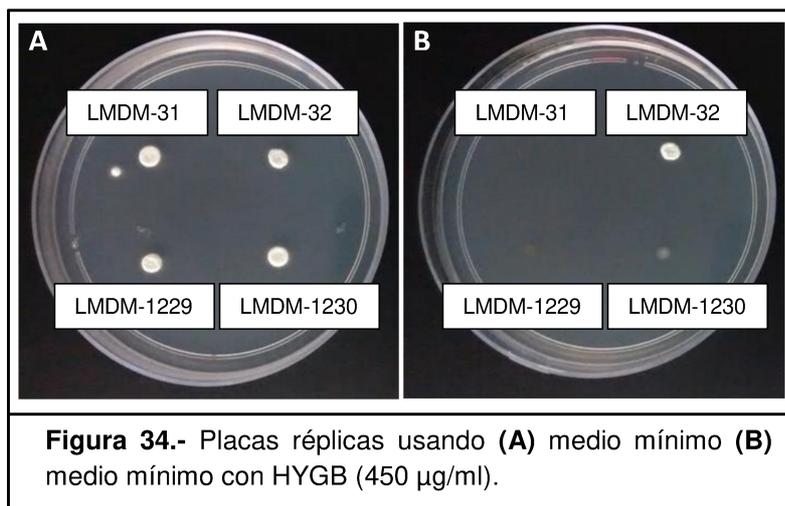
#### 4.2.2. Reemplazo del gen *CYP51A* de *A. fumigatus* por el gen *CYP51A* de *R. oryzae*.

Para la obtención de mutantes de *A. fumigatus* con en el gen *CYP51A* de *R. oryzae*, se utilizó la cepa LMDM-32 ( $\Delta KU80$  y  $\Delta CYP51A$ ) de *A. fumigatus*. Esta cepa se obtuvo en trabajos previos de nuestro laboratorio donde se deletó el gen *CYP51A* de la cepa LMDM-31 ( $\Delta KU80$ ) utilizando el vector PUM-108 (cedido por la Dra. Emilia Mellado del Instituto de Salud Carlos III) [107]. La cepa LMDM-32 se transformó por electroporación usando la construcción de 3,5 kb descrita en el punto anterior. Para la selección de mutantes se utilizó FLC en una concentración 100  $\mu\text{g/ml}$ . El uso de FLC como agente de selección se basa en que se espera que la incorporación de un gen *CYP51A* funcional de un hongo filamentoso hará al hongo receptor resistente a esta droga. Así, se obtuvieron dos mutantes resistentes a FLC que fueron llamados LMDM-1229 y LMDM-1230 (**Figura 33**). Ambos transformantes fueron analizados para determinar si la construcción se incorporó en el genoma en el lugar esperado (recombinación homóloga reemplazando el gen *AfCYP51A*) o ectópicamente.

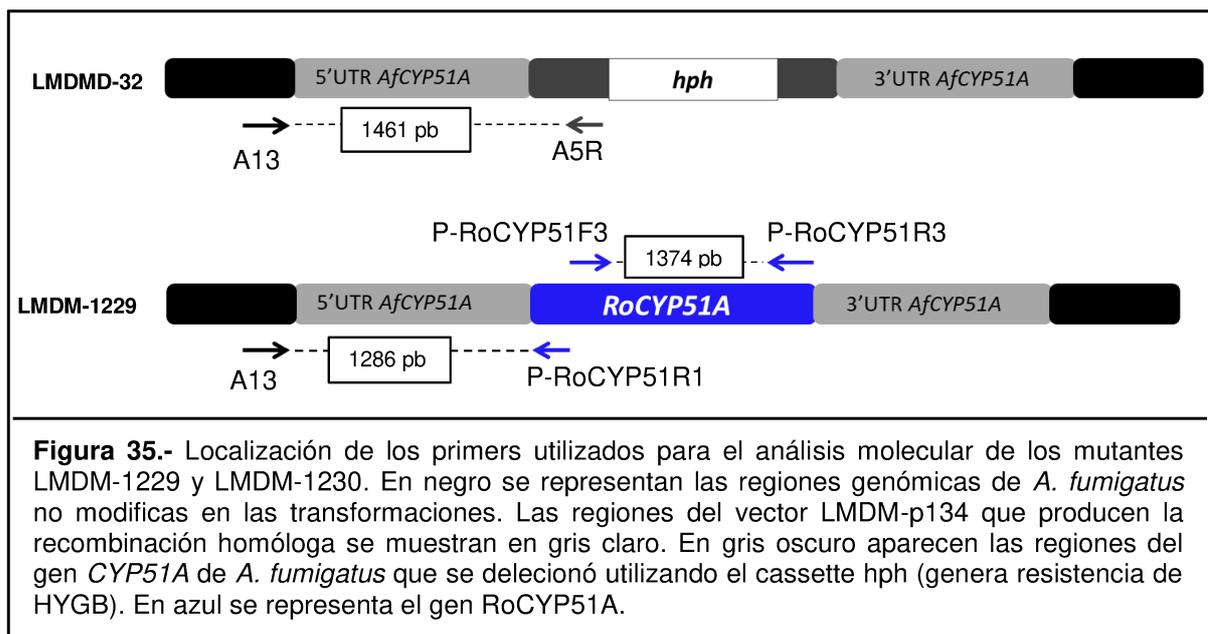


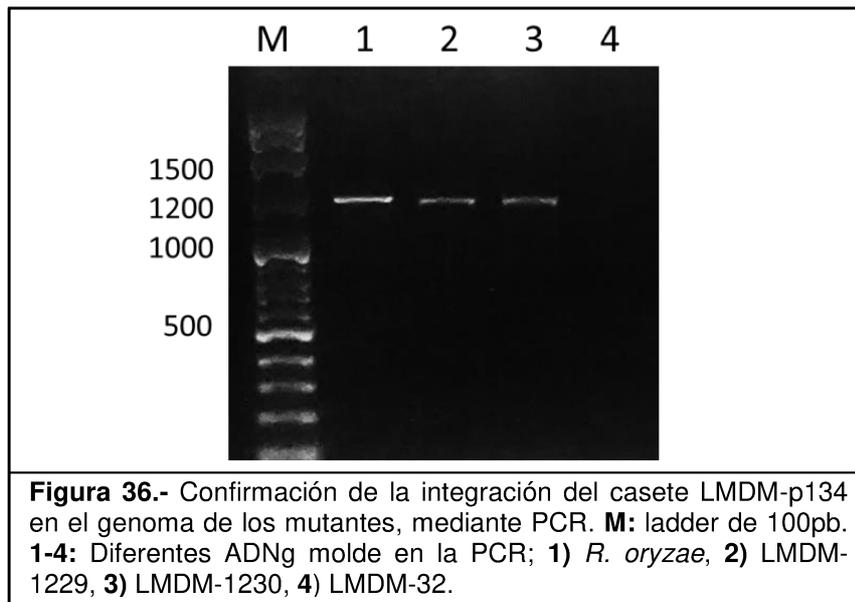
El análisis de las cepas mutantes obtenidas se realizó fenotípica y molecularmente mediante la evaluación de la resistencia a la HYGB y por PCR, respectivamente.

La cepa LMDM-32 es resistente a HYGB ya que su gen *CYP51A* fue eliminado (knockeado) mediante el uso de un casete de resistencia HYGB [158]. Después de la transformación, la recombinación homóloga del casete LMDM-p134 revertiría el fenotipo de resistencia HYGB, dado que el casete de resistencia HYGB y *RoCYP51A* (del vector LMDM-p134) están flanqueados por regiones similares (5' y 3' UTR de *AfCYP51A*) Este fenotipo de sensibilidad a HIGB se observó en los dos transformantes (**Figura 34**)



Por otro lado, la integración del *RoCYP51A* en el genoma de los transformantes LMDM-1229 y LMDM-1230 se confirmó por PCR, mediante la amplificación del exón 3 del gen del Mucoral, usando los primers P-RoCYP51F3 y P-RoCYP51R3 (**Figura 35**). Se obtuvo la banda de 1374 pb esperada luego de la amplificación por PCR (**Figura 36**).

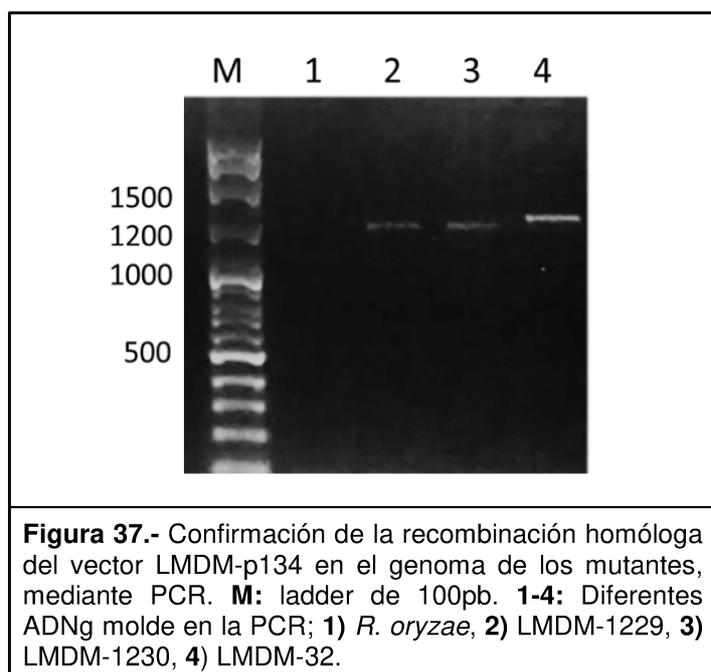




La recombinación homóloga en los transformantes resistentes a FLC en los que *RoCYP51A* se integró en sus genomas se verificó mediante una PCR multiplex con los primers A13, A5R y P-RoCYP51R1 (**Figura 35** y **Tabla 9**). El primer A13 se diseñó para hibridar con la región 5'UTR del *AfCYP51A*, 1264 pb corriente abajo del codón de inicio del *AfCYP51A* (una región no incluida en la construcción clonada en LMDM-p134). Por otro lado, el primer A5R hibrida 197 pb corriente arriba del codón de inicio de *AfCYP51A*, una región presente en la cepa parental de *A. fumigatus* (LMDM-32) que sería reemplazada por la integración homóloga de la construcción LMDM-p134. El último primer de la PCR multiplex, llamado P-RoCYP51R1, fue diseñado para abarcar la unión exón 1-exón 2 de *RoCYP51A* (Fig. 1 y Tabla 2). Por lo tanto, si la recombinación del casete de electroporación se realizó de forma homóloga, se observa una banda de PCR de 1286 pb (con el par de primers A13 / P-RoCYP51R1). Por el contrario, se obtendría un fragmento de PCR de 1461 pb para la cepa parental o para las cepas no transformantes. Además, se observaría una banda (1461 pb) en cepas que albergan integraciones ectópicas. Para los dos transformantes obtenidos, se obtuvo una única banda de 1248 pb, demostrado que la construcción de LMDM-p134 se integró de forma homóloga (**Figura 37**).

**Tabla 9.** Primers utilizados para evaluar la recombinación homóloga.

Primer	Secuencia (5'→3')
A13	CTTCCCACATCCATCTTCT
A5R	TCTCTGCACGCAAAGAAG
P-RoCYP51R1	GGATCTTTGGGTTGAATAAACTGAGATAAAAGATGAATGAC



Además, los genes *CYP51A* de los transformantes se amplificaron por PCR y se secuenciaron confirmándose que ninguno de los mutantes presentaba cambios en la secuencia de este gen respecto de la cepa de *R. oryzae* wild-type (LMDM-597).

### 4.2.3. Análisis del fenotipo de los transformantes

#### 4.2.3.1. Análisis macroscópico y microscópico

Las características macro y microscópicas de las cepas mutantes LMDM-1229 y LMDM-1230 no mostraron diferencias con las de las cepas parentales, presentando todas las características comunes de *A. fumigatus*. Tampoco se detectaron diferencias en cuanto a morfología de las hifas y producción de conidios.

#### 4.2.3.2. Sensibilidad a antifúngicos

##### 4.2.3.2.1. Método de microdilución

La incorporación del gen *RoCYP51A* en el genoma de *A. fumigatus* LMDM-32 no modificó los valores de CIM a equinocandinas y AMB (Tabla 1). Por el contrario, los patrones de sensibilidad a azoles se vieron alterados en los mutantes. Los transformantes imitaron los valores de CIM obtenidos para la cepa LMDM-597 y superaron las CIM de la cepa salvaje (*A. fumigatus* LMDM-31). La integración homóloga de *RoCYP51A* en *A. fumigatus*

incrementó 33 y 16 veces las CIM de ITC y PSC al comparar con las CIM de la cepa parental LMDM-32 (Tabla 2). De forma similar, los valores de CIM de FLC aumentaron 40 veces con respecto a la cepa LMDM-32. Los mayores incrementos en los valores de CIM se observaron para VRC. Los mutantes mostraron un aumento de CIM de 266 y 533 veces en comparación con LMDM-31 y LMDM-32, respectivamente. Cuando se evaluó la CIM de los mutantes a ISAV se vió un incremento de 128 y 8 veces en comparación con la CIM de LMDM-32 y *R. oryzae*, respectivamente (**Tabla 10**).

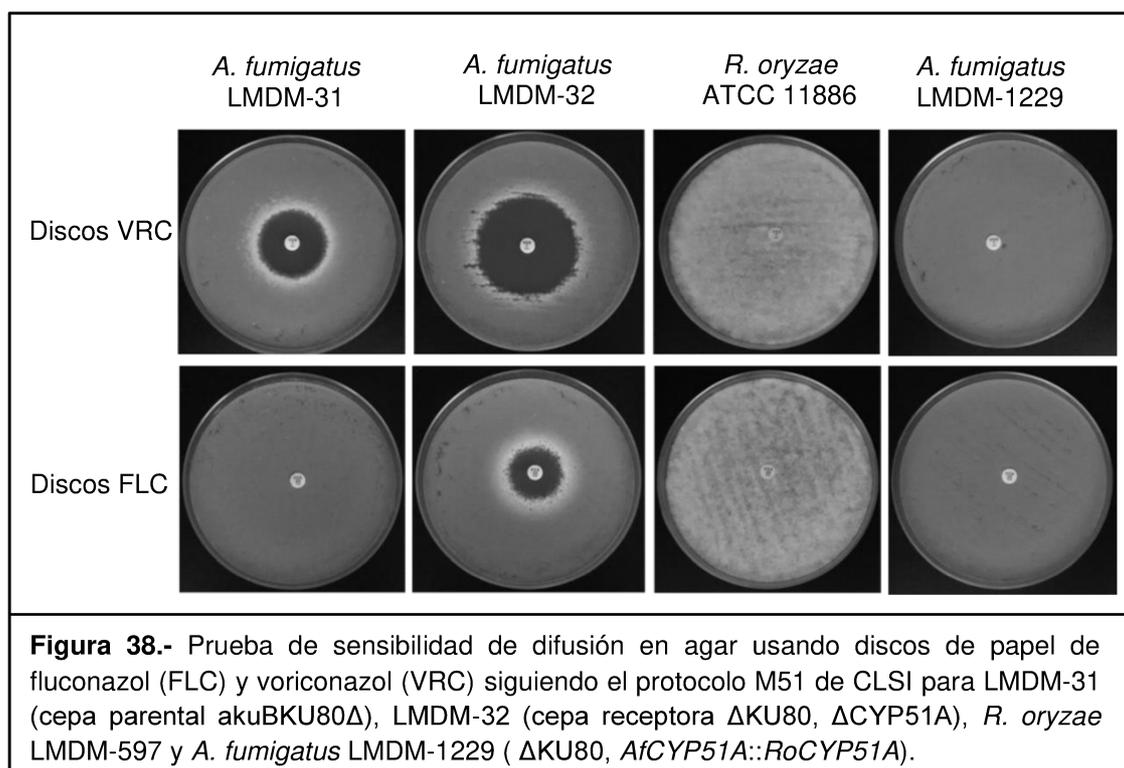
**Tabla 10.** Valores de CIM de los reemplazos génicos en la cepa LMDM-32 y de las correspondientes cepas parentales.

Cepas	Valores de CIM ( $\mu\text{g/ml}$ )							
	FLC	PSC	ITC	VRC	ISAV	AMB	CSF	ANF
LMDM-31	>320.00	0.25	0.12	0.12	0.50	0.50	0.06	0.03
LMDM-32	16.00	0.12	0.03	0.06	0.25	0.50	0.06	0.03
LMDM-597	>320.00	2.00	1.00	>16.00	4	2.00	>8.00	>8.00
LMDM-1229	>320.00	2.00	1.00	>16.00	>16.00	0.50	0.06	0.03
LMDM-1230	>320.00	2.00	1.00	>16.00	>16.00	0.50	0.06	0.03

#### 4.2.3.2.2. Método de difusión en medio solido

Al igual que lo observado cuando se llevó a cabo la determinación de CIM por el método de microdilución, el mismo aumento de resistencia se observó cuando se evaluó la sensibilidad a FLC y VRC usando discos de papel (**Figura 38**).

No se observaron diámetros de inhibición para ninguna cepa, a excepción de FLC y VRC frente a LMDM-32 (diámetros de inhibición de 19 mm y 48 mm) y VRC frente a LMDM-31 (32 mm).



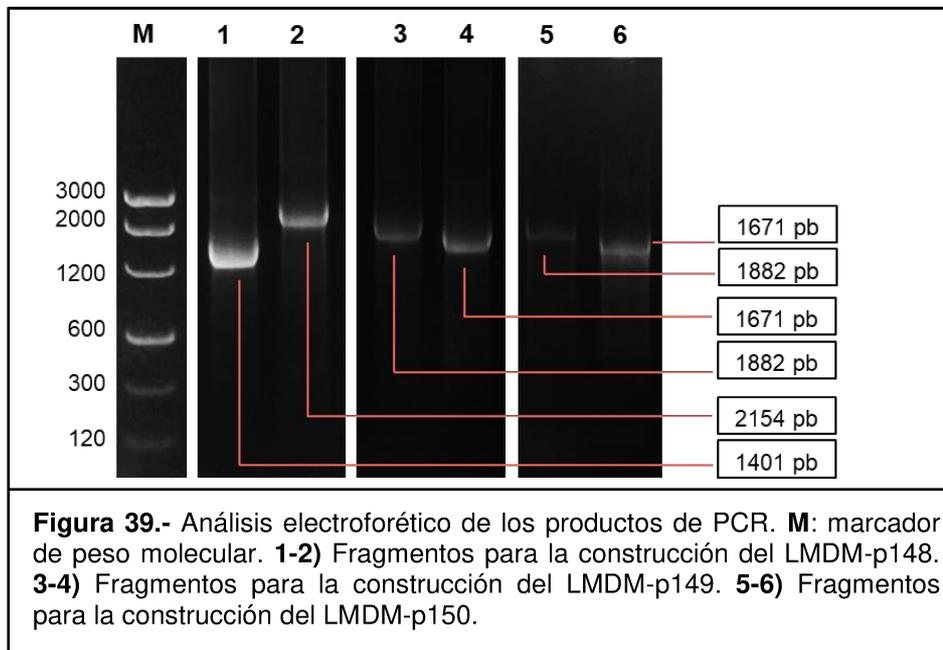
#### 4.3. Obtención de una cepa de *A. fumigatus* con su gen *CYP51A* reemplazado por el *CYP51A* de *R. oryzae* con las mutaciones Y121F, T289A y Y121F+T289A.

*R. oryzae* presenta en su Cyp51Ap los polimorfismos naturales F129Y y A290T, equivalentes a las sustituciones Y121F y T289A descritas para *A. fumigatus* resistentes a los azoles. Para evaluar el rol de ambos polimorfismos naturales en el fenotipo de resistencia intrínseco de *R. oryzae* a VRC, se procedió a generar diferentes cepas quiméricas de *A. fumigatus* con los genes *RoCYP51A* con las mutaciones que conducen a las sustituciones F129Y, A290T y F129Y/A290T (como en *A. fumigatus* susceptible a azoles).

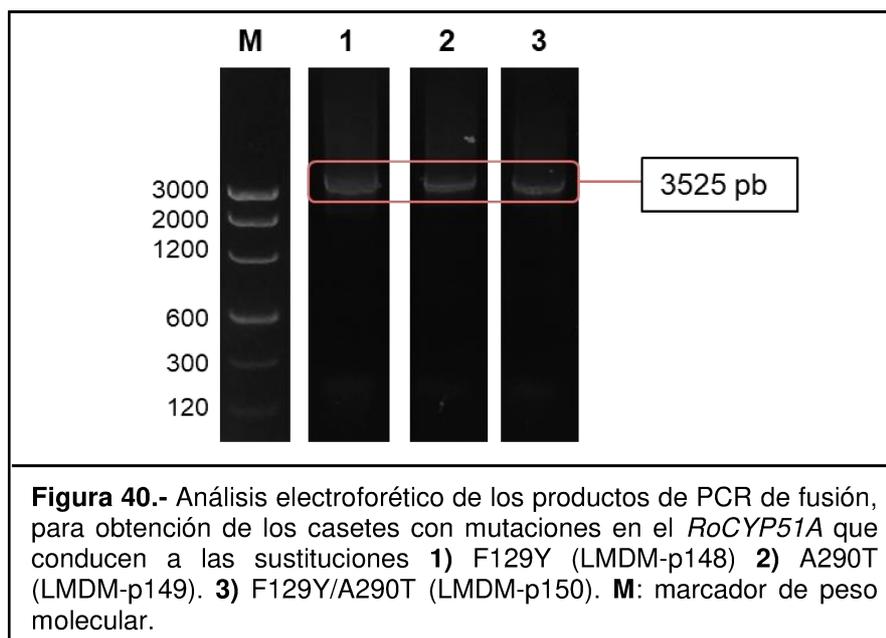
##### 4.3.1 Obtención de los vectores de transformación LMDM-p148, LMDM-p149 y LMDM-p150.

La construcción de los vectores de transformación LMDM-p145, LMDM-p146 y LMDM-p147 albergando en el gen *RoCYP51A* las mutaciones t386a, g868a y t386a/g868a, respectivamente, se realizó en dos etapas. La primera etapa consistió en dos reacciones de PCR individuales. Se amplificó por un lado el 5'UTR del *AfCYP51A* con la porción del *RoCYP51A* con la mutación deseada en el extremo 3' y por otro lado, la misma mutación en el extremo 5' del *RoCYP51A* con el 3'UTR de *AfCYP51A*. Para esto se usó como DNA

molde al plásmido LMDM-p134 (punto 4.2.1). Así, se generaron fragmentos de 1401 pb y 2154 pb para LMDM-p148 y 1882 pb y 1671 pb para LMDM-p149 y LMDM-p150. Los seis fragmentos obtenidos fueron analizados por electroforesis (**Figura 39**).

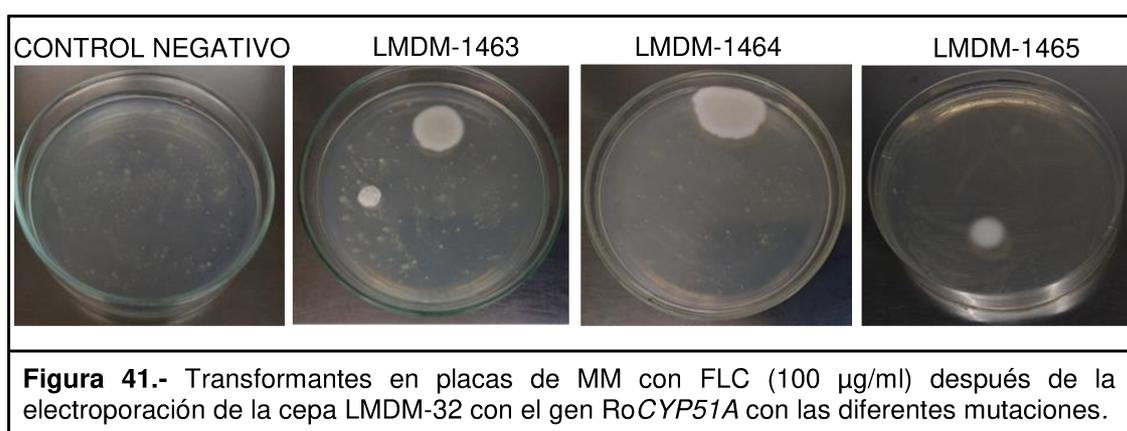


En la segunda etapa se llevó a cabo la fusión de cada par de fragmentos obtenidos en el paso anterior (previamente purificados), dando como resultado tres construcciones de 3525 cada una. Los productos de fusión se analizaron por electroforesis (**Figura 40**). Una vez obtenidos los fragmentos purificados se comprobó la presencia de las mutaciones deseadas mediante secuenciación.

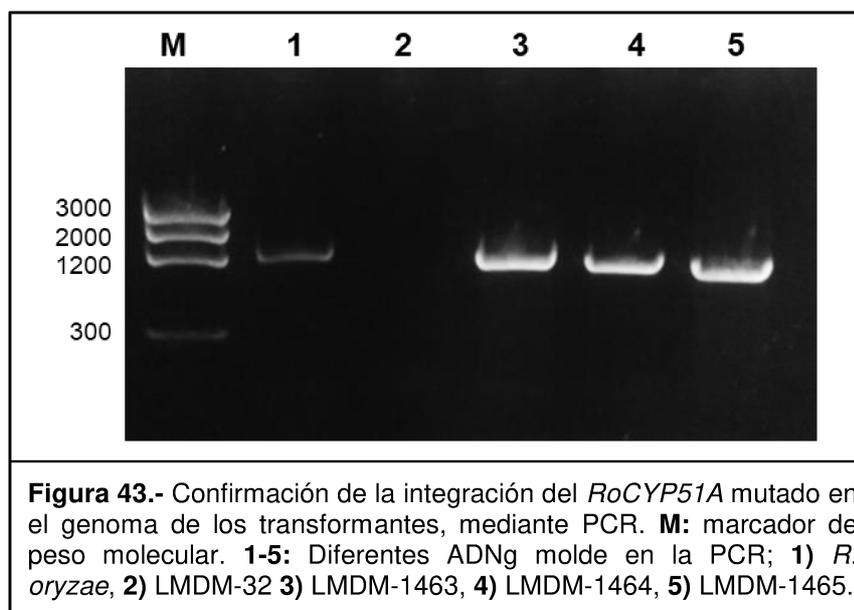
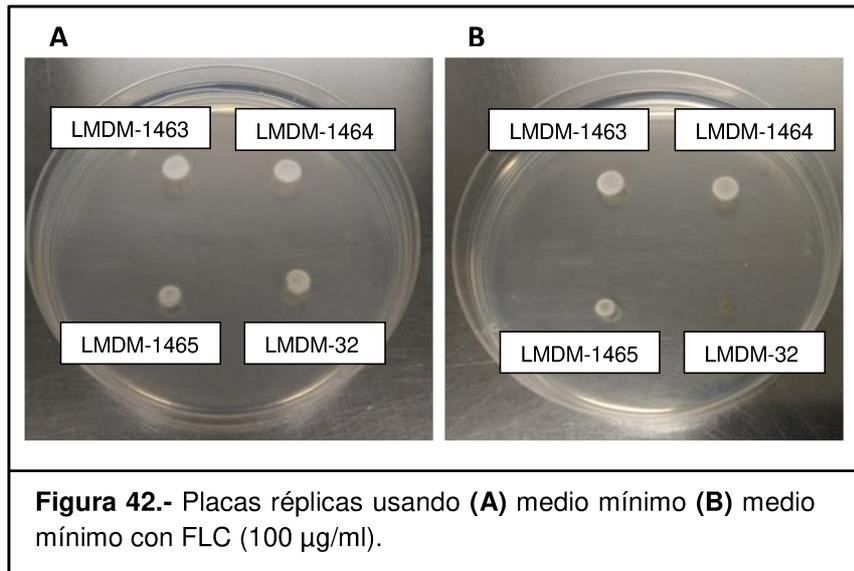


#### 4.3.2. Reemplazo del *CYP51A* de *A. fumigatus* por el gen *RoCYP51A* mutado.

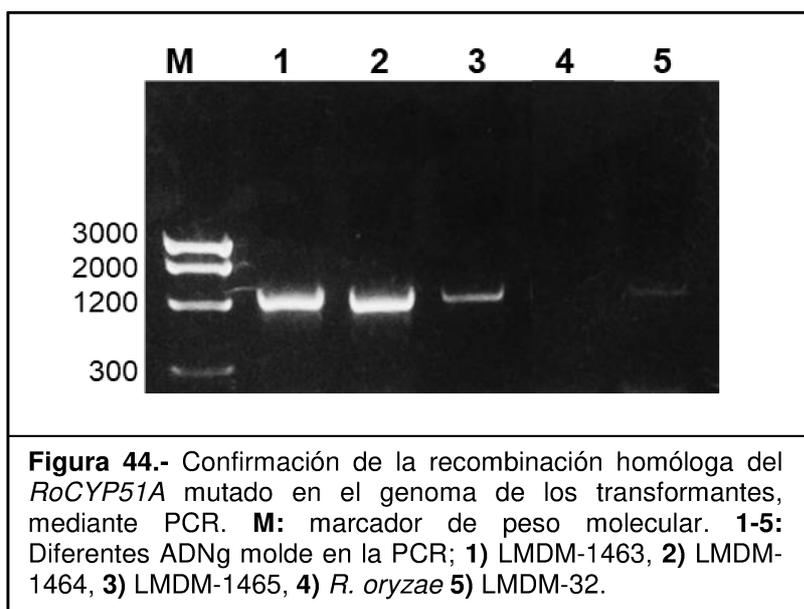
Para comprobar si las sustituciones de aminoácidos F129Y y A290T de Cyp51Ap de *R. oryzae* tenían implicancia, individualmente o en combinación, en el fenotipo de resistencia a VRC, se procedió a realizar el reemplazo del gen *CYP51A* de la cepa LMDM-32, por los genes *RoCYP51A* mutados, por recombinación homóloga. Para la selección de mutantes resistentes, se utilizó FLC en una concentración de 100 µg/ml. Los transformantes aparecieron entre los días 2 y 5 posteriores a la electroporación y se llamaron LMDM-1463 (*RoCYP51A*-F129Y), LMDM-1464 (*RoCYP51A*-A290T) y LMDM-1465 (*RoCYP51A*-F129Y/A290T) (**Figura 41**).



Se confirmó en ambas cepas la integración genómica de los casetes incluidos en LMDM-p148, LMDM-p149 y LMDM-p150 fenotípicamente mediante la evaluación de la resistencia a FLC 100 µg/ml (2<sup>o</sup> purificación de transformantes en presencia del agente selector) (**Figura 42**) y molecularmente mediante amplificación del gen *RoCYP51A* con los primers P-RoCYP51F1 y P-RoCYP51R3 (**Tabla 3**) (**Figura 43**)



La confirmación de la recombinación homóloga de los tres casetes en los genomas de los mutantes se realizó mediante PCR multiplex con los primers A13, A5R y P-RoCYP51R1 (**Figura 35**). Así, se obtuvieron fragmentos únicos de 1248 pb para las tres cepas mutantes y un fragmento de 1461 pb para la cepa parental, mientras que para *R. oryzae* no se obtuvo banda ya que el primer A13 hibrida en el genoma de *A. fumigatus* (**Figura 44**).



La incorporación de las mutaciones deseadas se comprobó mediante amplificación de los genes *RoCYP51A* en los transformantes obtenidos y secuenciación de los mismos.

### 4.3.3. Análisis del fenotipo de los transformantes.

#### 4.3.3.1. Análisis macroscópico y microscópico

Al igual que para el mutante LMDM-1229, las características macro y microscópicas de las cepas mutantes LMDM-1463, LMDM-1464 y LMDM-1465 no mostraron diferencias con las de las cepas parentales, presentando todas las características comunes de *A. fumigatus*.

#### 4.3.3.2. Sensibilidad a antifúngicos

##### 4.3.3.2.1. Método de microdilución

Para todos los transformantes obtenidos se determinaron las CIMs para evaluar su nivel de sensibilidad a los azoles. Los valores de CIM obtenidos se detallan en la **Tabla 11**. Los valores de CIM a FLC e ITC obtenidos para las 3 cepas mutantes imitaron los valores de CIM de *R. oryzae* wild-type. Las cepas que albergaron el *RoCyp51A* con las mutaciones individuales o en combinación presentaron un incremento de la CIM a ISAV en 128 y 8 veces en comparación con LMDM-32 y *R. oryzae*, respectivamente. La incorporación homóloga del *RoCYP51A*-A290T y *RoCYP51A*-F129Y / A290T en la cepa parental produjo

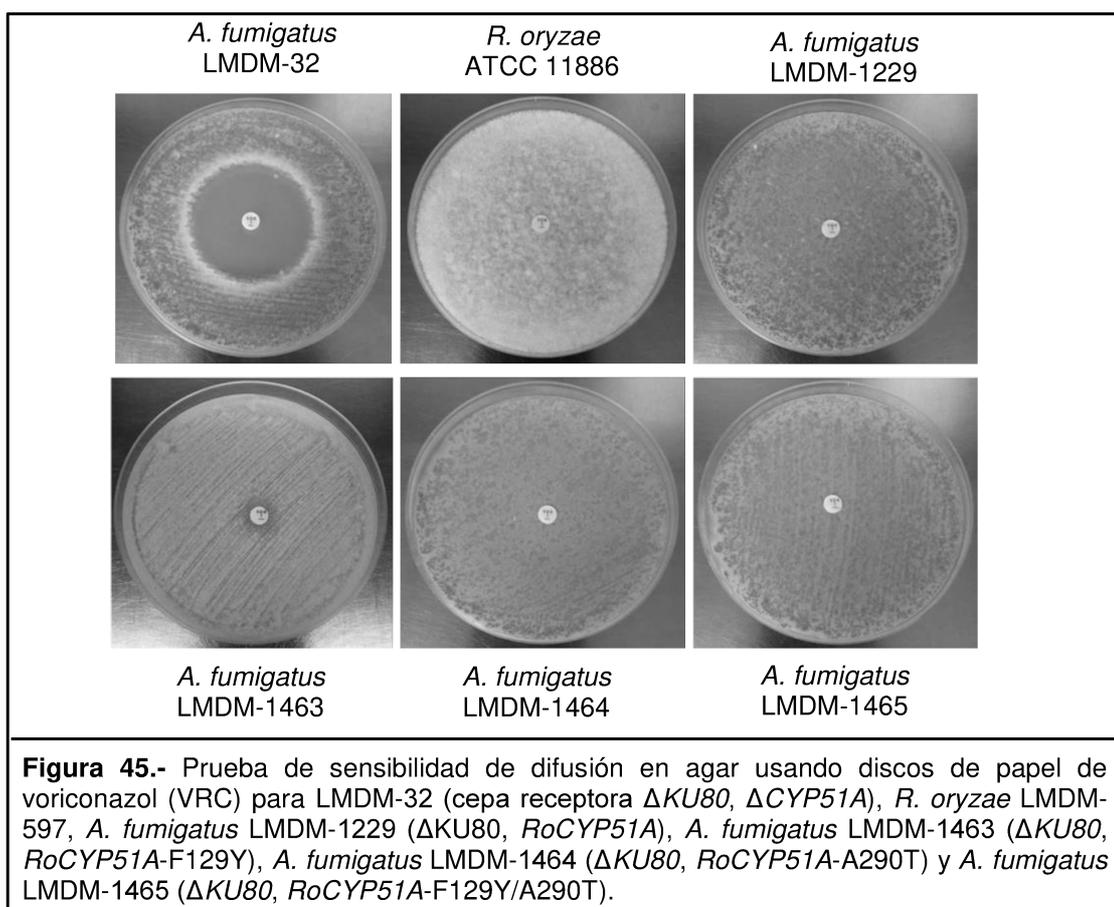
un aumento de 533 veces en las CIM a VRC. Este valor imita el fenotipo de sensibilidad reducida de *R. oryzae* a VRC. El mutante quimérico con el *RoCYP51A*-F129Y mostró una disminución de la CIM a VRC de 4 veces en comparación con el valor de CIM de *R. oryzae*. La sensibilidad a PSC aumentó 32 veces en *A. fumigatus* con *RoCYP51A*-F129Y y *RoCYP51A*-F129Y / A290T en comparación con la cepa LMDM-597, mientras que *RoCYP51A*-A290T mostró los mismos valores de CIM a PSC que *R. oryzae*. En la Tabla 4.4 se muestran las lecturas de las CIMs a PSC a las 24h y 48h. Para el resto de las drogas no se observó diferencia en las lecturas a los distintos tiempos.

**Tabla 11.** Valores de CIM de los reemplazos génicos con el *RoCYP51A* mutado, en la cepa LMDM-32 y de las correspondientes cepas parentales.

Cepas	Genotipo	Valores de CIM ( $\mu\text{g/ml}$ )					
		FLC	PSC <sup>24h</sup>	PSC <sup>48h</sup>	ITC	VRC	ISAV
LMDM-31	$\Delta\text{KU80}$	>320.00	0.25	0.25	0.12	0.12	0.50
LMDM-32	$\Delta\text{KU80}, \Delta\text{CYP51A}$	16.00	0.12	0.12	0.03	0.06	0.25
LMDM-597	WT	>320.00	2.00	>16.00	1.00	>16.00	4
LMDM-1229	$\Delta\text{KU80}, \text{RoCYP51A}$	>320.00	2.00	>16.00	1.00	>16.00	>16.00
LMDM-1463	$\Delta\text{KU80}, \text{RoCYP51A-F129Y}$	>320.00	1.00	1.00	1.00	8.00	>16.00
LMDM-1464	$\Delta\text{KU80}, \text{RoCYP51A-A290T}$	>320.00	2.00	>16.00	1.00	>16.00	>16.00
LMDM-1465	$\Delta\text{KU80}, \text{RoCYP51A-F129Y/A290T}$	>320.00	1.00	2.00	1.00	>16.00	>16.00

#### 4.3.3.2.2. Método de difusión en agar.

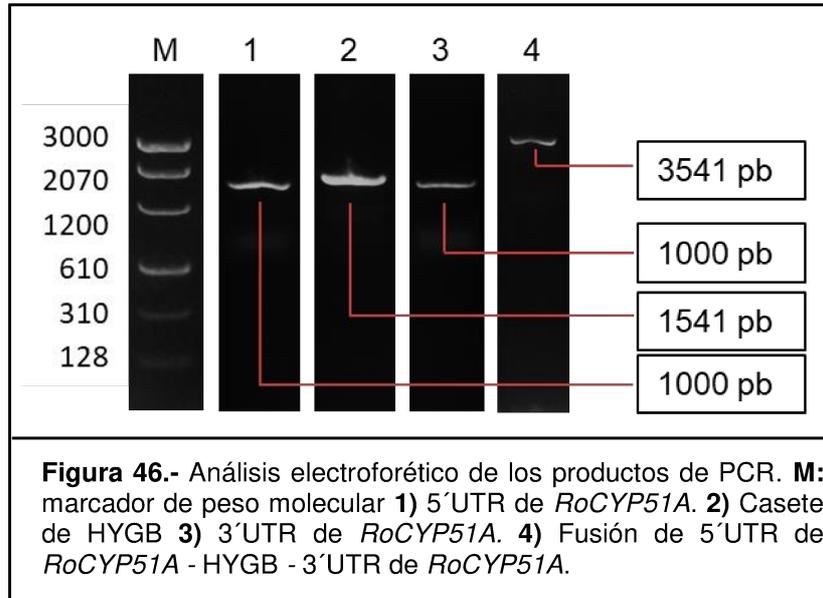
Las diferencias en la sensibilidad a VRC que mostraron las diferentes mutantes cuando se determinó la CIM por microdilución se confirmaron mediante difusión en medio sólido usando discos de papel (**Figura 45**). Solo se observó diámetro de inhibición en las cepas LMDM-32 (48 mm) y LMDM-1463 (15mm).



#### 4.4. Obtención de una cepa de *R. oryzae* defectiva en *CYP51A*

##### 4.4.1. Obtención del vector de disrupción LMDM-p124

La generación del vector de disrupción del *RoCYP51A* se llevó a cabo de la misma manera que para el vector LMDM-p134, mediante PCR, en dos pasos. En el primer paso se amplificó el casete de HYGB, la región inmediatamente corriente arriba del codón del inicio del gen *RoCYP51A* (región 5'UTR) y la inmediatamente corriente abajo del codón de stop del mismo gen (región 3'UTR). El análisis de los fragmentos UTR de 1000 pb y del casete de HYGB de 1541 pb se realizó por electroforesis (**Figura 46**). En el segundo paso, se fusionaron estos tres fragmentos a través de una PCR de fusión, generando la construcción de 3541 pb.

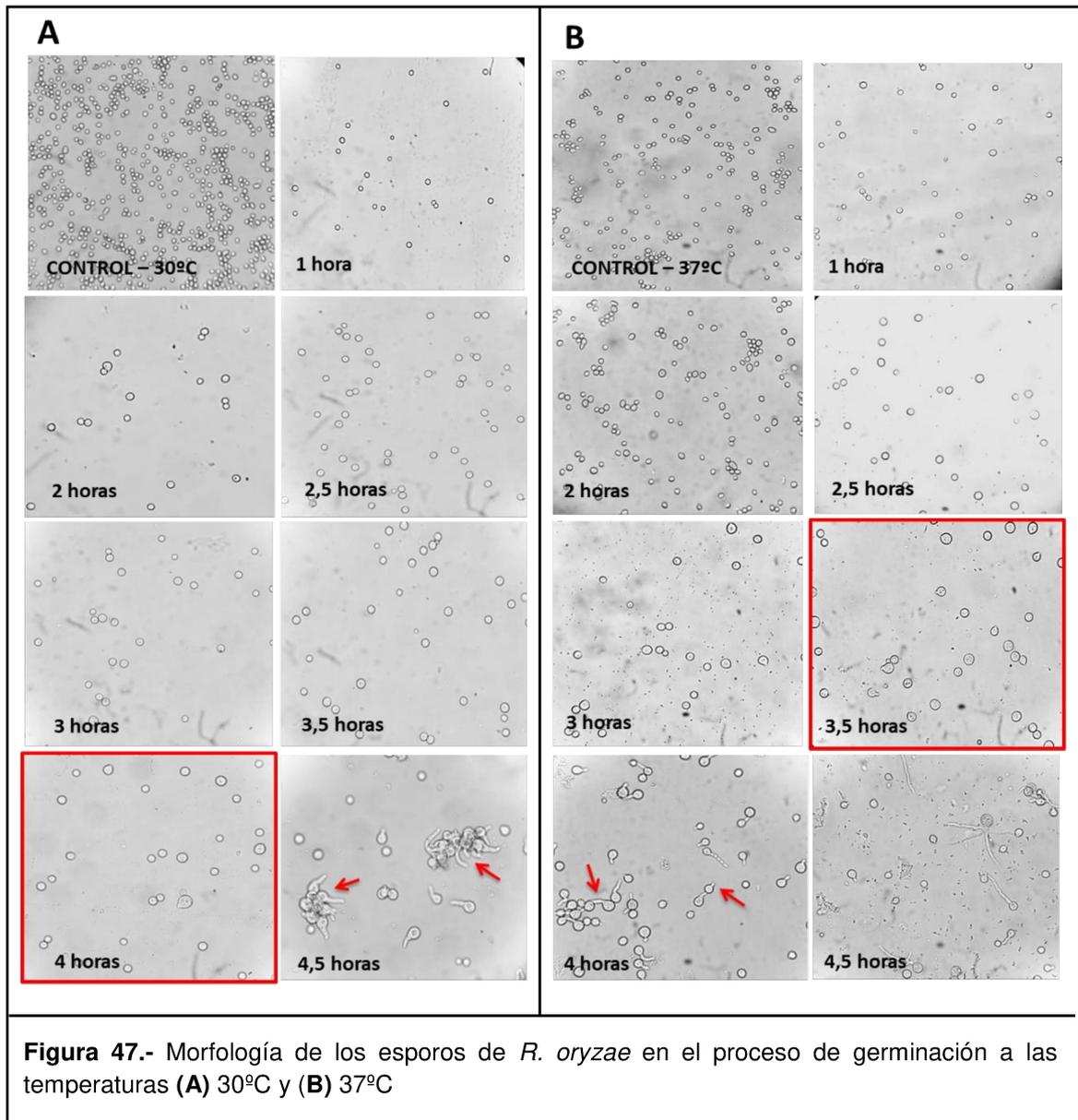


#### 4.4.2. Estandarización de un protocolo de transformación para *R. oryzae*.

##### 4.4.2.1. Velocidad de germinación

El tiempo y la temperatura de germinación de los esporos son factores importantes para la eficiencia de transformación. En la **figura 4.20** se observa el tamaño de los esporos a los distintos tiempos y temperaturas ensayadas. Los esporos comenzaron a hincharse después de aproximadamente 3 h de cultivo en agitación rápida, mientras que de 4 a 5 h formaron gradualmente filamentos miceliales cortos (señalados en la **Figura 4.20** con flechas rojas).

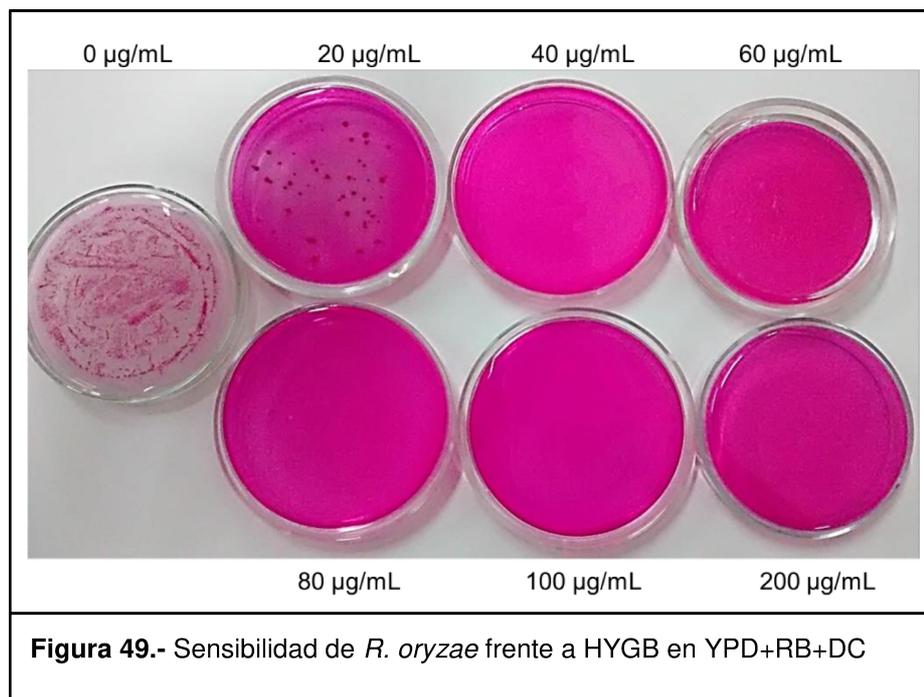
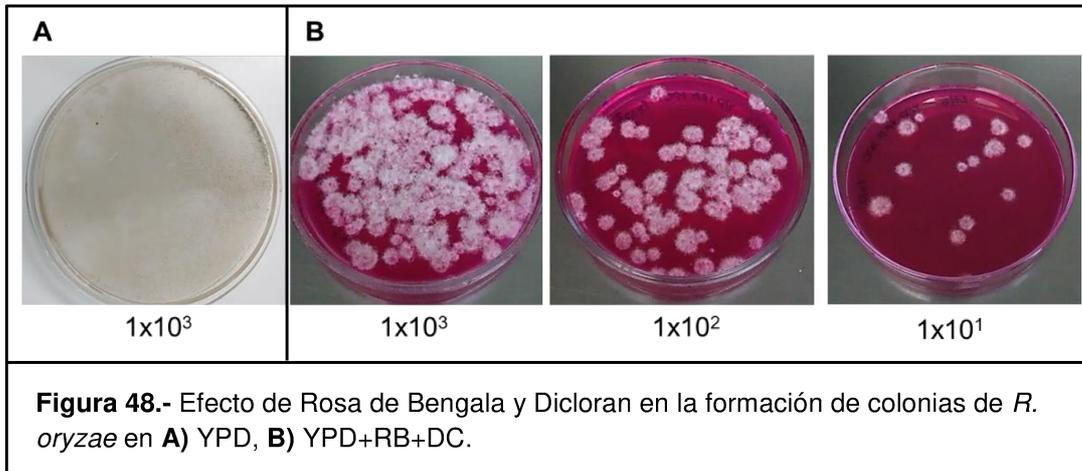
Debido a que la germinación sincronizada de las esporas es difícil de lograr, el proceso de germinación solo puede controlarse en base a la mayoría de las esporas. El tiempo de incubación óptimo se definió como la última medición donde no se vio germinación, siendo de 4h y 3,5h, incubando a temperaturas de 30° y 37°C, respectivamente (señalado con un recuadro rojo en la **Figura 47**).



#### 4.4.2.2. Obtención de colonias aisladas

La obtención de transformantes a partir de colonias aisladas es un paso esencial para una transformación exitosa. *R. oryzae*, al igual que otros miembros del orden Mucorales, exhibe un gran crecimiento radial y baja sensibilidad a la HYGB. Por lo tanto, para obtener transformantes seleccionables, a las placas de YPD con HYGB, se añadió Rosa de bengala y Dicloran, los cuales reducen el crecimiento de las hifas y aumentan la sensibilidad del hongo. En las placas sin adición de RB y DC, el micelio cubrió toda la superficie de la placa, mientras que en las placas conteniendo RB y DC se pudieron contar colonias aisladas, acorde al inóculo sembrado en cada una (**Figura 48**). Al agregar 0 µg/mL a 200 µg/mL de HYGB en las placas, solo se observó crecimiento en la placa sin droga y en la placa con 20

$\mu\text{g/mL}$  de HYGB (**Figura 49**). Para la selección de transformantes, se decidió utilizar  $100 \mu\text{g/mL}$  de HYGB para asegurar la selección de transformantes verdaderos y descartar falsos positivos.



#### 4.4.2.3. Condiciones de electroporación

Si bien ya se comprobó que la resistencia intrínseca al VRC en *R. oryzae* se debe exclusivamente al *CYP51A* (ver inciso 4.2.3.2.), también se deseaba obtener cepas de *R. oryzae* defectivas en dicho gen y evaluar la sensibilidad a VRC. A pesar de probar diferentes condiciones de electroporación de *R. oryzae* con el casete de resistencia a HYGB, en ningún caso se pudieron obtener transformantes, solo se observó crecimiento de background y ningún transformante verdadero.

### 4.5. Evaluación de combinaciones de antifúngicos

#### 4.5.1. Combinación de drogas utilizando método de microdilución (placas de checkerboard)

Debido a las limitadas opciones terapéuticas a la hora de aplicar un tratamiento antifúngico para las mucormicosis y a los reportes cada vez más frecuentes de aislamientos resistentes, se planteó la necesidad de buscar alternativas terapéuticas para determinar si se podrían alcanzar mejores resultados. En este sentido, se combinaron diferentes antifúngicos con drogas con diversas acciones terapéuticas pero que han demostrado tener actividad antifúngica frente a *A. fumigatus* y *Candida albicans* resistentes a antifúngicos azólicos. Tal es el caso de la AMD (antiarrítmico), NIF (hipotensor), LAN (inhibidores de las bombas H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa gástrica) etc. [211], [212], [213], [214], [215], [216], [217]. La actividad *in vitro* de las drogas individuales y las combinaciones VRC+AMD, VRC+NIF, VRC+LAN, VRC+DIS, VRC+AMB, VRC+PSC, VRC+CSF se evaluaron frente diferentes especies de Mucorales (25 cepas). Las drogas no convencionales como AMD, NIF, LAN y DIS no presentaron actividad antifúngica frente a ninguna de las cepas ensayadas cuando se las evaluó como droga única. En la **Tabla 12** se presentan las CIMs individuales y las  $\Sigma$ FIC para todas las cepas analizadas frente a los antifúngicos clásicos.

**Tabla 12.** Resultados de la sensibilidad a los antifúngicos individuales y en combinación.

Cepa	Organismo	CIM (µg/mL)				ΣFIC (Interpretation) <sup>b</sup>					
						VRC - PSC		VRC - AMB		VRC - CSF	
		VRC	PSC	AMB	CSF	CIM	AH	CIM	AH	CIM	AH
165	<i>R. microsporus</i>	8.00	1.00	2.00	16.00	0.75(I)	Si	0.75(I)	Si	0.75(I)	Si
156	<i>R. microsporus</i>	4.00	1.00	2.00	16.00	1.00(I)	Si	2.04(I)	No	1.00(I)	Si
157	<i>R. microsporus</i>	4.00	0.50	1.00	16.00	0.50(S)	Si	1.03(I)	No	0.75(I)	Si
158	<i>R. microsporus</i>	8.00	0.50	2.00	16.00	1.00(I)	Si	1.04(I)	No	2.00(I)	Si
159	<i>R. microsporus</i>	4.00	1.00	2.00	16.00	1.00(I)	No	1.03(I)	No	1.50(I)	No
164	<i>R. microsporus</i>	4.00	1.00	2.00	16.00	1.00(I)	No	1.01(I)	Si	1.00(I)	No
167	<i>R. microsporus</i>	4.00	1.00	2.00	16.00	1.02(I)	Si	1.03(I)	No	1.25(I)	No
168	<i>R. microsporus</i>	4.00	1.00	2.00	16.00	1.03(I)	No	2.50(I)	No	2.00(I)	No
176	<i>R. microsporus</i>	8.00	1.00	2.00	16.00	0.63(I)	Si	2.25(I)	Si	1.25(I)	No
184	<i>R. microsporus</i>	8.00	1.00	2.00	16.00	0.75(I)	Si	1.03(I)	Si	1.03(I)	No
379	<i>R. microsporus</i>	8.00	1.00	4.00	16.00	0.63(I)	Si	1.00(I)	No	0.75(I)	Si
596	<i>R. microsporus</i>	2.00	1.00	1.00	16.00	1.06(I)	No	2.00(I)	No	1.03(I)	No
1073	<i>R. microsporus</i>	2.00	1.00	0.50	16.00	1.06(I)	No	1.06(I)	No	2.00(I)	No
1074	<i>R. microsporus</i>	2.00	1.00	0.25	16.00	0.75(I)	No	0.62(I)	No	2.00(I)	No
1127	<i>R. microsporus</i>	8.00	2.00	1.00	16.00	0.50(S)	No	0.50(S)	No	0.75(I)	No
n = 15	<i>R. microsporus</i>	4.59	0.95	1.45	16.00	0.82		1.14		1.18	
597	<i>R. oryzae</i>	8.00	1.00	2.00	16.00	0.75(I)	No	0.75(I)	No	0.75(I)	No
1126	<i>R. oryzae</i>	8.00	1.00	1.00	16.00	0.75(I)	No	0.50(S)	No	1.00(I)	No
1075	<i>R. oryzae</i>	4.00	1.00	0.25	16.00	1.00(I)	No	0.62(I)	No	2.00(I)	No
n = 3	<i>R. oryzae</i>	6.35	1.00	0.79	16.00	0.83		0.61		1.14	
1122	<i>S. racemosum</i>	4.00	1.00	0.50	16.00	1.00(I)	Si	1.00(I)	Si	2.00(I)	Si
1123	<i>S. racemosum</i>	4.00	1.00	0.25	16.00	0.75(I)	No	1.00(I)	No	2.00(I)	Si
1124	<i>S. racemosum</i>	16.00	2.00	0.50	16.00	1.00(I)	No	1.00(I)	No	2.00(I)	No
576	<i>S. racemosum</i>	16.00	2.00	2.00	16.00	0.50(S)	Si	0.5(S)	Si	1.00(I)	Si
n = 4	<i>S. racemosum</i>	8.00	1.40	0.59	16.00	0.78		0.88		1.75	
1128	<i>L. blakesleeana</i>	4.00	0.50	0.50	16.00	0.75(I)	Si	1.00(I)	Si	2.00(I)	No
1121	<i>L. corymbifera</i>	8.00	1.00	0.25	16.00	0.50(S)	Si	1.00(I)	No	2.00(I)	Si
1125	<i>L. ramosa</i>	16.00	1.00	1.00	16.00	0.31(S)	No	0.62(I)	No	1.00(I)	No
n = 3	<i>Lichtheimia</i> spp.	8.00	0.80	0.50	16.00	0.49		1.09		1.45	
n = 25	Mucorales	5.74	1.03	1.03	16.00	0.81		1.09		1.45	
n = 10	no- <i>R. microsporus</i>	8.00	1.15	0.62	16.00	0.73		0.80		1.70	

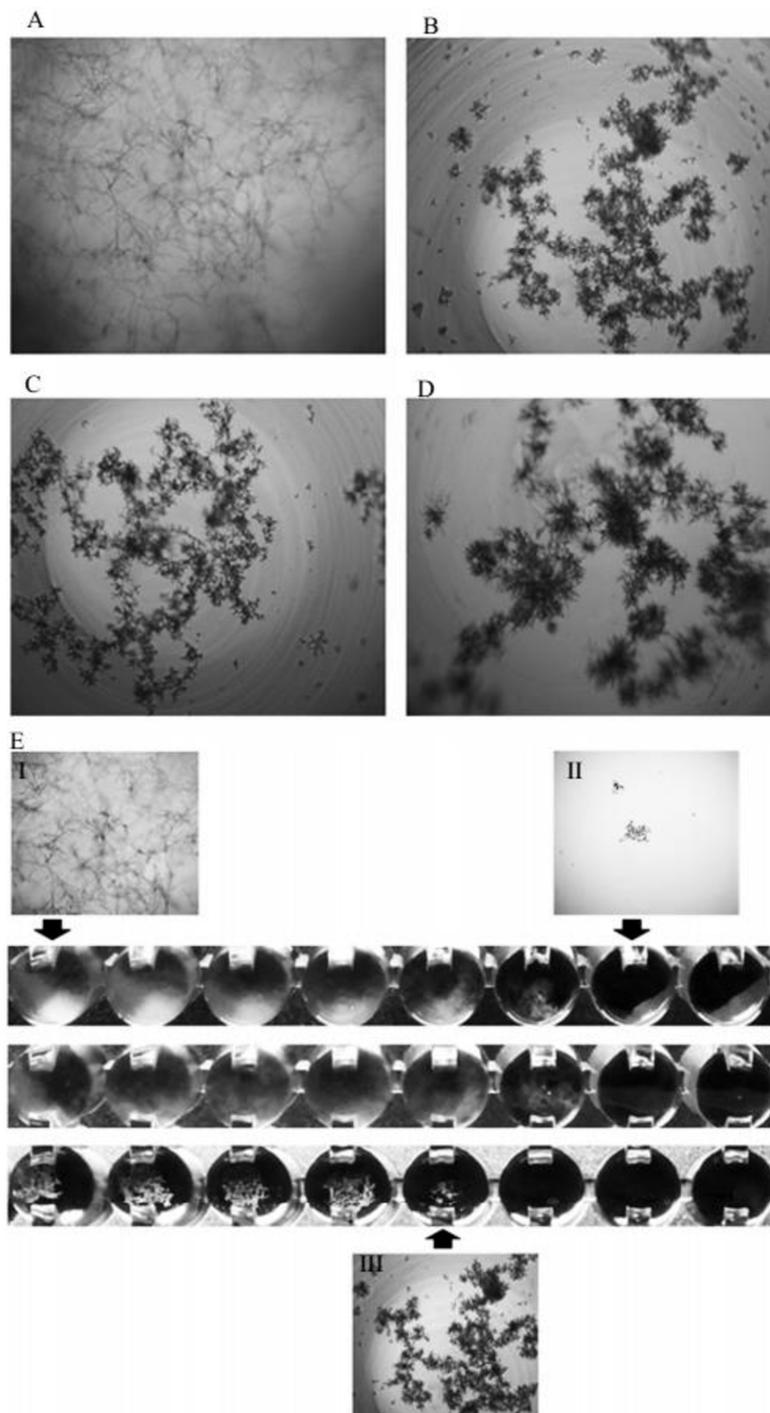
S= sinergismo; I=Indiferencia o sin interacción.

Como se esperaba, AMB y PSC fueron las drogas más activas (ambos drogas mostraron media geométrica (MG) de 1.03 µg/mL para todos los aislamientos). Sin embargo, cuando se compararon las CIM de *R. microsporus* (n = 15) con las CIM de otros aislamientos de Mucorales (n = 10), se encontraron diferencias específicas de especie para AMB pero no para PSC. Para el polieno, *R. microsporus* mostró CIM estadísticamente más altas que las otras especies (1.45 µg/mL y 0.62 µg/mL, respectivamente; P = 0.0091). Para todos los aislamientos se obtuvieron valores de CIMs a VRC y CSF elevados, aunque se observaron

MG de CIM a VRC más bajas para *R. microsporus* que para los otros Mucorales (4.59 µg/mL vs. 8.00 µg/mL, respectivamente; P = 0.0295).

Las  $\Sigma$ FIC variaron según la combinación utilizada. Brevemente, se obtuvieron  $\Sigma$ FIC = 0.5 (sinergismo límite) para cuatro cepas con la combinación de VRC + PSC y para tres cepas con la combinación VRC + AMB, mientras que solo una cepa de *L. ramosa* mostró  $\Sigma$ FIC = 0.31 para la combinación VRC + PSC. La combinación VRC + CSF exhibió  $\Sigma$ FIC interpretada como no interacción para todas las cepas probadas, con valores de  $\Sigma$ FIC promedio de 1.45.

Se observaron al microscopio alteraciones de hifas (AH) (definidas como formas de hifas pequeñas, redondeadas y compactas, en comparación con el control de crecimiento) para algunos aislamientos cuando se enfrentaron contra combinaciones de VRC + AMB, VRC + PSC y VRC + CSF (**Figura 50**). Éste efecto se asemeja a la concentración mínima efectiva (MEC) reportada para Ascomycetes filamentosos que crecen en presencia de una droga del grupo de las equinocandinas. Se observó en 48% (12 de 25 cepas), 28% (n = 7) y 36% (n = 9) de las cepas analizadas cuando se enfrentaron contra las combinaciones de VRC + PSC, VRC + AMB y VRC + CSF, respectivamente (**Tabla 12**). No se observaron AH microscópicos para ninguna de las cepas estudiadas cuando se probaron las drogas individuales.



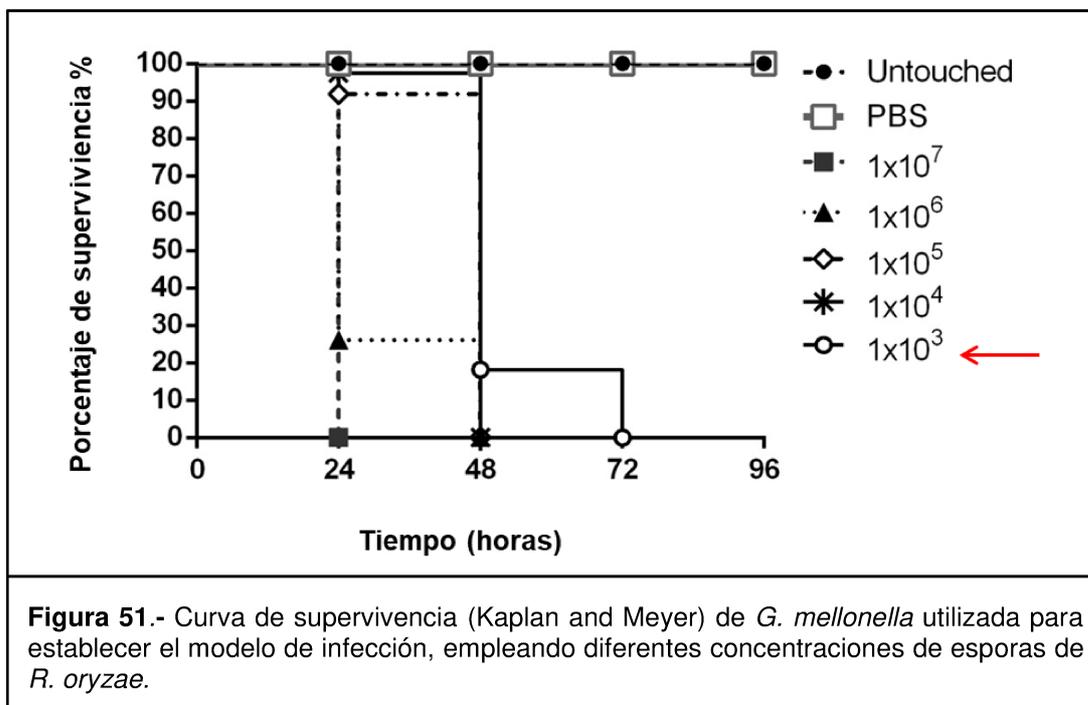
**Figura 50.-** Microfotografía de luz (50x) de los cambios morfológicos en *R. microsporus* LMDM-165 observados en combinaciones de drogas. **(A)** Control de crecimiento; **(B)** VRC + AMB (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  + 0.06  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente); **(C)** VRC + PSC (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  + 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente); **(D)** VRC + CSF (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  + 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente). **(E)** Placas de microdilución que muestran AMB solo (línea superior: 0.03–4.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), VRC solo (línea media, 0.12–16.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y combinación VRC + AMB (línea inferior). Las CIM de AMB y VRC son 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente. Se muestra el aspecto microscópico correspondiente (I: control de crecimiento, II: 100% inhibición y III: Alteraciones microscópicas de hifas).

#### 4.5.2. Estudio *in vivo* utilizando el invertebrado *G. mellonella* para evaluar combinaciones de drogas

Para evaluar si la AH microscópica observada tiene algún impacto *in vivo*, se usó un modelo de mucormicosis en *G. mellonella*. Para esto, se utilizaron las cepas *R. microsporus* LMDM-165 y *R. oryzae* LMDM-597 como agentes de infección ya que mostraron exactamente los mismos valores de CIM y  $\Sigma$ FIC para todos los antifúngicos, individuales y en combinación, pero diferentes comportamientos microscópicos cuando se enfrentaron a las combinaciones de drogas. *R. microsporus* LMDM-165 mostró  $\Sigma$ FIC interpretadas como no interacción, pero mostró la AH microscópica mencionada para todas las combinaciones probadas. Por otro lado, *R. oryzae* LMDM-597 exhibió las mismas  $\Sigma$ FIC pero no se observó AH.

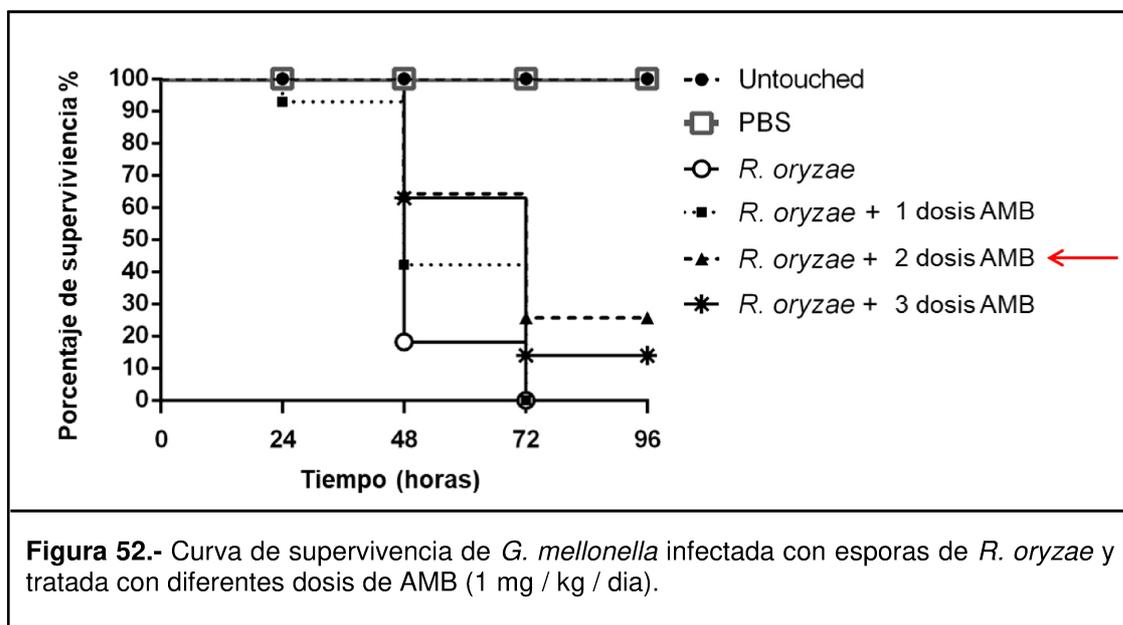
##### Puesta a punto del modelo de infección

El inóculo seleccionado para el modelo de mucormicosis fue de  $10^3$  esporas / larvas para ambas cepas, ya que se obtuvo un 80% de mortalidad a las 48 h después de la infección (concentraciones de esporas más altas produjeron un 100% de mortalidad entre el primer y el segundo día después de la infección) (**Figura 51**).



## Puesta a punto de la dosificación de drogas individuales y en combinación

Se evaluó el número de dosis de AMB necesarias para aumentar la supervivencia a las 96 h después de la infección. Se observó un aumento significativo en la supervivencia al comparar una y dos dosis de AMB ( $P = 0.033$ ), mientras que no se observaron cambios de supervivencia cuando se usaron tres dosis de AMB ( $P = 0.161$ ) (**Figuras 52**). Por lo tanto, se eligió utilizar dos dosis como el modelo de tratamiento ideal. Se usó el mismo número de dosis para todos los tratamientos probados. Los grupos de control de toxicidad mostraron una supervivencia del 100% (datos no mostrados para reducir la complejidad de la Figura 52)



## Evaluación del efecto de drogas individuales y combinadas en *G. mellonella* infectadas con Mucorales

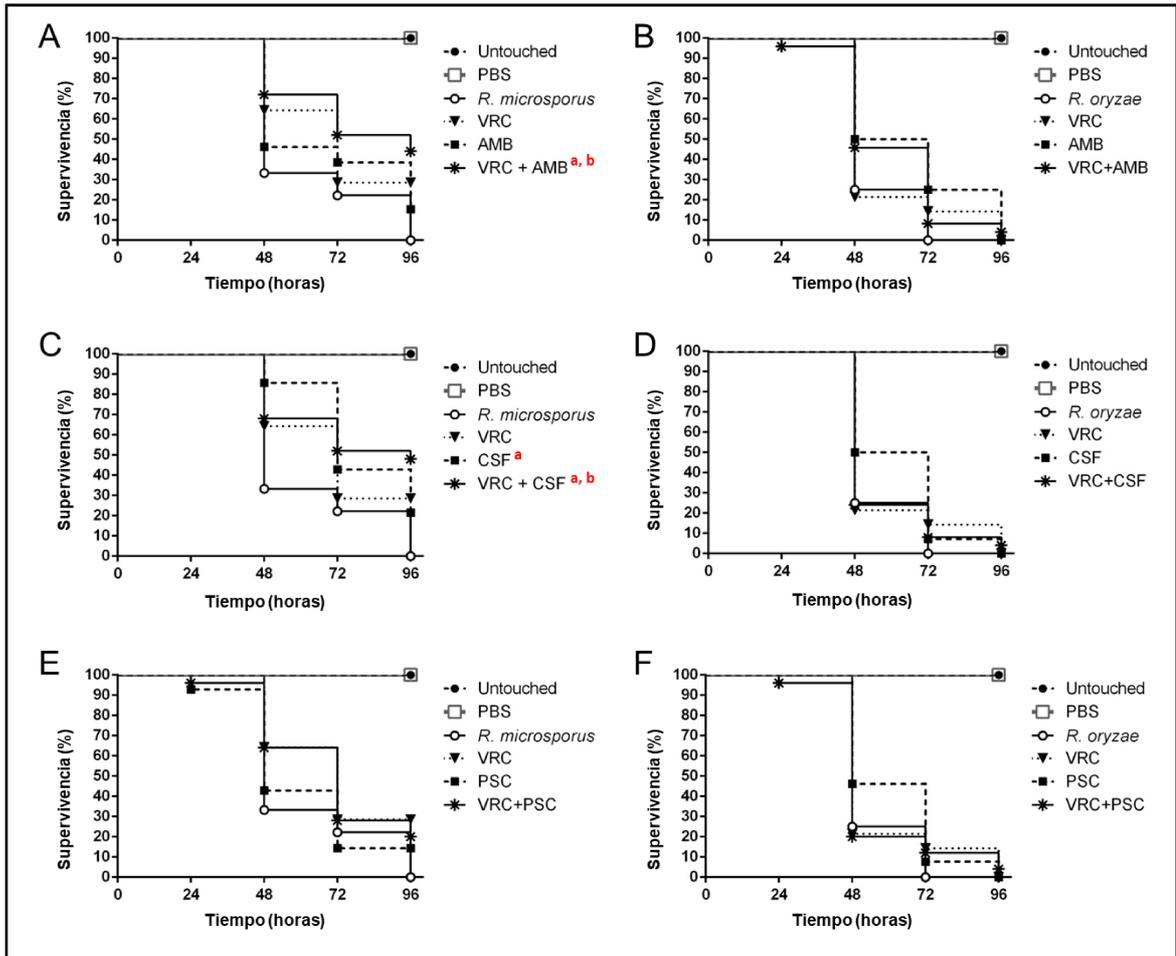
La supervivencia media (días en los que se registró una supervivencia del 50%) fue uno o dos días en los grupos de control no tratados, infectados con las cepas LMDM-165 y LMDM-597. Cuando se usaron drogas individuales (a dosis terapéuticas), no se observó una mejora estadísticamente significativa en la supervivencia, excepto para el grupo infectado con LMDM-165 cuando se trató con CSF ( $P = 0.035$ ) (**Figura 53**).

En cuanto a las combinaciones de drogas, las larvas infectadas con *R. microsporus* y *R. oryzae* recibieron una combinación de drogas en dosis iguales a las concentraciones más

bajas en las que se observó AH *in vitro* para *R. microsporus* LMDM-165. Por lo tanto, las dosis de AMB se redujeron 32 veces (0,03 mg / kg / día) en comparación con la dosis terapéutica habitual. La CIM de AMB para ambas cepas fue de 2 µg/mL, pero la AH microscópica se observó a 0,06 µg/mL cuando AMB se combinó con otros antifúngicos. Del mismo modo, las dosis de CSF y azol se redujeron cuatro veces (0,125 mg/kg/día y 2,5 mg/kg/día, respectivamente). Para estos últimos antifúngicos, se observaron AH en pocillos donde las concentraciones de droga fueron 4 veces más bajas que las MIC registradas, respectivamente. A pesar de estas reducciones de dosis, la supervivencia media para las combinaciones fue mayor que para las drogas individuales para todas las combinaciones probadas, cuando el agente infeccioso era *R. microsporus* LMDM-165 (**Figura 53**).

Estas mejorías en la supervivencia fueron estadísticamente significativas cuando se compararon los tratamientos de VRC + AMB y VRC + CSF con el grupo sin tratamiento y con el grupo tratado con AMB (P = 0.0087 y P = 0.0081 vs. sin tratamiento y P = 0.040 y P = 0.045 vs. grupo de tratamiento con AMB, respectivamente). Por el contrario, cuando las larvas infectadas con *R. oryzae* fueron tratadas con combinaciones de drogas, no se observó mejoría en la supervivencia en comparación a los grupos no tratados o tratados con drogas individuales (todos los P > 0.05) (**Figura 53**).

Ninguno de los antifungicos solos o en combinación mostraron un efecto tóxico en las larvas a las concentraciones utilizadas (no se muestran datos sobre los grupos de toxicidad).



**Figura 53.-** Curvas de supervivencia de *G. mellonella* infectada con *R. microsporius* LMDM-165 tratadas con dos dosis de: **(A)** VRC (10 mg / kg / día), AMB (1 mg / kg / día) y VRC + AMB (2.5 mg / kg / día + 0.03 mg / kg / día); **(C)** VRC (10 mg / kg / día), CSF (0.5 mg / kg / día) y VRC + CSF (2.5 mg / kg / día + 0.125 mg / kg / día); **(E)** VRC (10 mg / kg / día), PSC (10 mg / kg / día) y VRC + PSC (2.5 mg / kg / día + 2.5 mg / kg / día). Infecciones con *R. oryzae* LMDM-597 tratadas con: **(B)** VRC (10 mg / kg / día), AMB (1mg / kg / día) y VRC + AMB (2.5 mg / kg / día + 0.03 mg / kg / día); **(D)** VRC (10 mg / kg / día), CSF (0.5 mg / kg / día) y VRC + CSF (2.5 mg / kg / día + 0.125 mg / kg / día); **(F)** VRC (10 mg / kg / día), PSC (10 mg / kg / día) y VRC + PSC (2.5 mg / kg / día + 2.5 mg / kg / día). <sup>a</sup> Mejora estadísticamente significativa en la supervivencia en comparación con los no tratados. <sup>b</sup> Mejora estadísticamente significativa en la supervivencia en comparación con AMB.



## **DISCUSSION**

## 5.- DISCUSION

### Relación del fenotipo de resistencia a azoles con el gen *CYP51A* de *R. oryzae*.

La mucormicosis es una de las micosis más difíciles de tratar, ya que sus agentes etiológicos son naturalmente resistentes a los antifúngicos utilizados para el tratamiento de primera línea de las aspergilosis y candidiasis (VRC y FLC, respectivamente) [218], [48], [219]. El mecanismo molecular involucrado en el fenotipo de resistencia intrínseca de los Mucorales no se conoce. Sin embargo, los mecanismos de resistencia a azoles fueron estudiados en algunos Ascomycetes (principalmente *Candida* spp. y *Aspergillus fumigatus*) y Basidiomycetes (*Cryptococcus* spp.) y se vio que son similares, independientemente de las especies fúngicas estudiadas [220], [164], [221], [222], [223]. Además, estos mecanismos en general son similares tanto para la resistencia intrínseca como secundaria. Los mismos se limitan principalmente a la sobreexpresión de bombas de flujo, mutaciones en las enzimas targets (*ERG11* y *CYP51A*) y/o hiperexpresión de las enzimas targets (debido a aneuploidias o producción de enzimas por alteración en promotores y/o factores de transcripción). Lo que sí cambia entre los diferentes hongos estudiados es la prevalencia de estos mecanismos. Así, en *Candida* spp. el mecanismo más frecuente es la hiperexpresión de bombas de flujo, mientras que para *A. fumigatus* el mecanismo está más relacionado a mutaciones en la enzima target de azoles (Cyp51Ap) [220], [221], [222], [223],[40]. En *Cryptococcus* spp., los pocos mecanismos descritos incluyen la sobreexpresión de diferentes genes por duplicaciones cromosómicas reversibles (heteroresistencia), mutaciones puntuales en Erg11p y sobreexpresión de la bomba de eflujo [221], [194], [224], [225], [226], [227].

En este trabajo nos propusimos estudiar los mecanismos moleculares de resistencia de *R. oryzae* a los azoles.

La tecnología de knock-out génico fue la utilizada en el desarrollo de esta tesis para estudiar la función del gen *CYP51A* de *R. oryzae* en el fenotipo de resistencia. Esta metodología 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. En la técnica de *knock-out* de genes, el gen endógeno en estudio se intercambia por recombinación homóloga por otro gen que altera su fenotipo de manera de poder seleccionar los transformantes más fácilmente a posteriori (cassette de selección).

De esta forma, nos planteamos estudiar el gen *CYP51A* por dos vías. Por un lado, obtener cepas de *R. oryzae* defectivas en dicho gen y por el otro, reemplazar el gen *CYP51A* de *A. fumigatus* por su gen homólogo de *R. oryzae*.

Siguiendo la primera vía planteada, si bien se pudo obtener el vector de disrupción con el cassette que confiere resistencia a la HYGB, determinar la velocidad de germinación óptima de *R. oryzae* y establecer las condiciones de cultivo adecuadas para obtener colonias aisladas, no se pudieron obtener las cepas *knock out* del gen *CYP51A*, aun habiendo probado diferentes condiciones de electroporación y cantidades de ADN.

Esto podría deberse, en parte, a lo planteado por Skory en 2002 [228], quien demostró que la manipulación genética de *R. oryzae* es difícil, por la fuerte tendencia de los plásmidos transformados a replicarse en estructuras concatenadas de alto peso molecular que rara vez se integran en los cromosomas. El mismo autor vio más adelante que incluso los plásmidos linealizados tienden a replicarse de manera autónoma después de un evento de unión de extremos no homólogos (NHEJ) [229]. También se vio que la introducción de una ruptura en la doble cadena dentro de las regiones homólogas en un plásmido linealizado puede mejorar significativamente la probabilidad de integración en *R. oryzae* [228], [229]. Sin embargo, esta recombinación de plásmidos transformados ocurre solo a través de un solo evento cruzado o mediante un mecanismo de reparación de rotura de doble cadena que corrige las mutaciones puntuales [229].

Por otro lado, se sabe que *R. oryzae* tiene hifas cenocíticas y que las esporangiosporas son multinucleadas [167]. En 2010, Ibrahim y col. plantearon la hipótesis de que la disrupción génica en este mucoral era complicada por la presencia de núcleos heterocarióticos tanto en el micelio como en las esporangiosporas [230]. En este trabajo los autores encontraron más de 10 núcleos presentes en las esporas inflamadas [230]. No pudieron obtener ningún aislamiento homocariótico, incluso con varias rondas de esporulación y aislamientos de colonias en medio selectivo.

Esto explicaría porque en este trabajo no pudimos obtener cepas de *R. oryzae* defectivas en el gen *CYP51A*.

Luego continuamos con la obtención de cepas quiméricas de *A. fumigatus* con el *CYP51A* de *R. oryzae*, mediante la técnica de transformación por electroporación.

Utilizamos un nuevo procedimiento de selección de transformantes, que incluye el uso de FLC como agente selector y una mutante de *A. fumigatus* hipersensible a FLC. Los resultados obtenidos respaldan el concepto de que otros alelos del gen *CYP51* podrían

estudiarse usando un mutante de *A. fumigatus* (con el *CYP51A* delecionado) como huésped heterólogo y FLC como agente selector.

Usando la estrategia de selección y transformación descrita, confirmamos que la región codificante del gen *CYP51A* de *R. oryzae* (*RoCYP51A*) es la única responsable de su fenotipo de resistencia intrínseca a VRC y FLC. La integración homóloga del *RoCYP51A* en el genoma de *A. fumigatus* hipersensible produjo mutantes cuyas CIM imitaron los patrones de sensibilidad a azoles observados en la cepa *wild type* de *R. oryzae*. La participación del promotor y terminador del *RoCYP51A* en el fenotipo estudiado se descartó, ya que el gen *RoCYP51A* integrado en las quimeras de *A. fumigatus* estaba regulado por las regiones promotoras y terminadoras del *AfCYP51A wild type* (5' y 3' UTRs, respectivamente). Por lo tanto, la sobreexpresión del *CYP51A* no es necesaria para reproducir el fenotipo de resistencia a los agentes azólicos observado. En el mismo sentido, la amplificación del número de copias de los genes *CYP51* no tendría implicancia en la resistencia estudiada, ya que ambos genes se encuentran en igual cantidad que el gen *housekeeping ACT1*.

La relación entre los genes *CYP51* y la relativa mejor actividad de PSC que VRC frente a las especies de Mucorales fue sugerida por Chau y col [231], al transformar los genes *CYP51* en *Saccharomyces cerevisiae*. Además, los mismos autores argumentaron que dos sustituciones de aminoácidos naturales en las Cyp51p de Mucorales explicarían su patrón particular de sensibilidad a los azoles. Ellos alinearon las secuencias Cyp51Ap (Erg11p, para levaduras) de *Cunninghamella elegans*, *R. oryzae*, *Candida albicans* y *A. fumigatus* y plantearon la hipótesis de que las sustituciones Y132F y/o F145M (numeración de *C. albicans*) serían las responsables de la resistencia de los Mucorales a azoles. Estas sustituciones se vincularon con resistencia secundaria a FLC y sensibilidad a ITC y PSC en cepas de *C. albicans* e *Histoplasma capsulatum* [232], [233]. Recientemente, Caramalho y col. [234] plantearon a la sustitución natural Y132F como hipótesis para explicar la resistencia intrínseca de los Mucorales a VRC y FLC. Los autores generaron un modelo por homología de RoCyp51p basado en el Erg11p de *Saccharomyces cerevisiae* y concluyeron que la sugerencia inicial de Chau y col. [231] era correcta. La misma sustitución Y132F fue descrita en *A. fumigatus* resistente a VRC (Y121F usando la numeración de Cyp51Ap de *A. fumigatus*). Sin embargo, cepas clínicas de *A. fumigatus* que presentaron un patrón similar de sensibilidad a azoles, es decir, un alto nivel de resistencia a VRC (CIM > 8 µg /ml) y un aumento de 8 veces en los valores de CIM a PSC e ITC, albergaban la sustitución Y121F asociada con una segunda sustitución de aminoácidos en la misma proteína (T289A) y una repetición de 46 nucleótidos en el promotor de *CYP51A* (denominada TR46 / Y121F / T289A) [173], [175], [176]. Snelders y col. [170] demostraron, usando recombinación genética, que las tres modificaciones juntas son necesarias para reproducir dicho patrón de

resistencia a azoles, especialmente CIM a VRC > 8 µg /ml. En una publicación realizada por nuestro grupo se demostró que la resistencia intrínseca de *A. fumigatus* a FLC se debe a la sustitución natural T301I en su Cyp51Ap [158]. Además se vió que esta sustitución no tiene impacto en los valores de CIM a VRC [158]. Por su parte, *R. oryzae* presenta un residuo de treonina en la posición equivalente en ambas Cyp51p, lo cual sugiere que la resistencia intrínseca a VRC y FLC en este mucoral estaría relacionada con otros residuos aminoácidos. Esta información refuerza la idea de la posible participación de la sustitución Y132F en el fenotipo observado.

En este trabajo estudiamos molecularmente la implicancia de las sustituciones naturales F129Y y A290T de la proteína RoCyp51Ap en la resistencia a azoles (equivalentes a las sustituciones Y121F y T289A descritas para *A. fumigatus* resistente a azoles). Se obtuvieron así dos quimeras albergando el gen RoCYP51A con las mutaciones individuales y también una doble mutante con las sustituciones F129Y / A290T.

La mutante quimérica de *A. fumigatus* albergando el RoCYP51A con la mutación F129Y obtenida presentó una disminución de 4 veces en los valores de CIM a VRC. Esto respalda la suposición de que el polimorfismo natural F129Y en la Cyp51Ap de *R. oryzae* es parcialmente responsable del fenotipo de resistencia a VRC.

Dada la hipersensibilidad al posaconazol observada en esta cepa, esta sustitución de aminoácidos parece estar relacionada con la interacción posaconazol-RoCyp51Ap.

Los estudios moleculares realizados en esta tesis refutan la hipótesis planteada por Caramalho y col. [234], de que el residuo F129 en Cyp51Ap de Mucorales es el único responsable de la menor sensibilidad a los triazoles de cadena corta (VCZ, FLC), pero no a los de cadena larga (PSC).

Por su parte, el polimorfismo A290T parece no tener participación en el fenotipo de resistencia al VRC y FLC.

### **Evaluación in vitro e in vivo de combinaciones de antifungicos frente a Mucorales.**

La tasa de mortalidad de la mucormicosis ha permanecido por encima del 40% durante años [6], [235], [236]. El tratamiento efectivo de estas micosis depende del diagnóstico rápido, el desbridamiento quirúrgico, la reducción o eliminación de los factores de riesgo y el tratamiento antifúngico temprano [236]. Uno de los principales avances en el tratamiento de la mucormicosis fue el cambio de AMB deoxicolato a las formulaciones lipídicas de AMB [237], [238], [239] y el uso del PSC e ISAV como terapias de desescalamiento y de salvataje

[54], [9] . A pesar de estos avances, la mortalidad sigue siendo inaceptable y, claramente, se necesitan nuevos enfoques [57]. Estos hechos han estimulado el interés en estudiar combinaciones de antifúngicos para determinar si se podrían lograr mejores resultados y utilizarse como un recurso terapéutico que puede ser explotado clínicamente.

Las equinocandinas y tratamientos combinados fueron probados en modelos animales con resultados promisorios, pero se obtuvieron resultados menos alentadores en escenarios clínicos [239], [57], [240]. En 2014, Kontoyiannis y col. publicaron un ensayo clínico prospectivo donde se utilizó una monoterapia (principalmente AMB lipídica) en el 60% de los casos, mientras que la terapia combinada (AMB + PSC y AMB + equinocandinas) se usó en los pacientes restantes. Concluyeron que para mejorar la supervivencia es más importante el inicio rápido del tratamiento que utilizar una terapia única o combinada [57].

Cabe destacar que en la mayoría de las publicaciones en las que fue evaluada la efectividad de un tratamiento, no se identificaron los agentes etiológicos a nivel de especie o variedad [57], [63], [241].

Por su parte, 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 *G. mellonella* (Lepidoptera) [201], [242]. 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 *A. fumigatus*, levaduras del género *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. parapsilosis sensu lato*) y *Cryptococcus neoformans* [202], [203], [204], [205], [206].

En este trabajo nos propusimos evaluar la naturaleza y la intensidad del efecto *in vitro* de combinaciones de drogas contra seis especies diferentes de Mucorales, evaluar un modelo de mucormicosis en *G. mellonella* y determinar si existe alguna correlación *in vitro-in vivo*.

Nuestros datos sugirieron que la sensibilidad *in vitro* e *in vivo* a un determinado tratamiento depende en gran medida del agente etiológico. Encontramos diferencias en el

comportamiento frente a las drogas, incluso en las diferentes variedades de *R. microsporus*. Estos resultados concuerdan con los datos reportados previamente [46].

En cuanto a la evaluación de combinaciones de drogas *in vivo*, varios artículos demostraron su efectividad utilizando modelos murinos de mucormicosis debido a *R. oryzae* (Gebremariam y col. además usaron *Mucor circinelloides*) [59]. Sin embargo, ninguno realizó una evaluación previa de la actividad *in vitro* de las combinaciones probadas [59], [239], [61], [62], [64], [65]. En nuestro trabajo, primero evaluamos la actividad *in vitro* de las combinaciones probadas y luego las probamos en un modelo de mucormicosis de *G. mellonella*, utilizando dos especies de *Rhizopus* con valores idénticos de CIM y  $\Sigma$ FIC pero con diferente morfología microscópica después de la exposición a las drogas. Utilizamos un modelo de infección similar al publicado por Kaerger y col. [243] pero utilizando una temperatura de incubación más alta (37 °C frente a 30 °C) y un inóculo más bajo ( $10^3$  esporas/larva vs  $10^6$  esporas/larvas). La razón por la cual realizamos estos cambios fue que la mayoría de los modelos publicados de infecciones fúngicas usaban 37 °C como temperatura de incubación [202], [204], [244], [245], [246]. Sin embargo, como lo describen Kaerger y col. [243], las especies termotolerantes de *Rhizopus* (patógenos humanos) se propagan más rápidamente dentro de la larva a temperaturas más altas. Por lo tanto, los inóculos se redujeron en nuestro modelo para evitar este problema y que nos permita evaluar las diferencias en la eficacia del tratamiento.

Decidimos probar combinaciones que incluyen VRC (VRC + CSF, VRC + AMB y VRC + PSC) ya que estas combinaciones cumplen parcialmente lo que Spellberg y col. consideraron como características que las combinaciones de drogas pueden tener para ser estudiadas como potenciales opciones de tratamiento de mucormicosis [58]. Así, estas drogas son agentes ya aprobados y con buena eficacia y seguridad. Sin embargo, no hay datos sobre mejoras en la supervivencia en modelos animales de mucormicosis. En este trabajo, las combinaciones probadas mejoraron la supervivencia de la larvas, de una manera dependiente de la cepa (mayor supervivencia en larvas infectadas con *R. microsporus* que con *R. oryzae*). También elegimos probar combinaciones de drogas con VRC basados en reportes donde se vio que las combinaciones que incluían azoles demostraron ser sinérgicas contra hongos resistentes a azoles [214], [247], [248] y que la exposición previa a los triazoles mejoró la actividad de AMB contra *Rhizopus* spp [249]. Los resultados presentados en esta tesis demuestran que las combinaciones de antifúngicos que incluyen VRC (+ AMB y + CSF) producen un cambio morfológico en las hifas de algunas cepas de Mucorales (efecto no observado cuando se tratan con los antifúngicos solos). Cuando estas modificaciones morfológicas fueron observadas, se obtuvo una mejor

supervivencia de las larvas de *G. mellonella*. Por lo tanto, pareciera que la alteración de hifa observada microscópicamente se correlaciona mejor con la mejoría en la supervivencia que la  $\Sigma$ FIC. La reducción sustancial, especialmente en las dosis de AMB, significaría una reducción concomitante de la toxicidad en un hipotético tratamiento combinado. Además, considerando que algunos autores mostraron que la mucormicosis debe tenerse en cuenta en pacientes que reciben VRC como profilaxis de aspergilosis [250], [251], [252], el VRC más una dosis baja de AMB debería estudiarse como una opción de tratamiento preventivo tanto para la aspergilosis como para la mucormicosis, especialmente en pacientes inmunodeprimidos con diabetes y / o desnutrición [250].

Cuando se usó VRC + CSF en el modelo de *G. mellonella*, también se observó una mejora en la supervivencia. Es difícil explicar cómo el VRC puede mejorar la actividad de AMB y CSF cuando se combinan. Sin embargo, artículos anteriores han demostrado que la CSF aumenta la actividad de otras drogas contra hongos intrínsecamente resistentes a las equinocandinas, como *Cryptococcus* spp. y *Fusarium* spp [253], [254]. Del mismo modo, combinaciones que incluían azoles mostraron ser sinérgicas contra hongos resistentes a los azoles [214], [248], [255]. Por el contrario, un trabajo reciente demostró que la micafungina no mejoró la actividad del ISAV en un modelo murino de mucormicosis [59]. Sin embargo, esta falta de mejora en la tasa de supervivencia también estaría relacionada con la eficacia limitada observada para este azol recién comercializado, reportado por Maurer y col. utilizando un modelo de mucormicosis en *G. mellonella* [256].

Este trabajo sería un punto de partida para comprender cómo las combinaciones de antifúngicos alteran las hifas de Mucorales y contribuyen a la mejora de la supervivencia de *G. mellonella*. Sin embargo, se necesita más trabajos para confirmar la aplicabilidad clínica de nuestras observaciones, evaluar las concentraciones relativas y la farmacodinámica de los antifúngicos probados dentro de los tejidos de la larva y aclarar el mecanismo molecular involucrado en la alteración de las hifas de Mucorales.



## **CONCLUSIONES**

## 6.- CONCLUSIONES

- Se identificaron en el genoma de *R. oryzae* dos genes parálogos que codifican 14- $\alpha$  esterol demetilasa. Los mismos se caracterizaron y se nombraron como *CYP51A* y *CYP51B*. Se confirmó que los genes *RoCYP51A* y *RoCYP51B* se encuentran en el genoma de *R. oryzae* en igual cantidad que el gen de expresión constitutiva *ACT1*.
- Se determinó la velocidad de germinación óptima de *R. oryzae* y se establecieron las condiciones de cultivo adecuadas para obtener colonias aisladas de éste Mucoral. No fue posible obtener mutantes de *R. oryzae* defectivos en el *CYP51A* dado que fue imposible lograr la transformación de estos hongos por electroporación.
- Se estableció un método novedoso de selección de mutantes en *CYP51* en hongos filamentosos basado en el uso de una cepa de *A. fumigatus* deficiente en los genes *KU80* y *CYP51A* y fluconazol como agente selector.
- Se obtuvieron cepas de *A. fumigatus* con su gen *CYP51A* reemplazado por el gen *CYP51A* de *R. oryzae*. Los mutantes imitaron los valores de CIMs a azoles presentados por la cepa *wild type* de *R. oryzae*. Así, se confirmó fenotípica y molecularmente la relación del gen *RoCYP51A* con la resistencia a azoles.
- Se estudiaron molecularmente los polimorfismos naturales F129Y, A290T y F129Y/A290T de la *RoCyp51Ap*, obteniéndose cepas de *A. fumigatus* con el *RoCYP51A* albergando dichas sustituciones. La disminución de 4 veces en las CIMs a VRC observada en la mutante quimérica con *RoCYP51A*-F129Y respalda la hipótesis que sostiene que el polimorfismo natural F129Y es parcialmente responsable del fenotipo de resistencia a VRC.
- La mutación F129Y en *RoCyp51Ap* genera hipersensibilidad al PSC. Este aminoácido estaría implicado en la interacción PSC-*RoCyp51Ap*. Por el contrario, el polimorfismo A290T parece no tener implicación en la resistencia al VRC y FLC ni con la sensibilidad a PSC.

- Las opciones terapéuticas de tratamiento de las mucormicosis son escasas. Una alternativa para solucionar este problema es el uso de combinaciones de antifúngicos. En este trabajo se investigó en primer lugar la actividad in vitro del voriconazol combinada con otros azoles, polienos y equinocandinas, contra diferentes especies de Mucorales. Se obtuvieron resultados dependientes de la especie. Además, se observaron al microscopio alteraciones en el desarrollo de la hifa para algunas cepas frente a las combinaciones estudiadas.
- Se estableció un modelo de Mucormicosis en *G. mellonella* útil para evaluar tratamientos antifúngicos. La supervivencia de las larvas de *G. mellonella* tratadas con las combinaciones VRC+AMB y VRC+CSF se correlaciona con las alteraciones de las hifas observadas microscópicamente.



## **BIBLIOGRAFIA**

## 7.- BIBLIOGRAFIA

- [1] JA Ribes, CL Vanover-Sams, DJ Baker (2000) Zygomycetes in Human Disease. *Clin Microbiol Rev* 13 (2):236-301.
- [2] B Spellberg, J Edwards, A Ibrahim (2005) Novel Perspectives on Mucormycosis: Pathophysiology, Presentation, and Management. *Clin Microbiol Rev* 18 (3):556-569.
- [3] D Farmakiotis, DP Kontoyiannis (2016) Mucormycoses. *Infect Dis Clin North Am* 30 (1):143-163.
- [4] M Richardson (2009) The ecology of the zygomycetes and its impact on environmental exposure. *Clin Microbiol Infect* 15 (5):2-9.
- [5] A Bonifaz (2012) *Micología Médica Básica*. 4.<sup>a</sup> ed. Mexico: McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A.
- [6] MM Roden, TE Zaoutis, WL Buchanan, TA Knudsen, TA Sarkisova, RL Schaufele, M Sein, T Sein, CC Chiou, JH Chu, DP Kontoyiannis, TJ Walsh (2005) Epidemiology and Outcome of Zygomycosis: A Review of 929 Reported Cases. *Clin Infect Dis* 41 (5):634-653.
- [7] W Jeong, C Keighley, R Wolfe, WL Lee, MA Slavin, DCM Kong, SCA Chen (2019) The epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis: a systematic review and meta-analysis of case reports. *Clin Microbiol Infect* 25 (1):26-34.
- [8] MZR Gomes, RE Lewis, DP Kontoyiannis (2011) Mucormycosis Caused by Unusual Mucormycetes, Non-*Rhizopus*, -*Mucor*, and-*Lichtheimia* Species. *Clin Microbiol Rev* 24 (2):411-445.
- [9] A Skiada, C Lass-Floerl, N Klimko, A Ibrahim, E Roilides, G Petrikkos (2018) Challenges in the diagnosis and treatment of mucormycosis. *Med Mycol* 56:S93-S101.
- [10] S Gamarra, MS Chaves, MS Cabeza, D Macedo, F Leonardelli, D Franco, M Boleas, G Garcia-Effron (2018) Mucormycosis outbreak due to *Rhizopus microsporus* after arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction surgery evaluated by RAPD and MALDI-TOF Mass spectrometry. *J Mycol Med* 28 (4):617-622.

- [11] MS Chaves, D Franco, JC Nanni, ML Basaldúa, M Boleas, G Aphalo, P Feltes Silva, MC Elgadban, F Emery, S Gamarra, G Garcia-Effron, C Bantar (2016) Control of an outbreak of postoperative bone mucormycosis: An intervention study of contiguous cohorts. *Am J Infect Control* 44 (12):1715-1717.
- [12] MC Dignani, J Santander, N Refojo, R Abrantes, A Hevia, L Clara, M Sánchez, G Davel, T Chiller, G Almada, S Robilotti, N Mosso, et al. (2018) Osteomielitis por mucorales (OMM) asociada a artroscopia de reparación de ligamento cruzado anterior: investigación epidemiológica y recomendaciones para su prevención. *Artrosc (B Aires)*:92-99.
- [13] G Walther, L Wagner, O Kurzai (2019) Updates on the Taxonomy of Mucorales with an Emphasis on Clinically Important Taxa. *J fungi (Basel, Switzerland)* 5 (4).
- [14] G Petrikos, A Skiada, O Lortholary, E Roilides, TJ Walsh, DP Kontoyiannis (2012) Epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis. *Clin Infect Dis* 54 (1).
- [15] DP Kontoyiannis, RE Lewis (2006) Invasive zygomycosis: update on pathogenesis, clinical manifestations, and management. *Infect Dis Clin North Am* 20 (3):581-607, vi.
- [16] CP Wajszczuk, JS Dummer, M Ho, DH Van Thiel, TE Starzl, S Iwatsuki, B Shaw (1985) Fungal infections in liver transplant recipients. *Transplantation* 40 (4):347-353.
- [17] JB Atkinson, DH Connor, M Robinowitz, HA McAllister, R Virmani (1984) Cardiac fungal infections: Review of autopsy findings in 60 patients. *Hum Pathol* 15 (10):935-942.
- [18] D Bitar, D Van Cauteren, F Lanternier, E Dannaoui, D Che, F Dromer, JC Desenclos, O Lortholary (2009) Increasing incidence of zygomycosis (mucormycosis), France, 1997-2006. *Emerg Infect Dis* 15 (9):1395-401.
- [19] JR Rees, RW Pinner, RA Hajjeh, ME Brandt, AL Reingold (1998) The Epidemiological Features of Invasive Mycotic Infections in the San Francisco Bay Area, 1992-1993: Results of Population-Based Laboratory Active Surveillance. *Clin Infect Dis* 27 (5):1138-1147.
- [20] HJ Tietz, D Brehmer, W Jänisch, H Martin (1998) [Incidence of endomycoses in the autopsy material of the Berlin Charité Hospital]. *Mycoses* 41 (2):81-5.
- [21] J Brown (2005) Zygomycosis: An emerging fungal infection. *Am J Heal Pharm* 62 (24):2593-2596.

- [22] GN Pongas, RE Lewis, G Samonis, DP Kontoyiannis (2009) Voriconazole-associated zygomycosis: a significant consequence of evolving antifungal prophylaxis and immunosuppression practices? *Clin Microbiol Infect* 15:93-97.
- [23] G Davel, CE Canteros, A Burkett, IN Tiraboschi, R Pereda, D Pirola, I Maldonado, AS Lancillota, SP Cataldi, A Arechavala, M Bianchi, C Garbasz, et al. (2007) Epidemiological status of mycoses in the Argentine Republic. *Rev Argent Microbiol* 39 (1):28-33.
- [24] AN Malani, CA Kauffman (2007) Changing epidemiology of rare mould infections: implications for therapy. *Drugs* 67 (13):1803-12.
- [25] K Shimodaira, Y Okubo, H Nakayama, M Wakayama, M Shinozaki, T Ishiwatari, D Sasai, T Nemoto, K Takahashi, T Ishii, T Saji, K Shibuya (2012) Trends in the prevalence of invasive fungal infections from an analysis of annual records of autopsy cases of Toho University. *Mycoses* 55 (5):435-443.
- [26] M Shindo, K Sato, J Jimbo, T Hosoki, K Ikuta, A Sano, K Nishimura, Y Torimoto, Y Kohgo (2007) [Breakthrough pulmonary mucormycosis during voriconazole treatment after reduced-intensity cord blood transplantation for a patient with acute myeloid leukemia]. *Rinsho Ketsueki* 48 (5):412-7.
- [27] GTJ van Well, I van Groeningen, YJ Debets-Ossenkopp, AM van Furth, CM Zwaan (2005) Zygomycete infection following voriconazole prophylaxis. *Lancet Infect Dis* 5 (9):594.
- [28] I Tiraboschi, M Bravo, N Fernández, D Stecher, M Melero, M Lasala (2012) [Mucormycosis. An emergent mycosis]. *Medicina (B Aires)* 72 (1):23-7.
- [29] PL Featherston, G Fernández, H Munguía, ME Marín (1998) [Mucormycosis: Study of five cases found in San Juan de Dios hospital and Sor Maria Ludovica hospital in La Plata, Argentina]. *Rev Argent Microbiol* 30 (4):176-9.
- [30] J Marcó Del Pont, L De Cicco, G Gallo, J Llera, E De Santibanez, D D'Agostino (2000) Hepatic arterial thrombosis due to *Mucor* species in a child following orthotopic liver transplantation. *Transpl Infect Dis* 2 (1):33-35.
- [31] LR Strazza, J Guzman, RE Ghelli, S Carrizo, A Zaya, A Cazaux, VH Cambursano (2007) [Pulmonary mucormycosis in a patient with diabetes mellitus: favorable evolution under medical treatment]. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba* 64 (3):93-8.

- [32] DL Muscolo, L Carbo, LA Aponte-Tinao, MA Ayerza, A Makino (2009) Massive bone loss from fungal infection after anterior cruciate ligament arthroscopic reconstruction. *Clin Orthop Relat Res* 467 (9):2420-2425.
- [33] G Davel, P Featherston, A Fernández, R Abrantes, C Canteros, L Rodero, C Sztern, D Perrotta (2001) Maxillary sinusitis caused by *Actinomucor elegans*. *J Clin Microbiol* 39 (2):740-742.
- [34] G Petrikkos, C Tsioutis (2018) Recent Advances in the Pathogenesis of Mucormycoses. *Clin Ther* 40 (6):894-902.
- [35] H Prakash, A Chakrabarti (2019) Global epidemiology of mucormycosis. *J Fungi* 5 (1).
- [36] TJ Walsh, MN Gamaletsou, MR McGinnis, RT Hayden, DP Kontoyiannis (2012) Early clinical and laboratory diagnosis of invasive pulmonary, extrapulmonary, and disseminated mucormycosis (zygomycosis). *Clin Infect Dis* 54 (1).
- [37] L Millon, E Scherer, S Rocchi, AP Bellanger (2019) Molecular strategies to diagnose mucormycosis. *J Fungi* 5 (1).
- [38] SS Dadwal, DP Kontoyiannis (2018) Recent advances in the molecular diagnosis of mucormycosis. *Expert Rev Mol Diagn* 18 (10):845-854.
- [39] RE Lewis, DP Kontoyiannis (2013) Epidemiology and treatment of mucormycosis. *Future Microbiol* 8 (9):1163-1175.
- [40] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2017) Reference Method for Broth Microdilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. 3rd ed. CLSI standard M38. Wayne, PA.
- [41] Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2017) EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 9.3.1: Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds.
- [42] OA Cornely, S Arikian-Akdagli, E Dannaoui, AH Groll, K Lagrou, A Chakrabarti, F Lanternier, L Pagano, A Skiada, M Akova, MC Arendrup, T Boekhout, et al. (2014) ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of mucormycosis 2013. *Clin Microbiol Infect* 20:5-26.
- [43] R Caramalho, E Maurer, U Binder, R Araújo, S Dolatabadi, C Lass-Flörl, M Lackner (2015) Etest cannot be recommended for In Vitro susceptibility testing of mucorales.

- Antimicrob Agents Chemother* 59 (6):3663-3665.
- [44] J Singh, D Rimek, R Kappe (2005) In vitro susceptibility of 15 strains of zygomycetes to nine antifungal agents as determined by the NCCLS M38-A microdilution method. *Mycoses* 48 (4):246-250.
- [45] QN Sun, AW Fothergill, DI McCarthy, MG Rinaldi, JR Graybill (2002) In vitro activities of posaconazole, itraconazole, voriconazole, amphotericin B, and fluconazole against 37 clinical isolates of zygomycetes. *Antimicrob Agents Chemother* 46 (5):1581-2.
- [46] RG Vitale, GS de Hoog, P Schwarz, E Dannaoui, S Deng, M Machouart, K Voigt, WWJ van de Sande, S Dolatabadi, JF Meis, G Walther (2012) Antifungal Susceptibility and Phylogeny of Opportunistic Members of the Order Mucorales. *J Clin Microbiol* 50 (1):66-75.
- [47] A Alastruey-Izquierdo, M V Castelli, I Cuesta, O Zaragoza, A Monzón, E Mellado, JL Rodríguez-Tudela (2009) In vitro activity of antifungals against zygomycetes. *Clin Microbiol Infect* 15 (5):71-76.
- [48] E Dannaoui (2017) Antifungal resistance in mucorales. *Int J Antimicrob Agents* 50 (5):617-621.
- [49] MA Pfaller, PR Rhomberg, NP Wiederhold, C Gibas, C Sanders, H Fan, J Mele, LL Kovanda, M Castanheira (2018) In vitro activity of isavuconazole against opportunistic fungal pathogens from two mycology reference laboratories. *Antimicrob Agents Chemother* 62 (10):pii: e01230-18.
- [50] PE Verweij, GM González, NP Wiederhold, C Lass-Flörl, P Warn, M Heep, MA Ghannoum, J Guinea (2009) In vitro antifungal activity of isavuconazole against 345 mucorales isolates collected at study centers in eight countries. *J Chemother* 21 (3):272-281.
- [51] M Lackner, R Caramalho, C Lass-Flörl (2014) Laboratory diagnosis of mucormycosis: Current status and future perspectives. *Future Microbiol* 9 (5):683-695.
- [52] N V Sipsas, MN Gamaletsou, A Anastasopoulou, DP Kontoyiannis, N V Sipsas, MN Gamaletsou, A Anastasopoulou, DP Kontoyiannis (2018) Therapy of Mucormycosis. *J Fungi* 4 (3):90.
- [53] OA Cornely, A Alastruey-Izquierdo, D Arenz, SCA Chen, E Dannaoui, B Hochhegger, M Hoenigl, HE Jensen, K Lagrou, RE Lewis, SC Mellinghoff, M Mer, et al. (2019)

- Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Lancet Infect Dis* pii: S1473 (19):30312-3.
- [54] MH Miceli, CA Kauffman (2015) Isavuconazole: A New Broad-Spectrum Triazole Antifungal Agent. *Clin Infect Dis* 61 (10):1558-1565.
- [55] FM Marty, L Ostrosky-Zeichner, OA Cornely, KM Mullane, JR Perfect, GR Thompson, GJ Alangaden, JM Brown, DN Fredricks, WJ Heinz, R Herbrecht, N Klimko, et al. (2016) Isavuconazole treatment for mucormycosis: a single-arm open-label trial and case-control analysis. *Lancet Infect Dis* 16 (7):828-837.
- [56] V Nagappan, S Deresinski (2007) Reviews of anti-infective agents: posaconazole: a broad-spectrum triazole antifungal agent. *Clin Infect Dis* 45 (12):1610-1617.
- [57] DP Kontoyiannis, N Azie, B Franks, DL Horn (2014) Prospective antifungal therapy (PATH) alliance®: Focus on mucormycosis. *Mycoses* 57 (4):240-246.
- [58] B Spellberg, A Ibrahim, E Roilides, RE Lewis, O Lortholary, G Petrikos, DP Kontoyiannis, TJ Walsh (2012) Combination therapy for mucormycosis: Why, what, and how? *Clin Infect Dis* 54 (1):73-78.
- [59] T Gebremariam, NP Wiederhold, A Alqarihi, P Uppuluri, N Azie, JE Edwards, AS Ibrahim (2017) Monotherapy or combination therapy of isavuconazole and micafungin for treating murine mucormycosis. *J Antimicrob Chemother* 72 (2):462-466.
- [60] AS Ibrahim, T Gebremariam, Y Fu, JE Edwards, B Spellberg (2008) Combination echinocandin-polyene treatment of murine mucormycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 52 (4):1556-1558.
- [61] AS Ibrahim, T Gebremariam, G Luo, Y Fu, SW French, JE Edwards, B Spellberg (2011) Combination therapy of murine mucormycosis or aspergillosis with iron chelation, polyenes, and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother* 55 (4):1768-1770.
- [62] RE Lewis, R Ben-Ami, L Best, N Albert, TJ Walsh, DP Kontoyiannis (2013) Tacrolimus enhances the potency of posaconazole against *Rhizopus oryzae* in vitro and in an experimental model of mucormycosis. *J Infect Dis* 207 (5):834-841.
- [63] C Reed, R Bryant, AS Ibrahim, J Edwards, Jr., SG Filler, R Goldberg, B Spellberg

- (2008) Combination Polyene-Caspofungin Treatment of Rhino-Orbital-Cerebral Mucormycosis. *Clin Infect Dis* 47 (3):364-371.
- [64] B Spellberg, Y Fu, JE Edwards, AS Ibrahim (2005) Combination therapy with amphotericin B lipid complex and caspofungin acetate of disseminated zygomycosis in diabetic ketoacidotic mice. *Antimicrob Agents Chemother* 49 (2):830-832.
- [65] AM Sugar, XP Liu (2000) Combination antifungal therapy in treatment of murine pulmonary mucormycosis: roles of quinolones and azoles. *Antimicrob Agents Chemother* 44 (7):2004-6.
- [66] FC Odds (2003) Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother* 52 (1):1-1.
- [67] MA Ghannoum, LB Rice (1999) Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* 12 (4):501-517.
- [68] M Bard, ND Lees, T Turi, D Craft, L Cofrin, R Barbuch, C Koegel, JC Loper (1993) Sterol synthesis and viability of erg11 (cytochrome P450 lanosterol demethylase) mutations in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Lipids* 28 (11):963-7.
- [69] TC White, KA Marr, RA Bowden (1998) Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 11 (2):382-402.
- [70] D Sanglard, F Ischer, T Parkinson, D Falconer, J Bille (2003) *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 47 (8):2404-12.
- [71] D Dimster-Denk, J Rine (1996) Transcriptional regulation of a sterol-biosynthetic enzyme by sterol levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16 (8):3981-3989.
- [72] LW Parks, CD Bottema, RJ Rodriguez, TA Lewis (1985) Yeast sterols: yeast mutants as tools for the study of sterol metabolism. *Methods Enzymol* 111:333-46.
- [73] RT Lorenz, LW Parks (1992) Cloning, sequencing, and disruption of the gene encoding sterol C-14 reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Cell Biol* 11 (9):685-92.
- [74] MH Lai, M Bard, CA Pierson, JF Alexander, M Goebel, GT Carter, DR Kirsch (1994) The identification of a gene family in the *Saccharomyces cerevisiae* ergosterol biosynthesis pathway. *Gene* 140 (1):41-49.

- [75] N Jia, B Arthington-Skaggs, W Lee, CA Pierson, ND Lees, J Eckstein, R Barbuch, M Bard (2002) *Candida albicans* sterol C-14 reductase, encoded by the ERG24 gene, as a potential antifungal target site. *Antimicrob Agents Chemother* 46 (4):947-57.
- [76] M Bard, DA Bruner, CA Pierson, ND Lees, B Biermann, L Frye, C Koegel, R Barbuch (1996) Cloning and characterization of ERG25, the *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding C-4 sterol methyl oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1):186-190.
- [77] KE Aaron, CA Pierson, ND Lees, M Bard (2001) The *Candida albicans* ERG26 gene encoding the C-3 sterol dehydrogenase (C-4 decarboxylase) is essential for growth. *FEMS Yeast Res* 1 (2):93-101.
- [78] D Gachotte, SE Sen, J Eckstein, R Barbuch, M Krieger, BD Ray, M Bard (1999) Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* ERG27 gene encoding the 3-keto reductase involved in C-4 sterol demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (22):12655-60.
- [79] D Gachotte, R Barbuch, J Gaylor, E Nickel, M Bard (1998) Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* ERG26 gene encoding the C-3 sterol dehydrogenase (C-4 decarboxylase) involved in sterol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (23):13794-9.
- [80] C Mo, M Valachovic, SK Randall, JT Nickels, M Bard (2002) Protein-protein interactions among C-4 demethylation enzymes involved in yeast sterol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (15):9739-44.
- [81] CA Pierson, N Jia, C Mo, ND Lees, AM Sturm, J Eckstein, R Barbuch, M Bard (2004) Isolation, characterization, and regulation of the *Candida albicans* ERG27 gene encoding the sterol 3-keto reductase. *Med Mycol* 42 (5):461-73.
- [82] H Vanden Bossche, P Marichal, L Le Jeune, MC Coene, J Gorrens, W Cools (1993) Effects of itraconazole on cytochrome P-450-dependent sterol 14 alpha-demethylation and reduction of 3-ketosteroids in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 37 (10):2101-5.
- [83] ND Lees, B Skaggs, DR Kirsch, M Bard (1995) Cloning of the late genes in the ergosterol biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*-A review. *Lipids* 30 (3):221-226.
- [84] KL Jensen-Pergakes, MA Kennedy, ND Lees, R Barbuch, C Koegel, M Bard (1998) Sequencing, disruption, and characterization of the *Candida albicans* sterol

- methyltransferase (ERG6) gene: drug susceptibility studies in *erg6* mutants. *Antimicrob Agents Chemother* 42 (5):1160-7.
- [85] RF Gaber, DM Copple, BK Kennedy, M Vidal, M Bard (1989) The yeast gene ERG6 is required for normal membrane function but is not essential for biosynthesis of the cell-cycle-sparking sterol. *Mol Cell Biol* 9 (8):3447-3456.
- [86] WH Ashman, RJ Barbuch, CE Ulbright, HW Jarrett, M Bard (1991) Cloning and disruption of the yeast C-8 sterol isomerase gene. *Lipids* 26 (8):628-32.
- [87] JPR Keon, CS James, S Court, C Baden-Daintree, AM Bailey, RS Burden, M Bard, JA Hargreaves (1994) Isolation of the ERG2 gene, encoding sterol  $\Delta 8\Delta \rightarrow 7$  isomerase, from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* and its expression in the maize smut pathogen *Ustilago maydis*. *Curr Genet* 25 (6):531-537.
- [88] LY Young, CM Hull, J Heitman (2003) Disruption of ergosterol biosynthesis confers resistance to amphotericin B in *Candida lusitanae*. *Antimicrob Agents Chemother* 47 (9):2717-24.
- [89] E Pinjon, GP Moran, CJ Jackson, SL Kelly, D Sanglard, DC Coleman, DJ Sullivan (2003) Molecular mechanisms of itraconazole resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 47 (8):2424-37.
- [90] Y Miyazaki, A Geber, H Miyazaki, D Falconer, T Parkinson, C Hitchcock, B Grimberg, K Nyswaner, JE Bennett (1999) Cloning, sequencing, expression and allelic sequence diversity of ERG3 (C-5 sterol desaturase gene) in *Candida albicans*. *Gene* 236 (1):43-51.
- [91] A Geber, CA Hitchcock, JE Swartz, FS Pullen, KE Marsden, KJ Kwon-Chung, JE Bennett (1995) Deletion of the *Candida glabrata* ERG3 and ERG11 genes: effect on cell viability, cell growth, sterol composition, and antifungal susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 39 (12):2708-17.
- [92] BA Arthington, LG Bennett, PL Skatrud, CJ Guynn, RJ Barbuch, CE Ulbright, M Bard (1991) Cloning, disruption and sequence of the gene encoding yeast C-5 sterol desaturase. *Gene* 102 (1):39-44.
- [93] DC Lamb, S Maspahy, DE Kelly, NJ Manning, A Geber, JE Bennett, SL Kelly (1999) Purification, reconstitution, and inhibition of cytochrome P-450 sterol delta<sup>22</sup>-desaturase from the pathogenic fungus *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 43 (7):1725-8.

- [94] BA Skaggs, JF Alexander, CA Pierson, KS Schweitzer, KT Chun, C Koegel, R Barbuch, M Bard (1996) Cloning and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* C-22 sterol desaturase gene, encoding a second cytochrome P-450 involved in ergosterol biosynthesis. *Gene* 169 (1):105-109.
- [95] HM Van Den Brink, RF Van Gorcom, CA Van Den Hondel, PJ Punt (1998) Cytochrome P450 enzyme systems in fungi. *Fungal Genet Biol* 23 (1):1-17.
- [96] TC White (1997) Increased mRNA levels of ERG16, CDR, and MDR1 correlate, with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother* 41 (7):1482-1487.
- [97] Y Aoyama, Y Yoshida, Y Sonoda, Y Sato (1989) Deformylation of 32-oxo-24,25-dihydrolanosterol by the purified cytochrome P-450<sub>14DM</sub> (lanosterol 14 alpha-demethylase) from yeast evidence confirming the intermediate step of lanosterol 14 alpha-demethylation. *J Biol Chem* 264 (31):18502-5.
- [98] JM Trzaskos, RT Fischer, MF Favata (1986) Mechanistic studies of lanosterol C-32 demethylation. Conditions which promote oxysterol intermediate accumulation during the demethylation process. *J Biol Chem* 261 (36):16937-42.
- [99] E Mellado, TM Diaz-Guerra, M Cuenca-Estrella, JL Rodriguez-Tudela (2001) Identification of Two Different 14- Sterol Demethylase-Related Genes (cyp51A and cyp51B) in *Aspergillus fumigatus* and Other *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol* 39 (7):2431-2438.
- [100] C Chen, VF Kalb, TG Turi, JC Loper (1988) Primary Structure of the Cytochrome P450 Lanosterol 14 $\alpha$ -Demethylase Gene from *Candida tropicalis*. *DNA* 7 (9):617-626.
- [101] C Délye, F Laigret, MF Corio-Costet (1997) A mutation in the 14 $\alpha$ -Demethylase gene of *Uncinula necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor. *Appl Environ Microbiol* 63 (8):2966-2970.
- [102] SG Revankar, J Fu, MG Rinaldi, SL Kelly, DE Kelly, DC Lamb, SM Keller, BL Wickes (2004) Cloning and characterization of the lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (ERG11) gene in *Cryptococcus neoformans*. *Biochem Biophys Res Commun* 324 (2):719-728.
- [103] JG van Nistelrooy, JM van den Brink, JA van Kan, RF van Gorcom, MA de Waard (1996) Isolation and molecular characterisation of the gene encoding eburicol 14 alpha-demethylase (cYP51) from *Penicillium italicum*. *Mol Gen Genet* 250 (6):725-33.

- [104] Y Yoshida, Y Aoyama (1984) Yeast cytochrome P-450 catalyzing lanosterol 14  $\alpha$ -demethylation. I. Purification and spectral properties. *J Biol Chem* 259 (3):1655-60.
- [105] GM Morris, WG Richards (1991) Molecular modelling of the sterol C-14 demethylase of *Saccharomyces cerevisiae*, En: *Biochemical Society Transactions*, 19, (3)793-795.
- [106] SS Gonçalves, ACR Souza, A Chowdhary, JF Meis, AL Colombo (2016) Epidemiology and molecular mechanisms of antifungal resistance in *Candida* and *Aspergillus*. *Mycoses* 59 (4):198-219.
- [107] E Mellado, G Garcia-Effron, MJ Buitrago, L Alcazar-Fuoli, M Cuenca-Estrella, JL Rodriguez-Tudela (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 (6):2536-2538.
- [108] W Hu, S Sillaots, S Lemieux, J Davison, S Kauffman, A Breton, A Linteau, C Xin, J Bowman, J Becker, B Jiang, T Roemer (2007) Essential gene identification and drug target prioritization in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog* 3 (3):e 24.
- [109] L-J Ma, AS Ibrahim, C Skory, MG Grabherr, G Burger, M Butler, M Elias, A Idnurm, BF Lang, T Sone, A Abe, SE Calvo, et al. (2009) Genomic analysis of the basal lineage fungus *Rhizopus oryzae* reveals a whole-genome duplication. *PLoS Genet* 5 (7):e1000549.
- [110] LM Podust, TL Poulos, MR Waterman (2001) Crystal structure of cytochrome P450 14  $\alpha$ -sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 98 (6):3068-3073.
- [111] L Xiao, V Madison, AS Chau, D Loebenberg, RE Palermo, PM McNicholas (2004) Three-Dimensional Models of Wild-Type and Mutated Forms of Cytochrome P450 14 $\alpha$ -Sterol Demethylases from *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* Provide Insights into Posaconazole Binding. *Antimicrob Agents Chemother* 48 (2):568-574.
- [112] R Gollapudy, S Ajmani, SA Kulkarni (2004) Modeling and interactions of *Aspergillus fumigatus* lanosterol 14- $\alpha$  demethylase «A» with azole antifungals. *Bioorganic Med Chem* 12 (11):2937-2950.
- [113] G Garcia-Effron (2015) Point Mutations and Membrane-targeting Antifungal Resistance in *Aspergillus fumigatus* and Other Non-*Candida* Species, En: *Antifungals. From Genomics to Resistance and the Development of Novel Agents*, (Eds: AT (Institute of MUHL Coste), P (Host-PISG Vandeputte), Caister Academic Press, p. 27-

53.

- [114] E Snelders, A Karawajczyk, RJA Verhoeven, H Venselaar, G Schaftenaar, PE Verweij, WJG Melchers (2011) The structure-function relationship of the *Aspergillus fumigatus* cyp51A L98H conversion by site-directed mutagenesis: The mechanism of L98H azole resistance. *Fungal Genet Biol* 48 (11):1062-1070.
- [115] M Liu, N Zheng, D Li, H Zheng, L Zhang, H Ge, W Liu (2016) Cyp51A-based mechanism of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: Illustration by a new 3D Structural Model of *Aspergillus fumigatus* CYP51A protein. *Med Mycol* 54 (4):400-408.
- [116] A Nash, J Rhodes (2018) Simulations of CYP51A from *Aspergillus fumigatus* in a model bilayer provide insights into triazole drug resistance. *Med Mycol* 56 (3):361-373.
- [117] DJ Sheehan, CA Hitchcock, CM Sibley (1999) Current and emerging azole antifungal agents. *Clin Microbiol Rev* 12 (1):40-79.
- [118] DW Denning, P Ribaud, N Milpied, D Caillot, R Herbrecht, E Thiel, A Haas, M Ruhnke, H Lode (2002) Efficacy and Safety of Voriconazole in the Treatment of Acute Invasive Aspergillosis. *Clin Infect Dis* 34 (5):563-571.
- [119] J Maertens, W Meersseman, P Van Bleyenbergh (2009) New therapies for fungal pneumonia. *Curr Opin Infect Dis* 22 (2):183-190.
- [120] H Sanati, P Belanger, R Fratti, M Ghannoum (1997) A new triazole, voriconazole (UK-109,496), blocks sterol biosynthesis in *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother* 41 (11):2492-2496.
- [121] A Dudakova, B Spiess, M Tangwattanachuleeporn, C Sasse, D Buchheidt, M Weig, U Groß, O Bader (2017) Molecular tools for the detection and deduction of azole antifungal drug resistance phenotypes in *Aspergillus* species. *Clin Microbiol Rev* 30 (4):1065-1091.
- [122] H Ji, W Zhang, Y Zhou, M Zhang, J Zhu, Y Song, J Lü, J Zhu (2000) A three-dimensional model of lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase of *Candida albicans* and its interaction with azole antifungals. *J Med Chem* 43 (13):2493-2505.
- [123] Y Yoshida, Y Aoyama (1990) Stereoselective interaction of an azole antifungal agent with its target, lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (cytochrome p-45014dm): A model study

- with stereoisomers of triadimenol and purified cytochrome p-45014dm from yeast. *Chirality* 2 (1):10-15.
- [124] T Fukuoka, DA Johnston, CA Winslow, MJ de Groot, C Burt, CA Hitchcock, SG Filler (2003) Genetic basis for differential activities of fluconazole and voriconazole against *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother* 47 (4):1213-9.
- [125] JH Rex, MA Pfaller, JN Galgiani, MS Bartlett, A Espinel-Ingroff, MA Ghannoum, M Lancaster, FC Odds, MG Rinaldi, TJ Walsh, AL Barry (1997) Development of Interpretive Breakpoints for Antifungal Susceptibility Testing: Conceptual Framework and Analysis of In Vitro-In Vivo Correlation Data for Fluconazole, Itraconazole, and *Candida* Infections. *Clin Infect Dis* 24 (2):235-247.
- [126] TM Diaz-Guerra, E Mellado, M Cuenca-Estrella, JL Rodriguez-Tudela (2003) A point mutation in the 14 $\alpha$ -sterol demethylase gene *cyp51A* contributes to itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 47 (3):1120-1124.
- [127] PA Mann, RM Parmegiani, S-Q Wei, CA Mendrick, X Li, D Loebenberg, B DiDomenico, RS Hare, SS Walker, PM McNicholas (2003) Mutations in *Aspergillus fumigatus* resulting in reduced susceptibility to posaconazole appear to be restricted to a single amino acid in the cytochrome P450 14 $\alpha$ -demethylase. *Antimicrob Agents Chemother* 47 (2):577-581.
- [128] PE Verweij, DTA Te Dorsthorst, AJMM Rijs, HG De Vries-Hospers, JFGM Meis, the DIWP for I Mycoses (2002) Nationwide survey of in vitro activities of itraconazole and voriconazole against clinical *Aspergillus fumigatus* isolates cultured between 1945 and 1998. *J Clin Microbiol* 40 (7):2648-2650.
- [129] AM Nascimento, GH Goldman, S Park, SAE Marras, G Delmas, U Oza, K Lolans, MN Dudley, PA Mann, DS Perlin (2003) Multiple resistance mechanisms among *Aspergillus fumigatus* mutants with high-level resistance to itraconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 47 (5):1719-1726.
- [130] A Gomez-Lopez, G Garcia-Effron, E Mellado, A Monzon, JL Rodriguez-Tudela, M Cuenca-Estrella (2003) In vitro activities of three licensed antifungal agents against spanish clinical isolates of *Aspergillus* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 47 (10):3085-8.
- [131] F Leonardelli, L Theill, ME Nardin, D Macedo, C Dudiuk, E Mendez, S Gamarra, G Garcia-Effron (2017) First itraconazole resistant *Aspergillus fumigatus* clinical isolate

- harbouring a G54E substitution in Cyp51Ap in South America. *Rev Iberoam Micol* 34 (1):46-48.
- [132] G Isla, F Leonardelli, IN Tiraboschi, N Refojo, A Hevia, W Vivot, W Szusz, SB Córdoba, G García-Effron (2018) First clinical isolation of an azole-resistant *Aspergillus fumigatus* isolate harboring a TR46 Y121F T289A mutation in South America. *Antimicrob Agents Chemother* 62 (10):pii: e00872-18.
- [133] T Pelaez, P Gijón, E Bunsow, E Bouza, W Sánchez-Yebra, M Valerio, B Gama, M Cuenca-Estrella, E Mellado (2012) Resistance to voriconazole due to a G448S substitution in *Aspergillus fumigatus* in a patient with cerebral aspergillosis. *J Clin Microbiol* 50 (7):2531-2534.
- [134] J Mosquera, DW Denning (2002) Azole cross-resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 46 (2):556-7.
- [135] H Hof (2001) Critical annotations to the use of azole antifungals for plant protection. *Antimicrob Agents Chemother* 45 (11):2987-2990.
- [136] E Snelders, SMT Camps, A Karawajczyk, G Schaftenaar, GHJ Kema, HA van der Lee, CH Klaassen, WJG Melchers, PE Verweij (2012) Triazole fungicides can induce cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One* 7 (3):e31801.
- [137] DP Kontoyiannis (2002) Why Prior Fluconazole Use Is Associated with an Increased Risk of Invasive Mold Infections in Immunosuppressed Hosts: An Alternative Hypothesis. *Clin Infect Dis* 34 (9):1281-1283.
- [138] HM Wood, MJ Dickinson, JA Lucas, PS Dyer (2001) Cloning of the *CYP51* gene from the eyespot pathogen *Tapesia yallundae* indicates that resistance to the DMI fungicide prochloraz is not related to sequence changes in the gene encoding the target site enzyme. *FEMS Microbiol Lett* 196 (2):183-187.
- [139] PS Dyer, J Hansen, Delaney, JA Lucas (2000) Genetic control of resistance to the sterol 14alpha-demethylase inhibitor fungicide prochloraz in the cereal eyespot pathogen *Tapesia yallundae*. *Appl Environ Microbiol* 66 (11):4599-604.
- [140] D Sanglard, F Ischer, M Monod, J Bille (1997) Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: Characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology* 143 (2):405-416.

- [141] AT Coste, M Karababa, F Ischer, J Bille, D Sanglard (2004) TAC1, transcriptional activator of CDR genes, is a new transcription factor involved in the regulation of *Candida albicans* ABC transporters CDR1 and CDR2. *Eukaryot Cell* 3 (6):1639-1652.
- [142] DP Kontoyiannis, RE Lewis (2002) Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet* 359 (9312):1135-1144.
- [143] S Perea, JL López-Ribot, BL Wickes, WR Kirkpatrick, OP Dib, SP Bachmann, SM Keller, M Martinez, TF Patterson (2002) Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 46 (6):1695-703.
- [144] E Lamping, A Ranchod, K Nakamura, JDA Tyndall, K Niimi, AR Holmes, M Niimi, RD Cannon (2009) Abc1p is a multidrug efflux transporter that tips the balance in favor of innate azole resistance in *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother* 53 (2):354-369.
- [145] M Karababa, AT Coste, B Rognon, J Bille, D Sanglard (2004) Comparison of gene expression profiles of *Candida albicans* azole-resistant clinical isolates and laboratory strains exposed to drugs inducing multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother* 48 (8):3064-3079.
- [146] SK Katiyar, TD Edlind (2001) Identification and expression of multidrug resistance-related ABC transporter genes in *Candida krusei*. *Med Mycol* 39 (1):109-116.
- [147] E Pinjon, CJ Jackson, SL Kelly, D Sanglard, G Moran, DC Coleman, DJ Sullivan (2005) Reduced azole susceptibility in genotype 3 *Candida dubliniensis* isolates associated with increased CaCDR1 and CdCDR2 expression. *Antimicrob Agents Chemother* 49 (4):1312-1318.
- [148] B Posteraro, M Sanguinetti, D Sanglard, M La Sorda, S Boccia, L Romano, G Morace, G Fadda (2003) Identification and characterization of a *Cryptococcus neoformans* ATP binding cassette (ABC) transporter-encoding gene, CnAFR1, involved in the resistance to fluconazole. *Mol Microbiol* 47 (2):357-371.
- [149] D Sanglard, F Ischer, J Bille (2001) Role of ATP-binding-cassette transporter genes in high-frequency acquisition of resistance to azole antifungals in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 45 (4):1174-1183.
- [150] D Sanglard, F Ischer, D Calabrese, PA Majcherczyk, J Bille (1999) The ATP binding

- cassette transporter gene CgCDR1 from *Candida glabrata* is involved in the resistance of clinical isolates to azole antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 43 (11):2753-2765.
- [151] D Sanglard, F Ischer, M Monod, J Bille (1996) Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 40 (10):2300-2305.
- [152] RD Cannon, E Lamping, AR Holmes, K Niimi, P V Baret, M V Keniya, K Tanabe, M Niimi, A Goffeau, BC Monk (2009) Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 22 (2):291-321.
- [153] JW Slaven, MJ Anderson, D Sanglard, GK Dixon, J Bille, IS Roberts, DW Denning (2002) Increased expression of a novel *Aspergillus fumigatus* ABC transporter gene, atrF, in the presence of itraconazole in an itraconazole resistant clinical isolate. *Fungal Genet Biol* 36 (3):199-206.
- [154] K Angermayr, W Parson, G Stöffler, H Haas (1999) Expression of atrC - Encoding a novel member of the ATP binding cassette transporter family in *Aspergillus nidulans* - is sensitive to cycloheximide. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1453 (2):304-310.
- [155] AC Andrade, G Del Sorbo, JGM Van Nistelrooy, MA De Waard (2000) The ABC transporter AtrB from *Aspergillus nidulans* mediates resistance to all major classes of fungicides and some natural toxic compounds. *Microbiology* 146 (8):1987-1997.
- [156] D Sanglard, FC Odds (2002) Resistance of *Candida* species to antifungal agents: Molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* 2 (2):73-85.
- [157] E Mellado, G Garcia-Effron, L Alcázar-Fuoli, WJG Melchers, PE Verweij, M Cuenca-Estrella, JL Rodríguez-Tudela (2007) A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of cyp51A alterations. *Antimicrob Agents Chemother* 51 (6):1897-1904.
- [158] F Leonardelli, D Macedo, C Dudiuk, MS Cabeza, S Gamarra, G Garcia-Effron (2016) *Aspergillus fumigatus* intrinsic fluconazole resistance is due to the naturally occurring T301I substitution in Cyp51Ap. *Antimicrob Agents Chemother* 60 (9):5420-6.
- [159] DW Denning, K Venkateswarlu, KL Oakley, MJ Anderson, NJ Manning, DA Stevens, DW Warnock, SL Kelly (1997) Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 41 (6):1364-1368.

- [160] AM Albarrag, MJ Anderson, SJ Howard, GD Robson, PA Warn, D Sanglard, DW Denning (2011) Interrogation of Related Clinical Pan-Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Strains: G138C, Y431C, and G434C Single Nucleotide Polymorphisms in *cyp51A*, Upregulation of *cyp51A*, and Integration and Activation of Transposon *Atf1* in the *cyp51A* Promoter. *Antimicrob Agents Chemother* 55 (11):5113-5121.
- [161] G Garcia-Effron, A Dilger, L Alcazar-Fuoli, S Park, E Mellado, DS Perlin (2008) Rapid detection of triazole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 46 (4):1200-1206.
- [162] E Mellado, G Garcia-Effron, L Alcazar-Fuoli, M Cuenca-Estrella, JL Rodriguez-Tudela (2004) Substitutions at methionine 220 in the 14 $\alpha$ -sterol demethylase (Cyp51A) of *Aspergillus fumigatus* are responsible for resistance in vitro to azole antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 48 (7):2747-2750.
- [163] NG Almyroudis, DA Sutton, AW Fothergill, MG Rinaldi, S Kusne (2007) In vitro susceptibilities of 217 clinical isolates of zygomycetes to conventional and new antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 51 (7):2587-2590.
- [164] MC Arendrup (2014) Update on antifungal resistance in *Aspergillus* and *Candida*. *Clin Microbiol Infect* 20 (6):42-48.
- [165] G Garcia-Effron, DP Kontoyiannis, RE Lewis, DS Perlin (2008) Caspofungin-resistant *Candida tropicalis* strains causing breakthrough fungemia in patients at high risk for hematologic malignancies. *Antimicrob Agents Chemother* 52 (11):4181-4183.
- [166] L Gregson, J Goodwin, A Johnson, L McEntee, CB Moore, M Richardson, WW Hope, SJ Howard (2013) In vitro susceptibility of *Aspergillus fumigatus* to isavuconazole: Correlation with itraconazole, voriconazole, and posaconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 57 (11):5778-5780.
- [167] L-J Ma, AS Ibrahim, C Skory, MG Grabherr, G Burger (2009) Genomic Analysis of the Basal Lineage Fungus *Rhizopus oryzae* Reveals a Whole-Genome Duplication. *PLoS Genet* 5 (7):1000549.
- [168] A Chowdhary, C Sharma, JF Meis (2017) Azole-resistant aspergillosis: Epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. *J Infect Dis* 216:S436-S444.
- [169] J Lescar, I Meyer, K Akshita, K Srinivasaraghavan, C Verma, M Palous, D Mazier, A Datry, A Fekkar (2017) *Aspergillus fumigatus* harbouring the sole Y121F mutation shows decreased susceptibility to voriconazole but maintained susceptibility to

- itraconazole and posaconazole (August 2014):3244-3247.
- [170] E Snelders, SMT Camps, A Karawajczyk, AJMM Rijs, J Zoll, PE Verweij, WJG Melchers (2015) Genotype-phenotype complexity of the TR46/Y121F/T289A cyp51A azole resistance mechanism in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol* 82:129-135.
- [171] E Vermeulen, J Maertens, H Schoemans, K Lagrou (2012) Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* due to TR46/Y121F/T289A mutation emerging in Belgium, July 2012. *Euro Surveill* 17 (48):pii: 20326.
- [172] A Chowdhary, C Sharma, S Kathuria, F Hagen, JF Meis (2014) Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* with the environmental TR46/Y121F/T289A mutation in India. *J Antimicrob Chemother* 69 (2):555-557.
- [173] JWM van der Linden, SMT Camps, GA Kampinga, JPA Arends, YJ Debets-Ossenkopp, PJA Haas, BJA Rijnders, EJ Kuijper, FH van Tiel, J Varga, A Karawajczyk, J Zoll, et al. (2013) Aspergillosis due to Voriconazole Highly Resistant *Aspergillus fumigatus* and Recovery of Genetically Related Resistant Isolates From Domiciles. *Clin Infect Dis* 57 (4):513-520.
- [174] T Pelaez, MC Monteiro, R Garcia-Rubio, E Bouza, A Gomez-Lopez, E Mellado (2015) First detection of *Aspergillus fumigatus* azole-resistant strain due to Cyp51A TR46/Y121F/T289A in an azole-naive patient in Spain. *New Microbes New Infect* 6:33-34.
- [175] I Montesinos, M Dodemont, K Lagrou, F Jacobs, I Etienne, O Denis (2014) New case of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* due to TR46/Y121F/T289A mutation in Belgium. *J Antimicrob Chemother* 69 (12):3439-3440.
- [176] J van Ingen, HA van der Lee, TAJ Rijs, J Zoll, T Leenstra, WJG Melchers, PE Verweij (2015) Azole, polyene and echinocandin MIC distributions for wild-type, TR34/L98H and TR46/Y121F/T289A *Aspergillus fumigatus* isolates in the Netherlands. *J Antimicrob Chemother* 70 (1):178-181.
- [177] DP Kontoyiannis, N Sagar, KD Hirschi (1999) Overexpression of Erg11p by the regulatable GAL1 promoter confers fluconazole resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother* 43 (11):2798-800.
- [178] A Lupetti, R Danesi, M Campa, M Del Tacca, S Kelly (2002) Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol Med* 8 (2):76-81.

- [179] H Hamamoto, K Hasegawa, R Nakaune, YJ Lee, Y Makizumi, K Akutsu, T Hibi (2000) Tandem repeat of a transcriptional enhancer upstream of the sterol 14 $\alpha$ -demethylase gene (CYP51) in *Penicillium digitatum*. *Appl Environ Microbiol* 66 (8):3421-3426.
- [180] N Osherov (2001) Resistance to itraconazole in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus* is conferred by extra copies of the A. nidulans P-450 14 $\alpha$ -demethylase gene, pdmA. *J Antimicrob Chemother* 48 (1):75-81.
- [181] HJM Van Den Brink, HJGM Van Nistelrooy, MA De Waard, CAMJJ Van Den Hondel, RFM Van Gorcom (1996) Increased resistance to 14 $\alpha$ -demethylase inhibitors (DMIs) in *Aspergillus niger* by coexpression of the *Penicillium italicum* eburicol 14 $\alpha$ -demethylase (cyp51) and the A. niger cytochrome P450 reductase (cprA) genes. *J Biotechnol* 49 (1-3):13-18.
- [182] P Le Pape, RA Lavergne, F Morio, C Alvarez-Moreno (2016) Multiple fungicide-driven alterations in azole-resistant *Aspergillus fumigatus*, Colombia, 2015. *Emerg Infect Dis* 22 (1):156-157.
- [183] CJ Hodiament, KM Dolman, IJM Ten berge, WJG Melchers, PE Verweij, D Pajkrt (2009) Multiple-azole-resistant *Aspergillus fumigatus* osteomyelitis in a patient with chronic granulomatous disease successfully treated with long-term oral posaconazole and surgery. *Med Mycol* 47 (2):217-220.
- [184] A Coste, A Selmecki, A Forche, D Diogo, ME Bougnoux, C D'Enfert, J Berman, D Sanglard (2007) Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. *Eukaryot Cell* 6 (10):1889-1904.
- [185] A Selmecki, M Gerami-Nejad, C Paulson, A Forche, J Berman (2008) An isochromosome confers drug resistance in vivo by amplification of two genes, ERG11 and TAC1. *Mol Microbiol* 68 (3):624-641.
- [186] S Dolatabadi, G Walther, AHG Gerrits van den Ende, GS de Hoog (2014) Diversity and delimitation of *Rhizopus microsporus*. *Fungal Divers* 64 (1):145-163.
- [187] J Sambrook, EF Fritsch, T Maniatis (1989) Molecular cloning : a laboratory manual. 2.<sup>a</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- [188] DW Holden (1994) DNA mini prep method for *Aspergillus fumigatus* (and other filamentous fungi). New York: Molecular biology of pathogenic fungi, a laboratory manual. Telos Press.

- [189] TD Edlind, KW Henry, J-P Vermitsky, MP Edlind, S Raj, SK Katiyar (2005) Promoter-dependent disruption of genes: simple, rapid, and specific PCR-based method with application to three different yeast. *Curr Genet* 48 (2):117-125.
- [190] RM Horton, HD Hunt, SN Ho, JK Pullen, LR Pease (1989) Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* 77 (1):61-68.
- [191] TD Schmittgen, KJ Livak (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3 (6):1101-8.
- [192] KJ Livak, TD Schmittgen (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* 25 (4):402-8.
- [193] E Sionov, H Lee, YC Chang, KJ Kwon-Chung (2010) *Cryptococcus neoformans* Overcomes Stress of Azole Drugs by Formation of Disomy in Specific Multiple Chromosomes. *PLoS Pathog* 6 (4):e1000848.
- [194] E Sionov, YC Chang, KJ Kwon-Chung (2013) Azole heteroresistance in *Cryptococcus neoformans*: Emergence of resistant clones with chromosomal disomy in the mouse brain during fluconazole treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 57 (10):5127-5130.
- [195] D Cullen, SA Leong, LJ Wilson, DJ Henner (1987) Transformation of *Aspergillus nidulans* with the hygromycin-resistance gene, hph. *Gene* 57 (1):21-26.
- [196] DW Denning, SA Radford, KL Oakley, L Hall, EM Johnson, DW Warnock (1997) Correlation between in-vitro susceptibility testing to itraconazole and in-vivo outcome of *Aspergillus fumigatus* Infection. *J Antimicrob Chemother* 40 (3):401-414.
- [197] JL Rodriguez-Tudela, E Chryssanthou, E Petrikkou, J Mosquera, DW Denning, M Cuenca-Estrella (2003) Interlaboratory evaluation of hematocytometer method of inoculum preparation for testing antifungal susceptibilities of filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 41 (11):5236-7.
- [198] E Petrikkou, JL Rodri, A Gómez, A Molleja, M Cuenca-estrella, AN. Molleja, E Mellado (2001) Inoculum Standardization for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi Pathogenic for Humans Inoculum Standardization for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi Pathogenic for Humans. *J Clin Microbiol* 39 (4):1345-1347.
- [199] Clinical and Laboratory Standards Institute (2010) M51-A Method for Antifungal Disk

Diffusion Susceptibility Testing of Nondermatophyte Filamentous Fungi; Approved Guideline, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

- [200] MD Johnson, C Macdougall, L Ostrosky-zeichner, JR Perfect, JH Rex (2004) MINIREVIEW Combination Antifungal Therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 48 (3):693-715.
- [201] R Ben-Ami, G Garcia-Effron, RE Lewis, S Gamarra, K Leventakos, DS Perlin, DP Kontoyiannis (2011) Fitness and virulence costs of *Candida albicans* FKS1 hot spot mutations associated with echinocandin resistance. *J Infect Dis* 204 (4):626-635.
- [202] S Gago, R García-Rodas, I Cuesta, E Mellado, A Alastruey-Izquierdo (2014) *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* virulence in the non-conventional host *Galleria mellonella*. *Virulence* 5 (2):278-285.
- [203] R García-Rodas, A Casadevall, JL Rodríguez-Tudela, M Cuenca-Estrella, O Zaragoza (2011) *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement and cellular gigantism during *Galleria mellonella* infection. *PLoS One* 6 (9):e24485.
- [204] AC Mesa-Arango, A Forastiero, L Bernal-Martínez, M Cuenca-Estrella, E Mellado, O Zaragoza (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 (5):461-472.
- [205] C Rueda, M Cuenca-Estrella, O Zaragoza (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 (2):1071-1083.
- [206] L Scorzoni, MP de Lucas, AC Mesa-Arango, AM Fusco-Almeida, E Lozano, M Cuenca-Estrella, MJ Mendes-Giannini, O Zaragoza (2013) Antifungal Efficacy during *Candida krusei* Infection in Non-Conventional Models Correlates with the Yeast In Vitro Susceptibility Profile. *PLoS One* 8 (3):e60047.
- [207] RE Lewis (2011) Current concepts in antifungal pharmacology. *Mayo Clin Proc* 86 (8):805-817.
- [208] W Kloezen, F Parel, R Brüggemann, K Asouit, M Helvert-van Poppel, A Fahal, J Mouton, W van de Sande (2018) Amphotericin B and terbinafine but not the azoles prolong survival in *Galleria mellonella* larvae infected with *Madurella mycetomatis*. *Med Mycol* 56 (4):469-478.

- [209] I Ruiz-Camps, I Jarque (2014) Enfermedad fúngica invasora por hongos filamentosos en pacientes hematológicos. *Rev Iberoam Micol* 31 (4):249-254.
- [210] ME da Silva Ferreira, MRVZ Kress, M Savoldi, MHS Goldman, A Härtl, T Heinekamp, AA Brakhage, GH Goldman (2006) The akuB(KU80) mutant deficient for nonhomologous end joining is a powerful tool for analyzing pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell* 5 (1):207-211.
- [211] J Afeltra, E Dannaoui, JFGM Meis, JL Rodriguez-Tudela, PE Verweij (2002) In vitro synergistic interaction between amphotericin B and pentamidine against *Scedosporium prolificans*. *Antimicrob Agents Chemother* 46 (10):3323-6.
- [212] J Afeltra, JFGM Meis, RG Vitale, JW Mouton, PE Verweij, E Eurofung Network (2002) In vitro activities of pentamidine, pyrimethamine, trimethoprim, and sulfonamides against *Aspergillus* species. *Antimicrob Agents Chemother* 46 (6):2029-2031.
- [213] J Afeltra, PE Verweij (2003) Antifungal Activity of Nonantifungal Drugs. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 22 (7):397-407.
- [214] J Afeltra, RG Vitale, JW Mouton, PE Verweij (2004) Potent synergistic in vitro interaction between nonantimicrobial membrane-active compounds and itraconazole against clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* resistant to itraconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 48 (4):1335-1343.
- [215] RG Vitale, J Afeltra, E Dannaoui (2005) Antifungal Combinations, En: *Antifungal Agents*, 118, New Jersey: Humana Press, p. 143-152.
- [216] RG Vitale, J Afeltra, GS de Hoog, AJ Rijs, PE Verweij (2003) In vitro activity of amphotericin B and itraconazole in combination with flucytosine, sulfadiazine and quinolones against *Exophiala spinifera*. *J Antimicrob Chemother* 51 (5):1297-1300.
- [217] RG Vitale, J Afeltra, JFGM Meis, PE Verweij (2007) Activity and post antifungal effect of chlorpromazine and trifluoperazine against *Aspergillus*, *Scedosporium* and zygomycetes. *Mycoses* 50 (4):270-276.
- [218] AM Tortorano, M Richardson, E Roilides, A van Diepeningen, M Caira, P Munoz, E Johnson, J Meletiadis, Z-D Pana, M Lackner, P Verweij, T Freiburger, et al. (2014) ESCMID and ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. and others. *Clin Microbiol Infect* 20 (3):27-46.

- [219] FM Marty, L Ostrosky-Zeichner, OA Cornely, KM Mullane, JR Perfect, GR Thompson, GJ Alangaden, JM Brown, DN Fredricks, WJ Heinz, R Herbrecht, N Klimko, et al. (2016) Isavuconazole treatment for mucormycosis: A single-arm open-label trial and case-control analysis. *Lancet Infect Dis* 16 (7):828-837.
- [220] A Chowdhary, C Sharma, F Hagen, JF Meis (2014) Exploring azole antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus* with special reference to resistance mechanisms. *Future Microbiol* 9 (5):697-711.
- [221] ME Bosco-Borgeat, M Mazza, CG Taverna, S Córdoba, OA Murisengo, W Vivot, G Davel (2016) Sustitución aminoacídica en la enzima lanosterol 14  $\alpha$ -demetilasa de *Cryptococcus neoformans* involucrada en la resistencia al fluconazol de aislamientos clínicos. *Rev Argent Microbiol* 48 (2):137-142.
- [222] RH Jensen (2016) Resistance in human pathogenic yeasts and filamentous fungi: prevalence, underlying molecular mechanisms and link to the use of antifungals in humans and the environment. *Dan Med J* 63 (10):pii: B5288.
- [223] C Sharma, A Chowdhary (2017) Molecular bases of antifungal resistance in filamentous fungi. *Int J Antimicrob Agents* 50 (5):607-616.
- [224] S Altamirano, D Fang, C Simmons, S Sridhar, P Wu, K Sanyal, L Kozubowski (2017) Fluconazole-Induced Ploidy Change in *Cryptococcus neoformans* Results from the Uncoupling of Cell Growth and Nuclear Division. *mSphere* 2 (3):pii: e00205-17.
- [225] RW Bastos, HCS Carneiro, LVN Oliveira, KM Rocha, GJC Freitas, MC Costa, TFF Magalhães, VSD Carvalho, CE Rocha, GF Ferreira, TA Paixão, F Moyrand, et al. (2018) Environmental triazole induces cross-resistance to clinical drugs and affects morphophysiology and virulence of *Cryptococcus gattii* and *C. neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 62 (1):pii: e01179-17.
- [226] E Sionov, YC Chang, HM Garraffo, MA Dolan, MA Ghannoum, KJ Kwon-Chung (2012) Identification of a *Cryptococcus neoformans* cytochrome P450 lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (Erg11) residue critical for differential susceptibility between fluconazole/voriconazole and itraconazole/posaconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 56 (3):1162-1169.
- [227] ML Yang, J Uhrig, K Vu, A Singapuri, M Dennis, A Gelli, GR Thompson (2016) Fluconazole susceptibility in *Cryptococcus gattii* is dependent on the ABC transporter Pdr11. *Antimicrob Agents Chemother* 60 (3):1202-1207.

- [228] C Skory (2002) Homologous recombination and double-strand break repair in the transformation of *Rhizopus oryzae*. *Mol Genet Genomics* 268 (3):397-406.
- [229] CD Skory (2005) Inhibition of non-homologous end joining and integration of DNA upon transformation of *Rhizopus oryzae*. *Mol Genet Genomics* 274 (4):373-383.
- [230] AS Ibrahim, T Gebremariam, L Lin, G Luo, MI Husseiny, CD Skory, Y Fu, SW French, JE Edwards, B Spellberg (2010) The high affinity iron permease is a key virulence factor required for *Rhizopus oryzae* pathogenesis. *Mol Microbiol* 77 (3):587-604.
- [231] AS Chau, G Chen, PM McNicholas, PA Mann (2006) Molecular basis for enhanced activity of posaconazole against *Absidia corymbifera* and *Rhizopus oryzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 50 (11):3917-3919.
- [232] M Kudo, M Ohi, Y Aoyama, Y Nitahara, S-K Chung, Y Yoshida (2005) Effects of Y132H and F145L Substitutions on the Activity, Azole Resistance and Spectral Properties of *Candida albicans* Sterol 14-Demethylase P450 (CYP51): A Live Example Showing the Selection of Altered P450 through Interaction with Environmental Compounds. *J Biochem* 137 (5):625-632.
- [233] LJ Wheat (2006) Activity of newer triazoles against *Histoplasma capsulatum* from patients with AIDS who failed fluconazole. *J Antimicrob Chemother* 57 (6):1235-1239.
- [234] R Caramalho, JDA Tyndall, BC Monk, T Larentis, C Lass-Flörl, M Lackner (2017) Intrinsic short-Tailed azole resistance in mucormycetes is due to an evolutionary conserved aminoacid substitution of the lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase. *Sci Rep* 7 (1):3-12.
- [235] B Spellberg, J Edwards, A Ibrahim (2005) Novel Perspectives on Mucormycosis: Pathophysiology, Presentation, and Management. *Clin Microbiol Rev* 18 (3):556-569.
- [236] B Spellberg, AS Ibrahim (2010) Recent advances in the treatment of mucormycosis. *Curr Infect Dis Rep* 12 (6):423-429.
- [237] B Gleissner, A Schilling, I Anagnostopolous, I Siehl, E Thiel (2004) Improved outcome of zygomycosis in patients with hematological diseases? *Leuk Lymphoma* 45 (7):1351-1360.
- [238] A Skiada, F Lanternier, AH Groll, L Pagano, S Zimmerli, R Herbrecht, O Lortholary, GL Petrikos (2013) Diagnosis and treatment of mucormycosis in patients with hematological malignancies: Guidelines from the 3rd European Conference on

- Infections in Leukemia (ECIL 3). *Haematologica* 98 (4):492-504.
- [239] AS Ibrahim, T Gebremariam, Y Fu, JE Edwards, B Spellberg, B Spellberg (2008) Combination echinocandin-polyene treatment of murine mucormycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 52 (4):1556-1558.
- [240] AS Ibrahim, JC Bowman, V Avanesian, K Brown, B Spellberg, JE Edwards, CM Douglas, CM Douglas (2005) Caspofungin inhibits *Rhizopus oryzae* 1,3-beta-D-glucan synthase, lowers burden in brain measured by quantitative PCR, and improves survival at a low but not a high dose during murine disseminated zygomycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 49 (2):721-727.
- [241] SJ Taj-Aldeen, MN Gamaletsou, B Rammaert, N V. Sipsas, V Zeller, E Roilides, DP Kontoyiannis, M Henry, V Petraitis, B Moriyama, DW Denning, O Lortholary, et al. (2017) Bone and joint infections caused by mucormycetes: A challenging osteoarticular mycosis of the twenty-first century. *Med Mycol* 55 (7):691-704.
- [242] Q Favre-Godal, S Dorsaz, EF Queiroz, C Conan, L Marcourt, BPE Wardojo, F Voinesco, A Buchwalder, K Gindro, D Sanglard, JL Wolfender (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.
- [243] K Kaerger, VU Schwartz, S Dolatabadi, I Nyilasi, SA Kovács, U Binder, T Papp, S de Hoog, ID Jacobsen, K Voigt (2015) Adaptation to thermotolerance in *Rhizopus* coincides with virulence as revealed by avian and invertebrate infection models, phylogeny, physiological and metabolic flexibility. *Virulence* 6 (4):395-403.
- [244] S Gago, C Serrano, A Alastruey-Izquierdo, I Cuesta, E Martín-Mazuelos, AI Aller, A Gómez-López, E Mellado (2017) Molecular identification, antifungal resistance and virulence of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus deneoformans* isolated in Seville, Spain. *Mycoses* 60 (1):40-50.
- [245] L Alcazar-Fuoli, M Buitrago, A Gomez-Lopez, E Mellado (2015) An alternative host model of a mixed fungal infection by azole susceptible and resistant *Aspergillus* spp strains. *Virulence* 6 (4):376-384.
- [246] A Forastiero, L Bernal-Martínez, E Mellado, E Cendejas, A Gomez-Lopez (2015) In vivo efficacy of voriconazole and posaconazole therapy in a novel invertebrate model of *Aspergillus fumigatus* infection. *Int J Antimicrob Agents* 46 (5):511-517.

- [247] S Gamarra, EMF Rocha, Y-Q Zhang, S Park, R Rao, DS Perlin (2010) Mechanism of the synergistic effect of amiodarone and fluconazole in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 54 (5):1753-1761.
- [248] G Garcia-Effron, E Mellado, A Gomez-Lopez, L Alcazar-Fuoli, M Cuenca-Estrella, JL Rodriguez-Tudela (2005) Differences in interactions between azole drugs related to modifications in the 14-alpha sterol demethylase gene (*cyp51A*) of *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 49 (5):2119-2121.
- [249] AP Bellanger, ND Albert, RE Lewis, TJ Walsh, DP Kontoyiannis (2015) Effect of preexposure to triazoles on susceptibility and virulence of *Rhizopus oryzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 59 (12):7830-7832.
- [250] DP Kontoyiannis, MS Lionakis, RE Lewis, G Chamilos, M Healy, C Perego, A Safdar, H Kantarjian, R Champlin, TJ Walsh, II Raad (2005) Zygomycosis in a Tertiary-Care Cancer Center in the Era of *Aspergillus*- Active Antifungal Therapy: A Case-Control Observational Study of 27 Recent Cases . *J Infect Dis* 191 (8):1350-1360.
- [251] FM Marty, LA Cosimi, LR Baden (2004) Breakthrough Zygomycosis after Voriconazole Treatment in Recipients of Hematopoietic Stem-Cell Transplants [7]. *N Engl J Med* 350 (9):950-952.
- [252] GT Siwek, KJ Dodgson, M-S de Margarida, LA Bartelt, SB Kilborn, PL Hoth, DJ Diekema, MA Pfaller (2004) Invasive Zygomycosis in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients Receiving Voriconazole Prophylaxis. *Clin Infect Dis* 39 (4):584-587.
- [253] S Arikan, M Lozano-Chiu, V Paetznick, JH Rex (2002) In vitro synergy of caspofungin and amphotericin B against *Aspergillus* and *Fusarium* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 46 (1):245-7.
- [254] SP Franzot, A Casadevall (1997) Pneumocandin L-743,872 enhances the activities of amphotericin B and fluconazole against *Cryptococcus neoformans* in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 41 (2):331-6.
- [255] E Dannaoui, J Afeltra, JFGM Meis, PE Verweij, E Roilides, N Maglaveras, T Abrahamsen, P Gaustad, DW Denning, JL Rodriguez-Tudela, G Petrikos (2002) In vitro susceptibilities of zygomycetes to combinations of antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 46 (8):2708-2711.
- [256] E Maurer, C Hörtnagl, M Lackner, D Grässle, V Naschberger, P Moser, E Segal, M

Semis, C Lass-Flörl, U Binder (2019) *Galleria mellonella* as a model system to study virulence potential of mucormycetes and evaluation of antifungal treatment. *Med Mycol* 57 (3):351-362.