



14 ALFA ESTEROL DEMETILASA DE *RHIZOPUS ARRHIZUS* (SYN. *RHIZOPUS ORYZAE*): PARTICIPACIÓN EN LA RESISTENCIA NATURAL A VORICONAZOL

Daiana Macedo

Doctorado en Ciencias Biológicas

Director: Dr. Guillermo García-Effron

Lugar de realización: Laboratorio de Micología y Diagnóstico Molecular, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral

Fecha de la defensa: 17 de marzo de 2020

daiana_macedo@hotmail.com

Resumen

Rhizopus oryzae es el principal agente causal de la mucormicosis, una infección fúngica angioinvasiva, de rápida progresión con alta morbilidad y mortalidad asociada. Actualmente, no existe un tratamiento totalmente efectivo para estas micosis, debido 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). Los antifúngicos azólicos actúan inhibiendo la síntesis de ergosterol mediante interacción con las enzimas 14 alfa esterol demetilasa, codificadas en hongos filamentosos por los genes *CYP51*. Los mecanismos moleculares de resistencia de los Mucorales al VRC no se conocen; sin embargo, la resistencia a los azoles en otros hongos filamentosos se ha relacionado principalmente con 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 VRC y evaluar nuevas opciones terapéuticas.

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*.

Se obtuvo 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. Se demostró molecularmente 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 antifúngicos 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 + caspofungina (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 VRC con AMB y con CSF, 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 antifúngicas 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*.

Abstract

14 ALPHA STEROL DEMETHYLASE OF RHIZOPUS ARRHIUS (SYN. RHIZOPUS ORYZAE): PARTICIPATION IN NATURAL RESISTANCE TO VORICONAZOLE

Rhizopus oryzae is the most prevalent causative agent of mucormicosis. Currently, there is no fully effective treatment for these mycoses, since these fungi are resistant to most of the available antifungals. The toxicity of the main available treatment (amphotericin B (AMB)) is another important problem. 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.

We demonstrated that the coding sequence of the RoCYP51A gene is solely responsible for the azole sensitivity patterns of *R. oryzae*. The natural substitution F129Y in Cyp51Ap was shown to have an implication in resistance to voriconazole and in reduced sensitivity to posaconazole.

Regarding the search for therapeutic alternatives, the in vitro activity of eight drugs, alone and in combination with voriconazole, was evaluated against 25 Mucoral strains. AMB and posaconazole were the most active drugs when evaluated alone. Microscopic alterations in the development of hypha were observed for some isolates when confronted against drugs combinations. Using a *Galleria mellonella* mucormycosis model, better survival was observed in the combined treatments of voriconazole with AMB and with caspofungin, compared to AMB alone for *R. microsporus*. This greater survival was obtained using a 32 times lower dose of AMB 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.