

Artículo original

## Análisis cuantitativo de la expresión de genes de resistencia a fluconazol en cepas de *Candida albicans* aisladas al ingreso de adultos mayores a una unidad de cuidados intensivos de Manizales, Colombia

Ana Elisa Rojas<sup>1,3</sup>, Jorge Enrique Pérez<sup>2,3</sup>, Johan Sebastián Hernández<sup>2,3</sup>, Yuliana Zapata<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Universidad Católica de Manizales, Manizales, Colombia

<sup>2</sup> Grupo de Investigación Médica, Universidad de Manizales, Manizales, Colombia

<sup>3</sup> Grupo de Resistencia Antibiótica de Manizales, Manizales, Colombia

**Introducción.** Las infecciones oportunistas asociadas con *Candida albicans* han tenido gran repercusión en la salud pública por la mortalidad que generan en determinados grupos poblacionales. Aunque existen tratamientos farmacológicos disponibles, es evidente el aumento de la resistencia desarrollada por el agente patógeno, por lo que la determinación de los mecanismos de resistencia de las cepas presentes en las áreas hospitalarias es importante, ya que permitiría plantear mejores esquemas de tratamiento.

**Objetivo.** Analizar la expresión de los genes *ERG11*, *CDR1* y *MDR1* en cepas de *C. albicans* aisladas de adultos mayores a su ingreso en la unidad de cuidados intensivos del Hospital Santa Sofía de Manizales, Colombia.

**Materiales y métodos.** Se seleccionaron 29 muestras (21 resistentes y 8 sensibles) y se conformaron dos grupos de trabajo, uno de muestras con exposición al fluconazol y el otro sin esta. El ARN extraído se cuantificó mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real (RT-qPCR).

**Resultados.** Se encontraron diferencias significativas en la expresión del gen *MDR1* en el grupo de cepas de *C. albicans* resistentes. Dos de las cepas resistentes (104 y 62-2) expuestas al antifúngico presentaron valores muy elevados en la expresión de este gen. La expresión del *ERG11* y del *CDR1* no fue significativa en los grupos estudiados.

**Conclusión.** El aumento de sobreexpresión del gen *MDR1* indica que este puede ser el responsable de la resistencia; sin embargo, algunas cepas resistentes no sobreexpresaron los genes analizados, lo que indica que puede haber otros genes involucrados en la resistencia de las cepas estudiadas.

**Palabras clave:** *Candida albicans*; fluconazol; farmacoresistencia fúngica; farmacoresistencia fúngica múltiple.

**Quantitative analysis of the expression of fluconazole-resistant genes in strains of *Candida albicans* isolated from elderly people at their admission in an intensive care unit in Manizales, Colombia**

**Introduction:** Opportunistic infections associated with *Candida albicans* have had a great impact on public health due to the mortality they generate in certain population groups.

Although pharmacological treatments are available, the resistance developed by the pathogen has become increasingly evident. For this reason, determining the mechanisms of resistance associated with the strains found in different hospital areas is important since it would help improving treatment plans.

**Objective:** To analyze the expression of *ERG11*, *CDR1*, and *MDR1* genes in strains of *C. albicans* isolated from elderly patients at admittance in the intensive care unit of Hospital Santa Sofía in Manizales, Colombia.

**Materials and methods:** A total of 29 samples (21 resistant and 8 sensitive) were selected and distributed in two working groups: with and without exposure to fluconazole. The extracted RNA was quantified by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR).

**Results:** Significant differences were found in the expression of the *MDR1* gene in the group of resistant *C. albicans* strains. Two of the resistant strains (104 and 62-2) exposed to the antifungal showed very high values in the expression of this gene. The expression of *ERG11* and *CDR1* was not significant among the groups studied.

**Conclusion:** The increased overexpression of the *MDR1* gene indicates that it may be responsible for the resistance. However, some resistant strains did not overexpress any of the genes analyzed, which indicates that there may be other genes involved in the resistance of the strains under study.

**Keywords:** *Candida albicans*; fluconazole; drug resistance, fungal; drug resistance, multiple, fungal.

**Recibido:** 12/09/2018

**Aceptado:** 31/07/2019

**Publicado:** 05/08/2019

### Citación:

Rojas AE, Pérez JE, Hernández JS, Zapata Y. Análisis cuantitativo de la expresión de genes de resistencia a fluconazol en cepas de *Candida albicans* aisladas al ingreso de adultos mayores a una unidad de cuidados intensivos de Manizales, Colombia. Biomédica. 2020;40:153-65. <https://doi.org/10.7705/biomedica.4723>

### Correspondencia:

Ana Elisa Rojas, Carrera 23 No 60-63, Manizales, Colombia  
Teléfono: (576) 893 3050, extensión 3142; fax: (576) 878 2937  
arojas@ucm.edu.co

### Contribución de los autores:

Ana Elisa Rojas: trabajo experimental  
Jorge Enrique Pérez: diseño del trabajo experimental  
Johan Sebastián Hernández: redacción del proyecto y recolección de las muestras  
Yuliana Zapata: análisis de datos  
Todos los autores participaron en la redacción del manuscrito.

### Financiación:

Este proyecto fue financiado por la Universidad Católica de Manizales mediante el Acuerdo N° 099 del Consejo Académico del 18 de diciembre de 2014 y por la Universidad de Caldas, proyecto código: 0592213

### Conflicto de intereses:

Los autores declaramos que no existe ningún conflicto de intereses para la publicación del presente manuscrito.

Varias especies de *Candida* son comensales, y colonizan la piel y las superficies mucosas de los seres humanos. Los pacientes gravemente enfermos o inmunocomprometidos son más propensos a desarrollar infecciones superficiales y sistémicas potencialmente mortales (1).

En el tratamiento de infecciones por *Candida* spp., los azoles han sido el tratamiento de primera línea. El fluconazol es el más usado de este grupo, pues se le considera el primer antifúngico sistémico con toxicidad reducida y con un excelente perfil farmacocinético; además, tiene presentaciones para formulación oral o intravenosa (2,3).

En Colombia, la frecuencia de *Candida* spp. en hemocultivos es del 5 % y es el quinto germen más frecuentemente aislado (4). En los estudios realizados en nuestro país entre el 2003 y el 2015, se ha reportado que la frecuencia de resistencia de *C. albicans* al fluconazol varía entre el 1,1 y el 8,6 %, (5-9). Los datos más recientes indican que el porcentaje de resistencia a los azoles sigue siendo bajo y permanece estable. Sin embargo, a nivel regional dicha resistencia se ha estudiado poco y, en Caldas, no se conocen los mecanismos de resistencia responsables de la resistencia de las especies de *Candida*.

El primer mecanismo asociado con la disminución de la sensibilidad de *Candida* spp. a los azoles es la inducción de bombas de expulsión que disminuyen la concentración del fármaco en la célula fúngica (10,11). El primer grupo de estas proteínas de membrana corresponde a las CDR, grupo de transportadoras de tipo ABC (*ATP binding cassette*), que expulsan diferentes compuestos mediante un mecanismo activo dependiente de ATP. En *C. albicans* se han caracterizado dos de estos genes, el *CDR1* y el *CDR2*, los cuales se sobreexpresan en más del 50 % de las cepas resistentes a los medicamentos antifúngicos (12).

El gen *MDR1* codifica la proteína de 564 aminoácidos conocida como Mdr1, la cual es un transportador de tipo I de diferentes moléculas, entre ellas, los medicamentos. Esta proteína pertenece a la superfamilia de facilitadores principales (*Major Facilitator Superfamily*, MFS). Se ha reportado que su sobreexpresión contribuye al flujo externo de los azoles usualmente empleados para tratar la infección por *C. albicans* (13).

Otro mecanismo común de resistencia en las especies de *Candida* es la sobreexpresión del gen que codifica la enzima diana (*ERG11*), lo que incrementa los niveles de la enzima desmetilasa de 14 $\alpha$  lanosterol en la membrana del hongo y puede llevar a que los azoles no tengan afinidad por la enzima (14-16).

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar por primera vez en la región de Caldas la expresión de algunos de los factores de resistencia al fluconazol más descritos en la literatura científica en una selección de los aislamientos incluidos en el primer muestreo para la evaluación de la resistencia antifúngica de especies de *Candida* en las unidades de cuidados intensivos de este departamento.

## **Materiales y métodos**

### ***Selección de muestras y grupos de análisis***

En los procedimientos se usaron elementos de las guías *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments* (MIQE) para este tipo de experimentos de expresión (17). De las cepas de *C. albicans* de pacientes colonizados obtenidas previamente en el “Estudio

de la colonización de especies de *Candida* en adultos mayores al ingreso de cuidados intensivos” (9), se seleccionaron 29: 21 clasificadas como resistentes al fluconazol (concentración inhibitoria mínima, CIM, de 8 µg/ml o más a las 24 horas) y ocho sensibles (CIM de 2 µg/ml o menos a las 24 horas).

Las cepas seleccionadas se repicaron en agar PDA y se identificaron a nivel de especie, siguiendo los protocolos del laboratorio. Se confirmó su CIM frente al fluconazol, utilizando el método de microdilución para levaduras propuesto por *The Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) en su manual M27-A3 (18).

### **Ensayo de macrodilución con fluconazol y sin fluconazol**

Cada cepa fue sometida a una prueba de macrodilución siguiendo el protocolo propuesto por el CLSI y utilizando el medio líquido de cultivo Sabouraud; todos los tubos inoculados se incubaron con agitación constante a 35 °C hasta el momento en el que se produjo la fase logarítmica de crecimiento de las levaduras, cuando se hizo la lectura de cada uno de los tubos para establecer su CIM, comparando el tamaño del sedimento celular de cada concentración de fluconazol con el control positivo.

Se recolectaron las células del tubo en el que se presentó un crecimiento celular mayor del 50 %, se ajustó la concentración celular a un valor entre  $2 \times 10^8$  y  $3 \times 10^8$  levaduras, proceso que también se realizó con el tubo correspondiente al control positivo. Cada tubo empleado se centrifugó para obtener el sedimento de levaduras, el cual se recolectó en un tubo libre de ADNasa y ARNasa, y se conservó en solución RNAlater™ (Ambion, ThermoFisher) y se congeló a -80 °C hasta el momento de la extracción del ARN.

### **Extracción de ARN**

Cada uno de los tubos con el sedimento de levaduras se sometió al proceso de extracción de ARN utilizando el estuche RiboPure RNA™, yeast (Invitrogen), ampliamente usado en la extracción de ARN en *C. albicans*, y siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

### **Criterios de calidad del ARN extraído**

Se hicieron lecturas de la absorbancia de las muestras a 230, 260 y 280 nm en un espectrofotómetro UVIS Drop UVS99™ (Avans Biotechnology). Aquellos ARN con relaciones de  $A_{260}:A_{280}$  y  $A_{260}:A_{230}$  mayores o iguales a 2, se consideraron de alta pureza y fueron posteriormente utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real (RT-qPCR). Para establecer el grado de integridad del ARN obtenido, se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 1 % y se consideró que el ARN no estaba degradado cuando aparecieron dos bandas en el gel.

### **Estandarización del protocolo de expresión del ARN mensajero mediante RT-qPCR**

Para estandarizar y evaluar la eficiencia de los cebadores, se utilizó la cepa de *C. albicans* ATCC 90028 como referencia de cepa sensible y se eligió al azar una cepa del grupo resistente al fluconazol. El protocolo se cumplió en cada una de las cepas elegidas de los grupos de trabajo propuestos.

### **Selección y optimización de cebadores para la qPCR**

Los cebadores para la reacción del gen de control endógeno de referencia (*ACT1*) y de los genes de resistencia (*ERG11*, *MDR1*, *CDR1*) (cuadro 1) fueron los propuestos por Chau, *et al.* (19).

Para la prueba de optimización de los cebadores, se utilizó 1 µl del ADN complementario, y las temperaturas ideales de alineamiento y concentración óptima de cebadores para cada uno de los genes se evaluaron con el reportero SYBR Green™ (Applied Biosystems), siguiendo los pasos propuestos por Chau, *et al.* (19). El análisis de la temperatura de disociación (*melting temperature*, Tm) permitió evaluar la especificidad de los cebadores.

### **Protocolo de la transcripción inversa del ARN total a ADN complementario**

El proceso de transcripción inversa se hizo separadamente de las reacciones de la qPCR, utilizando el estuche SensiFAST cDNA™ (Bioline) y siguiendo sin modificaciones las indicaciones del fabricante. La reacción de transcripción inversa se realizó en el termociclador StepOnePlus Real-Time PCR System™ (Applied Biosystems) con el siguiente protocolo: incubación a 25 °C durante 10 minutos, luego a 50 °C durante 30 minutos y, finalmente, se inactivó la enzima a 85 °C durante 5 minutos.

### **Experimento de qPCR**

Los análisis de PCR en tiempo real se llevaron a cabo en el equipo StepOnePlus™ (Applied Biosystem) utilizando el estuche Power Up SYBR Green Master Mix™ (Applied Biosystem). Para evaluar la expresión a nivel de la transcripción de los genes *ERG11*, *CDR1* y *MDR1*, se utilizó como gen de referencia el *ACT1*. La especificidad de los productos de las reacciones de q-PCR se evaluó mediante el análisis de las curvas de disociación. La cepa de *C. albicans* ATCC 90028 se utilizó como referencia.

Cada reacción de cuantificación mediante q-PCR contenía 10 µl de PowerUp SYBR Green Master Mix 2x™, 1,6 µl de cada pareja de cebadores en una concentración final de 0,8 µM (cuadro 1), 2 µl de ADN complementario, y el volumen de 20 µl se completó con agua tratada con DEPC (Thermo Scientific).

El programa de amplificación utilizado consistió en una desnaturalización inicial con dos pasos: a 50 °C durante dos minutos y a 95 °C durante dos minutos, seguidos de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos y una extensión a 60 °C durante un minuto. Con el fin de establecer la curva de disociación del ADN complementario e identificar las reacciones de amplificación no específicas, se utilizaron los siguientes parámetros: 95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante un minuto y 95 °C durante 15 segundos.

**Cuadro 1.** Secuencia de cebadores usados en los ensayos de qPCR

<b>Gen</b>		<b>Secuencia del cebador (5'-3')</b>
<i>ACT1</i>	Hacia adelante	TTGGTGATGAAGCCCAATCC
	Hacia atrás	CATATCGTCCCAGTTGGAACA
<i>MDR1</i>	Hacia adelante	TTACCTGAAACTTTTGGCAAACA
	Hacia atrás	ACTTGTGATTCTGTCGTTACCG
<i>CDR1</i>	Hacia adelante	TTTAGCCAGAACTTTCACATCATGATT
	Hacia atrás	TATTTATTTCTTCATGTTTCATATGGATTGA
<i>ERG11</i>	Hacia adelante	GGTATTGGCTGGTCCTAATGTGA
	Hacia atrás	GCTTGAATCAAATAAGTGAATGGATTAC

### **Análisis de la reacción de qPCR**

Se utilizó el método de análisis comparativo  $\Delta C_t$  propuesto por Livak (20) para establecer la diferencia entre el ciclo de cruce del umbral de detección ( $C_t$ ) de los genes de resistencia (*ERG11*, *MDR1* y *CDR1*) y el gen de control endógeno de referencia (*ACT1*); el análisis de los resultados se hizo con el programa StepOnePlus Real-Time PCR™ (Applied Biosystems). Este mismo programa permitió evaluar la eficiencia de cada una de las reacciones. Los genes de cada una de las muestras se analizaron por triplicado.

### **Análisis estadístico**

En el análisis estadístico de los datos, se usó la prueba no paramétrica de Wilcoxon pareada mediante el programa R. El valor de  $p < 0,05$  se consideró como estadísticamente significativo.

### **Resultados**

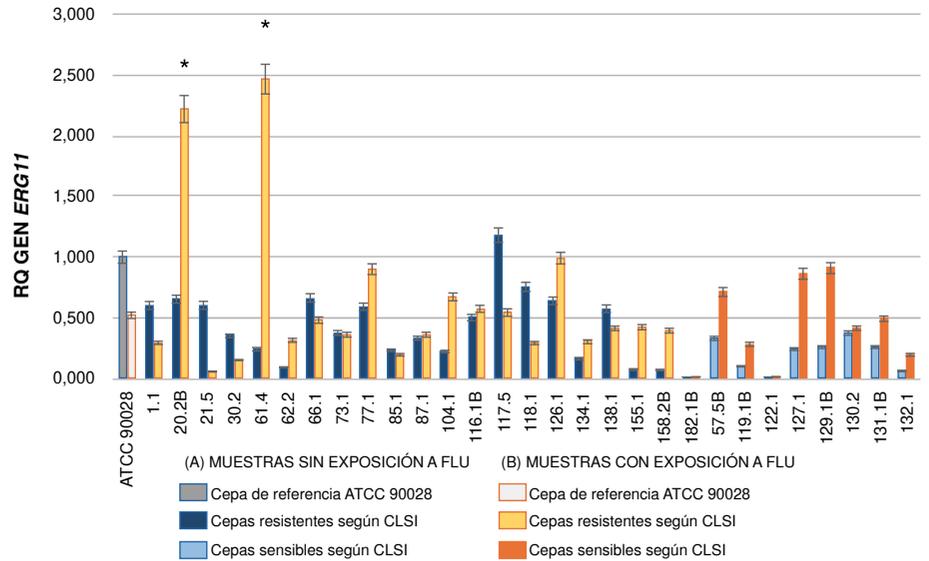
#### **Cuantificación relativa de los genes *ERG11*, *CDR1* y *MDR1* mediante q-PCR**

La media, la desviación estándar y la mediana obtenidas en la cuantificación relativa (RQ) de cada uno de los genes estudiados en cada uno de los grupos de análisis, se presentan en el cuadro 2. La expresión génica de todos los genes fue muy similar, con excepción del gen *MDR1*, que presentó sobreexpresión en las cepas resistentes, y del gen *ERG11* que la presentó en las cepas sensibles.

El promedio de la expresión del gen *ERG11* en todos los grupos estudiados tuvo un valor por debajo de la cepa de referencia ATCC; solo dos muestras del grupo de resistentes expuestas al fluconazol (20-2B y 61-4) generaron una expresión relativa mayor de 2, en tanto que nueve de estas cepas presentaron una sobreexpresión menor (62-2, 77-1, 87-1, 104-1, 116-1, 126-1, 134-1, 155-1 y 158-2B). Siete de las ocho muestras sensibles también presentaron un aumento en la expresión del gen al exponerlas al fluconazol (57-5B, 119-1B, 127-1, 129-1B, 130-2, 131-1B y 132-1) (figura 1).

En el análisis estadístico, no se observaron diferencias significativas ( $p=0,96$ ) en la expresión de este gen al comparar las cepas resistentes con las sensibles; sin embargo, al comparar los valores de expresión de las cepas expuestas con las no expuestas, sí se encontró una diferencia significativa en las cepas sensibles mas no en las resistentes ( $p=0,0008$  y  $p=0,072$ ) (cuadro 2).

Al analizar la expresión del gen *MDR1* en las cepas resistentes bajo exposición al antifúngico, se encontró que nueve de ellas presentaban un aumento en la expresión de este gen y, en tres de estas (30-2, 62-2 y 104-1), con valores relativos por encima de 20 (cuadro 3). Al comparar los valores de este gen en este grupo con fluconazol y sin fluconazol, se encontró una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) (cuadro 2). En el grupo de las cepas sensibles, tres presentaron un aumento en la expresión de este gen, pero solamente una con valores por encima de uno (cuadro 3). No se encontraron diferencias significativas al comparar los resultados de las expuestas con las de las no expuestas (cuadro 2). Al comparar los valores de las cepas sensibles con las resistentes no expuestas al fluconazol, se observó que no había significación estadística ( $p=0,1071$ ). El mismo comportamiento se encontró al comparar las cepas sensibles y las resistentes expuestas al fluconazol ( $p=0,33$ ).



\* Cepas con expresión relativa mayor de dos con respecto a las cepas sin exposición al fluconazol y a la cepa de referencia ATCC, respectivamente.

**Figura 1.** Expresión relativa (CR) del gen *ERG11* en cepas de *Candida albicans*. **(A)** Grupo sin exposición al fluconazol (FLU): cepas resistentes (barras azules), cepas sensibles (barras celestes). Cepa de referencia: ATCC 90028 (barra gris). **(B)** Grupo con exposición al fluconazol: cepas resistentes (barras amarillas), cepas sensibles (barras naranjas). Cepa de referencia: ATCC 90028 (barra blanca)

**Cuadro 2.** Valores estadísticos de la expresión relativa de los genes *ERG11*, *MDR1* y *CDR1* en cepas sensibles y resistentes al fluconazol

Variable	n	Media	DE	P (2 colas)*
<i>ERG11</i> (R) sin exposición a fluconazol	21	0,42	0,29	0,0724
<i>ERG11</i> (R) con exposición a fluconazol	21	0,59	0,63	
<i>CDR1</i> (R) sin exposición a fluconazol	21	0,08	0,04	0,1252
<i>CDR1</i> (R) con exposición a fluconazol	21	0,1	0,11	
<i>MDR1</i> (R) sin exposición a fluconazol	21	1,91	4,8	<0,0001
<i>MDR1</i> (R) con exposición a fluconazol	21	64,65	274,23	
<i>ERG11</i> (S) sin exposición a fluconazol	8	0,2	0,13	0,0008
<i>ERG11</i> (S) con exposición a fluconazol	8	0,48	0,32	
<i>CDR1</i> (S) sin exposición a fluconazol	8	0,07	0,07	0,1448
<i>CDR1</i> (S) con exposición a fluconazol	8	0,04	0,03	
<i>MDR1</i> (S) sin exposición a fluconazol	8	0,42	0,35	0,066
<i>MDR1</i> (S) con exposición a fluconazol	8	0,59	0,56	

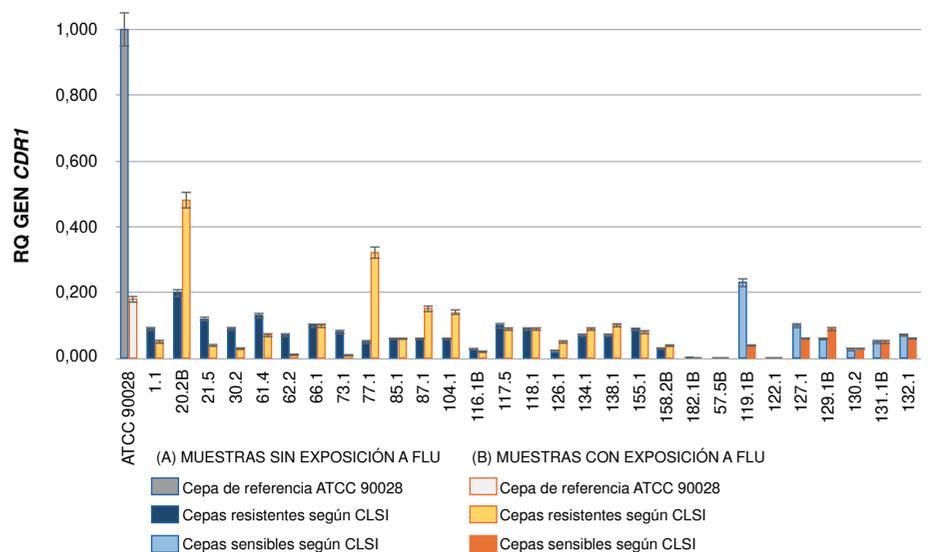
\* Valor de p (2 colas): se obtuvo comparando los valores de cada uno de los genes (*ERG11*, *CDR1* y *MDR1*) en los grupos de cepas sensibles (S) y resistentes (R), con exposición al fluconazol y sin ella, con el fin de establecer la variación de cada uno de ellos.

En cuanto al gen *CDR1*, se evidenció que seis de las 21 cepas resistentes al fluconazol (20-2B, 77-1, 87-1, 104-1, 134-1 y 138-1) presentaron un aumento en su expresión al compararlas con las no expuestas (figura 2), aunque ninguno de estos valores fue mayor de 1. Al comparar los valores obtenidos en estas cepas con exposición al medicamento y sin ella, no se observó una variación significativa en la expresión del gen (p=0,1252); un comportamiento similar se presentó en el grupo de las cepas sensibles (p=0,1448) (cuadro 2). Al comparar el grupo de cepas resistentes con el de las sensibles expuestas y no expuestas al antimicótico, tampoco se encontró significación estadística (p=0,2699 y p=0,11).

**Cuadro 3.** Cuantificación relativa del gen MDR1 en cepas de *Candida albicans*, resistentes y sensibles al fluconazol, con exposición al antifúngico y sin ella

Perfil de sensibilidad	No de muestra	Valor promedio de CR sin exposición a fluconazol	Valor promedio de CR con exposición a fluconazol
	ATCC 90028	1,000	0,750
R	1-1	1,950	1,470
R	20-2B	0,640	0,540
R	21-5	0,370	0,000
R	30-2	0,16	20,88
R	61-4	1,110	3,680
R	62-2	1,125	1260,01
R	66-1	0,590	0,620
R	73-1	1,580	0,460
R	77-1	1,330	1,570
R	85-1	1,420	0,990
R	87-1	0,280	0,730
R	104-1	22,64	61,21
R	116-1B	2,370	1,010
R	117-5	0,300	0,100
R	118-1	0,350	0,090
R	126-1	1,560	1,390
R	134-1	1,370	1,940
R	138-1	0,400	0,230
R	155-1	0,400	0,620
R	158-2B	0,130	0,120
R	182-1B	0,000	0,000
S	57-5B	0,000	0,000
S	119-1B	0,520	1,750
S	122-1	0,000	0,020
S	127-1	0,760	0,740
S	129-1B	0,490	0,660
S	130-2	1,000	0,750
S	131-1B	0,380	0,590
S	132-1	0,230	0,250

CR: cuantificación relativa; R: resistente; S: sensible



**Figura 2.** Expresión relativa (CR) del gen CDR1 en cepas de *Candida albicans* (A) Grupo sin exposición al fluconazol (FLU): cepas resistentes (barras azules), cepas sensibles (barras celestes). Cepa de referencia: ATCC 90028 (barra gris). (B) Grupo con exposición al fluconazol: cepas resistentes (barras amarillas), cepas sensibles (barras naranjas). Cepa de referencia: ATCC 90028 (barra blanca)

Al analizar los datos obtenidos en las cepas resistentes, se observó que cuatro sobreexpresaron tres genes (77-1, 87-1, 104-1, y 134-1); seis cepas sobreexpresaron dos genes (20-2B, 61-4, 62-2, 126-1, 155-1 y 158-2B), y tres cepas sobreexpresaron un solo gen (30-2, 66-1 y 116-1B).

## Discusión

El objetivo del estudio fue caracterizar los principales mecanismos moleculares de resistencia al fluconazol en cepas clínicas de *C. albicans*, una levadura comensal oportunista responsable del 42 % de las infecciones por levaduras en Colombia (21). En los estudios previos se había evaluado la sensibilidad de *Candida* spp. a diferentes antifúngicos; sin embargo, hasta ahora no se había reportado ningún estudio regional que identificara los mecanismos moleculares de resistencia o que estableciera su frecuencia en cepas de *C. albicans* aisladas de instituciones de salud. En este contexto, el presente estudio permite entender de manera preliminar los mecanismos de resistencia al fluconazol que se están generando a nivel local.

La estandarización de la metodología de cuantificación de los genes mediante q-PCR y su análisis en diferentes cepas de *C. albicans*, representan el primer paso en la correcta cuantificación relativa de los genes asociados con la resistencia. Se siguió un protocolo que garantizaba las condiciones necesarias para establecer la especificidad de cada pareja de cebadores y optimizar las reacciones de q-PCR, la concentración de cebadores y las temperaturas de los ciclos de amplificación, con el fin de obtener eficiencias entre el 90 y el 100 %.

Un segundo objetivo consistió en evaluar el grado de expresión de los genes *ERG11*, *CDR1* y *MDR1* en las cepas resistentes y sensibles al fluconazol, expuestas y no expuestas al antifúngico. En varios estudios se ha reportado que es común encontrar que estos genes se sobreexpresan en presencia de ciertos medicamentos antifúngicos (14,22). Se ha comprobado que este tipo de sobreexpresión es independiente del tipo de antifúngico que se use en las pruebas. En este estudio, se evidenció que en solo cuatro aislamientos resistentes expuestos al fluconazol se sobreexpresaron los tres genes, pero no se descarta que en las cepas estudiadas existan mutaciones de dichos genes que no permitan una expresión en conjunto.

La cuantificación de los transcritos del gen *ERG11* en las cepas resistentes y en las sensibles al fluconazol demostró que, si bien en dos cepas resistentes (20-2B, 61-4) hubo un aumento considerable de la expresión en comparación con las demás, en general, la expresión de *ERG11* no presentó diferencias significativas entre las cepas resistentes, las expuestas y las no expuestas; además, en siete de las ocho cepas sensibles hubo sobreexpresión del gen (figura 1), lo cual sugiere que este no sería el mecanismo responsable de la resistencia en las cepas analizadas. Estos resultados concuerdan con los de algunas publicaciones que mencionan que la sobreexpresión del *ERG11* no estaría claramente asociada con la generación de resistencia de *C. albicans* (19,23-25). Sin embargo, en otras especies intrínsecamente resistentes a los azoles, por ejemplo, *C. krusei*, la sobreexpresión de este gen sí se ha asociado con resistencia (26).

En los estudios de Hiller, *et al.*, se demostró que la acción del gen *MDR1* es suficiente para conferir resistencia a *C. albicans* contra medicamentos como el fluconazol (27). En el presente estudio, se encontró que nueve cepas resistentes expuestas al medicamento presentaron sobreexpresión de

este gen y, al comparar los datos con las cepas no expuestas, se encontró significación estadística. En un estudio anterior realizado por nuestro grupo de investigación, la cepa 104-1 presentó la mutación G464S del gen *ERG11*, mutación que en diferentes estudios se ha relacionado con la resistencia al fluconazol (28). A pesar de que esta cepa presentó sobreexpresión de los tres genes, dicho valor fue mayor con el *MDR1*, por lo cual los resultados obtenidos indicarían que dicha cepa tendría cuatro factores de resistencia, de los cuales dos serían preponderantes en la generación de este tipo de reacción al fluconazol.

La función del *MDR1* como un gen de resistencia a múltiples fármacos en *C. albicans* se ha establecido en diversos estudios, en los que se evidencia una fuerte correlación entre la sobreexpresión y la resistencia (14,23,29-33). Se ha reportado que la sobreexpresión del *MDR1* en cepas resistentes está mediada por mutaciones de los elementos de regulación en trans y, en investigaciones realizadas a nivel de los elementos en cis, también se ha reportado que las mutaciones puntuales en esas regiones contribuyen a la generación de resistencia (34).

En los estudios en los que se ha inactivado el gen *MDR1*, se ha producido una pérdida parcial o completa del fenotipo resistente (35,36). Sin embargo, en otros estudios se ha observado que este gen generalmente se sobreexpresa con otros genes que le confieren resistencia a *C. albicans* frente a diferentes fármacos, lo que sugiere que la sola sobreexpresión del *MDR1* no sería suficiente para mediar la resistencia a algunos medicamentos y que esta dependería de alteraciones adicionales (37-39). Esto explicaría parcialmente los resultados obtenidos en este estudio pues, aunque hubo significación estadística en la expresión de este gen en las cepas resistentes, solamente en nueve de las veintiún cepas hubo sobreexpresión del gen, en tanto que en cuatro de los aislamientos se sobreexpresaron los otros genes analizados en este estudio. Por ello, no se puede afirmar que este gen sea el único responsable de la resistencia al fluconazol en las cepas analizadas y son necesarios más estudios que permitan profundizar los diferentes aspectos de la resistencia de estas cepas.

Con respecto a la expresión del gen *CDR1*, a diferencia de investigaciones anteriores (22-25,40), en este estudio no se observó correlación entre la resistencia al fluconazol y los niveles de expresión del gen. Aunque ocho de los aislamientos clasificados como resistentes y expuestos al antifúngico presentaron sobreexpresión, su valor no sobrepasó el obtenido en la cepa de referencia y, al compararlos con los datos de los aislamientos sensibles y expuestos al fluconazol, no mostraron significación estadística. Este resultado evidencia que la transcripción de este gen no estaría implicada en la resistencia de las cepas analizadas en el presente estudio y es similar al obtenido por Chau, *et al.*, y Cernicka, *et al.* (40,41), quienes no encontraron una correlación determinante entre el aumento de la transcripción del gen y la disminución de la sensibilidad en las cepas estudiadas.

Los hallazgos del presente estudio sustentan la necesidad de secuenciar los genes *MDR1* y *CDR1* para determinar las implicaciones de las mutaciones en ausencia o en presencia de resistencia en las cepas encontradas en los hospitales locales, mutaciones que se han descrito en diversos estudios (42,43). Ello permitiría un mejor enfoque y un mayor conocimiento de la resistencia de *C. albicans*.

En el presente estudio, hubo varias limitaciones. La primera se refiere a la procedencia de las cepas, todas ellas de pacientes colonizados, por lo que los resultados obtenidos no se podrían extrapolar a lo que estuviera ocurriendo a nivel clínico; sin embargo, la presencia de levaduras resistentes con niveles de expresión relativa mayores de 2 en diferentes genes, sería un factor de riesgo para la candidiasis de origen endógeno resistente al tratamiento con fluconazol en estos pacientes, lo que podría eventualmente complicar su situación clínica debido a la facilidad con la que estas levaduras sobreexpresan uno o varios de los genes mencionados; además, la presencia de estas cepas en las mucosas es un riesgo adicional de transmisión a otras personas y, por lo tanto, de dispersión de la resistencia. En este contexto, podría decirse *a priori* que uno de los mecanismos de resistencia más frecuentes estaría asociado con el gen *MDR1*.

La ausencia de muestras de pacientes con candidiasis sistémica y resistencia al fluconazol, no permite confirmar la asociación de dicha resistencia con los genes analizados. Aunque el número de muestras resistentes en este estudio fue baja, si se pudo establecer que en cinco de los veintiún aislamientos los factores de resistencia, se expresaron a concentraciones que permiten confirmar la resistencia presentada por estas cepas al antifúngico *in vitro*.

Por último, el presente análisis se limitó al efecto asociado con un solo antifúngico, lo que impidió obtener resultados mucho más contundentes con respecto al perfil de sensibilidad de las cepas analizadas.

A pesar de estas limitaciones, los resultados obtenidos permiten un análisis preliminar del posible papel causal de la exposición al fluconazol en el desarrollo de la resistencia de los aislamientos de *C. albicans*, lo que validaría la recomendación de evitar la prescripción innecesaria e inadecuada del antifúngico y su uso a largo plazo, el cual debe basarse en la confirmación del diagnóstico (44).

En resumen, es evidente que más de un mecanismo molecular puede contribuir al fenotipo de resistencia global en muchos aislamientos. Algo similar se ha observado en varios estudios (22,23). La aparición de múltiples mecanismos de resistencia probablemente refleja los largos períodos de exposición al fármaco y el modo de acción estático de los azoles frente a las levaduras. Es necesario, entonces, continuar analizando las cepas resistentes procedentes de personas colonizadas y las de pacientes que no mejoran adecuadamente con el tratamiento antimicótico, con el fin de entender mejor los mecanismos moleculares más frecuentemente asociados con la resistencia a estos medicamentos en la región y, así, establecer protocolos de tamización temprana de las cepas resistentes para garantizar una mayor efectividad del tratamiento y una disminución de costos al usar medicamentos realmente efectivos.

### **Agradecimientos**

A las auxiliares del laboratorio de investigación del Grupo Biosalud y demás personal de la Universidad de Caldas, por su colaboración, apoyo logístico y cofinanciación del proyecto; a los directivos y personal administrativo y de apoyo de la Dirección de Investigaciones y Posgrado de la Universidad Católica de Manizales, por contribuir con los recursos técnicos y financieros necesarios para la ejecución de este proyecto de investigación.

## Referencias

1. Hasan F, Xess I, Wang X, Jain N, Fries BC. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. *Microbes Infect.* 2009;11:753-61. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.04.018>
2. Andes D. Clinical utility of antifungal pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Curr Opin Infect Dis.* 2004;17:533-40.
3. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK, Calandra TF, Edwards JE, *et al.* Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2009;48:503-35. <https://doi.org/10.1086/596757>
4. Cortés JA, Reyes P, Gómez C, Buitrago G, Leal AL. Fungal bloodstream infections in tertiary care hospitals in Colombia. *Rev Iberoam Micol.* 2011;28:74-8. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2010.12.002>
5. De Bedout C, Ayabaca J, Vega R, Méndez M, Santiago ÁR. Evaluación de la susceptibilidad de especies de *Candida* al fluconazol por el método de difusión de disco. *Biomédica.* 2003;23:31-7. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v23i1.1195>
6. Gutiérrez C, De Bedout C, Tobón AM, Cano LE, Arango M, Tabares AM, *et al.* Sensibilidad a fluconazol y voriconazol de aislamientos de *Candida* spp., obtenidos de mucosa oral de pacientes con sida. *Infectio.* 2008;11:183-9.
7. Duque C, Gómez B, Uribe O, Alarcón J, Soto F, Urán L, *et al.* Caracterización de la candidiasis vulvovaginal en mujeres de la ciudad de Medellín, Colombia. *Nova.* 2009;7:157-60.
8. Maldonado NA, Cano LE, De Bedout C, Arbeláez CA, Roncancio G, Tabares AM, *et al.* Association of clinical and demographic factors in invasive candidiasis caused by fluconazole-resistant *Candida* species: A study in 15 hospitals, Medellín, Colombia 2010-2011. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014;79:280-6. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.02.003>
9. Hernández JS. Estudio básico-clínico de la colonización de especies de *Candida* en adultos mayores al ingreso de cuidados intensivos (tesis). Manizales: Universidad de Caldas; 2015.
10. Kanafani ZA, Perfect JR. Resistance to antifungal agents: Mechanisms and clinical impact. *Clin Infect Dis.* 2008;46:120-8. <https://doi.org/10.1086/524071>
11. Pemán J, Cantón E, Espinel-Ingroff A. Antifungal drug resistance mechanisms. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2009;7:453-60. <https://doi.org/10.1586/eri.09.18>
12. Rocha MF, Bandeira SP, De Alencar LP, Melo LM, Sales JA, Paiva M de AN, *et al.* Azole resistance in *Candida albicans* from animals: Highlights on efflux pump activity and gene overexpression. *Mycoses.* 2017;60:462-8. <https://doi.org/10.1111/myc.12611>
13. Mandal A, Kumar A, Singh A, Lynn AM, Kapoor K, Prasad R. A key structural domain of the *Candida albicans* Mdr1 protein. *Biochem J.* 2012;445:313-22. <https://doi.org/10.1042/BJ20120190>
14. White TC. 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.* 1997;41:1482-7. <https://doi.org/10.1128/AAC.41.7.1482>
15. Joseph-Horne T, Hollomon DW. Molecular mechanisms of azole resistance in fungi. *FEMS Microbiol Lett.* 1997;149:141-9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10321.x>
16. Kontoyiannis DP, Lewis RE. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet.* 2002;359:1135-44. [https://doi.org/10.1016/S01406736\(02\)08162-X](https://doi.org/10.1016/S01406736(02)08162-X)
17. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, *et al.* The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009;55:611-22. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
18. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Third edition. Wayne: CLSI; 2008.
19. Chau AS, Mendrick CA, Sabatelli FJ, McNicholas PM, Loeberberg D. Application of real-time quantitative PCR to molecular analysis of *Candida albicans* strains exhibiting reduced susceptibility to azoles. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:2124-31. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.6.2124-2131.2004>
20. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup> $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* 2001;25:402-8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

21. Zuluaga A, de Bedout C, Agudelo CA, Hurtado H, Arango M, Restrepo Á, *et al.* Sensibilidad a fluconazol y voriconazol de especies de *Candida* aisladas de pacientes provenientes de unidades de cuidados intensivos en Medellín, Colombia (2001-2007). *Rev Iberoam Micol.* 2010;27:125-9. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2010.04.001>
22. White TC, Holleman S, Dy F, Stevens DA, Mirels LF. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:1704-13. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.6.1704-1713.2002>
23. Perea S, López-Ribot JL, Kirkpatrick WR, Mcatee RK, Santillán RA, Martínez M, *et al.* Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:2676-84. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.10.2676-2684.2001>
24. Mane A, Vidhate P, Kusro C, Waman V, Saxena V, Kulkarni-Kale U, *et al.* Molecular mechanisms associated with fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* isolates from India. *Mycoses.* 2016;59:93-100. <https://doi.org/10.1111/myc.12439>
25. Salari S, Khosravi AR, Mousavi SAA, Nikbakht-Brojeni GH. Mechanisms of resistance to fluconazole in *Candida albicans* clinical isolates from Iranian HIV-infected patients with oropharyngeal candidiasis. *J Mycol Med.* 2016;26:35-41. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2015.10.007>
26. Tavakoli M, Zaini F, Kordbacheh M, Safara M, Raoofian R, Heidari M. Upregulation of the ERG11 gene in *Candida krusei* by azoles. *Daru.* 2010;18:276-80.
27. Hiller D, Sanglard D, Morschhauser J. Overexpression of the MDR1 gene is sufficient to confer increased resistance to toxic compounds in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:1365-71. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1365-1371.2006>
28. Correa RA. Evaluación de mutaciones del gen *ERG11* como causa de resistencia al fluconazol en aislamientos clínicos de pacientes colonizados por *C. albicans* obtenidas de adultos mayores en la unidad de cuidado intensivo del Hospital Santa Sofía de Manizales - Colombia (tesis). Manizales: Universidad de Caldas; 2016.
29. Franz R, Kelly SL, Lamb DC, Kelly DE, Ruhnke M, Morschhäuser J. Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42:3065-72. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.12.3065>
30. Franz R, Ruhnke M, Morschhäuser J. Molecular aspects of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Mycoses.* 1999;42:453-8. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.1999.00498.x>
31. López-Ribot JL, McAtee RK, Lee LN, Kirkpatrick WR, White TC, Sanglard D, *et al.* Distinct patterns of gene expression associated with development of fluconazole resistance in serial *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42:2932-7. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.11.2932>
32. Sanglard D, Kuchler K, Ischer F, Pagani JL, Monod M, Bille J. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:2378-86. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.11.2378>
33. Khosravi Rad K, Falahati M, Roudbary M, Farahyar S, Nami S. Overexpression of *MDR-1* and *CDR-2* genes in fluconazole resistance of *Candida albicans* isolated from patients with vulvovaginal candidiasis. *Curr Med Mycol.* 2016;2:24-9. <https://doi.org/10.18869/acadpub.cmm.2.4.24>
34. Wirsching S, Michel S, Köhler G, Morschhäuser J. Activation of the multiple drug resistance gene *MDR1* in fluconazole-resistant, clinical *Candida albicans* strains is caused by mutations in a trans-regulatory factor. *J Bacteriol.* 2000;182:400-4. <https://doi.org/10.1128/JB.182.2.400-404.2000>
35. Wirsching S, Michel SM. Targeted gene disruption in *Candida albicans* wild-type strains: The role of the *MDR1* gene in fluconazole resistance of clinical *Candida albicans* isolates. *Mol Microbiol.* 2000;36:856-65. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01899.x>
36. Wirsching S, Moran GP, Sullivan DJ, Coleman DC. *MDR1*-mediated drug resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:3416-21. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.12.3416-3421.2001>

37. Karababa M, Coste AT, Rognon B, Bille J, Sanglard D. Comparison of gene expression profiles of *Candida albicans* azole-resistant clinical isolates and laboratory strains exposed to drugs inducing multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:3064-79. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.8.3064-3079.2004>
38. Kusch H, Biswas K, Schwanfelder S, Engelmann S, Rogers PD, Hecker M, *et al*. A proteomic approach to understanding the development of multidrug-resistant *Candida albicans* strains. *Mol Genet Genomics*. 2004;271:554-65. <https://doi.org/10.1007/s00438-004-0984-x>
39. Rogers PD, Barker KS. Genome-wide expression profile analysis reveals coordinately regulated genes associated with stepwise acquisition of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates. *Society*. 2003;47:1220-7. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.4.1220-1227.2003>
40. Park S, Perlin DS. Establishing surrogate markers for fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Microb drug Resist*. 2005;11:232-8. <https://doi.org/10.1089/mdr.2005.11.232>
41. Watamoto T, Samaranyake LP, Egusa H, Yatani H, Seneviratne CJ. Transcriptional regulation of drug-resistance genes in *Candida albicans* biofilms in response to antifungals. *J Med Microbiol*. 2011;60:1241-7. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.030692-0>
42. Morschhäuser J, Barker KS, Liu TT, BlaB-Warmuth J, Homayouni R, Rogers PD. The transcription factor Mrr1p controls expression of the *MDR1* efflux pump and mediates multidrug resistance in *Candida albicans*. *PLoS Pathog*. 2007;3:1603-16. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.030692-0>
43. Eddouzi J, Parker JE, Vale-Silva LA, Coste A, Ischer F, Kelly S, *et al*. Molecular mechanisms of drug resistance in clinical *Candida* species isolated from Tunisian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57:3182-93. <https://doi.org/10.1128/AAC.00555-13>
44. Marchaim D, Lemanek L, Sobel JD, Kaye KS. Fluconazole-resistant *Candida albicans* vulvovaginitis. *Obstet Gynecol*. 2012;120:1407-14. <https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e31827307b2>