



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

Trabajo Fin de Grado:

**MECANISMOS DE RESISTENCIA
ANTIFÚNGICOS
Y
NUEVOS ANTIFÚNGICOS EN
DESARROLLO**

Autor: Beatriz Valencia Torres

Tutor: Lucía Monteoliva Díaz

Convocatoria: Junio 2018

INDICE

1- RESUMEN	1
2- INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	1
3- OBJETIVOS	3
4- METODOLOGÍA	3
5- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	4
5.1- Mecanismos moleculares de resistencia a azoles	4
a) Activación de bombas de eflujo	4
b) Mutación de la enzima-diana	9
c) Desregulación de la expresión de la enzima-diana	11
d) Modificación de la ruta biosintética del ergosterol	12
5.2- Mecanismos moleculares de resistencia a equinocandinas	13
5.3- Antifúngicos en desarrollo para combatir la resistencia de los hongos	15
a) Pared celular	15
b) Membrana celular	16
c) Inhibidores específicos de Cyp51p fúngico	17
6- CONCLUSIONES	18
7- BIBLIOGRAFÍA Y NOTAS	19

1- RESUMEN

Las infecciones fúngicas han crecido significativamente en las últimas décadas, convirtiéndose en causas importantes de morbilidad y mortalidad, particularmente en pacientes inmunocomprometidos. Este incremento epidemiológico está asociado al limitado arsenal de antimicóticos del que se dispone, así como a su uso generalizado, que ha provocado el desarrollo de cepas resistentes con una susceptibilidad reducida al tratamiento de primera línea; azoles y equinocandinas. En esta revisión se explican detalladamente los recientes mecanismos moleculares de resistencia a azoles y equinocandinas, desarrollados por cepas de *Candida spp*, *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus fumigatus* que incluyen activación de bombas, mutación y desregulación de la enzima diana y alteración de la ruta de biosíntesis del ergosterol, con el fin de evitarlos y plantear nuevas estrategias antifúngicas que mejoren la calidad de vida del paciente.

2- INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

En los últimos años, las micosis invasoras se han presentado como un importante problema de salud pública produciéndose un incremento global en la incidencia, con altas tasa de morbilidad y mortalidad; más de 300 millones de personas de todas las edades y condiciones padecen una infección fúngica grave cada año y se estima que 1,66 millones fallecen.

La mayoría de las infecciones fúngicas invasoras (IFIS) están asociadas a otros problemas de salud, como el SIDA, el cáncer o trasplantes entre otros, como consecuencia de la supresión del sistema inmunitario que resulta de esas afecciones. En estos pacientes inmunodeprimidos, el género fúngico más habitual entre las levaduras es *Candida spp*, cuarta causa de infección nosocomial (IFIS-NOS) en los EEUU y Europa, además de ser el tercer agente microbiano en aislarse de hemocultivos en las unidades de cuidados intensivos (UCI), con un 25-38% de mortalidad atribuida. Le sigue, aunque menor medida, *Cryptococcus neoformans*, hongo también levaduriforme, que ha tenido su incremento antes de la terapia antirretroviral en los pacientes con VIH y su forma diseminada afecta del 5 al 10% de ellos. Por último, y respecto a los hongos filamentosos emergentes, la especie *Aspergillus fumigatus* es la principal causa de IFI en las personas receptoras de un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH). A diferencia de *Candida spp*, el pronóstico de la aspergilosis invasora (AI) va a depender más del estado real del sistema inmunológico del

paciente que de la resistencia de este hongo a los antifúngicos, por ello afecta en un 1,25% a pacientes de UCI, pero con una alta incidencia de mortalidad que puede ir de un 40-100%.¹

Como se observa, el alcance de las infecciones fúngicas es impactante, lo que lleva a medidas de control y tratamiento de las mismas. Sin embargo, hay pocas clases químicas existentes de fármacos antimicóticos existentes: azoles, polienos, pirimidinas, y equinocandinas.²

Los **azoles**, antifúngicos más ampliamente usados en el tratamiento preventivo de las IFIS, bloquean la ruta biosintética del ergosterol. El ergosterol es un componente principal de la membrana de la célula fúngica que cumple la misma función que el colesterol en la célula humana. El mecanismo de acción de los azoles se basa en la capacidad de unirse con el grupo hemo, que forma parte de muchas enzimas que participan en la síntesis de ergosterol, particularmente de la 14-alfa demetilasa, dependiente del citocromo P450 y codificada por el gen *ERG11*. Esta unión bloquea la síntesis de ergosterol, acumulándose esteroides 14-alfa metilo, lo que inhibe el crecimiento de la célula fúngica. El incremento en la resistencia a azoles se debe principalmente a que estos fármacos son **fungistáticos** y no fungicidas.

Los **polienos** (Anfotericina B) se unen a todos los esteroides de la membrana plasmática pero interactúan con mayor afinidad con el ergosterol, aunque sin inhibir su síntesis. Al unirse a este se genera la formación de canales por los que la célula fúngica pierde iones y moléculas, hasta que finalmente se rompe. Por eso, Anfotericina B es un fármaco **fungicida** y debido a su hidrofobicidad y pobre absorción gastrointestinal su formulación es liposomal (Ambisome®) y se administra de forma intravenosa.

Respecto a las **pirimidinas**, la 5-Fluorocitosina es el único antifúngico de uso clínico perteneciente a esta clase; fármaco **fungistático** que atraviesa la membrana fúngica gracias a la citosina permeasa de la membrana. En el interior, esta molécula sufre modificaciones a 5-fluoracilo y se incorpora a la cadena de ARN, lo que ocasiona la producción de ARN aberrante e inhibición celular.

Finalmente, las **equinocandinas** son lipopéptidos derivados a partir de un producto original sintetizado por un hongo conocido como *Glazea lozoyensis*. Además de la caspofungina, en la actualidad disponemos de otras dos equinocandinas con indicaciones clínicas; micafungina y anidulafungina, también **fungicidas**. La principal novedad de estos radica en su mecanismo de acción, ya que actúan sobre la 1,3-beta glucano sintasa, enzima

necesaria para la formación de polímeros de 1,3-beta-glucano, esenciales para la pared fúngica. La inhibición de esta enzima reduce la síntesis del glucano, lo que causa inestabilidad osmótica en la célula fúngica y su posterior muerte.

El uso generalizado y/o precoz de los antimicóticos anteriormente mencionados está teniendo graves consecuencias para la terapia antifúngica debido a la aparición de cepas resistentes. Sobre todo, la candidemia por *Candida glabrata* está siendo cada vez más común y los aislados de esta especie están aumentando su resistencia tanto a azoles (9,6%) como a equinocandinas (1%).³

En esta revisión se explorará la naturaleza biológica detallada y compleja de los mecanismos de resistencia a los medicamentos antimicóticos con énfasis en las dos clases principales utilizadas como terapia de primera línea, azoles y las equinocandinas, a fin de encontrar nuevos fármacos o estrategias terapéuticas capaces de interferir con dichos mecanismos, mejorando así la eficacia de los compuestos utilizados actualmente.

3- OBJETIVOS

Los objetivos específicos que se persiguen son:

- Hacer una revisión bibliográfica detallada de los mecanismos moleculares actuales de resistencia a azoles y equinocandinas que presentan varias especies de hongos (*Candida* spp, *Cryptococcus* spp y *Aspergillus fumigatus*).
- Recoger los nuevos antifúngicos en desarrollo para combatir los mecanismos de resistencia ya mencionados.

4- METODOLOGÍA

En el presente trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica de artículos científicos sobre los distintos mecanismos de resistencia que oponen los diferentes hongos (principalmente *Candida* spp, *Aspergillus fumigatus* y *Cryptococcus* spp) a los antifúngicos de primera línea (azoles y equinocandinas), así como recientes publicaciones sobre nuevos antimicóticos que plantean nuevas dianas terapéuticas que superan estas limitaciones de resistencia.

Las fuentes bibliográficas han sido PubMed, Google Scholar y datos genéticos obtenidos de Candida Genome database (CGD) para la comprensión y análisis de dos de los principales mecanismos de resistencia azoles: las bombas de eflujo y las mutaciones de la enzima diana

(lanosterol-14- α -desmetilasa). Las fechas de búsqueda han sido entre los meses de marzo a mayo de 2018.

5- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1- MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTENCIA A AZOLES

Existen cuatro mecanismos relacionados con la resistencia a azoles: a) activación de bombas de eflujo, b) mutación de la enzima diana, c) desregulación de la enzima diana y d) alteración de la ruta de biosíntesis de ergosterol (ver figura 1).

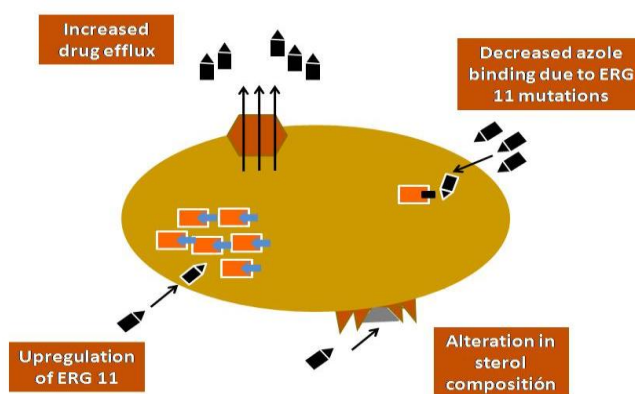


Figura 1: Mecanismos de resistencia a azoles³⁷

a) Activación de bombas de eflujo

El primero es la presencia de bombas de eflujo asociadas a la membrana que conducen a una disminución de la concentración de fármaco en el lugar de la diana. En los hongos, se describen dos clases principales de transportadores como involucrados en este mecanismo de resistencia: la superfamilia del cassette de unión al ATP (ABC) y la superfamilia del facilitador principal (SFM). Estas proteínas de membrana translocan activamente compuestos a través de las membranas celulares utilizando diferentes fuentes de energía.⁴

a.1) La superfamilia del cassette de unión al ATP (ABC)

Las proteínas ABC son transportadores primarios que emplean energía de la hidrólisis de ATP para impulsar la salida de medicamentos. Estructuralmente constan de doce dominios transmembrana (TMD) subdivididos en dos zonas —los cuales atraviesan la membrana seis veces a través de α -hélices— y dos dominios citoplásmicos de unión a nucleótidos (NBD) —que catalizan la hidrólisis de ATP—, de ahí que la topología típica de estas proteínas sea

[(NBD-TMD₆)₂] (ver figura 2). La secuenciación de los genomas de los diferentes hongos patógenos reveló que *A.fumigatus* era el hongo filamentoso modelo que poseía mayor número de bombas: con 49 transportadores de ABC, seguido de *C. albicans* con 28 proteínas ABC. Estas proteínas ABC, a su vez, se pueden clasificar en tres subfamilias conocidas: PDR (resistencia pleiotrópica a fármacos), MDR (resistencia a múltiples fármacos) y MRP (proteína asociada a resistencia a múltiples fármacos).⁵

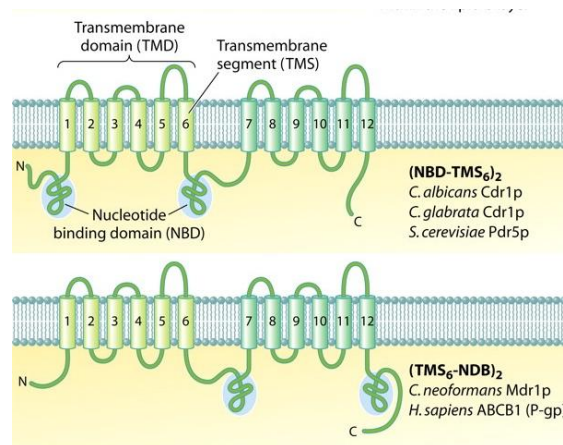


Figura 2: Transportador ATP¹²

- i. La subfamilia de proteínas PDR de *C. albicans* comprende siete miembros: Cdr1p, Cdr2p, Cdr3p, Cdr4p, Cdr11p [Cdr5p], Snq2 y York1. De ellos solo hay evidencias de que **Cdr1p** y **Cdr2p** están implicados en la resistencia a los fármacos azólicos. Estos transportadores son codificados por los genes *CDR* (*Candida Drug Resistance*) y la sobreexpresión constitutiva de estos dos genes (***CDR1*** y ***CDR2***) que codifican para las proteínas transportadoras Cdr1p y Cdr2p, constituyen el mecanismo de resistencia de *C. albicans* a todos los azoles. Es importante remarcar que los genes *CDR* están involucrados en la eliminación de diferentes azoles, mientras que la expresión aumentada de los genes *MDR* –que son los que codifican para la otra superfamilia de facilitador principal (MFS)– sólo confiere resistencia al fluconazol (FLZ)⁶. Además, se ha demostrado que esta regulación positiva de *CDR1* y *CDR2* en aislados clínicos resistentes se debe a mutaciones de ganancia de función (GOF) en el factor de transcripción de cluster de cinc (*Zn2 Cys6*) **Tac1p** y por la pérdida de heterocigosidad que lleva a la homocigosidad en el locus ***TAC1***.⁷

También en otras especies de *Candida*, homólogos funcionales de los genes *CDR1* y *CDR2* han sido descritos y asociados con resistencia a las drogas (ver tabla 1).

- ii. En *C. glabrata*, el alto nivel constitutivo de expresión de los genes transportadores ABC ***CgCDR1***, ***CgCDR2*** (también conocido como PDH1) y ***CgSNQ2*** juega un papel dominante en la resistencia a los azoles, sobre todo a FLZ y voriconazol (VCZ). Cuando se comparó en diversos estudios⁸ los niveles de expresión de *CgCDR1* con los de *CgCDR2*, se descubrió que en aislados que manifestaban simultáneamente los dos genes siempre se producía la regulación positiva de *CgCDR1*, mientras que *CgCDR2* se expresaba en niveles moderados. Estos hechos apoyaron la idea de que *CgCDR1* está más estrechamente asociado con la resistencia a los azoles que *CgCDR2*. Por otro lado, para el gen *CgSNQ2* se ha demostrado que puede desempeñar un papel determinante en este proceso, ya que se encuentra abundantemente en cepas cuyo fenotipo se relaciona con resistencia a múltiples azoles. La regulación positiva de estos tres genes se debe a la hiperactividad de un regulador de transcripción, Pdrp1p.⁹

Cómo mencionamos anteriormente, la mayor parte de bombas de flujo se encuentran en otros patógenos fúngicos que no son del género de *Candida*.

- iii. La sobreexpresión del gen ***AFRI*** (familia ABC) en *C. neoformans* puede provocar resistencia a FLZ. También se ha incluido recientemente el gen ***AFR2***, como culpable de resistencia a otros azoles y no sólo FLZ.
- iv. *A. fumigatus* contiene 12 genes que codifican el transportador de casete de unión a ATP, los cuales muestran una alta homología con las proteínas *S. cerevisiae* ***PDR5*** y ***PDR15*** que están implicadas en la resistencia a los azoles. Entre ellos, se identificó que ***CDR1B*** se sobreexpresaba en cepas resistentes a azoles, y la eliminación del gen ***CDR1B*** en una de dichas cepas dio como resultado una mayor susceptibilidad a itraconazol (ITZ). También se demostró que la depleción de otros dos transportadores más de tipo de ABC (***AtrF***, ***AtrI***) mostraron sensibilidad a los azoles. Los niveles de expresión del gen ***CDR1B*** (también llamado ***ABCB***) se indujeron ligeramente tras el tratamiento con VCZ, y otros genes transportadores (***ABCB*** / ***AFUIG0390***, ***ABCE***, ***MFSA***, ***MFSB*** y ***MFSC***) también mostraron estar regulados positivamente en respuesta al VCZ.¹⁰

Especie	Tipo de Bomba	Gen que la codifica y se sobreexpresa	Mutación culpable de la sobreexpresión del gen
<i>C.albicans</i>	ATP	<i>CDR1</i> Y <i>CDR2</i> (resistencia a todos los azoles)	Mutación GOF en el factor de transcripción Tac1p
	MFS	<i>MDR1</i> (<i>BENR</i>) (resistencia a FLZ) y <i>FLU</i>	Mutación de GOF en Mrr1p, Cap1p (en condiciones de estrés oxidativo) y Mcm1p
<i>C.glabrata</i>	ATP	<i>CgCDR1</i> , <i>CgCDR2</i> y <i>CgSNQ2</i>	Mutación en el factor de transcripción Pdr1p
	MFS	<i>CgFLR1</i>	No demostrado
<i>C.dublinensis</i> y <i>C.tropicalis</i>	MFS	<i>MDR1</i>	No demostrado
<i>A.fumigatus</i>	ATP	<i>CDR1B</i>	Tras el tratamiento de VVZ
<i>C.neoformans</i>	ATP	<i>AFR1</i> (resistencia a FLZ) Y <i>AFR2</i> (a todos los azoles)	No demostrado

Tabla 1: Clasificación de bombas y genes que las codifican de los diferentes hongos

a.2) La superfamilia del facilitador principal (MFS)

La segunda clase principal de transportadores de fármacos que participa en el desarrollo de la resistencia a múltiples fármacos en levaduras es MFS. Reciben dicho nombre puesto que están involucrados en simporte, antiporte y uniporte de diversos sustratos. A diferencia de la superfamilia ABC, estos son transportadores activos secundarios y utilizan el gradiente electroquímico de protones para impulsar el eflujo del fármaco en contra el gradiente de concentración a través de la membrana (ver figura 3). Estos transportadores MFS se caracterizan por tener numerosos dominios transmembrana (TMD) y su estructura generalmente comprende 12 o 14 TMD putativos con un intercalante bucle citoplasmático. Las proteínas MFS, de interés en esta revisión, realizan su función por protón antiporte y se clasifican en dos subfamilias: DHA1 (con 12 TMS) y DHA2 (con 14 TMS).¹¹

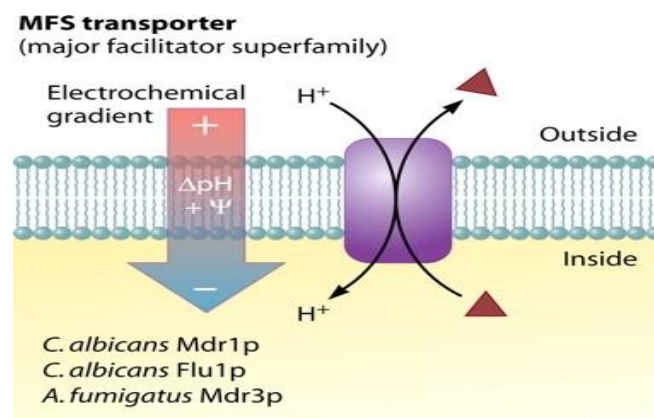


Figura 3: Transportador MFS ¹²

- i. A partir del genoma de *C. albicans* se reveló que de 95 proteínas MFS agrupadas en 17 familias que tiene sólo una proteína se había visto implicada en el eflujo de antifúngicos **Mdr1p**. Su sobreexpresión no sólo ha visto implicada en la resistencia a azoles de *C. albicans* (**CaMdr1p**), sino también de *C. dubliniensis* (**CdMdr1p**) y *C. parapsilosis* (**CpMdr1p**).¹²

La proteína CaMdr1p pertenece a la subfamilia DHA1. El gen que la codifica es **MDR1** (también denominado *BENR*, de resistencia a benomil), fue el primer gen transportador de MFS que se caracterizó y fue clonado por su capacidad de conferir resistencia a fluconazol, N-óxido de 4-nitroquinolina, cicloheximida, benomil, metotrexato y cerulenina en *S. cerevisiae*. La sobreexpresión heteróloga de **MDR1** en *Saccharomyces cerevisiae* confiere sólo resistencia a FLZ, pero no a otros azoles, lo que demostró que la sobreexpresión de **MDR1** es específica de FLZ.⁵

La regulación positiva de **MDR1**, al igual que en los genes *CDR* de *C. albicans*, también se debe a mutaciones de GOF, pero en este caso en otro factor de transcripción de Zinc (Zn2 Cys6) **Mrr1p** (que regula el gen transportador **MDR1**) seguido de la pérdida de la heterocigosidad¹³. Además, se han notificado otros dos reguladores positivos adicionales de **MDR** en *C. albicans*: **Cap1p**, factor de transcripción regula la expresión de **MDR1** en condiciones de estrés oxidativo, y **Mcml1p**, requerido para la inducción completa de **MDR1** en la mutación *benomyl* (o mutación de GOF en **Mrr1p**).

Por último, hay otro gen de *C. albicans* que codifica un segundo transportador MFS, **FLU1**. La expresión de **FLU1** en esta cepa no solo media resistencia a FLZ sino también a cicloheximida.⁷

Otros homólogos de **MDR1** se encuentran en *C. dubliniensis* y *C. tropicalis*, llamados **CdMDR1** y **CtMDR1**, los cuales se sobreexpresan en cepas con susceptibilidad reducida a FLZ.

- ii. Aislados clínicos obtenidos de individuos infectados por VIH con candidiasis orofaríngea¹⁴ informaron un alto nivel de resistencia a FLZ por la regulación al alza de **MDR1**, mientras que menos de la mitad de los aislamientos presentaron regulación positiva de *CDR*. **Dichos estudios demostraron que la regulación positiva de **MDR1** es el principal mecanismo de resistencia a FLZ en estas dos especies**, debido a que el gen *CdCDR1* en muchas cepas de *C. dubliniensis* sufre mutaciones puntuales siendo inactivado y *CdCDR2* es mínimamente expresado.

- iii. En *C. glabrata*, el homólogo de *MDR1* es *CgFLR1* y la importancia de *CgFLR1* en la resistencia a azoles aún no se ha demostrado, puesto que está eclipsado por el papel tan importante de las bombas ATP en *C. glabrata*.¹⁵

b) Mutación de la enzima diana

Otro mecanismo de resistencia a los azoles implica mutaciones puntuales no sinónimas en el gen *ERG11*. El gen *ERG11* codifica la diana principal de los antifúngicos azólicos, la enzima **lanosterol-14- α -desmetilasa**, la cual es responsable del principal paso en la ruta biosintética del ergosterol (la eliminación oxidativa del grupo 14 α -metilo del lanosterol y conversión en ergosterol, componente esencial de la membrana celular de los hongos). Por lo tanto, las mutaciones en *ERG11* originan modificaciones en la secuencia de aminoácidos y, en consecuencia, cambios en la estructura de la enzima diana lanosterol 14- α -desmetilasa, produciendo una alteración en el sitio de unión a los azoles.¹⁶

En especies distintas de *Candida*, principalmente *Aspergillus* y en menor medida *Cryptococcus*, las sustituciones de aminoácidos en esta enzima diana son su principal mecanismo de resistencia a los compuestos azólicos disminuyendo la unión de los mismos.

- i. *Aspergillus* spp tiene dos genes que codifican 14- α -demethylase: *CYP51A* y *CYP51B*. Sin embargo, la resistencia a los azoles está más asociada con la mutación en *CYP51A*, con más de treinta mutaciones identificadas. De esas treinta, las sustituciones de aminoácidos en la proteína codificada por *CYP51A* que se informaron con mayor frecuencia fueron Gly54, Pro216, Phe219, Met220 y Gly448, confiriendo resistencia adquirida a los azoles¹⁰. Sin embargo, en la mayoría de los aislados resistentes a itraconazol de diferentes estudios, los principales “hots spots” fueron en los codones **54, 220 y 138**.

Todas estas mutaciones conocidas tienden a surgir como consecuencia de la exposición a terapias de azoles a largo plazo (aproximadamente 4 meses) contra la aspergilosis crónica, y la mayoría confieren resistencia a ITZ, mientras que la resistencia a VCZ y/o posaconazol (PSZ) depende de la modificación específica del aminoácido. Por ejemplo, mutaciones asociadas con un cambio en glicina 54(Gly54) y 138(Gly138) por triptófano (**Gly54Trp**) – (**Gly138Trp**) causaron resistencia cruzada a ITZ y PSZ, pero no a VCZ. Mientras que la mutación de la metionina en la posición 220 por arginina (**Met220Arg**), confiere MIC altas a VCZ, ITZ o PSZ¹⁷. Por ello, la posición y naturaleza de la alteración dentro de la estructura proteica (Cyp51Ap) determinan el patrón de resistencia cruzada de

azol, ya que proximidad del sitio de unión al hemo afecta la unión de cualquier droga. Los aminoácidos G54 y G138 están localizados muy cerca de la abertura de los canales de acceso de ligando de la proteína. Como las glicinas se reemplazan por el residuo de triptófano grande e hidrófobo, no cierra lo suficiente el canal perturbando el acomplamiento de moléculas grandes, como ITZ y PSZ, pero no de moléculas pequeñas como el VCZ; que carece de esa cola larga que interactúa con el grupo hemo¹⁸ (ver figura 4).

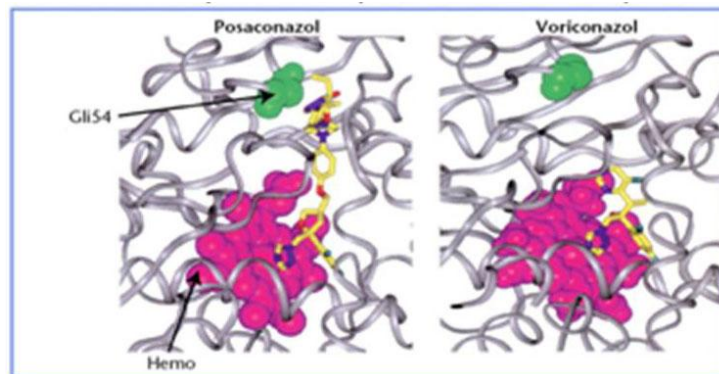


Figura 4: Diferencias en la unión a la enzima de PSZ y VCZ relacionadas con la menor posibilidad de aparición de resistencia del primero³⁸

También se ha identificado resistencia en pacientes no tratados con azoles que se deriva del medio ambiente y parece estar impulsada por el uso agrícola de azoles. Estos casos implicaron una sustitución en la posición 98 (de leucina a histidina) y una repetición en tándem de 34 bases (TR) en el promotor *CYP51A* (**TR34 / L98H**), que conduce a la sobreexpresión. Además, estas cepas resistentes se pueden cruzar con susceptibles, y producir una potenciación en la transferencia durante el ciclo sexual.¹⁹

- ii. En *C. neoformans*, el análisis de *ERG11* a partir de cinco aislados provenientes de episodios recurrentes de meningitis criptocócica mostró una mutación puntual unida a sustitución de aminoácidos: **Gly484Ser**, que no se observó en aislados parenterales susceptibles a azoles. La sustitución de aminoácidos Gly484Ser, corresponde con el Gly464Ser de *C. albicans* en *ERG11*, que confiere un cambio en el dominio de unión al hemo de la enzima lanosterol-14- α -desmetilasa, lo que conduce a una disminución de la unión del FLZ, ocurriendo lo mismo en *C. neoformans*.²⁰

En la especie *C. albicans*, las mutaciones de *ERG11* pueden jugar un papel menor que el aumento del flujo de fármaco.

- iii. En *C. albicans*, mediante la secuenciación del gen *ERG 11 (CYP51A1)*, han sido detectadas varias mutaciones puntuales en cepas resistentes a FLZ y VCZ: Arg467Lys,

Ile471Thr, Gly464Ser, Ser405Phe y Lys143Arg²¹. Siendo las sustituciones más comunes el reemplazo de una **arginina** por una **lisina** en el aminoácido 467 (**Arg467Lys**) y el cambio de una **glicina** por una **serina** en el aminoácido 464 (**Gly464Ser**), ambas alteran el entorno de la unión al hemo en Cyp51Ap (lanosterol-14 α -desmetilasa).

c) Desregulación de la expresión de la enzima diana

La sobreexpresión de *ERG11* da como resultado concentraciones aumentadas de lanosterol 14 α -desmetilasa y, en consecuencia, se requieren cantidades mayores del antifúngico para inhibir la enzima. En presencia de FLZ, *C. albicans* experimenta un mecanismo de retoalimentación en respuesta a la depleción de ergosterol con sobreexpresión del gen *ERG11*. Pero también, en ausencia de FLZ los aislados resistentes expresan *ERG11* a niveles más altos en comparación con los aislados susceptibles expuestos al fármaco. Por lo tanto, este mecanismo se ha descrito para muchos aislados resistentes a FLZ de *C. albicans*. La sobreexpresión de *ERG11* ha sido reportada para aislamientos de *C. glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei*, pero la contribución de este mecanismo a la resistencia a los azoles en estas especies sigue siendo en gran parte desconocido.

Dos mecanismos son los que explican la sobreexpresión constitutiva de *ERG11* en aislados resistentes a azoles:

- i. **La amplificación del gen *ERG11* o aneuploidía segmentaria específica**, que consiste en la formación de un isocromosoma que contiene dos copias del brazo izquierdo del cromosoma 5(i (5L)), donde reside el *ERG11*; y mediante la duplicación del cromosoma completo. El isocromosoma está fusionado en el telómero a un homólogo de longitud completa del cromosoma 5.²²
- ii. **Mutación en el gen que codifica el factor de transcripción de dedos de zinc Upc2p**, que regula la expresión de *ERG11* y la mayoría de los genes de biosíntesis de ergosterol dando como resultado la sobreexpresión de *ERG11* en *C. albicans*. El análisis de secuencia de los alelos *UPC2* en aislados clínicos de *C. albicans* reveló que el aislamiento resistente contenía una sustitución de un solo nucleótido en un alelo *UPC2* que dio como resultado un intercambio **Gly648Asp** en la proteína codificada (Upc2p). La introducción del alelo mutado en una cepa susceptible produjo una regulación positiva de *ERG11* y una resistencia aumentada a FLZ. Por tanto, la sobreexpresión de *UPC2* reduce la susceptibilidad a los azoles, mientras que su interrupción da como resultado

hipersuceptibilidad a los azoles, lo que podría constituir una nueva diana terapéutica con la que contrarrestar las evasiones de esta levadura.¹³

d) Alteración de la ruta de biosíntesis del ergosterol

Finalmente, un mecanismo de resistencia menos común es la alteración de otras enzimas de la ruta biosintética de los esteroides, a parte de la lanosterol-14- α -desmetilasa, que da como resultado la sustitución del ergosterol por otros esteroides en la membrana citoplásmica.

La exposición a compuestos de azol da como resultado el agotamiento del ergosterol de la membrana fúngica y la acumulación del producto tóxico 14 α -metil-3,6-diol, el cual inhibe el crecimiento del hongo²³. Por lo tanto, el mecanismo de resistencia que oponen los patógenos fúngicos consiste principalmente en la **inactivación de la enzima esteroil Δ 5, 6-desaturasa (Erg3p)**, codificada por *ERG3*, que cataliza la conversión del intermedio 14 α -metilfecosterol no tóxico acumulado debido a la actividad azólica, en el esteroil tóxico 14 α -metil-3,6-diol (uno de los pasos finales en la ruta biosintética del ergosterol) (ver figura 5). De esta forma, las mutaciones de pérdida de función de *ERG3* protegen a las células del hongo del daño producto tóxico 14 α -metil-3,6-diol, debido a la acumulación de 14 α -metilfecosterol que sustituye al ergosterol y conduce a membranas funcionales, negando la acción de los azoles en la ruta biosintética del ergosterol.²⁴

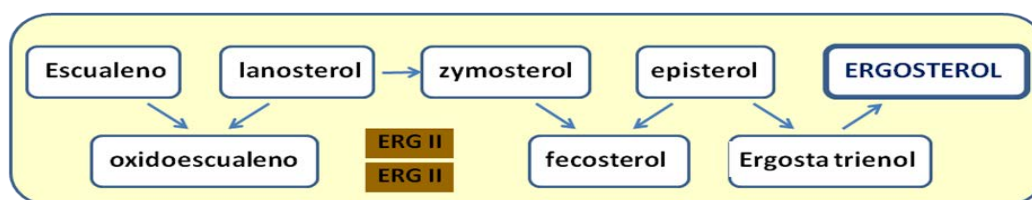


Figura 5: Ruta biosintética del ergosterol⁷

Las mutaciones *ERG3* son suficientes para la resistencia a los azoles en *C. albicans* y *C. dubliniensis*, aunque rara vez se asocian con una resistencia de alto nivel y parecen ser un mecanismo bastante poco común en los aislados *in vitro*, pero no se han relacionado ni con *Aspergillus* ni con *C. neoformans*. Las mutaciones *ERG3* se asocian con resistencia cruzada a polienos (Anfotericina B), ya que las membranas celulares carecen de su ergosterol objetivo.

De los mutantes *ERG3* descritos en *C. albicans* y *C. dubliniensis*, solo algunos experimentan mutaciones que conducen a cambios de aminoácidos en *ERG3* y a la inactivación de la enzima²⁵. Hasta ahora, solo se ha confirmado una alteración genética, el cambio de Asp19Glu, obtenido *in vitro* por cultivos en serie de una cepa salvaje de *C. albicans*

en presencia de FLZ. Se han informado también otros cambios de aminoácido en *C. dubliniensis*, pero el mecanismo exacto necesita ser aún investigado. Sin embargo, sí que quedó demostrado que ambos aislados también mostraron una sobreexpresión significativa de *ERG11*, que se induce como un mecanismo compensador en los aislados mutantes *ERG3*.

Además, el hecho de que los mutantes *ERG3* de *C. albicans* no se relacionen con resistencias de alto nivel a azoles se debe a que los mutantes *ERG3* carecen de las balsas ricas en ergosterol asociadas con el desarrollo de las hifas, que es la forma más patogénica del hongo.²⁶

Por último, otras mutaciones de los genes de la vía de biosíntesis de ergosterol (*ERG6*, *ERG24* y *ERG2*) también se incluyen en la susceptibilidad reducida a los azoles.

5.2- MECANISMO MOLECULAR DE RESISTENCIA A EQUINOCANDINAS

Las equinocandinas se unen de manera no competitiva a las subunidades Fks1p y Fks2p de la enzima β -1,3 glucano sintasa, y bloquean la síntesis de β -1,3-D glucano –parte integral de la estructura y función de la pared celular de los hongos–. Esta interrupción da como resultado una pared celular altamente permeable conduciendo a la lisis celular en las levaduras y al crecimiento aberrante de hifas en mohos.

La disminución de afinidad a la diana también forma parte del mecanismo de resistencia a las equinocandinas. La β -1,3 glucano sintasa está codificada por los genes *FKS1* y *FKS2* en diferentes especies de hongos. Hasta ahora, la resistencia a las equinocandinas se ha atribuido a mutaciones específicas que conducen a sustituciones de aminoácidos en dos regiones diferentes de estos genes (puntos calientes 1 y 2 o HS1 y HS2), dando como resultado alteraciones en la conformación de las subunidades Fks1p y Fks2p, así como menor afinidad a las equinocandinas. En la mayoría de especies de *Candida*, y sobre todo en *C. albicans*, las mutaciones de resistencia se producen en las dos regiones anteriormente mencionadas de *FKS1*, que incluyen residuos Phe641 -Pro649 y Arg1361, en cambio en *C. glabrata* en regiones equivalentes de *FKS2*.^{27, 6}

i. En los aislados clínicos *C. albicans* se encuentran mutaciones en dos regiones de punto caliente de *FKS1*: [HS1: la región entre 641 y 648 (que comprende un dominio citoplásmico / sitio de unión de equinocandinas)] y [HS2: región 1345-1365]. Estos sitios son responsables de la mayoría de las mutaciones que confieren resistencia a las

equinocandinas, incluida la más descrita: la sustitución de la serina en la posición 645 (**Ser645**), por otros aminoácidos como **Pro**, **Phe** y **Tyr**. Las sustituciones de aminoácidos disminuyen entre 50 y 3000 veces la sensibilidad de la β -1,3 glucano sintasa al fármaco y elevan los valores de MIC de 5 a 100 veces.²⁸

- ii. En cambio, en *C. glabrata* las mutaciones están también en HS1, pero tanto en las regiones de *FKS1* como *FKS2*. Siendo las más conocidas las mutaciones en **HS1** de **FKS2**. El cambio en **Ser663** de *FKS2* (equivalente a *C. albicans* Ser645) es la sustitución de aminoácido más prominente (> 50%). Otras sustituciones encontradas en fracasos clínicos incluyen **Ser629** en *FKS1* y **Phe659** en *FKS2*²⁹. Además, a partir de los datos de la CIM en modelos de infección con ratones, se evidenció que no todas estas mutaciones de *FKS* causan el mismo nivel de resistencia, puesto que el patrón de susceptibilidad a la equinocandina de 1,3- β -D-glucano sintasa depende de la sustitución de aminoácidos y su localización (por ejemplo, las mutaciones en Ser629 (*FKS1*) y Ser663 (*FKS2*) mostraron los CI50 más altos para todos los fármacos de equinocandina).³⁰

También, el nivel de resistencia a la equinocandina puede depender de la expresión relativa de los genes *FKS*, que puede variar más de 20 veces. La expresión de *FKS2* es dependiente de calcineurina y regulada negativamente por FK506. Por lo tanto, la resistencia conferida por *FKS2* puede revertirse después del tratamiento con el inhibidor de calcineurina FK506.³¹

Por último, hay que tener en cuenta que el uso previo de equinocandinas es un factor de riesgo para el fracaso de la terapia con equinocandina tanto en *C. glabrata* como en *C. albicans*, ya que la exposición principalmente a caspofungina, produce la activación de la vía de integridad celular, dando como resultado una expresión mejorada de los genes *FKS*.³⁰

Las alteraciones en las subunidades Fks1p y Fks2p también se han asociado con la resistencia a la equinocandina en otros hongos.

- i. La aparición de la sustitución de aminoácidos S678P en el gen *AfFKS1* (responsable de la síntesis de glucano en *A. fumigatus*) junto con un aumento en la producción de quitina para mantener su pared celular, se ha atribuido al desarrollo de resistencia en mutantes de *A. fumigatus*. Esta sustitución de aminoácidos en el gen *AfFKS1*, se debe a una mutación puntual en la posición del nucleótido 2086 (de T a C).³²

- ii. *Cryptococcus neoformans* es intrínsecamente resistente a las equinocandinas sin alteración de *FKS*.

5.3- ANTIFÚNGICOS EN DESARROLLO PARA COMBATIR LA RESISTENCIA DE LOS HONGOS

El descubrimiento de nuevos antimicóticos sintéticos es un reto porque los hongos son organismos eucariotas, al igual que las células humanas. A pesar de ello, se han realizado numerosos enfoques durante la última década para encontrar nuevas alternativas. Los nuevos agentes cuentan con las características del “antifúngico ideal” (toxicidad reducida, actividad fungicida, no fungistática, y amplio espectro contra hongos patógenos resistentes), la mayoría están en evaluación preclínica y clínica y ofrecen mecanismos de acción más selectivos (ver figura 7).

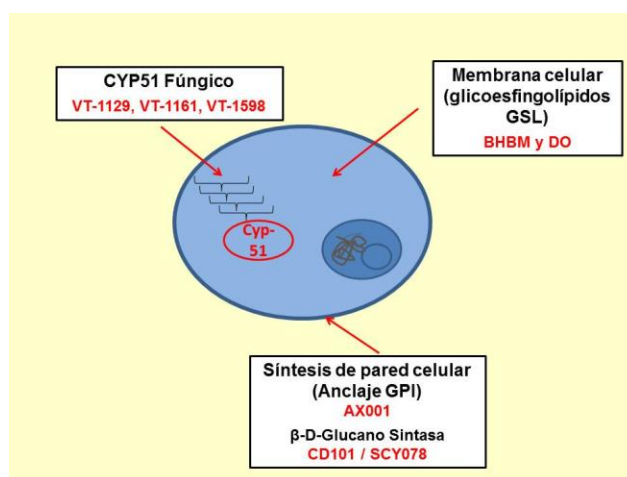


Figura 7: Blancos celulares y bioquímicos de agentes de investigación contra patógenos fúngicos resistentes a los medicamentos (modificada de ³⁶)

a) Pared celular

La pared celular es una diana muy accesible de los hongos, puesto que es esencial para estos y no se encuentra en los huéspedes mamíferos (ver tabla 2).

Inhibición de la biosíntesis de glucosilfosfatidilinositol fúngico: AX001

Uno de los objetivos potenciales en el desarrollo de nuevos antimicóticos fueron las proteínas ancladas a glucosilfosfatidilinositol (GPI), puesto que muchas de ellas se transportan a la pared celular y participan en la síntesis y ensamblaje de esta, convirtiéndose en esenciales para la etapa adhesión celular (“adhesinas”). AX001 (anteriormente E-1210) es un compuesto antifúngico frente a la pared celular en investigación preclínica que impide la acilación del inositol mediante la inhibición de la

inositol aciltransferasa (Gwp1p) –la cuarta enzima en la vía de anclaje de GPI– evitando así la maduración de proteínas ancladas a GPI, y como consecuencia, la pared se vuelve frágil deteniéndose el crecimiento de los hongos³³. Se ha demostrado una potente actividad in vivo en infecciones fúngicas invasivas, incluida la candidiasis invasora causada por aislados resistentes a azoles y equinocandina, aspergilosis y fusariosis. Además su toxicidad fue tan baja como la de FLZ, en un ensayo de citotoxicidad utilizando células humanas HK-2.³⁴

Inhibición de la glucano sintasa: CD101 y SCY-078.

Las equinocandinas se encuentran entre la clase más nueva de agentes antifúngicos al actuar inhibiendo la (1→3)-β-D-glucano sintasa específica de la pared celular de los hongos, sin embargo deben administrarse por vía intravenosa diariamente por su estructura compleja de lipopéptidos .

- **CD101 (biafungina)** es una nueva equinocandina semisintética actualmente en desarrollo que ha sido modificada estructuralmente para conferir una semivida larga (>80 horas), permitiendo una administración intravenosa una vez a la semana. CD-101 muestra una potente actividad in vitro contra especies de *Candida* y *Aspergillus*, con una baja frecuencia de mutaciones en regiones de punto caliente de *FKS1* y *FKS2* como se observó con anidulafungina y caspofungina, y también tiene actividad in vitro contra una de las especies más resistentes emergentes *C. auris*.
- **SCY-078** es otro inhibidor de la glucan sintasa actualmente en desarrollo, pero de administración oral. SCY-078 (antes MK-3118) es el derivado de enfumafungina y el primero en su clase de antifúngicos triterpénicos, con el mismo mecanismo de acción que las equinocandinas, y cuya absorción es gastrointestinal. Este compuesto estructuralmente novedoso, tiene principalmente actividad fungicida contra especies de *Candida* (especialmente *C. albicans*, *C. glabrata*) y *C. tropicalis* en estudios de susceptibilidad in vitro por microdilución de caldo. SCY-078 puede ser prometedor contra el patógeno *C. auris* según dos estudios in vitro recientes, y también tiene un papel en el tratamiento de aspergilosis invasivas según estudios preclínicos.³⁵

b) Membrana celular

Una de las estrategias de búsqueda de antifúngicos frente a la membrana se centra en los glicosfingolípidos (GSL), una clase de glicolípidos situados en las membranas celulares y que son factores de virulencia clave en una variedad de hongos. Dos compuestos

recientemente identificados hacia esa diana fueron: N'-(3-bromo-4-hidroxibencilideno)-2-metilbenzohidrazida (**BHBM**) y su derivado, 3-bromo-N'-(3-bromo-4-hidroxibencilideno) **benzohidrazida (D0)**, que disminuyen los niveles de glucosilceramida (GlcCer) fúngico pero no de mamífero. Cuando los hongos carecen de la GSL, concretamente de la GlcCer, no pueden replicarse, BHBM y DO son bien tolerados en animales y pronto entrarán en ensayos clínicos en humanos.³⁶

c) Inhibidores específicos de Cyp51p fúngico: VT-1129, VT-1161 y VT-1598

La clase de antifúngicos azoles además de la inhibición de lanosterol 14 α -desmetilasa fúngica (a su vez conocida como Cyp51p) también pueden inhibir las enzimas del citocromo P450 humanas (Cyp450), que son responsables del metabolismo de diversas sustancias y drogas.⁹

Nombre	Espectro de actividad	Diana	Mecanismo de acción
AX001	<i>Candida</i> spp, (except <i>C.krusei</i>) y mohos <i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> y <i>Scedosporium</i>	Pared celular	Interrupción la síntesis del glicosilfosfatidilinositol (GPI)
CD101 / SCY-078	<i>Candida</i> spp (incluida <i>C.auris</i>) y <i>Aspergillus fumigatus</i>	Pared celular	Inhibidor de (1 \rightarrow 3)- β -D-glucano sintasa
BHBM y D0	Levaduras oportunistas	Membrana celular	Inhibición de glicoesfingolípidos (GSL)
VT-1129 y VT-1161	<i>Candida</i> spp y <i>Cryptococcus</i>	Vía metabólica	Inhibidor de Cyp51p fúngico

Tabla 2: Clasificación de antifúngicos en desarrollo

Por ello, se ha reemplazado el grupo de unión a triazol con un tetrazol que se liga menos al sitio activo de las enzimas Cyp450 de mamíferos, dando lugar a compuestos con inhibición más específica de Cyp51p fúngica, llamados VT-1129, VT-1161 y VT-1598 (ver tabla 2). Uno de estos agentes se encuentra actualmente en ensayos clínicos (VT-1129), y los otros dos en ensayos preclínicos: **VT-1129** tiene potente actividad in vitro contra especies de *Candida* y *Cryptococcus*, pero especialmente contra *Cryptococcus gattii* con susceptibilidad reducida a fluconazol³⁴; **VT1161** presentó alta eficacia contra aislados de *Candida* resistentes a FLZ y está en ensayos in vivo para candidiasis vulvovaginal recidivante y tratamientos de onicomicosis; **VT-1598** presenta la actividad más potente contra mohos, incluidas varias especies de *Aspergillus* y *Rhizopus arrhizus*, así como aislamientos de hongos.

6- CONCLUSIONES

- Las micosis se están presentando como un problema de salud pública por el incremento global de su incidencia debido al desarrollo de mecanismos de resistencia a la terapia de primera línea; azoles y equinocandinas.
- En la actualidad, los principales mecanismos de resistencia a azoles que se encontraron en *Candida* spp, *Cryptococcus* spp y *A. fumigatus* son: bombas de flujo, desregulación y sobreexpresión de enzima diana y alteración de la biosíntesis del ergosterol. Las sobreexpresión de bombas de tipo ATP tienen especial importancia en las especies *C. albicans* y *A. fumigatus*, ya que poseen los genes *CDR* que las codifican, en cambio, los transportadores MFS aparecen más en las especies *C. dubliniensis* y *C. tropicalis* y los genes *MDR* que los codifican sólo producen resistencia a fluconazol.
- La mutación de la enzima lanosterol-14- α -desmetilasa (Cyp51Ap) podría considerarse el principal mecanismo de resistencia de *A. fumigatus*, debido a un cambio de un aminoácido Gly54 por triptófano que ocasiona una alteración en la unión del grupo hemo de Cyp51Ap a los azoles.
- La sobreexpresión de esta enzima diana viene dada por dos mecanismos: amplificación del gen *ERG11* y mutación del gen que codifica el factor de transcripción Upc2p; mecanismos solo confirmados en la especie *C. albicans*.
- La alteración ruta de la biosíntesis del ergosterol por la inactivación de la enzima esterol Δ 5,6-desaturasa (Erg3p) es de los mecanismos menos comunes y está asociado a resistencias de bajo nivel.
- Por otro lado, las equinocandinas se encuentran entre las clases más nuevas de antifúngicos, sin embargo cada vez hay más especies resistentes a ellas, cómo *C. albicans* y *C. glabrata* por el desarrollo de mutaciones en los puntos calientes (HS1 y HS2) de los genes *FKS1* y *FKS2* responsables de la expresión de la glucan sintasa.
- Estos acontecimientos han provocado la investigación por parte de la comunidad científica de nuevas estrategias para combatir la resistencia de estos hongos, cómo la interrupción de la maduración de las proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) en la pared, disminución de los glicoesfingolípidos (GSL) de membrana e inhibición específica del Cyp51p fúngico.

7- BIBLIOGRAFÍA Y NOTAS

- ¹ Moreno, X. (2014). Epidemiología de las enfermedades fúngicas invasoras. *Acta científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas*, 17(2), 75-80.
- ² Pemán, J., salabert, M. (2013). Epidemiología y prevención de las infecciones nosocomiales causadas por especies de hongos filamentosos y levaduras. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31 (5), 328-341. doi.org/10.1016/j.eimc.2013.02.002.
- ³ Camps, I.R. (2010) Estudio poblacional prospectivo sobre candidemia en España (estudio CANDIPOP) Recuperado de <https://www.seimc.org/contenidos/gruposdeestudio/geiras/dcientificos/estudiosyensayos>
- ⁴ Campoy, S., Adrio, J. L. (2017). Antifungals. *Biochemical Pharmacology*, 133, 86-96. doi:10.1016/j.bcp.2016.11.019
- ⁵ Prasad, R., Rawal, M. K. (2014). Efflux pump proteins in antifungal resistance. *Front. Pharmacol*, 5, 202. doi:10.3389/fphar.2014.00202
- ⁶ Scorzoni, L., de Paula e Silva, A., Marcos, C., Assato, P.A. (2017). Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis. doi:10.3389/fmicb.2017.00036
- ⁷ Cowen, L.A., Sanglard, D., Rogers, P. D., Perlin, D. S. (2015). Mechanisms of Antifungal Drug Resistance. doi:10.1101/cshperspect.a019752
- ⁸ Sanguinetti, M., Posteraro, B., Fiori, B., Ranno, S. (2005). Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 668–679. doi:10.1128/AAC.49.2.668-679.2005.
- ⁹ Fuentesfria, A., Pippi, B., Dalla Lana, D., Donato, K. and Andrade, S. (2018). Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. *Applied microbiology*, 66, 12-13. doi:10.1111/lam.12820
- ¹⁰ Goldman, G. H., Hagiwara, D., Watanabe, A., y Kamei, K. (2017). Epidemiological and Genomic Landscape of Azole Resistance Mechanisms in *Aspergillus*. doi:10.3389/fmicb.2016.01382
- ¹¹ Prasad, R., Redhu, A. K., Shah, A. H. (2016). Transportadores de MFS de especies de *Candida* y su papel en la resistencia clínica a los medicamentos. *FEMS Yeast Research*, 16 (4), doi:10.1093/femsyr/fow043
- ¹² Cannon, R. D., Lamping, E., Holmes, A. R. (2009). Efflux-Mediated Antifungal Drug Resistance. *Clin.Microbiol.Rev.* 22 (2), 291-321. doi:10.1128 /CMR.00051-08
- ¹³ Dunkel, N., Liu, T. T., Barker, K. S., Homayouni, R. (2008). A gain-of-function mutation in the transcription factor Upc2p causes upregulation of ergosterol biosynthesis genes and increased fluconazole resistance in a clinical *Candida albicans* isolate. *Eukaryot. Cell* 7, 1180–1190. doi:10.1128/EC.00103-08
- ¹⁴ Perea, S., López-Ribot, J. L., Wickes, B. L., Kirkpatrick, W. R., et al. (2002). Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1695–1703. doi:10.1128/AAC.46.6.1695-1703.2002
- ¹⁵ Bennett, E., Kuang-HuaChen, Miyazaki, T. (2007). The bZip transcription factor Cgap1p is involved in multidrug resistance and required for activation of multidrug transporter gene *CgFLR1* in *Candida glabrata*. doi:10.1016/j.gene.2006.08.010
- ¹⁶ Xiang, M. J., Liu, J. Y., Ni, P. H., Wang, S., Shi, C., Wei, B., et al (2013). *Erg11* mutations associated with azole resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 13, 386–393. doi:10.1111/1567-1364.12042
- ¹⁷ Howard, S. J., Cerar, D., Anderson, M. J., Albarrag, A., et al (2009). Frequency and evolution of Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 1068–1076. doi:10.3201/eid1507.090043
- ¹⁸ Chowdhary, A., Sharma, C., Meis, J. F. (2017). Azole-Resistant Aspergillosis: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. *The Journal of Infectious Diseases*, 216, (3), 436-444. doi:10.1093/infdis/jix210
- ¹⁹ Chowdhary, A., Sharma, C., van den Boom, M., Yntema, J. B. et al (2014). *Aspergillus fumigatus* multi-azole-resistant en el ambiente en Tanzania. *J. Antimicrob. Chemother*, 69, 2979-2983. doi:10.1093 / jac / dku259

- ²⁰ Bosco-Borgeat, M. E., Mazza, M., Taverna, C. G., Córdoba, S. et al (2016). Amino acid substitution in *Cryptococcus neoformans* lanosterol 14- α -demethylase involved in fluconazole resistance in clinical isolates. *Rev. Argent Microbiol*, 48, 137–142. doi:10.1016/j.ram.2016.03.003
- ²¹ Xiang, M. J., Liu, J. Y., Ni, P. H., Wang, S., Shi, C., Wei, B., et al. (2013). *Erg11* mutations associated with azole resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res*, 13, 386–393. doi:10.1111/1567-1364.12042
- ²² Selmecki, A., Forche, A. and Berman, J. (2006). Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*. *Science*, 313, 367–370. doi:10.1126/science.1128242
- ²³ Sanglard, D. (2016). Emerging threats in antifungal-resistant fungal pathogens. *Front. Med. (Lausanne)*, 3, 11. doi:10.3389/fmed.2016.00011
- ²⁴ Vale-Silva, L. A., Coste, A. T., Ischer, F., Parker, J. E., Kelly, S. L., Pinto, E. et al (2012). Azole resistance by loss of function of the sterol $\Delta 5,6$ -desaturase gene (*ERG3*) in *Candida albicans* does not necessarily decrease virulence. *Antimicrob. Agents Chemother*, 56, 1960–1968. doi:10.1128/AAC.05720-11
- ²⁵ Morio, F., Pagniez, F., Lacroix, C., Miegville, M. and Le Pape, P. (2012). Amino acid substitutions in the *Candida albicans* sterol $\Delta 5,6$ -desaturase (*Erg3p*) confer azole resistance: characterization of two novel mutants with impaired virulence. *J. Antimicrob. Chemother*, 67, 2131–2138. doi:10.1093/jac/dks186
- ²⁶ Martel, C. M., Parker, J. E., Bader, O., Weig, M., Gross, U., Warrilow, A. G., et al. (2010). Identification and characterization of four azole-resistant *erg3* mutants of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 54, 4527–4533. doi:10.1128/AAC.00348-10
- ²⁷ Patil, A., Majumdar, S., (2017) Echinocandins in antifungal pharmacotherapy. *Pharmacy and Pharmacology* 69,12,1635-1660. doi:10.1111/jphp.12780
- ²⁸ Balashov, S. V., Park, S., and Perlin, D. S. (2006). Assessing resistance to the echinocandin antifungal drug caspofungin in *Candida albicans* by profiling mutations in *FKS1*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 50, 2058–2063. doi:10.1128/AAC.01653-05
- ²⁹ Garcia-Effron, G., Lee, S., Park, S., Cleary, J. D. and Perlin, D. S. (2009). Effect of *Candida glabrata* *FKS1* and *FKS2* mutations on echinocandin sensitivity and kinetics of 1,3-beta-D-glucan synthase: implication for the existing susceptibility breakpoint. *Antimicrob. Agents Chemothe.* 53, 3690–3699. doi:10.1128/AAC.00443-09
- ³⁰ Pham, C. D., Bolden, C. B., Kuykendall, R. J., and Lockhart, S. R. (2014). Development of a Luminex-based multiplex assay for detection of mutations conferring resistance to Echinocandins in *Candida glabrata*. *J. Clin. Microbiol*, 52, 790–795. doi:10.1128/JCM.03378-13
- ³¹ Perlin, D. S. (2015). Echinocandin resistance in *Candida*. *Clin. Infect. Dis*, 61(6), 612–617. doi:10.1093/cid/civ791
- ³² Rocha, E. M., Garcia-Effron, G., Park, S. and Perlin, D. S. (2007). A Ser678Pro substitution in *Fks1p* confers resistance to echinocandin drugs in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 51, 4174–4176. doi:10.1128/AAC.00917-07
- ³³ Watanabe, N. A., Miyazaki, M., Horii, T. et al (2012). E1210, a new broad-spectrum antifungal, suppresses *Candida albicans* hyphal growth through inhibition of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis. *Antimicrob Agents Chemother*, (56), 960-71
- ³⁴ Wiederhold, N. P. (2017). Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. *Infection and Drug Resistance*, 10, 249–259. doi:10.2147/IDR.S124918
- ³⁵ Scorneaux, B., Angulo, D., Borroto-Esoda, K., Ghannoum, M. et al (2017) .SCY-078 is fungicidal in time-kill studies against *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother*.
- ³⁶ McCarthy, M.W., Kontoyiannis, D.P., Cornely, O.A., Perfect, J-R. and Walsh, T.J. (2017). Novel Agents and Drug Targets to Meet the Challenges of Resistant Fungi. *The Journal of Infectious Diseases*, 216, (3), 474-483. doi:10.1093/infdis/jix130
- ³⁷ Pino, C. (2007) Posaconazol: Antifúngico de amplio espectro. Recuperado de <http://slideplayer.es/slide/3436666/release/woothee>
- ³⁸ Carretero ,M. (2007). Posaconazol. *Offam*, 4, (26), 126-128.