



DETERMINACIÓ DE MECANISMES DE RESISTÈNCIA AL VORICONAZOL EN SOQUES D'ASPERGILLUS SECCIÓ NIGRI

TREBALL DE FINAL DE GRAU

NÚRIA GRAU PRADES

JAVIER CAPILLA LUQUE
JOSÉ FRANCISCO CANO LIRA

Juny de 2018, Tarragona
Grau de Biotecnologia

AGRAÏMENTS

M'agradaria donar les gràcies a tots els integrants de la Unitat de Micologia de la URV per haver-me acollit i tractat com una més, gràcies a vosaltres em vaig sentir com a casa. En especial però, agraeixo a l'Alba que em permetés ajudar en la seva investigació i que resolgués tots els meus dubtes amb infinita paciència, gràcies a tu he pogut créixer molt en l'àmbit professional.

Per descomptat, agraeixo a Javier Capilla haver-me tutoritzat el treball i que hagi estat sempre tant disposat a quedar per parlar-ne i donar-me consell.

També agraeixo a la URV la oportunitat d'haver tingut aquesta experiència.

Sense cada un de vosaltres aquest treball no hauria sigut possible.

1. ÍNDEX

2. DADES DEL CENTRE	4
3. RESUM I PARAULES CLAU.....	5
4. INTRODUCCIÓ	6
4.1. FONGS	6
4.2. ASPERGILLUS.....	7
4.2.1. <i>Morfologia</i>	7
4.2.2. <i>Taxonomia</i>	8
4.2.3. <i>Aspergil·losis</i>	10
4.3. AZOLS I MECANISMES DE RESISTÈNCIA	11
4.3.1. <i>Mecanisme d'acció</i>	11
4.3.2. <i>Mecanismes de resistència</i>	11
4.4. LACASES	13
5. HIPÒTESIS DEL TREBALL I OBJECTIUS	14
6. MÈTODES.....	15
6.1. SOQUES	15
6.2. PREPARACIÓ D'INÒCULS	15
6.3. DETERMINACIÓ DE CMIS.....	16
6.4. DETECCIÓ DE MUTACIONS EN EL GEN <i>CYP51A</i>	17
6.5. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT LACASA	18
6.6. QUANTIFICACIÓ D'ERGOSTEROL.....	19
7. RESULTATS I DISCUSSIÓ	21
7.1. DETERMINACIÓ DE CMIS.....	21
7.2. MUTACIONS EN EL GEN <i>CYP51A</i>	22
7.3. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT LACASA	24
7.4. QUANTIFICACIÓ D'ERGOSTEROL.....	28
8. CONCLUSIONS.....	30
9. PERSPECTIVES DE FUTUR.....	31
10. BIBLIOGRAFIA	33
11. AUTOAVALUACIÓ	36
ANNEXOS.....	I
ANNEX I: IMATGES DELS HALOS DE LACASA	II
ANNEX II: LLISTAT DE MUTACIONS.....	VI

2. DADES DEL CENTRE

Aquest treball està basat en les pràctiques realitzades en la Unitat de Microbiologia de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la URV, departament de Ciències Mèdiques Bàsiques (DCMB). Aquestes pràctiques van tenir lloc en la seva totalitat en les instal·lacions d'aquesta facultat, en el carrer de Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Tarragona.

L'estructura interna del DCMB comprèn 12 unitats funcionals i dues comissions específiques. Els investigadors del DCMB formen part de grups de recerca consolidats amb una producció científica destacada.

La Unitat de Micologia es dedica a l'estudi, identificació i caracterització de fongs. Per a això disposa d'un grup especialitzat en taxonomia; que s'encarrega de fer estudis taxonòmics d'espècies fúngiques a partir de mostres de múltiples ambients i localitats utilitzant tant tècniques clàssiques com moleculars; i un grup especialitzat en micologia mèdica, que estudia els factors gènics implicats en la virulència de fongs d'importància clínica i caracteritza els mecanismes d'infecció que aquests utilitzen; desenvolupa noves tècniques histològiques de diagnòstic i fa estudis de sensibilitat antifúngica, *in vitro* i *in vivo*.

La Unitat de Micologia és un centre de referència en l'àmbit hospitalari quant a la identificació fongs oportunistes, i està especialitzada a fer estudis de tipat molecular de fongs responsables d'infeccions nosocomials (les produïdes al centres sanitaris).

A més, aquesta unitat col·labora estretament amb el Grup de Microbiologia Ambiental, especialitzat en estudis amb bacteris usats com a indicadors de la qualitat de l'aigua destinada al consum humà, té experiència de contractes amb companyes farmacèutiques, centres hospitalaris i l'administració pública i, a part de les diferents publicacions per part dels seus investigadors, ha coeditat l'*Atlas of Clinical Fungi* amb el Centre de Col·leccions de Cultius de Fongs de *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS), d'Utrecht. També forma part de l'IISPV (Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili) que gestiona l'activitat de recerca biomèdica en diferents institucions de la zona.

3. RESUM I PARAULES CLAU

L'aspergil·losi invasiva és una malaltia infecciosa causada per fongs del gènere *Aspergillus* que resulta letal entre el 30 i el 95% dels casos, segons els òrgans afectats, i que en les darreres dècades ha vist augmentada la seva incidència de forma paral·lela a l'increment de població immunodeprimida. El tractament d'elecció contra aquesta malaltia inclou el grup dels antifúngics azòlics, però cada vegada hi ha més aïllats d'*Aspergillus* capaços de resistir els tractaments amb aquests compostos. Si bé *Aspergillus fumigatus* és el principal agent causal, altres espècies d'*Aspergillus* també poden causar aspergil·losi invasiva sent fongs d'*Aspergillus* secció Nigri els segons en incidència. Encara que els mecanismes de resistència antifúngica estan extensament estudiats en *A. fumigatus*, aquests es desconeixen en espècies no-*fumigatus*. En aquest treball s'han inclòs soques d'*Aspergillus* de la secció Nigri amb diferents graus de sensibilitat al voriconazol i s'han estudiat possibles mecanismes de resistència tals com la presència de mutacions en la proteïna diana dels azols, Cyp51A, la degradació de l'antifúngic per part de les lacases i l'augment de la quantitat d'ergosterol en la membrana. No es va poder establir una relació entre les mutacions trobades i la resistència de les soques, però sí entre aquesta i l'activitat lacasa. Es va observar que les soques amb major resistència a voriconazol contenien una major concentració d'ergosterol; amb la qual cosa sembla que els mecanismes de resistència al voriconazol de la secció Nigri difereixen dels descrits per *A. fumigatus*.

Paraules clau: *Aspergillus*, CMI, CYP51, mutacions puntuals, lacases, ergosterol, voriconazol, resistència antifúngica.

4. INTRODUCCIÓ

4.1. FONGS

El regne dels fongs està compost per un gran grup d'organismes eucariotes amb característiques molt diverses, des d'éssers unicel·lulars aquàtics a grans bolets terrestres. Els fongs es caracteritzen per ser éssers unicel·lulars (llevats) o pluricel·lulars (filamentosos) amb un alt contingut de quitina a les seves parets cel·lulars (amb excepció dels Mucorales) i ergosterol a la seva membrana plasmàtica. Són organismes heteròtrofs que obtenen els nutrients per absorció, prèvia digestió extracel·lular per secreció d'enzims. S'estima que existeixen al voltant de 2,2 a 3,8 milions d'espècies (Hawksworth i Lücking, 2017), de les quals només se n'han descrit 120.000.

La majoria de fongs són sapròfits, sent uns grans descomponedors de matèria orgànica i jugant un paper essencial en el cicle de la matèria i l'energia. Els fongs també poden establir relacions mutualistes amb altres microorganismes com és el cas de les micorrizes o els líquens, però també poden actuar com a patògens de plantes així com d'animals aquàtics i terrestres. Han estat utilitzats des de l'inici de les societats humans com aliments en forma de bolets i en processos fermentatius en l'elaboració del pa o la cervesa. Més recentment, els fongs s'utilitzen també per a la producció de metabòlits secundaris, un dels casos més coneguts és la penicil·lina sintetitzada per fongs de la família *Penicillium* i utilitzada encara avui en dia com a antibiòtic.

Tot i així, els fongs també tenen efectes perjudicials ja que causen grans pèrdues econòmiques en camps de conreu així com en productes agrícoles (fig. 1). Moltes espècies també són capaces de produir micotoxines, tòxiques pels animals. A diferència d'altres microorganismes com ara bacteris i virus, els fongs presenten en



Figura 1. Nectarines infectades per *Aspergillus niger*

general baixa patogenicitat per a l'ésser humà i únicament els fongs dimòrfics (aquells que presenten creixement llevaduriforme i filamentós) poden ser considerats com a veritables fongs patògens primaris pels humans. La baixa infectivitat dels fongs en l'ésser humà, malgrat la gran exposició, és deguda principalment a l'elevada eficàcia del sistema immunitari en eliminar cèl·lules fúngiques dels teixits, principalment per l'acció dels neutròfils i els macròfags alveolars. Malgrat aquesta baixa patogenicitat, els casos d'infeccions fúngiques greus no han fet més que augmentar en les darreres dècades. Aquest augment s'ha anat produint de forma paral·lela a l'augment de població amb defectes immunitaris. Així doncs l'aparició de la SIDA, l'increment de transplantaments d'òrgans i de tractaments de llarga durada amb corticoesteroides així com l'ús de quimioteràpics contra el càncer, entre altres, han afavorit un augment en la incidència de micosis greus. Les espècies fúngiques amb capacitat de donar lloc a malalties greus en pacients immunodeprimits reben el nom de fongs oportunistes i, encara que es difícil fer un llistat de totes les espècies causants de infeccions oportunistes en l'ésser humà, actualment n'hi ha descrites unes 600 (Guarro, 2012; Hoog *et al.*, 2014).

Entre els fongs oportunistes, el gènere *Candida* és el més freqüentment aïllat en mostres clíniques, sent *C. albicans* la espècie més recurrent. Entre els fongs filamentosos, *Aspergillus* i, més concretament, *A. fumigatus* és la espècie amb major presència en infeccions humanes greus, seguit d'*Aspergillus* secció Nigri i secció Flavi.

4.2. ASPERGILLUS

El gènere *Aspergillus* va ser originalment descrit per Pier Antonio Micheli (1729) i comprèn al voltant de 250 espècies. Les espècies d'aquest gènere són aeròbiques i es troben en casi tots els ambients rics en oxigen. Normalment es troben com a contaminants en menjars amb midó, a més, poden desenvolupar-se sota condicions de gran pressió osmòtica i en ambients pobres en nutrients (oligòtrofs).

4.2.1. Morfologia

El nom *Aspergillus* prové de l'"aspergillum" (llatí) , l'estructura que forma les espores (conidis), que recorda a un instrument per escampar aigua beneïda amb

el mateix nom i es troba en totes les espècies del gènere, tot i que aproximadament un terç d'espècies també presenten una forma sexual (teleomorf). Aquesta estructura conidiòfora es pot trobar en l'extrem de les seves hifes septades.

El conidiòfor és l'estructura que suporta i dona lloc a les espores asexuals (conidis) i consisteix en un peu que es genera a partir del miceli somàtic i presenta en l'extrem terminal una vesícula. A sobre d'aquesta vesícula es disposen fiàlides que són les cèl·lules conidiogèniques que generen per mitosi els conidis. En algunes espècies d'*Aspergillus* també es poden observar unes cèl·lules entre la vesícula i les fiàlides, conegudes com mètules (fig. 2).

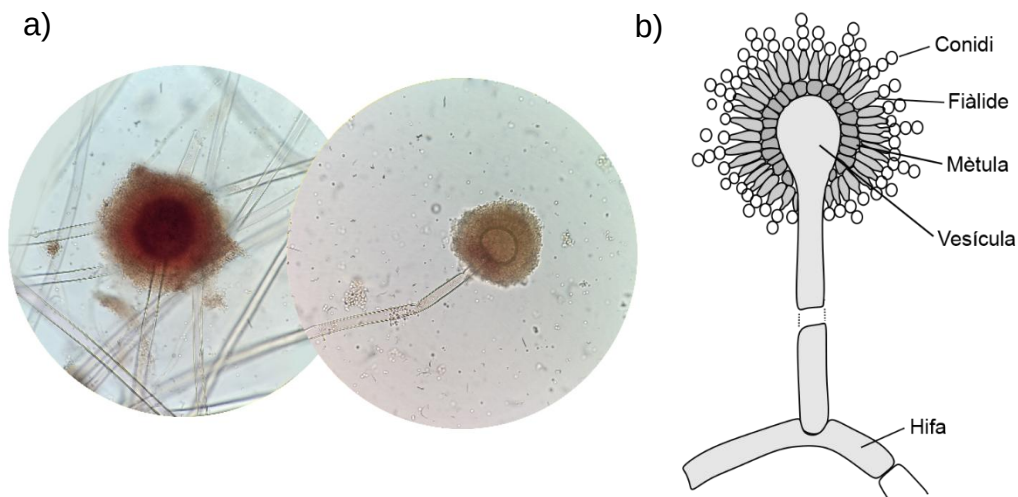


Figura 2. a) Microfotografies de conidiòfors d'*Aspergillus* sp. b) Esquema del conidiòfor i els seus components.

4.2.2. Taxonomia

El gènere *Aspergillus* es troba sota el fílum *Ascomycota*, classe *Eurotiomycetes*, ordre *Eurotiales*, família *Trichocomaceae*. Aquest gènere es troba dividit en 8 seccions, que engloben diferents espècies per característiques morfològiques i genètiques comunes; en el cas de la secció *Nigri* aquestes característiques són el color fosc de les colònies i conidis en forma de globus i diàmetres inferiors a 6µm.

Tradicionalment la classificació dels fongs es feia mitjançant la observació morfològica de les estructures reproductives, és per això que moltes espècies, incloent algunes del gènere *Aspergillus*, tenen noms diferents segons es parli de

la seva forma sexual (teleomorf) o asexual (anamorf). Les espècies tractades en aquest treball, però, són exclusivament asexuals.

La taxonomia de les espècies de *Aspergillus* resulta molt complexa i continua sense estar totalment resolta i, per aquest motiu, recentment aquestes s'han agrupat en seccions. A més, les diferències entre alguns taxons són molt petites, de manera que és difícil diferenciar-los amb certesa.

Actualment la classificació s'ajuda també de tècniques de biologia molecular, com la seqüenciació de genomes. La definició d'espècie en el camp de la micologia encara no està del tot clara, de manera que s'utilitza el criteri basat en el concepte de *phylogenetic species recognition* (PSR); aquest consisteix en la seqüenciació de certs gens que s'utilitzen com a marcadors i en el seu posterior anàlisi filogenètic. En el cas de les espècies d'*Aspergillus* aquests gens són el de la calmodulina, el de la β -tubulina i el de RPB2 (la segona subunitat més gran de la RNA polimerasa II), principalment.

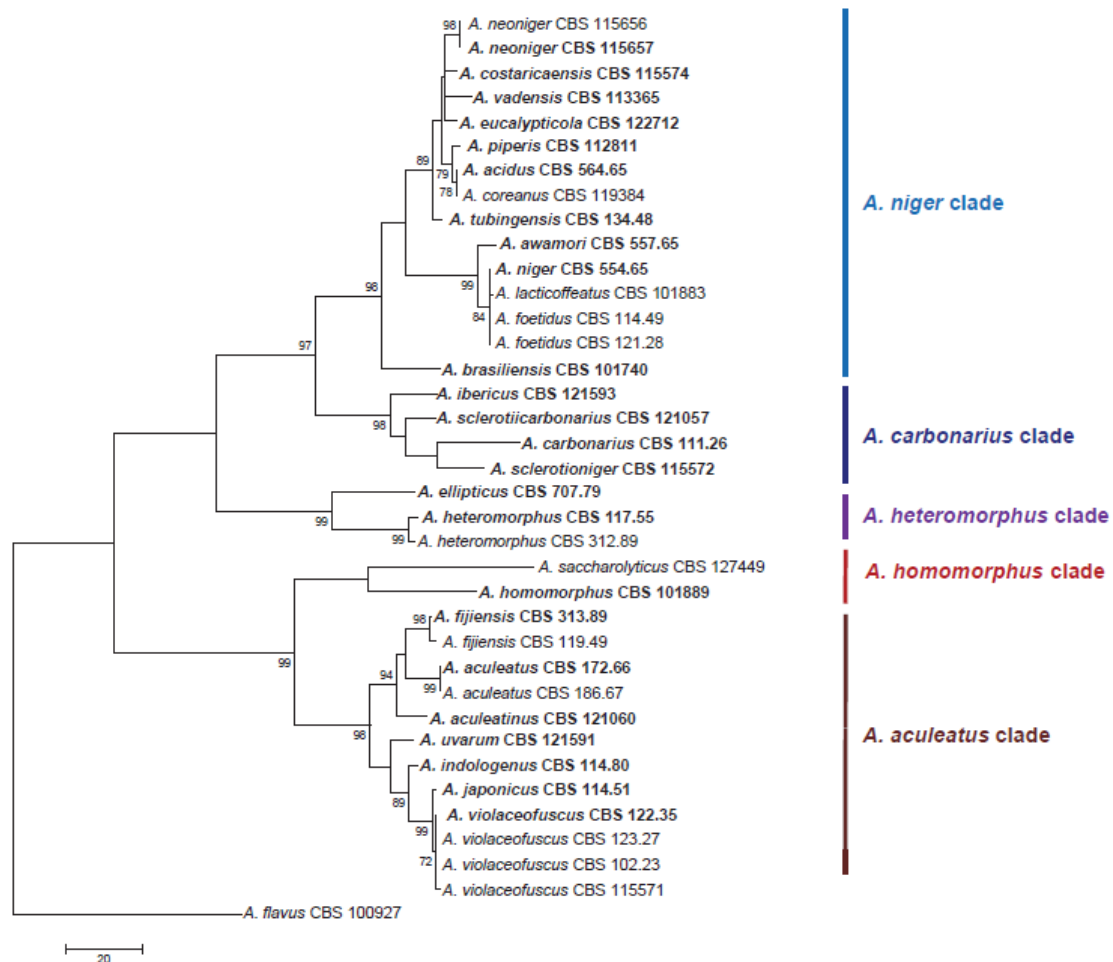


Figura 3. Arbre filogenètic de les espècies d'*Aspergillus* secció Nigri (Varga et al., 2011)

Mitjançant l'ús d'aquests sistemes de classificació taxonòmica podem afirmar que les espècies incloses en aquest treball, *A. brasiliensis*, *A. tubingensis* i *A. niger*, formen part del clade *A. niger*, dins la secció Nigri (fig. 3).

4.2.3. Aspergil·losis

Aspergil·losis és el nom donat a una gran varietat de malalties causades per la infecció de fongs del gènere *Aspergillus*. L'espècie causant més habitual és *Aspergillus fumigatus*, tot i que *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* o *Aspergillus nidulans*, d'entre altres, són també responsables d'infeccions greus.

La infecció es produeix principalment mitjançant la inhalació d'espores i poden donar lloc a aspergil·losi broncopulmonar al·lèrgica, crònica o aspergil·loma pulmonar. En el cas de pacients immunodeprimits, la primoinfecció pot donar lloc a quadres invasius que poden derivar en aspergil·losi sistèmica amb afectació multi orgànica incloent-hi el sistema nerviós central. El diagnòstic prematur és essencial per resoldre l'aspergil·losi invasora i aquest és un dels primers reptes als que s'enfronta el clínic. Degut a que l'aspergil·losi dona lloc a manifestacions clíniques poc específiques, i a que els *Aspergillus* poden actuar com a colonitzadors transitoris de vies aèries, sovint és necessari la combinació de diferents tècniques per tal de diagnosticar-la. Les imatges radiològiques, la biòpsia o els rentats broncoalveolars són algunes de les tècniques més utilitzades juntament amb la determinació de galactomanan o (1-3)- β -d-glucan sèrics (polisacàrids presents a la paret cel·lular) o la realització de cultius pel seu posterior estudi morfològic o molecular (Ullmann *et al.*, 2018). Un cop realitzada la correcta identificació de l'agent causal, el següent repte al que s'enfronta el clínic es l'establiment d'un tractament antifúngic adequat. Si bé en el cas d'*Aspergillus fumigatus* s'han establert punts de tall clínic que permeten diferenciar les soques sensibles als antifúngics dels resistents, en el cas de altres espècies aquests no s'han establert. El tractament d'elecció inclou els fàrmacs triazòlics (itraconazol, voriconazol, isavuconazol o posaconazol), o la amfotericina B liposomal en cas de resistència *in vitro* als anteriors (Chowdhary, Sharma i Meis, 2017).

Cal destacar que existeixen només 5 famílies d'antifúngics i.e, azols, equinocandines, poliens, al·lilamines i anàlegs de base. L'ús de les al·lilamines es troba limitat principalment a infeccions superficials i els anàlegs de base com la 5-fluorocitosina, només s'usen en combinació en casos excepcionals degut a la seva elevada toxicitat. La amfotericina B també presenta importants efectes tòxics pel que sovint cal interrompre el tractament per tal de revertir la toxicitat associada i les equinocandines han mostrat poca eficàcia (Nett i Andes, 2016). Així doncs, el tractament queda pràcticament limitat a l'ús dels azols.

4.3. AZOLS I MECANISMES DE RESISTÈNCIA

4.3.1. Mecanisme d'acció

Els azols actuen bloquejant la síntesi de l'ergosterol, un esterol que es troba en les membranes cel·lulars fúngiques. Aquest compost dona fluïdesa i permeabilitat a la membrana a més de permetre la funció d'algunes proteïnes, d'una manera similar al colesterol en les cèl·lules animals, i resulta imprescindible per la viabilitat dels fongs (Da Silva Ferreira *et al.*, 2005; Sharpe *et al.*, 2018).

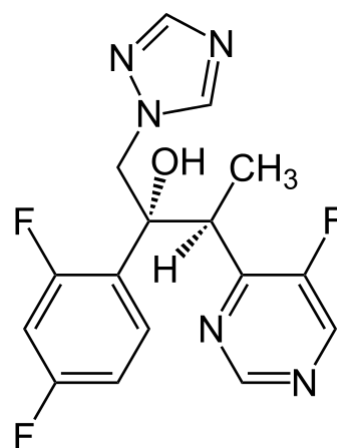


Figura 4. Estructura química del voriconazol

En concret, inhibeixen la síntesis de l'enzim 14- α -demetilasa (també anomenat Cyp51A), codificat pel gen *cyp51A* i involucrat en la ruta de síntesi de l'ergosterol. La inhibició d'aquest enzim provoca l'acumulació de precursors de l'esterol i la reducció de la quantitat d'ergosterol, provocant un efecte fungistàtic (inhibició del creixement fúngic) a baixes concentracions o fungicida (mort cel·lular) a altes concentracions (Nett i Andes, 2016).

4.3.2. Mecanismes de resistència

La resistència d'*Aspergillus fumigatus* als azols es va reportar per primera vegada als E.E.U.U. a finals dels 80 i a Espanya es comencen a detectar en l'ambient hospitalari al 2001 (Verweij, Mellado i Melchers, 2007). El principal mecanisme de resistència als azols descrit en *A. fumigatus* són mutacions puntuals a *cyp51A* i repeticions en tàndem en la seva regió promotora. S'han descrit mutacions puntuals en les posicions G54, P216, F219, M220 i G448 i

repeticions en tàndem en TR34/L98H;TTR46/Y121F/T289A que confereixen resistència a voriconazol o altres azols. A part d'aquests "hotspots" també s'han vist canvis d'aminoàcids en altres posicions (Y431, Y121, G138) en soques resistents (Mann *et al.*, 2003; Mellado *et al.*, 2004; Camps *et al.*, 2012; Krishnan Natesan *et al.*, 2012; Hagiwara *et al.*, 2016). Aquestes mutacions tendeixen a aparèixer durant tractaments perllongats amb fàrmacs azòlics i darrerament diversos estudis alerten sobre resistències creuades entre antifúngics fitosanitaris i d'ús hospitalari (Butts *et al.*, 2018).

Altres mecanismes s'han relacionat també amb la resistència als azols com ara sobre expressió de la proteïna diana Cyp51A, mecanismes d'efluxió per acció de bombes, rutes alternatives en la síntesi de l'ergosterol o degradació de l'antifúngic intra- o extra- cel·lularment (Hagiwara *et al.*, 2016) (fig. 5).

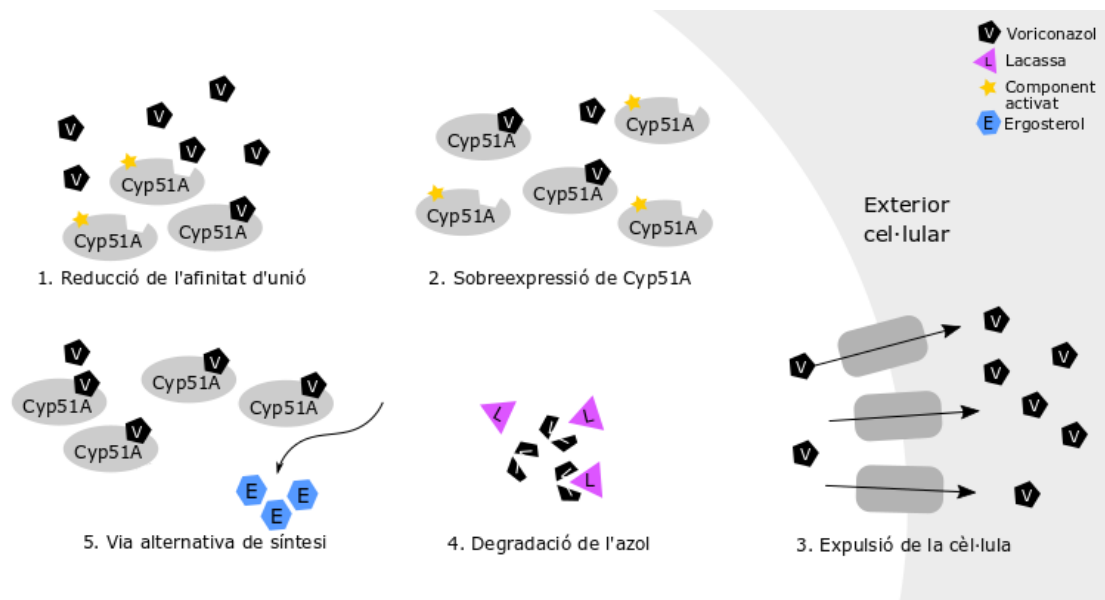


Figura 5. Representació dels mecanismes de resistència als azols més comuns en *A. fumigatus*.

Actualment estem presenciant un increment global de resistència als azols, cosa que suscita una gran preocupació ja que existeixen dubtes si l'ús dels azols continuarà sent efectiu els pròxims anys (Verweij, Mellado i Melchers, 2007; Howard *et al.*, 2009). Es desconeix si els mecanismes de resistència descrits en *Aspergillus fumigatus* actuen d'una manera similar en altres espècies del gènere, amb la qual cosa la problemàtica terapèutica s'estendria a altres espècies d'*Aspergillus*.

4.4. LACASES

Les lacases són enzims oxidants produïts per un gran nombre d'organismes, incloent els fongs del gènere *Aspergillus*. Aquests actuen sobre anells fenòlics utilitzant oxigen com a substrat secundari i transformant-lo en aigua. Les lacases tenen un gran ventall de substrats sobre els que poden actuar cosa que les fa d'especial interès en processos biotecnològics. Aquestes aplicacions inclouen la detoxificació de restes industrials produïdes en la indústria paperera, tèxtil i petroquímica però darrerament s'està investigant el seu ús en bioremediació per la seva capacitat de degradar pesticides i herbicides. Les lacases també s'utilitzen en certs sistemes de depuració d'aigües i inclús en cosmètics o en la producció de fàrmacs (Rodríguez Couto i Toca Herrera, 2006). Encara que hi ha poca bibliografia al respecte, s'ha hipotetitzat que les lacases fúngiques podrien estar implicades en la resistència als fàrmacs antifúngics. Estudis previs realitzats en *Talaromyces marneffe* (*Penicillium*), han revelat que les soques defectives en lacases són més sensibles a les espècies reactives d'oxigen, a la fagocitosi i als antifúngics que les soques salvatges (Sapmak et al., 2016). A més a més la producció de lacases s'ha vinculat amb una major virulència i resistència al tractament antifúngic en pacients de cryptococcosis (Sabiiti et al., 2014). El paper de les lacases en la resistència antifúngica en *Aspergillus* spp. no ha estat investigada i per aquest motiu em investigat la producció de lacases en *Aspergillus* secció Nigri i la seva relació amb resistència al voriconazol.

5. HIPÒTESIS DEL TREBALL I OBJECTIUS

El principal mecanisme de resistència als azols en *Aspergillus fumigatus* (espècie de referència) són les mutacions puntuals i repeticions en tàndem al gen *cyp51A*, que codifica per la proteïna que actua de diana pels azols. En altres espècies d'*Aspergillus* es desconeixen els mecanismes de resistència per aquests compostos i si aquests estan relacionats amb els descrits en *A. fumigatus*. És probable que els mecanismes de resistència en *Aspergillus spp.* no difereixin dels prèviament descrits per *A. fumigatus* ja que les diferents espècies comparteixen característiques fisiològiques, genètiques i ecològiques.

L'objectiu general del present treball és explorar si mutacions puntuals en *cyp51A* en el complex d'espècies *Aspergillus Nigri* són responsables de la resistència als azols i si aquestes mutacions són equivalents a les descrites en *A. fumigatus*. A més a més, s'investigarà si les soques amb major producció de lacases o aquelles amb major contingut d'ergosterol presenten una resistència augmentada al voriconazol amb la finalitat de detectar quin o quins factors son predominantment responsables de la resistència en la secció Nigri.

Per a la consecució de l'objectiu general es van establir els següents objectius concrets:

- Determinació de les concentracions mínimes inhibidores (CMI) de voriconazol en soques del complex Nigri.
- Dissenyar primers específics per a l'amplificació i posterior seqüenciació de *cyp51A*.
- Detecció de mutacions puntuals i repeticions en tàndem al gen *cyp51A* i correlació amb els valors de CMI.
- Quantificar l'activitat lacasa en soques d'*Aspergillus Nigri* abans i després de l'exposició a voriconazol i establir una correlació amb les CMIs
- Quantificar el contingut d'ergosterol abans i després de l'exposició a voriconazol i establir una correlació amb les CMIs obtingudes.

6. MÈTODES

6.1. Soques

Per la realització dels diferents estudis es van utilitzar un total de 14 soques pertanyents al gènere *Aspergillus* secció Nigri, clade *A. niger*. En concret, es disposa de 7 soques de l'espècie *A. niger*, 6 soques de l'espècie *A. tubingensis* i una soca de l'espècie *A. brasiliensis*, tal com mostra la taula 1. Aquestes són identificades pel seu número FMR, un sistema de classificació de la col·lecció de la Facultat de Medicina de Reus.

Espècie	FMR
<i>A. niger</i>	11894
<i>A. niger</i>	11898
<i>A. niger</i>	11254
<i>A. niger</i>	15388
<i>A. tubingensis</i>	11906
<i>A. niger</i>	15385
<i>A. tubingensis</i>	15389
<i>A. tubingensis</i>	14630
<i>A. tubingensis</i>	14635
<i>A. tubingensis</i>	14712
<i>A. tubingensis</i>	17207
<i>A. brasiliensis</i>	15386
<i>A. niger</i>	15441
<i>A. niger</i>	11900

Taula 1. Espècies i codis FMR de cadascuna de les soques utilitzades.

6.2. Preparació d'inòculs

Per realitzar els assajos descrits a continuació es van realitzar diferents d'inòculs. Aquests es van obtenir a partir de plaques amb cultius ben esporulats d'aproximadament 5 dies. Els cultius es van inundar amb solució salina amb 0.01% de Tween 20 i es van rascar suaument amb una nansa de cultiu per tal

6.3. Determinació de CMI's

L'assaig es va dur a terme en microplaques de 98 pouets, on es va disposar l'antifúngic en files a concentracions dobles seriades (rang de 16 a 0,031 µg/mL). Les columnes 11 i 12 es van fer servir com a control de medi (sense fàrmac ni microorganisme) i control positiu (sense fàrmac), respectivament. Les microplaques es van inocular amb 0,1mL de medi RPMI-1640 amb $0,4 \cdot 10^4$ - $5 \cdot 10^4$ conidis/mL a excepció de la columna 11, que es va fer servir com a control negatiu. A la darrera filera de la microplaca (filera H) s'hi va inocular una soca control (*quality control*), provinent de la col·lecció de l'ATCC, de la qual ja en sabíem la CMI (fig. 6). D'aquesta manera es podien assajar un total de 7 soques per microplaca.

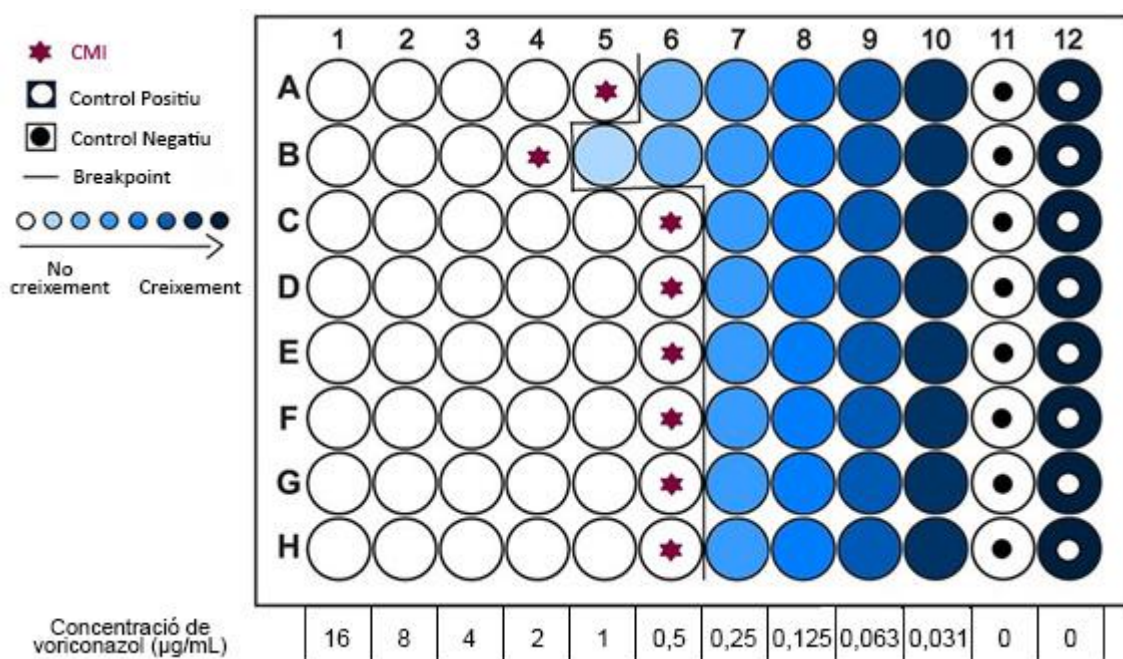


Figura 6. Esquema d'una microplaca de 96 pouets i la distribució de les concentracions de VRC assaïades.

Les microplaques es van incubar durant 48 hores a 30°C i, mitjançant la comparació amb el control positiu, es van assignar valors numèrics al creixement observable en cada pouet. El número 4 indicaria un creixement equivalent al control positiu i.e., 100% de creixement; el 3, un 75%; el 2, un 50%; el 1, un 25% i; el 0, un 0% de creixement. Definint-se la CMI d'un fàrmac vers la soca assajada com la concentració més baixa d'antifúngic a la que se li va assignar un 0.

6.4. Detecció de mutacions en el gen *cyp51A*

Es va buscar la seqüència del gen *cyp51A* d'*Aspergillus tubingensis* en la base de dades *Aspergillus Genome Database* per poder, a partir d'ella, dissenyar primers per l'amplificació d'aquest gen (taula 2).

Els primers es van dissenyar mitjançant el programa Oligo 7. Les característiques que es van considerar per aquest disseny van ser una energia lliure negativa fins un màxim de -3,6 kcal/mol, una temperatura de *melting* de 56 a 62 °C, una mida de 19 a 24 bases, un contingut de GC d'aproximadament 50% i l'absència d'estructures secundàries. Seguint aquestes premisses es van dissenyar quatre primers per l'amplificació del gen *cyp51A* (fig. 7).

Nom del primer	Seqüència	Temperatura de melting (°C)
<i>Asptu-F1</i>	ATGGCATATCTTGCTGTTGCA	60
<i>Asptu-R1</i>	TTAGTTCAAGGACCCCTTGGA	60
<i>cyp51A-F1</i>	GAACCCAGACGAGGAGAAG	60
<i>cyp51A-R2</i>	CGCAACATAATCCAAGAGCTA	60

Taula 2. Seqüència i TM dels primers utilitzats per l'amplificació de *cyp51A* d'*A. tubingensis*.

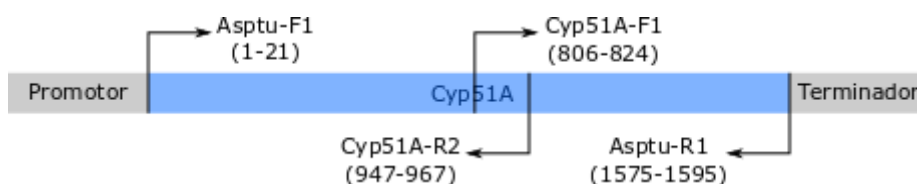


Figura 7. Esquema de la localització dels primers utilitzats per l'amplificació de *cyp51A* d'*A. tubingensis*.

Posteriorment es va dur a terme una amplificació del gen amb els *primers* dissenyats. Aquesta PCR es va efectuar amb una temperatura de desnaturalització de 98°C (1 minut), 25 cicles d'amplificació amb 10 segons a 98°C, 30 segons a la temperatura de *melting* (60°C) i 1,5 minuts a 72°C, l'extensió final va tenir lloc durant 10 minuts a 72°C. Els resultats d'aquesta PCR es van visualitzar en un gel d'agarosa a l'1,5%. La polimerasa utilitzada va ser EmeraldAmp GT PCR Master Mix, de la casa comercial TaKaRa.

Els productes de PCR, així com els *primers* utilitzats per a la seva amplificació, van ser enviats a l'empresa MacroGen per a la seva seqüenciació. Els resultats es van rebre en forma de cromatograma per correu electrònic. Es van alinear les seqüències obtingudes i aquesta nova seqüència conjunt es va comparar amb l'obtinguda de *Aspergillus Genome Database* mitjançant el programa SeqMan.

6.5. Determinació de l'activitat lacasa

Es van utilitzar medis de patata dextrosa agar (PDA) amb blau de bromofenol i diferents concentracions de voriconazol (0; 0,25; 1 i 2 µg/mL) i es van dispensar en plaques de Petri de plàstic de 8,6cm de diàmetre. Les plaques es van inocular en un punt central amb 40 µL d'una suspensió de conidis consistent en $1,25 \cdot 10^6$ conidis/mL ($5 \cdot 10^4$ conidis per placa). Aquestes es van deixar créixer 5 dies a 30°C i es van escanejar els resultats.

Mitjançant el programa ImageJ es va mesurar l'àrea ocupada per la colònia i l'àrea ocupada amb l'halo groc que indica activitat de la lacasa (fig. 8). La primera àrea es va restar de la darrera per tal d'obtenir l'àrea únicament de l'halo. A continuació es va efectuar una normalització dividint aquest nombre per l'àrea de la colònia, ja que si no es fes les colònies més grans sempre tindrien valors dels halos associats majors.

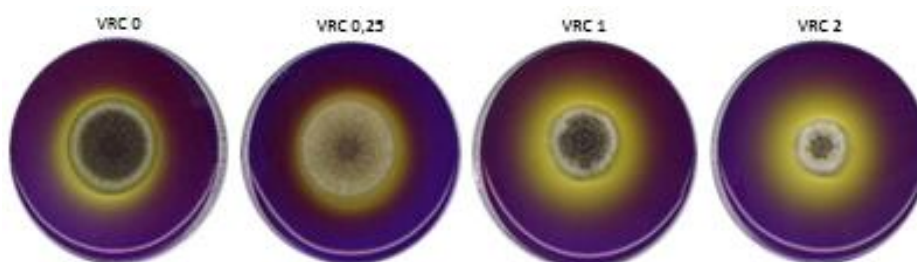


Figura 8. Exemple dels resultats obtinguts. Es pot observar la colònia en el centre de la placa i l'halo en groc. A la part superior s'indica la concentració de voriconazol (VRC) utilitzada.

6.6. Quantificació d'ergosterol

La quantificació de l'ergosterol es va realitzar en soques crescudes en medi YG amb o sense voriconazol per tal de valorar el contingut d'ergosterol en ambdues condicions. Es van inocular $1 \cdot 10^7$ cèl·lules en un erlenmeyer amb 50mL de medi YG i es va deixar créixer durant 12 hores en un shaker a 37°C i 180 rpm. Posteriorment el miceli es va filtrar amb filtres Monodur® i es va dividir entre dos erlenmeyers, un amb medi YG i 4µg/mL de VRC (condicions d'inducció) i l'altre, que servia de grup control, sense antifúngic. Es va deixar a 37°C i 180 rpm durant 8 hores.

A continuació, es va tornar a filtrar el miceli i es va guardar embolicat en paper d'alumini a -80°C (fig. 9).

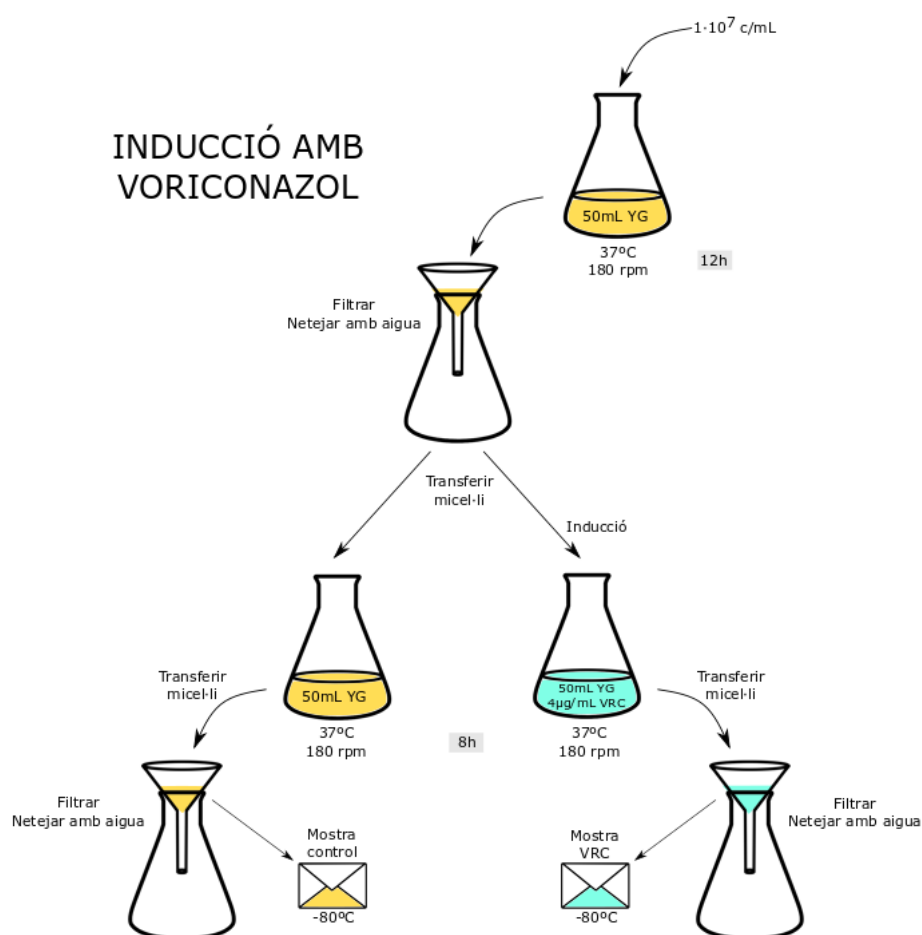


Figura 9. Esquema del procés d'inducció amb voriconazol.

Totes les mostres van ser liofilitzades per facilitar el trencament cel·lular posterior mitjançant una mòlta. La extracció d'ergosterol es va realitzar a partir de 60mg

de cada mostra que es van diluir en 6mL d'una solució de KOH (5,13M) i EtOH (65%). Després d'una hora en un bany d'aigua a 85°C es van afegir 2mL d'aigua i 6mL de n-heptà. Després de vortexar durant 3 minuts es va transferir la fase superior a un tub nou i es va deixar a -20°C. El contingut d'ergosterol va ser mesurat en Nanodrop (240 – 300nm) utilitzant n-heptà com a blanc. Aquest procediment està basat en l'usat per Arthington-Skaggs *et al.*, 1999.

7. RESULTATS I DISCUSSIÓ

7.1. Determinació de CMI

Al cap de 48h es va observar el creixement visible en els diferents pouets mitjançant l'ajuda d'un mirall invertit. Les CMI determinades per cada soca en front al voriconazol es poden veure en la taula 3.

Espècie	FMR	CMI (µg/mL)
<i>A. niger</i>	11894	0,25
<i>A. niger</i>	11898	0,25
<i>A. niger</i>	11254	1
<i>A. niger</i>	15388	1
<i>A. tubingensis</i>	11906	2
<i>A. niger</i>	15385	2
<i>A. tubingensis</i>	15389	2
<i>A. tubingensis</i>	14630	4
<i>A. tubingensis</i>	14635	4
<i>A. tubingensis</i>	14712	4
<i>A. tubingensis</i>	17207	4
<i>A. brasiliensis</i>	15386	8
<i>A. niger</i>	15441	8
<i>A. niger</i>	11900	16

Taula 3. CMI de les soques estudiades.

El rang de CMI és bastant gran, cobrint des de 0,25µg/mL fins a 16 µg/mL. Les diferents soques ja van ser escollides a partir d'un *screening* previ per tal de seleccionar soques amb sensibilitats diferents. Si bé en el cas de *A. fumigatus* s'han establert els punts de tall clínics i.e., valor de CMI que permet considerar si una soca és sensible o resistent al tractament, en altres espècies d'*Aspergillus* no existeixen aquests punts de tall. D'aquesta manera els protocols del CLSI per a E.E.U.U. estableixen que *A. fumigatus* es sensible a VRC si la CMI ≤ 0.25 µg/mL, resistent si la CMI ≥ 2 µg/mL i variable si la CMI es troba en valors entremitjos. En el cas de l'EUCAST per a Europa, es considera que una soca de

A. fumigatus es sensible a VRC si la CMI $\leq 1 \mu\text{g/mL}$, resistent si la CMI $\geq 2 \mu\text{g/mL}$. Encara que no s'han establert punts de tall clínics per altres espècies d'*Aspergillus*, en general s'accepta que aquests son una dilució més elevada que els obtinguts per *A. fumigatus* (Borman *et al.*, 2017; Kamali Sarwestani *et al.*, 2018). Tenint en conte aquests preceptes, 4/14 (28.6%) soques van resultar sensibles al VRC i 10/14 (71.4%) es podrien considerar resistents.

7.2. Mutacions en el gen *cyp51A*

Els primers dissenyats han demostrat ser útils per l'amplificació de *cyp51A* de *A. tubingensis*, corresponent-se les mides de les bandes observades en el gel d'agarosa amb les esperades (fig. 10).

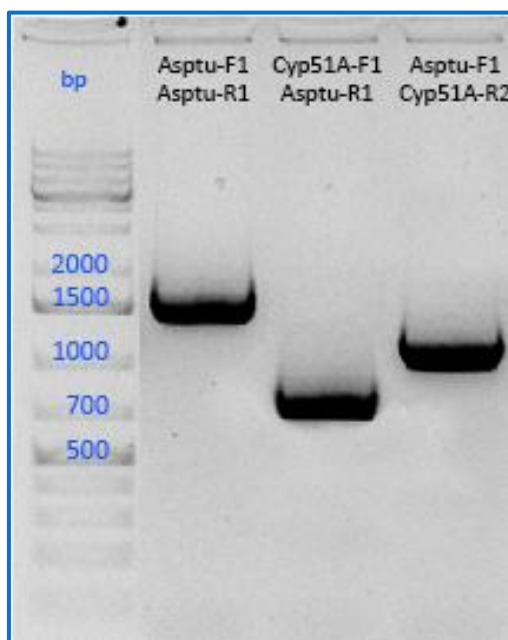


Figura 10. Bandes observades en un gel d'agarosa al 1,5% corresponents als amplicons obtinguts. En la part superior s'indiquen els primers utilitzats en cada cas.

Les soques seleccionades per aquest assaig van ser 11906, 14630, 14712 i 17207, pertanyents a l'espècie *A. tubingensis*.

La seqüenciació de *cyp51A* va permetre localitzar 29 mutacions en la soca 11906, de les quals 27 eren sinònimes; 23 mutacions en la soca 14630, de les quals 21 eren sinònimes; 32 mutacions en la soca 17207, de les quals 30 eren sinònimes; i 19 mutacions en la soca 14712, de les quals 17 eren sinònimes. Les mutacions que comporten un canvi d'aminoàcid es poden veure en la taula 4.

Soca (CMI)	Posició (base)	Base teòrica	Nova base	Posició (aminoàcid)	Aminoàcid teòric	Nou aminoàcid	Mutació
11906	475	C	T	158	Ala	Val	A158V
(2)	1293	C	T	431	Pro	Ser	P431S
14630	475	C	T	158	Ala	Val	A158V
(4)	1293	C	T	431	Pro	Ser	P431S
17207	190	A	G	63	Lys	Glu	K63E
(4)	1457	C	G	485	His	Gln	H485Q
14712	1185	G	A	395	Val	Ile	V395I
(4)	1457	C	G	485	His	Gln	H485Q

Taula 4. Mutacions amb canvi d'aminoàcid observades per cada una de les soques seqüenciades.

La majoria de mutacions sinònimes observades es troben repetides entre diferents soques, això evidencia que hi ha zones d'aquest gen que tenen una probabilitat més alta de ser mutades i ens mostra on són. Quasi totes aquestes mutacions corresponen a l'últim nucleòtid del codó i resulten ser sinònimes degut a la degeneració del codi genètic.

Pel que fa a les mutacions amb canvi d'aminoàcid, es pot veure que també es troben repetides entre diferents soques i que es localitzen principalment al principi o al final de *cyp51A*. Aquestes zones del gen no formen part del centre actiu de la proteïna per a la que codifica ni es troben en posicions involucrades en el plegament tridimensional d'aquesta, de manera que és bastant segur dir que no juguen un paper important en la seva funció i/o activitat. En concret, es pot veure que la soca 11906 i la 14630 tenen les mateixes mutacions de canvi d'aminoàcid, mentre que la seva CMI és diferent. Si bé en el cas d'*A. fumigatus*, diferents mutacions puntuals al gen *cyp51A* han sigut directament relacionades amb la resistència al VRC, els nostres resultats no permeten establir una relació directa entre la presència de mutacions puntuals al gen *cyp51A* i la resistència o sensibilitat al VRC en *Aspergillus no-fumigatus*. Es necessari, però, realitzar estudis incloent un nombre major de soques representatives de les diferents CMIs per tal de donar robustesa a aquesta observació.

Tot i la importància de les mutacions al gen *cyp51A* en la resistència als azols en *A. fumigatus*, diferents autors han suggerit altres mecanismes. Així doncs, la sobre expressió de bombes d'efluxió implicades en el transport d'azols (ABC i MFS) ha demostrat estar implicada en la resistència antifúngica d' *A. fumigatus*

als azols. Així mateix, el factor de transcripció *SrbA* que participa en una ruta alternativa de síntesi d'ergosterol ha demostrat estar també implicat en les resistències. Altres mecanismes com ara la quantitat d'ergosterol en les membranes fúngiques o alteracions en la dinàmica i estructura de membranes mitocondrials han estat recentment descrits com a possibles factors de resistència antifúngica (Garcia-Rubio, Cuenca-Estrella i Mellado, 2017). La resistència als azols sembla ser multifactorial i més que estar directament relacionada amb un sol factor, es trobaria relacionada amb característiques múltiples de soques concretes.

Seria interessant fer un anàlisi similar en les soques de *A. niger* per tal de veure si es podrien extreure les mateixes conclusions, de manera que els resultats es puguin estendre a més espècies de fongs de la secció Nigri i poder, potser, observar algun patró. A més, les soques estudiades de *A. niger* presenten un rang més ampli de CMI, de manera que és possible que hi hagi alguna mutació corresponent a les descrites en *A. fumigatus*, que només aparegui en soques molt resistents.

7.3. Determinació de l'activitat lacasa

Tres de les soques estudiades no van presentar activitat lacasa en absència de VRC en canvi, dues d'elles sí ho van fer en presència de VRC indicant que la producció de lacases pot ser induïda pel VRC. En la taula 5 es poden observar els valors dels halos normalitzats de cadascuna de les soques, que es troben representats en la figura 11.

SOCA	CMI	CONTROL	VRC 0,25 µg/mL	VRC 1 µg/mL	VRC 2 µg/mL
11894	0,25	0	0	0	0
11898	0,25	0,20	0,44	0	0
11254	1	0,24	0,27	0,70	0
15388	1	0,35	0,49	1,10	0
11906	2	0	0	0,47	0
15385	2	0,17	0,25	1,79	1,89
15389	2	0,38	0,30	1,54	0
14630	4	0,41	0,37	1,70	1,20

14635	4	0,18	0,26	2,33	1,52
14712	4	0,28	0,38	4,20	2,06
17207	4	0,11	0,20	0,94	1,02
15386	8	0	0	1,08	4,09
15441	8	0,22	0,39	1,84	0
11900	16	0,28	0,36	0,90	2,40

Taula 5. Valors normalitzats de l'halo obtinguts per cada soca.

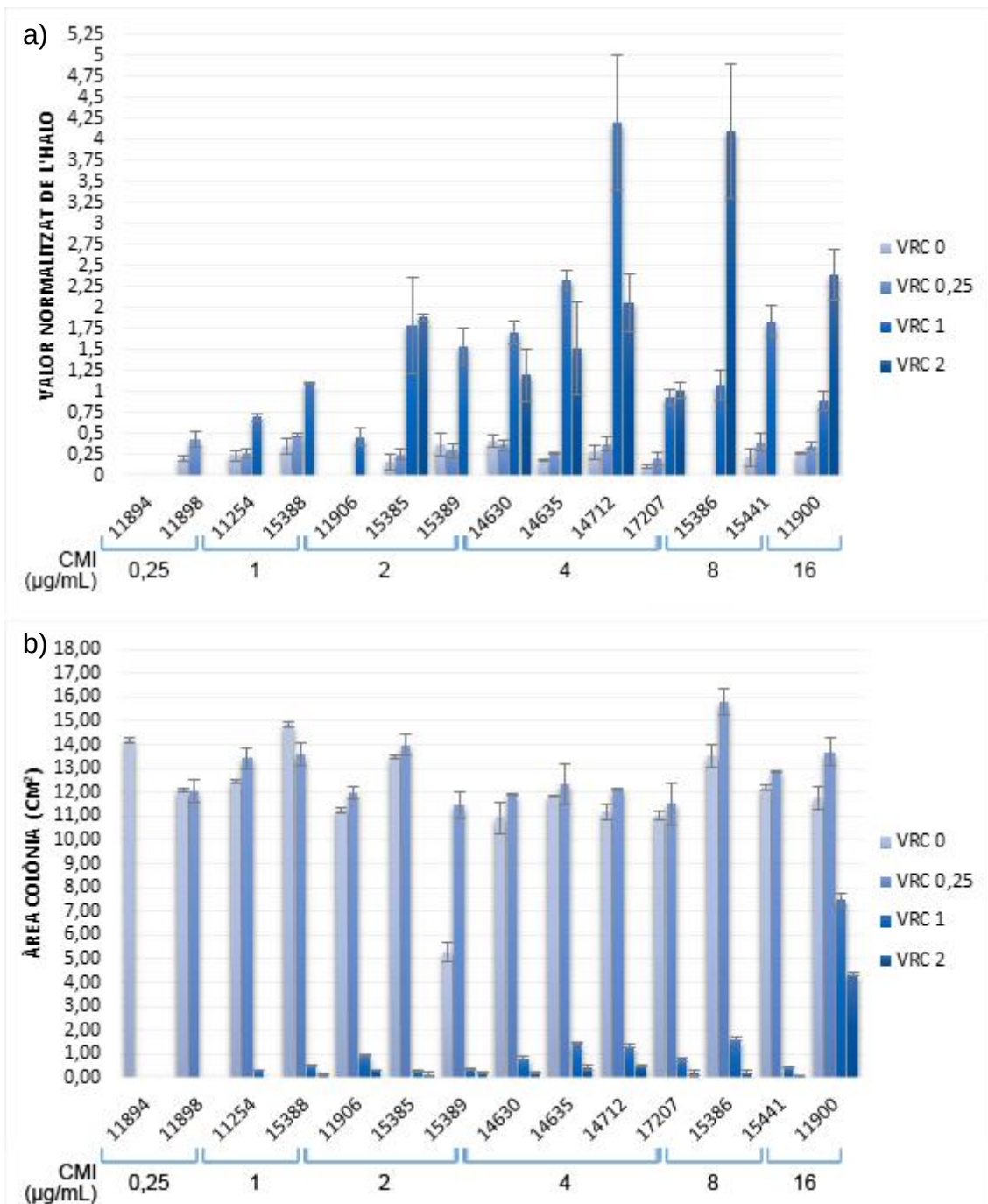


Figura 11. a) Representació gràfica de les dades de la taula 5. b) representació gràfica del creixement observat per cada soca en les diferents concentracions de voriconazol.

En general, es veu un augment en el valor de l'halo en concentracions creixents de voriconazol, de manera que es pot dir que la presència d'aquest antifúngic estimula la síntesi o activitat de les lacases.

En les soques amb CMI de 0,25 (11894 i 11898) es pot observar poca activitat lacasa; en el cas de la soca 11894 la seva activitat és nul·la sense presència de voriconazol i tampoc es veu induïda quan se n'hi afegeix i, de fet, ja no s'observa creixement en la concentració corresponent al seu CMI. En canvi, la soca 11898 sí que mostrava activitat lacasa en el medi sense voriconazol i encara era capaç de créixer en la concentració de 0,25µg/mL, mostrant una activitat encara major, de manera que és bastant possible que aquesta producció sigui el que li hagi permès sobreviure en presència de l'antifúngic. Cap de les dues ha sigut capaç de créixer en concentracions més elevades.

En les soques de CMI 1 (11254 i 15388) s'observa, en ambdós casos, una activitat creixent de lacases amb més concentració de voriconazol. Les dues presenten un comportament similar en les concentracions inferiors al seu CMI, però 15388 sempre té una activitat més elevada, i aquesta diferència es pot veure reflectida en les concentracions més altes d'antifúngic, ja que aquesta soca és capaç de créixer més en presència de 1µg/mL que 11254 i, en presència de 2µg/mL de voriconazol, es pot observar una mica de creixement, cosa que no es veu en el cas de 11254.

Les de CMI 2 (11906, 15385 i 15389), mostren totes la tendència d'augmentar l'activitat en concentracions de voriconazol majors, però les lacases de la 11906 i 15389 ja no presenten activitat en la concentració d'antifúngic més alta, tot i que ambdues presenten creixement en aquesta condició. Aquest fet fa pensar que hi ha altres mecanismes de resistència que juguen un paper més important que l'activitat de les lacases, almenys per aquestes soques, que els permeten créixer. A més, en totes aquestes soques es comença a observar un creixement lleugerament més elevat en presència de 0,25µg/mL que en la condició control, això reforça la hipòtesi que aquestes són capaces d'utilitzar el voriconazol en petites concentracions com a substrat, però en concentracions majors sembla que l'efecte perjudicial del voriconazol és més prevalent.

En les soques de CMI 4 (14630, 14635, 14712 i 17207) es pot observar un canvi pel que fa a les plaques amb 2µg/mL de voriconazol, ja que l'activitat de les lacases és inferior a les de 1µg/mL. En la soca 15385 (de CMI 2) ja es podia veure que l'activitat en la concentració més elevada tampoc era gaire alta, però en aquestes l'activitat es redueix a aproximadament la meitat de la condició VRC 1. Hauria sigut interessant, doncs, haver fet l'experiment amb una altra condició, VRC 0,5, per comprovar si aquesta tendència es podria observar també en soques de CMI 1. A més, també es pot apreciar el que ja es podia observar en les soques anteriors, un major creixement en presència d'una concentració baixa de voriconazol respecte la condició control.

Les soques de CMI 8 (15386 i 15441) mostren comportaments diferents entre elles, de manera que novament s'evidencia que hi ha altres mecanismes de resistència que afecten als resultats obtinguts. Això es pot veure també amb el fet que la soca 15386 no mostri activitat lacasa en les dos concentracions d'antifúngic més baixes però el creixement no es vegi afectat. A més, considerant que novament es veu un major creixement en VRC 0,25 que en VRC 0, podria ser que hi hagués un altre enzim involucrat en la degradació de l'azol que s'expressés més que la lacasa en aquesta soca, que és la única de l'espècie *Aspergillus brasiliensis*. En la soca 15441 no s'observa activitat de lacases en les plaques de VRC 2, però el creixement tampoc és l'esperat, és possible que hi hagi hagut un error en la preparació d'aquestes plaques.

Per últim, la soca 11900 amb un CMI de 16 mostra una activitat creixent de lacases en concentracions més elevades de voriconazol, el fet que les condicions estudiades es vegin més allunyades del CMI de la soca (>8 vegades més petites) explica que l'activitat no sigui tant elevada com en les soques anteriors mentre que el creixement és molt gran.

No s'observen diferències significatives entre el comportament de les soques d'*A. niger* i *A. tubingensis*.

7.4. Quantificació d'ergosterol

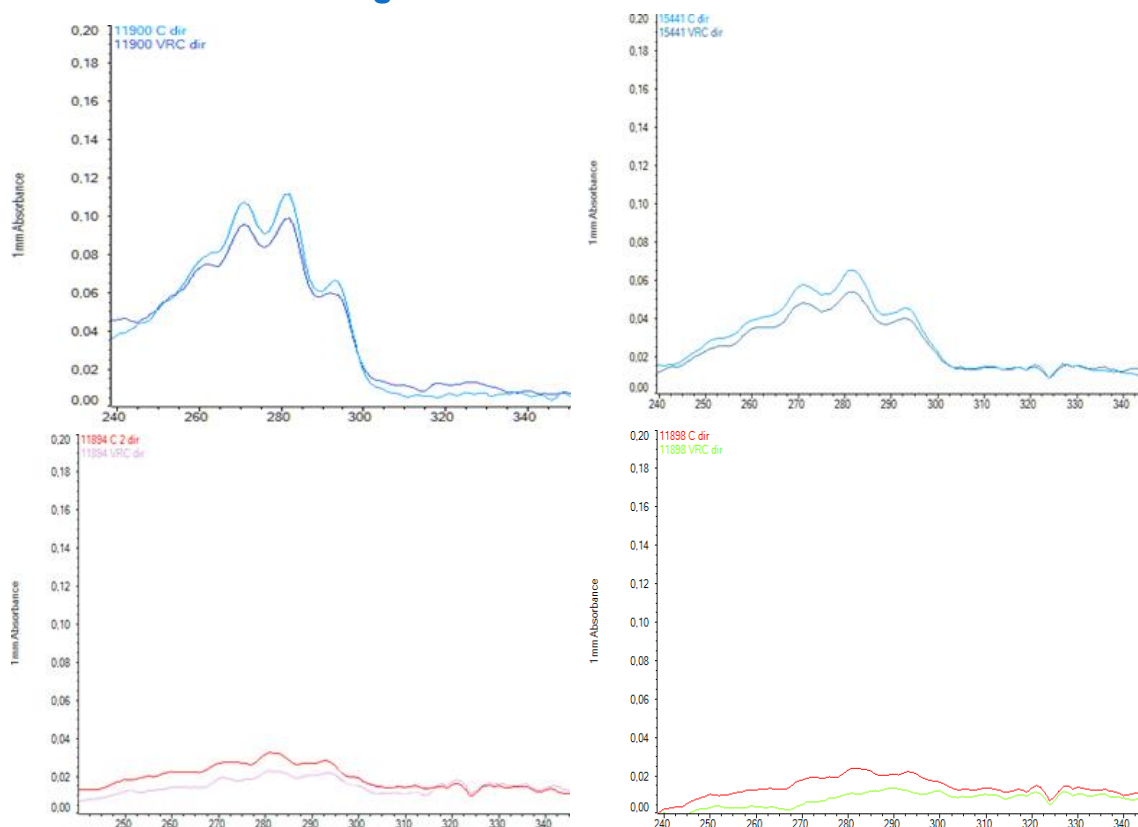


Figura 12. Espectres d'absorbància obtinguts en el programa Nanodrop per la quantificació d'ergosterol.

Els valors obtinguts d'ergosterol en les diferents soques van mostrar que l'exposició a VRC provoca una disminució en el contingut d'ergosterol, tal com s'esperava, però és d'interès que les soques amb una major CMI de VRC presenten uns nivells basals d'ergosterol majors que els corresponents a les soques amb CMIs baixes (fig. 12).

En les a soques de CMI 0,25 (11894 i 11898), les quantitats d'ergosterol són molt baixes i l'espectre resulta molt poc discernible, degut a això una quantificació numèrica seria molt inexacta.

Per les soques amb CMIs més altes (11900 i 15441) l'espectre resulta molt més clar. La soca de CMI 16 (11900) mostra un contingut d'ergosterol més elevat que la de CMI 8 (15441) tant en la mostra control com en la induïda. Ambdues es veuen afectades per la presència de l'antifúngic en una quantitat similar, però el fet de partir d'una concentració major en el cas de 11900 explica que el creixement d'aquesta es vegi menys afectat pel voriconazol. La presència d'una concentració major d'ergosterol fa que sigui necessària també una concentració

major de voriconazol per tal de fer-li front, de manera que es podria explicar la resistència de les soques. Amb aquests resultats es pot, doncs, establir una correlació entre la quantitat d'ergosterol i el CMI de la soca. Tot i així, caldria realitzar aquest estudi amb més soques de diferents CMIs.

Per la comprovació d'aquests resultats seria convenient realitzar l'anàlisi genètic del promotor de *cyp51A*, ja que una sobreexpressió d'aquest explicaria l'augment de la concentració d'ergosterol apreciable en les soques amb major CMI.

8. CONCLUSIONS

L'anàlisi de les mutacions trobades en *cyp51A* d'*A. tubingensis* mostra que existeixen “hotspots” per mutacions en aquest gen. Tot i així, la majoria d'aquestes mutacions són sinònimes (aproximadament un 90%) i es troben localitzades en els extrems del gen, sense formar part del centre actiu de la proteïna per la que codifica o trobar-se involucrades en el plegament d'aquesta.

Tot això ens indica que no hi sembla haver una relació directa entre la presència de mutacions i la resistència en aquesta espècie. Tot i així, caldria fer més estudis amb més soques de diferents espècies d'*A. Secció Nigri* i amb un rang de CMI més ampli.

Els resultats obtinguts mostren que la presència de voriconazol indueix l'activitat lacasa i que una activitat major sembla permetre un major creixement de la soca. Hi ha, però, alguns resultats que no es poden explicar solament amb l'activitat d'aquest enzim; això suggereix l'acció d'altres mecanismes de resistència, o potser d'un altre enzim capaç de degradar el voriconazol.

A més, el fet que en la majoria de casos es pogués veure un creixement major en presència de 0,25µg/mL de l'antifúngic que en les plaques control fa pensar que aquestes soques poden ser capaces d'utilitzar-lo com a substrat en concentracions baixes, però que en concentracions majors l'efecte fungicida és més prevalent. Caldria afegir noves concentracions de voriconazol a aquest assaig per comprovar si les diferents observacions són aplicables.

També sembla que es pot establir una correlació entre la quantitat d'ergosterol present en la soca i la seva CMI, però caldria realitzar aquest assaig amb més soques i fer un anàlisi estadístic dels resultats per poder afirmar-ho.

9. PERSPECTIVES DE FUTUR

Els experiments mostrats en aquest treball i els seus resultats formen part de les primeres etapes d'una investigació més àmplia pel que fa als mecanismes de resistència als azols per part d'*Aspergillus* secció Nigri; com a tals, estan destinats a donar una idea general de la direcció a la que encaminar els assajos posteriors.

A partir de l'anàlisi de les mutacions trobades en *cyp51A* d'*A. tubingensis* s'ha pogut veure que les soques d'aquesta espècie no mostren els mateixos patrons de mutacions que les d'*A. fumigatus*. Això indica que calen fer més estudis amb diferents espècies de la secció Nigri i amb un ventall més ampli de CMI's, per tal de poder acabar de caracteritzar les mutacions que es poden trobar i, de la mateixa manera que amb *A. fumigatus*, establir, si escau, en quins rangs de CMI's apareix cada mutació. Actualment aquests estudis s'estan duent a terme.

A més, també seria convenient seqüenciar altres parts del genoma d'aquestes espècies i fer un anàlisi similar, com seria el cas del promotor de *cyp51A*, el gen *SrbA* (factor de transcripció d'una ruta de síntesi alternativa d'ergosterol) o el gen *cdr1B* (codificant d'un transportador d'eflux) per tal d'estudiar la prevalença d'altres mecanismes de resistència des d'un punt de vista genètic.

Els resultats obtinguts apunten a que l'enzim lacasa pot estar relacionat amb la resistència als azols, tot i així, aquests només es corresponen a una o dues rèpliques i, per tant, caldria repetir els assajos per obtenir resultats més fiables. També caldria afegir altres condicions, com la concentració 0,5µg/mL de VRC; això permetria comprovar si alguns dels patrons observats es mantenen. A més, la manera de quantificar els resultats resulta una mica subjectiva, ja que és l'usuari mitjançant el programa ImageJ el que selecciona l'halo per tal de mesurar-ne l'àrea i molt sovint aquest no té límits ben definits, o la seva intensitat varia. Per tal de solucionar aquest problema, es proposa realitzar aquest assaig en medi líquid i mesurar el canvi de color indicador de l'activitat lacasa mitjançant un canvi en l'absorbància o bé utilitzar HPLC, ja que així s'obtindria un valor objectiu i absolut d'aquesta activitat.

La quantificació d'ergosterol es va fer de manera molt temptativa, ja que es volia comprovar si el procediment seguit per Arthington-Skaggs *et al.* seria aplicable a fongs filamentosos i a més a més se li van afegir algunes modificacions, com canvis en concentracions o el pas de liofilització. És per això que es va dur a terme amb molt poques soques. El fet que els resultats mostrin una correlació entre el nivell d'ergosterol i el CMI indica que cal seguir investigant en aquesta direcció i que, per tant, caldria fer el mateix procediment amb la resta de soques. A més, seria convenient poder obtenir un número concret a partir de l'espectre d'absorbància donat pel programa de Nanodrop, això permetria fer un anàlisi estadístic dels resultats.

10. BIBLIOGRAFIA

Arthington-Skaggs, B. A. *et al.* (1999) 'Quantitation of ergosterol content: Novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida albicans*', *Journal of Clinical Microbiology*, 37(10), pp. 3332–3337.

Borman, A. M. *et al.* (2017) 'MIC Distributions and Evaluation of Fungicidal Activity for Amphotericin B, Itraconazole, Voriconazole, Posaconazole and Caspofungin and 20 Species of Pathogenic Filamentous Fungi Determined Using the CLSI Broth Microdilution Method', *Journal of Fungi*, 3(2), p. 27. doi: 10.3390/jof3020027.

Butts, A. *et al.* (2018) 'Commonly used oncology drugs decrease antifungal effectiveness against *Candida* and *Aspergillus* species.', *Antimicrobial agents and chemotherapy*, (April), p. AAC.00504-18. doi: 10.1128/AAC.00504-18.

Camps, S. M. T. *et al.* (2012) 'Rapid induction of multiple resistance mechanisms in *Aspergillus fumigatus* during azole therapy: A case study and review of the literature', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(1), pp. 10–16. doi: 10.1128/AAC.05088-11.

Chowdhary, A., Sharma, C. and Meis, J. F. (2017) 'Azole-Resistant Aspergillosis: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment', *The Journal of infectious diseases*, 216(3), pp. S436–S444. doi: 10.1093/infdis/jix210.

Garcia-Rubio, R., Cuenca-Estrella, M. and Mellado, E. (2017) 'Triazole Resistance in *Aspergillus* Species: An Emerging Problem', *Drugs*. Springer International Publishing, 77(6), pp. 599–613. doi: 10.1007/s40265-017-0714-4.

Guarro, J. (2012) 'Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos', *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(1), pp. 33–39. doi: 10.1016/j.eimc.2011.09.006.

Hagiwara, D. *et al.* (2016) 'Epidemiological and genomic landscape of azole resistance mechanisms in *Aspergillus* fungi', *Frontiers in Microbiology*, 7(SEP), pp. 1–14. doi: 10.3389/fmicb.2016.01382.

- Hawksworth, D. L. and Lücking, R. (2017) 'Fungal Diversity Revisited : 2 . 2 to 3 . 8 Million Species', *Microbiology Spectrum*, 5(May 2018), pp. 1–17. doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016.Correspondence.
- Hoog, G. S. de et al. (2014) 'Atlas of Clinical Fungi'. Available at: <http://www.clinicalfungi.org/>.
- Howard, S. J. et al. (2009) 'Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure', *Emerging Infectious Diseases*, 15(7), pp. 1068–1076. doi: 10.3201/eid1507.090043.
- Kamali Sarwestani, Z. et al. (2018) 'Species identification and in vitro antifungal susceptibility testing of *Aspergillus section Nigri* strains isolated from otomycosis patients', *Journal de Mycologie Medicale*. Elsevier Masson SAS. doi: 10.1016/j.mycmed.2018.02.003.
- Krishnan Natesan, S. et al. (2012) 'In vitro-in vivo correlation of voriconazole resistance due to G448S mutation (*cyp51A* gene) in *Aspergillus fumigatus*', *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. Elsevier B.V., 74(3), pp. 272–277. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.06.030.
- Mann, P. A. et al. (2003) 'Mutations in *Aspergillus fumigatus* resulting in reduced susceptibility to posaconazole appear to be restricted to a single amino acid in the cytochrome P450 14 α -demethylase', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(2), pp. 577–581. doi: 10.1128/AAC.47.2.577-581.2003.
- Mellado, E. et al. (2004) 'Substitutions at Methionine 220 in the 14 α *Aspergillus fumigatus* Are Responsible for Resistance In Vitro to Azole Antifungal Drugs', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(7), pp. 2747–2750. doi: 10.1128/AAC.48.7.2747.
- Nett, J. E. and Andes, D. R. (2016) 'Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications', *Infectious Disease Clinics of North America*. Elsevier Inc, 30(1), pp. 51–83. doi: 10.1016/j.idc.2015.10.012.
- Rex, J. H. et al. (2008) *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard-Second Edition*, CLSI Document M38-A2.

- Rodríguez Couto, S. and Toca Herrera, J. L. (2006) 'Industrial and biotechnological applications of laccases: A review', *Biotechnology Advances*, 24(5), pp. 500–513. doi: 10.1016/j.biotechadv.2006.04.003.
- Sabiiti, W. *et al.* (2014) 'Efficient phagocytosis and laccase activity affect the outcome of HIV-associated cryptococcosis', *Journal of Clinical Investigation*, 124(5), pp. 2000–2008. doi: 10.1172/JCI72950.
- Sapmak, A. *et al.* (2016) 'Talaromyces marneffeii laccase modifies THP-1 macrophage responses', *Virulence*, 7(6), pp. 702–717. doi: 10.1080/21505594.2016.1193275.
- Sharpe, A. R. *et al.* (2018) 'Triazole resistance surveillance in *Aspergillus fumigatus*', *Medical Mycology*, 56(March), pp. S83–S92. doi: 10.1093/mmy/myx144.
- Da Silva Ferreira, M. E. *et al.* (2005) 'The ergosterol biosynthesis pathway, transporter genes, and azole resistance in *Aspergillus fumigatus*', *Medical Mycology*, 43(SUPPL.1). doi: 10.1080/13693780400029114.
- Ullmann, A. J. *et al.* (2018) 'Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline', *Clinical Microbiology and Infection*, 24, pp. e1–e38. doi: 10.1016/j.cmi.2018.01.002.
- Varga, J. *et al.* (2011) 'New and revisited species in *Aspergillus* section Nigri', *Studies in Mycology*, 69(June), pp. 1–17. doi: 10.3114/sim.2011.69.01.
- Verweij, P. E., Mellado, E. and Melchers, W. J. G. (2007) 'Multiple-Triazole – Resistant Aspergillosis', *New England Journal of Medicine*, 356(14), pp. 1481–1483.

11. AUTOAVALUACIÓ

He de confessar que al començar les pràctiques no sabia què esperar-me i vaig arribar molt nerviosa, ja que mai havia estat treballant en un laboratori fora de les pràctiques d'algunes assignatures de la carrera. A més, tampoc sabia exactament amb què treballaria, degut a que s'havia d'avaluar el que s'estaria fent en diferents línies d'investigació per tal de posar-me la que fos més convenient. Aquesta por, però, no va durar gaire ja que el Dr. Capilla em va fer una introducció detallada de què s'estava fent i els primers dies vaig poder treballar amb les tècnics de laboratori, cosa que em va permetre ubicar-me, habitar-me al funcionament del laboratori i conèixer els diferents investigadors.

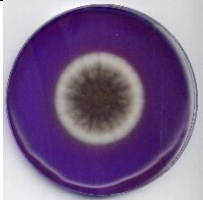
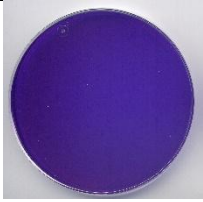
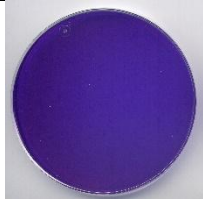
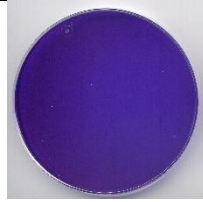
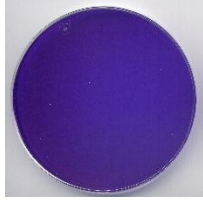
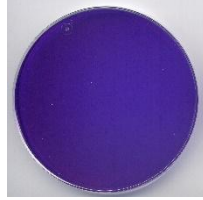
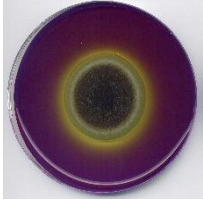
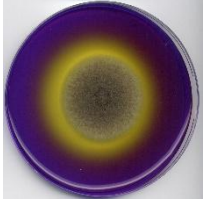
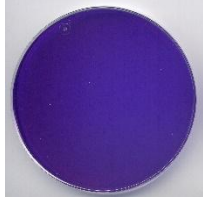
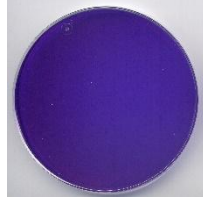
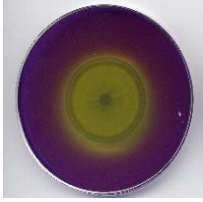
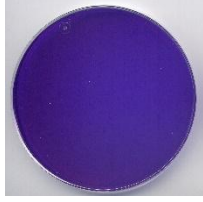
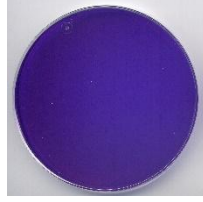
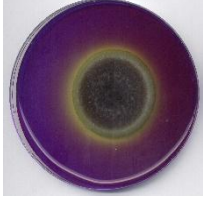
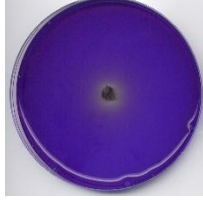
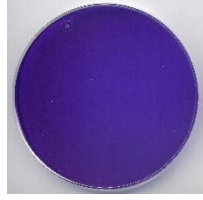
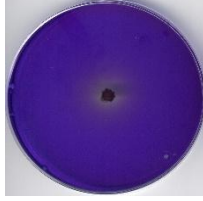
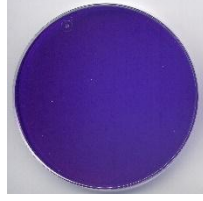
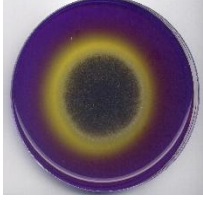
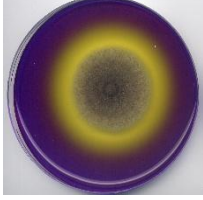
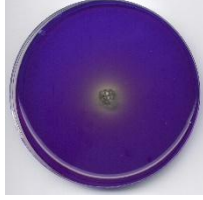
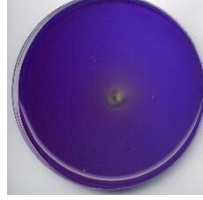
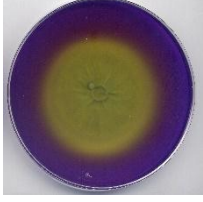
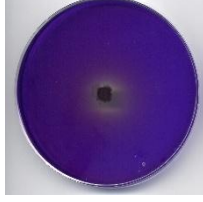
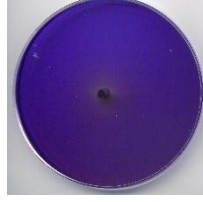
Una vegada vam decidir quina línia d'investigació seguiria més, em vaig informar sobre el gènere *Aspergillus*, sobre mecanismes de resistència... I em vaig adonar que gràcies al que havia après en la carrera era capaç d'entendre què es feia, com es feia i el perquè i donar les meves opinions. Així doncs, em vaig poder integrar en l'equip molt ràpidament i em vaig sentir molt còmoda en ell.

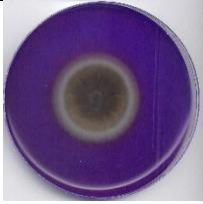
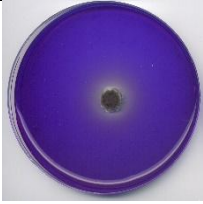
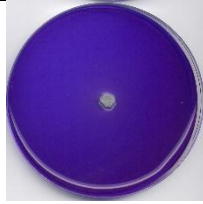
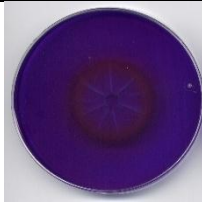
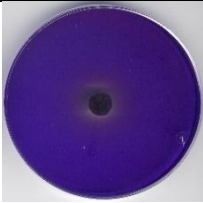
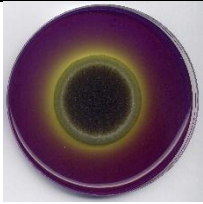
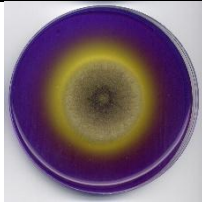
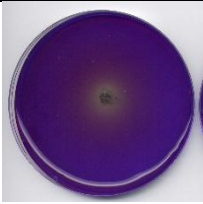
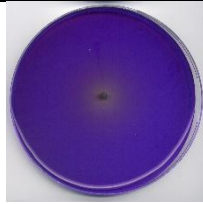
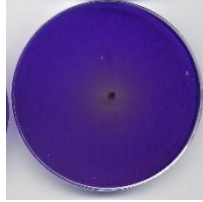
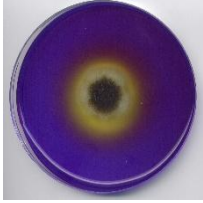
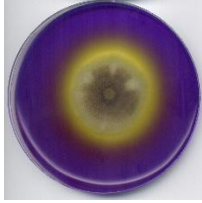
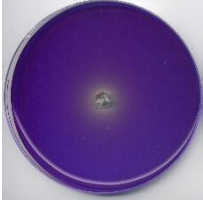
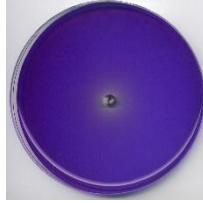
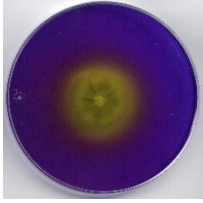
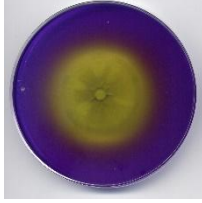
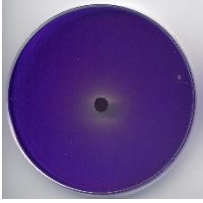
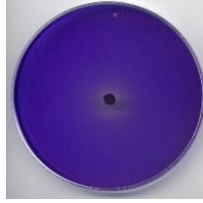
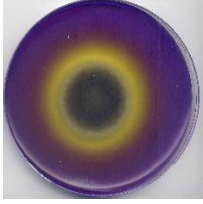
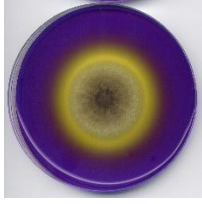
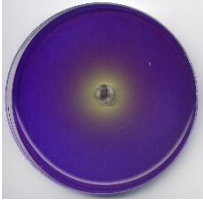
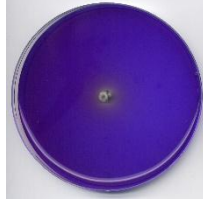
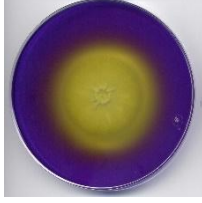
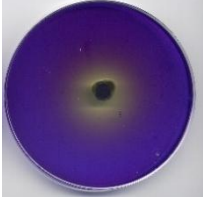
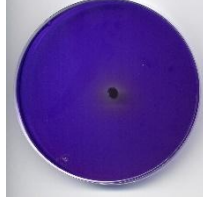
Aviat em vaig adonar també de la importància de la llibreta de laboratori que tant tothom odiava en les pràctiques de les assignatures, sobretot si s'està investigant, ja que cada petita modificació, observació... pot resultar molt més important del que podia semblar en primera instància. I, també, tenir una llibreta neta i entenedora facilita molt l'anàlisi dels resultats obtinguts.

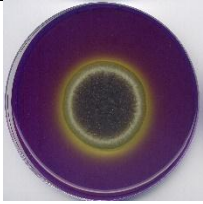
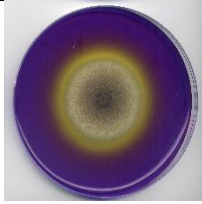
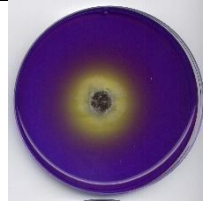
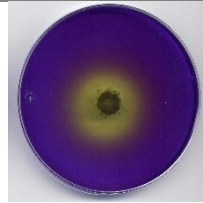
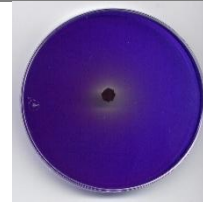
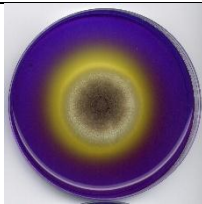
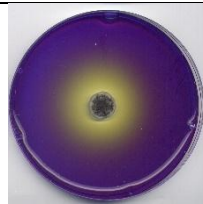
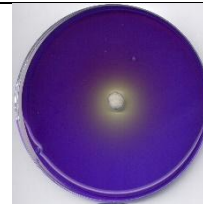
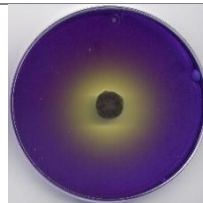
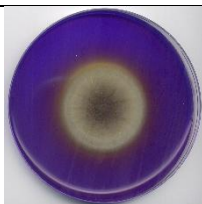
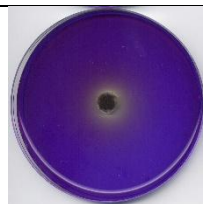
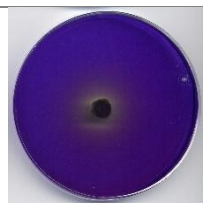
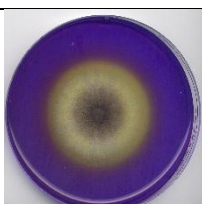
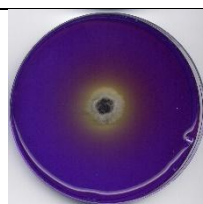
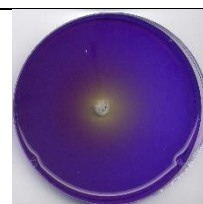
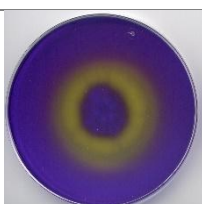
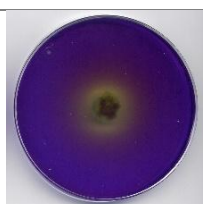
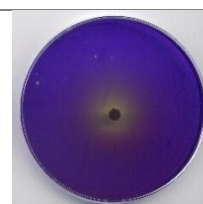
Crec que aquestes pràctiques m'han permès créixer molt en l'àmbit professional, ja que no es limitaven en seguir un protocol o un procés repetitiu, sinó que calia estar molt atent i pensar sobre els resultats i quin podria ser el següent pas a donar. A més, he pogut practicar algunes tècniques donades a classe i aprendre'n de noves, a part d'observar diferents maneres de fer coses similars quan les fan diferents investigadors. Com a conclusió, estic molt satisfeta d'haver fet les pràctiques en el grup de micologia de la FMR, de la meua feina allà i d'aquest mateix treball, que espero que sigui una fidel representació d'aquest sentiment.

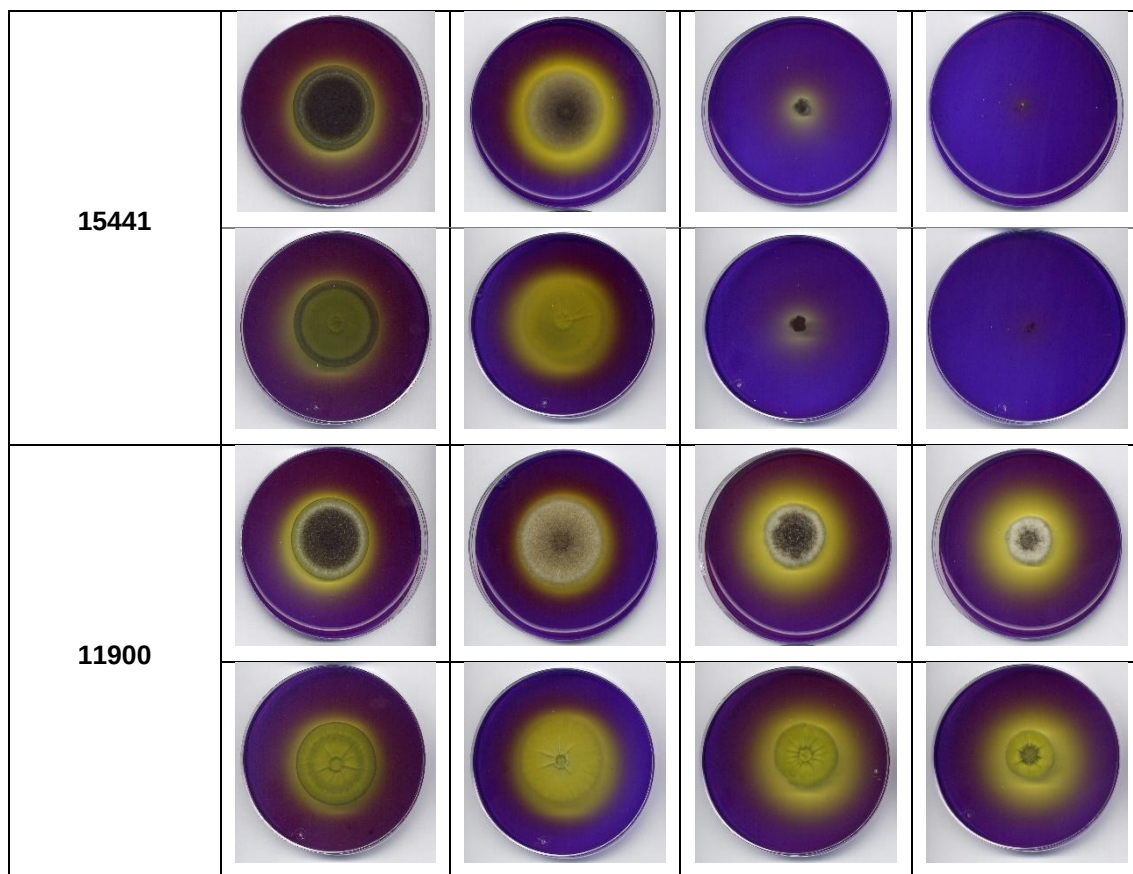
ANNEXOS

Annex I: Imatges dels halos de lacasa

SOCA	VRC 0	VRC 0,25	VRC 1	VRC 2
11894				
				
11898				
				
11254				
				
15388				
				

11906				
				
15385				
				
15389				
				
14630				
				

14635				
				
14712				
				
17207				
				
15386				
				



En les fotografies es poden observar les plaques per la part superior i inferior, per tal de mesurar les àrees amb ImageJ es van utilitzar les de la part inferior, fent la mitjana entre les diferents rèpliques.

Annex II: Llistat de mutacions

Les mutacions amb canvi d'aminoàcid es troben marcades amb un asterisc.

SOCA 11906				
Posició (base)	Base teòrica	Nova base	Aminoàcid teòric	Nou aminoàcid
156	G	A	Gly	Gly
475*	C	T	Ala	Val
494	T	C	Val	Val
512	G	A	Glu	Glu
524	T	C	Tyr	Tyr
554	G	T	Ala	Ala
653	G	A	Ala	Ala
689	G	A	Gly	Gly
794	T	C	Asn	Asn
845	G	C	Leu	Leu
866	T	C	Asn	Asn
878	A	G	Val	Val
908	C	T	Ile	Ile
911	A	T	Thr	Thr
1013	A	G	Gln	Gln
1031	C	T	Asn	Asn
1073	T	C	Asp	Asp
1091	G	A	Gln	Gln
1160	A	G	Pro	Pro
1172	C	T	Pro	Pro
1193	C	T	Pro	Pro
1250	C	T	Phe	Phe
1256	C	T	Asn	Asn
1293*	C	T	Pro	Ser
1301	G	A	Lys	Lys
1358	C	T	Ala	Ala
1367	C	T	Tyr	Tyr
1424	T	C	Asn	Asn
1457	C	T	His	His

SOCA 14630				
Posició (base)	Base teòrica	Nova base	Aminoàcid teòric	Nou aminoàcid
156	G	A	Gly	Gly
257	A	G	Gly	Gly
475*	C	T	Ala	Val
494	T	C	Val	Val
512	G	A	Glu	Glu
524	T	C	Tyr	Tyr
554	G	T	Ala	Ala
653	G	A	Ala	Ala

689	G	A	Gly	Gly
845	G	C	Leu	Leu
878	A	G	Val	Val
908	C	T	Ile	Ile
911	A	T	Thr	Thr
1013	A	G	Gln	Gln
1031	C	T	Asn	Asn
1073	T	C	Asp	Asp
1091	G	A	Gln	Gln
1172	C	T	Pro	Pro
1193	C	T	Pro	Pro
1256	C	T	Asn	Asn
1293*	C	T	Pro	Ser
1424	T	C	Asn	Asn
1457	C	T	His	His

SOCA 14712				
Posició (base)	Base teòrica	Nova base	Aminoàcid teòric	Nou aminoàcid
156	G	A	Gly	Gly
293	A	C	Thr	Thr
338	C	A	Gly	Gly
425	C	T	Asn	Asn
530	G	A	Arg	Arg
554	G	T	Ala	Ala
680	C	A	Leu	Leu
782	A	G	Thr	Thr
794	T	C	Asn	Asn
845	G	C	Leu	Leu
1013	A	G	Gln	Gln
1031	C	T	Asn	Asn
1073	T	C	Asp	Asp
1100	C	T	Ile	Ile
1160	A	G	Pro	Pro
1172	C	T	Pro	Pro
1185*	G	A	Val	Ile
1193	C	T	Pro	Pro
1457*	C	G	His	Gln

SOCA 17207				
Posició (base)	Base teòrica	Nova base	Aminoàcid teòric	Nou aminoàcid
156	G	A	Gly	Gly
190*	A	G	Lys	Glu
293	A	C	Thr	Thr
425	C	T	Asn	Asn
498	C	T	Leu	Leu

512	G	A	Glu	Glu
653	G	A	Ala	Ala
680	C	A	Leu	Leu
782	A	G	Thr	Thr
794	T	C	Asn	Asn
845	G	C	Leu	Leu
866	T	C	Asn	Asn
878	A	G	Val	Val
896	C	T	Ala	Ala
1013	A	G	Gln	Gln
1031	C	T	Asn	Asn
1061	T	C	Tyr	Tyr
1073	T	C	Asp	Asp
1100	C	T	Ile	Ile
1172	C	T	Pro	Pro
1250	C	T	Phe	Phe
1253	C	T	Pro	Pro
1265	G	A	Arg	Arg
1274	A	C	Pro	Pro
1292	A	G	Gln	Gln
1301	G	A	Lys	Lys
1304	G	A	Glu	Glu
1424	T	C	Asn	Asn
1457*	C	G	His	Gln
1481	C	T	Gly	Gly
1496	A	T	Pro	Pro
1514	G	T	Thr	Thr

