



Universidade de  
Aveiro  
Ano 2014/2015

Departamento de Biologia

**Elizangela Lima  
Fonseca**

**A importância dos factores de transcrição  
Ndt80 e Upc2 na resistência aos azoles em  
*Candida parapsilosis***

## **Declaração**

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia  
Ano 2014/2015

**Elizangela Lima  
Fonseca**

A importância dos factores de transcrição Ndt80 e Upc2  
na resistência aos azoles em *Candida parapsilosis*.

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para  
cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do  
grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular,  
realizada sob a orientação científica da Doutora Isabel  
Alexandra Marcos Miranda, Investigadora do Serviço e  
Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina  
da Universidade do Porto e da Professora Doutora  
Etelvina Maria de Almeida Paula Figueira, professora  
auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de  
Aveiro.

Dedico este trabalho aos meus avós e a minha mãe pelo incentivo e por acreditarem em mim.

## **O júri**

Presidente

Professora Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira  
Professora associada com agregação da Universidade de Aveiro

Os Vogais

Doutora Isabel Alexandra Marcos Miranda  
Investigadora do CINTESIS, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto (Orientadora)

Doutora Etelvina Maria de Almeida Paula Figueira  
Professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro (Co-orientadora)

Arguente principal

Doutora Raquel Monteiro Marques Silva  
Professora auxiliar convidada  
Universidade de Aveiro

## **Agradecimentos**

Agradeço à minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Isabel Miranda, pela paciência e prontidão para me ajudar no decorer deste trabalho. Agradeço a dedicação para me explicar as coisas até que eu as entendesse. Obrigada pela humildade que sempre demonstrou quando eu tive dificuldades e acima de tudo muito obrigada pela amizade.

Agradeço à minha co-orientadora Etelvina Figueira por todo o apoio e preocupação.

Um especial agradecimento à Joana Branco, pelo auxílio imprescindível e pela humildade que sempre teve comigo.

Agradeço a todo o pessoal extraordinário do serviço do laboratório de Microbiologia por toda a ajuda, integração e pela amizade.

Ao director do Serviço e Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Prof. Ácácio Rodrigues, muito obrigada pela oportunidade de desenvolver a minha dissertação nas instalações e por todo apoio ao longo do mestrado.

Agradeço a todos que me auxiliaram na integração em Portugal, em especial a Arísia Marieth, Carolina Gonçalves, Sandra Martins, Sara Almeida, Alírio Boaventura e Cláudia Lopes.

Finalmente agradeço aos meus avós pela bênção que representam na minha vida e não menos importante agradeço a minha mãe por todas as batalhas que ela travou no dia-dia para que eu pudesse estar hoje a terminar o meu mestrado. Sem ela, definitivamente isto não seria possível.

Obrigada a todos!

## Palavras-chave

*Candida parapsilosis*, resistência antifúngica, resistência aos azoles, factores de transcrição, *NDT80*, *UPC2*, produção de ergosterol, via biossintética da produção do ergosterol, genes *ERG*.

## Resumo

Ao longo da última década, a incidência de *Candida parapsilosis* em casos de fungemia tem vindo a aumentar significativamente. Vários estudos epidemiológicos apontam *C. parapsilosis* como a segunda espécie de *Candida* mais isolada em infeções sistémicas. As terapias para fungemia englobam um número reduzido de fármacos em que os mais utilizados são os azoles. Embora *C. parapsilosis* não seja considerada particularmente propensa a desenvolver resistência a antifúngicos, estudos realizados na última década sugerem que a sua baixa sensibilidade às equinocandinas e a continuada exposição aos azoles, pode vir a tornar-se motivo de preocupação clínica, uma vez que muito pouco se sabe acerca da cinética de aquisição de resistência. Estudos *in vitro*, indicam que *C. parapsilosis* adquire a resistência aos azoles de forma irreversível, no entanto, o mecanismo molecular responsável por esta resistência é díspar entre os diferentes azoles. Assim, enquanto após exposição ao fluconazole e voriconazole, o mecanismo desenvolvido por *C. parapsilosis* envolveu mutações *gain-of-function* no factor de transcrição *MRR1*, o que foi responsável pela sobreexpressão das bombas de efluxo, *MDR1*; a exposição ao posaconazole, conduziu a uma sobreexpressão dos genes *ERG*, responsáveis pela biossíntese do ergosterol. Para além destes, verificou-se também a sobreexpressão dos factores de transcrição, *NDT80* e *UPC2*. Assim, de modo a compreender a actuação destes factores de transcrição na resistência aos azoles, procedeu-se à deleção dos genes *NDT80* e *UPC2* na estirpe parental susceptível e na estirpe resistente ao posaconazole, utilizando a ferramenta molecular *SAT-Flipper*. A deleção dos genes *UPC2* e *NDT80* alterou o fenótipo da estirpe resistente para susceptível devido a uma redução acentuada da expressão dos genes *ERG*. A deteção de sequências consensus, anteriormente descritas como reconhecidas pelos factores de transcrição *Ndt80* e *Upc2*, nos promotores dos genes *ERG* demonstra que a expressão destes genes é controlada por estes factores de transcrição. Neste trabalho, ficou assim demonstrada a importância dos factores de transcrição *Ndt80* e *Upc2* na resistência aos azoles, através da regulação dos genes envolvidos na biossíntese do ergosterol.

**Keywords**

*Candida parapsilosis*, antifungal resistance, azoles resistance, transcription factors, *NDT80*, *UPC2*, ergosterol production, ergosterol biosynthetic pathway, *ERG* genes .

**Abstract**

In the past decade, an increasing of fungemia caused by *C. parapsilosis* has been reported. According to epidemiological studies, *C. parapsilosis* ranks as second cause of fungemia. However, few antifungal drugs are available in medical practice. Azoles are commonly used, due to their broad spectrum and effectiveness. *C. parapsilosis* is not particularly prone to develop antifungal resistance, however recent studies point that its low susceptibility to echinocandins and its continuous exposure to azoles, can become a concern in clinical practice, since the knowledge about the mechanisms developed to acquire resistance is scarce. *In vitro* studies points out that the acquisition of azole resistance in *C. parapsilosis* is irreversible, however the molecular mechanisms triggered after azoles exposure are distinct among azoles. While fluconazole and voriconazole exposure resulted in gain-of-function mutations in the transcription factor *MRR1*, responsible for efflux pumps overexpression, *MDR1*; posaconazole exposure triggered *ERG* genes overexpression, which increased ergosterol biosynthesis. Beyond this, also *NDT80* and *UPC2* transcription factors were also overexpressed. Thus, in order to understand the role and mode of action of these transcription factors in the azole resistance, *NDT80* and *UPC2* genes were knockout in a susceptible parental strain and in posaconazole resistant strain, using *SAT-Flipper* molecular tool. *UPC2* and *NDT80* genes deletion in the posaconazole resistant strain resulted in an alteration of azole susceptibility phenotype from resistant to susceptible, due to a drastic reduction in *ERG* genes expression. Furthermore, the detection of consensus core sequences on the promoters of *ERG* genes, previously described as being recognized by the transcriptions factors Ndt80 and Upc2, revealed that expression of *ERG* genes is controlled by Ndt80 and Upc2 transcription factors. In this study, we unveil the important role of Ndt80 and Upc2 transcription factors in azole resistance, through the regulation of genes involved in ergosterol biosynthesis.



## Índice

I. Lista de abreviaturas .....	i
II. Lista de Figuras e Tabelas .....	ii
1. <i>Candida parapsilosis</i> : um fungo patogénico emergente .....	1
1.1. Considerações gerais.....	1
1.2. Prevalência.....	2
1.3. Factores de Virulência .....	3
1.4. Terapia antifúngica .....	4
1.5. Resistência antifúngica de <i>C. parapsilosis</i> aos Azoles.....	6
1.5.1. A Biossíntese do ergosterol .....	9
1.6. O papel dos fatores de transcrição <i>NDT80</i> e <i>UPC2</i> na resistência aos Azoles.....	12
1.6.1. O gene <i>UPC2</i> reconhece uma sequência <i>sterol response element</i> (SRE) e activa a expressão dos genes <i>ERG</i> .....	13
1.6.2. O gene <i>NDT80</i> reconhece uma sequência <i>Middle Sporulation Element</i> (MSE).....	14
1.7. Caso de estudo e objectivos .....	15
2. Material e métodos.....	16
2.1. Estirpes e Condições de Crescimento .....	16
2.2. Transformação por Eletroporação .....	16
2.3. Detecção dos transformantes positivos e reciclagem da cassette.....	17
2.4. Extração de DNA Genómico de <i>C. parapsilosis</i> . .....	19
2.4.1. Extracção de DNA genómico pelo método de fervura .....	19
2.4.2. Extracção de DNA genómico pelo método fenol-clorofórmio.....	19
2.5. Eletroforese de DNA .....	20
2.6. Amplificação e Restrição do Gene <i>SADH</i> .....	21
2.7. Avaliação da Suscetibilidade .....	22
2.8. Avaliação da taxa de crescimento .....	22
2.9. Perfil de expressão génica .....	23
2.9.1. Extração de RNA .....	23
2.9.2. Síntese de DNA e RT-qPCR.....	23
3. Resultados.....	25

3.1.	Disrupção dos genes <i>NDT80</i> e <i>UPC2</i> .....	25
3.2.	A susceptibilidade de <i>C. parapsilosis</i> aos azoles é afetada pela deleção dos genes <i>UPC2</i> e <i>NDT80</i> .....	27
3.3.	Os promotores dos genes <i>ERG</i> possuem uma sequência de reconhecimento para os factores de transcrição Upc2 e Ndt80 .....	28
3.4.	A expressão dos genes <i>ERG</i> é regulada pelos factores de transcrição Upc2 e Ndt80 .....	29
3.5.	A deleção do gene <i>NDT80</i> afecta a taxa de crescimento e promove alterações de fenótipo celular.....	31
4.	Discussão .....	32
5.	Conclusão.....	35
6.	Referências bibliográficas.....	36

## I. Lista de abreviaturas

DNA – *Desoxirribonucleic Acid*

CIM – Concentração Inibitória Mínima

Clo – Cloranfenicol

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

DMSO – dimetilsulfóxido

DTT - ditioneitol

FLC – fluconazol

g (mg, µg, ng) – grama (miligrama, micrograma, nanograma)

g – força gravitacional

H<sub>2</sub>O – água

l (ml, µl) – litro (mililitro, microlitro)

mm – milímetros

ms – milissegundos

M (mM, µM) – molar (milimolar, micromolar)

MSE- *Middle sporulation element*

MOPS – ácido propanosulfônico morfolino

Nou - nourseotricina

pb- pares de bases

pm- picomoles

PBS – tampão fosfato salino

PCR- *polymerase chain reaction*

PSC - posaconazol

R - resistente

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

S – suscetível

S-DD - suscetível dose-dependente

SRE- *sterol response element*

U – unidades

VIH – vírus da imunodeficiência humana

YPD - yeast peptone dextrose

YPM - yeast peptone maltose

VRC – voriconazol

WT – *Wild type*

% - percentagem

DO – Densidade óptica

## II. Lista de Figuras e Tabelas

**Tabela 1.** *Primers* utilizados para confirmação da integração genómica da cassete de disrupção *SAT1 Flipper* para deleção dos genes *UPC2* e *NDT80* em *C. parapsilosis*.

**Tabela 2.** Componentes da reacção de PCR.

**Tabela 3.** Componentes da reacção de *PCR* realizada para confirmação da excisão da cassete de disrupção.

**Tabela 4.** Componentes da reacção de PCR para amplificação do gene *SADH*.

**Tabela 5.** *Primers* utilizados na amplificação do gene *SADH* de *C. parapsilosis* por PCR.

**Tabela 6.** *Primers* utilizados no RT-qPCR.

**Tabela 7.** Valores de CIM e fenótipo de suscetibilidade das estirpes de *C. parapsilosis*.

**Tabela 8.** Motivos SREs e MSEs encontrados nos promotores dos genes *ERG* de *C. parapsilosis*.

**Figura 1. Mecanismos de resistência aos azoles em *C. albicans*** (Vandeputte et al. 2012): sobreexpressão do gene *ERG11*, que codifica para a molécula alvo dos azoles; mutações pontuais do gene *ERG11*; efluxo ativo de fármacos resultante da sobreexpressão de genes que codificam para as bombas de efluxo; alterações da via biossintética do ergosterol, nomeadamente nos genes *ERG*, que culminam no aumento do ergosterol membranar dificultando a penetração do fármaco para o meio intracelular.

**Figura 2. A via biossintética do ergosterol em *S. cerevisiae* conduz à transformação do acetil CoA em ergosterol, por acção de enzimas codificadas pelos genes *ERG*** (Silva et al. 2011).

**Figura 3. Esquema ilustrativo da cassete *SAT1-flipper***, que é composta pelo gene *SAT1* (*CaSAT1*), marcador de resistência à nourseotricina, e o gene *FLP* (*CaFLP*). A expressão desses genes é controlada pelos promotores *ACT1* (*ACT1p*) e *MAL2* (*MAL2p*), respectivamente.

**Figura 4. Estratégia usada para efectuar a disrupção dos genes *NDT80* e *UPC2* em *C. parapsilosis* baseada na cassete *SAT1-Flipper*.** A construção da cassete de disrupção envolveu a clonagem das regiões promotora e terminadora dos genes a deletar na cassete

*SAT1-Flipper* (a). *C. parapsilosis* foi transformada com a referida cassete. Após recombinação homóloga, a cassete de interrupção integrou o genoma substituindo o gene alvo (a e b). Após interrupção do primeiro alelo do gene alvo, procedeu-se à reciclagem da cassete. Os mecanismos de reparação do DNA unem as extremidades nas regiões FRTs (c). A segunda cópia do gene foi deletada seguindo o mesmo procedimento.

**Figura 5. Construção dos mutantes de *C. parapsilosis upc2Δ*, *ndt80Δ* and *upc2Δ/ndt80Δ*.** Os genes *UPC2* e *NDT80* foram deletados na estirpe de *C. parapsilosis* resistente ao posaconazole BC014R\_PSC utilizando a cassete *SAT1-Flipper*. A confirmação da deleção foi realizada por PCR com a amplificação de fragmentos de 1.1 kb nas estirpes *upc2Δ* (linha 3) e *ndt80Δ* (linha 4). Como controlo positivo, o mesmo PCR amplificou as regiões adjacentes e os genes *UPC2* (linha 5) e *NDT80* (linha 6) na estirpe parental BC014R\_PSC. A confirmação da deleção na estirpe *upc2Δ/ndt80Δ* seguiu o mesmo protocolo. A linha 1 representa o controlo negativo e a linha 2 o marcador molecular (NZYDNA Ladder III).

**Figura 6. Os genes *UPC2* e *NDT80* estão envolvidos na resistência aos azoles em *C. parapsilosis*.** A expressão dos genes *ERG11*, *ERG25*, *ERG2* e *ERG4* foram analisados por qRT-PCR na estirpe BC014R\_PSC e nos mutantes EF8, EF12 e EF14. O gene *TUB4* foi usado como gene normalizador. Os níveis de expressão apresentados correspondem à média de cinco ensaios diferentes.

**Figure 7. Curva de crescimento do mutante *ndt80Δ* e da estirpe BC014\_RPSC em meio YPD.** Medições da densidade óptica (DO), a 600 nm que foram realizadas de hora a hora.

**Figura 8. Alteração morfológica das células de *C. parapsilosis* resultantes da deleção do gene *NDT80*.** Observação ao microscópio ótico (amplificação 40x). A estirpe *ndt80Δ* apresenta um fenótipo rugoso, compostas maioritariamente por células alongadas e pseudohifas.

# 1. *Candida parapsilosis*: um fungo patogénico emergente

## 1.1. Considerações gerais

As leveduras pertencentes ao género *Candida* são fungos unicelulares, ubíquos, e geralmente considerados agentes patogénicos oportunistas <sup>1</sup>. São leveduras saprófitas, comensais, que colonizam a pele e as mucosas, fazendo parte da microflora humana. Encontram-se no trato respiratório superior, trato gastrointestinal, cavidade oral ou vaginal, sem causar nenhum dano. No entanto, por desequilíbrio do sistema imunológico, podem tornar-se patogénicas, provocando candidíases que vão desde infeções superficiais de mucosas a infeções sistémicas do sangue e do líquido cefaloraquidiano <sup>2,3</sup>.

*C. parapsilosis* foi isolada pela primeira vez por Asford em 1928, de um doente com diarreia em Porto Rico. Inicialmente foi catalogada como pertencendo à espécie *Monila* por ser incapaz de fermentar maltose. O termo *parapsilosis*, atribuído por Asford, surgiu de modo a distingui-la de outros isolados mais frequentes, tendo sido mais tarde designada de *Candida parapsilosis*. *C. parapsilosis* foi considerada uma levedura não patogénica. Em 1940, esta perspectiva mudou após ter sido identificada como o agente causador de endocardite num consumidor de drogas por via intravenosa <sup>4,5</sup>. Desde então, *C. parapsilosis* tem vindo a sofrer várias alterações a nível da sua classificação filogenética.

Em virtude da sua heterogeneidade, a espécie *C. parapsilosis* foi dividido em três grupos com base em polimorfismos aleatórios do DNA, e morfotipagem <sup>6,7</sup>. Em 2005 foi proposto por Tavanti *et al.* <sup>7</sup> que o complexo *C. parapsilosis sensu lato* passasse a ser composto por três espécies estreitamente relacionadas denominadas de *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis*, e *C. metapsilosis*. Estas espécies têm sido alvo de vários estudos epidemiológicos nos últimos anos <sup>8,9</sup> e podem apresentar diferenças relativamente à suscetibilidade antifúngica e virulência.

Morfologicamente, *C. parapsilosis* apresenta células de diversas formas: ovais, redondas e cilíndricas, formando colónias cremosas, brilhantes, lisas ou rugosas, mas sempre de cor branca. Ao contrário de *Candida albicans*, *C. parapsilosis* não forma hifas verdadeiras, mas sim pseudohifas <sup>5</sup>. Evidências recentes apontam que a formação de pseudohifas está relacionada com disponibilidade de aminoácidos, particularmente a citrulina.

O fenótipo da colónia está directamente associada ao tipo de células que a compõem. Assim, a colónia lisa é formada por leveduras enquanto as colónias concêntricas ou crepe são compostas por pseudohifas <sup>2</sup>.

## 1.2. Prevalência

Comparativamente a outras espécies do género *Candida*, *C. parapsilosis* apresenta uma distribuição ubíqua, tendo sido isolada de diversas fontes, não estando por isso restrita ao hospedeiro humano <sup>4</sup>.

Ao longo da última década, a incidência da espécie *C. parapsilosis* em casos de fungemia tem vindo a aumentar significativamente. De facto, vários estudos epidemiológicos apontam *C. parapsilosis* como a segunda espécie de *Candida* mais isolada em infeções sistémicas <sup>5,10,11</sup>.

Infeções por *C. parapsilosis* afetam principalmente indivíduos com o sistema imunológico debilitado, em particular neonatos, doentes transplantados e/ou sujeitos a nutrição parenteral, doentes internados em unidades de queimados ou em unidades de cuidados intensivos <sup>12,13</sup>. Também já foram reportados surtos de *C. parapsilosis* associada a cateteres de diálise <sup>14</sup> e válvulas cardíacas prostéticas <sup>15</sup>.

Em neonatos, a maior incidência de fungemia verifica-se em prematuros de baixo peso e recém-nascidos que requerem acompanhamento médico em unidades de cuidados intensivos. Os prematuros possuem altas taxas de colonização por *Candida* em comparação com crianças nascidas a termo, tendo sido estabelecido que a colonização com *Candida* é inversamente proporcional à idade gestacional. A colonização por *Candida* em neonatos e consequente disseminação sistémica resulta em elevadas taxas de morbidade e mortalidade <sup>16</sup>. Assim, *C. parapsilosis* está entre as causas mais comuns de fungemia, estando associada a taxas de mortalidade entre os 28-59% <sup>13</sup>.

*C. parapsilosis* pode ser isolada nas mãos dos prestadores de cuidados de saúde e, por este motivo tem sido responsável por vários surtos de infeções, tornando-se assim uma espécie de interesse clínico crescente. Em alguns casos, a incidência de fungemia causada por *C. parapsilosis* é semelhante ou excede a de *C. albicans* <sup>12,17,18</sup>. Surtos periódicos de fungemia em unidades pediátricas causados por *C. parapsilosis* têm sido descritos em Espanha <sup>12</sup>, em Itália <sup>19</sup> e nos Estados Unidos <sup>4</sup>.

Neste último, espécies do género *Candida* constituem a quarta causa de infeções invasivas, sendo a espécie *C. parapsilosis* o terceiro agente causador de sepsis neonatal <sup>20</sup>.



Segundo Trofa et al.<sup>5</sup>, *C. parapsilosis* tem adquirido importância epidemiológica na Europa, Ásia e América do Sul, tendo-se verificado um aumento significativo da taxa de incidência desde 1990, sendo a sua taxa de incidência de 15.5% na América do Norte, 16.3% na Europa e 23.4% na América Latina.

Em Portugal, dados provenientes de um estudo sobre fungemia realizado no Hospital S. João, Porto, mostraram que este tipo de infeções foi detetado em 3,17 dos casos por 1,000 doentes/dia. O género *Candida* foi identificado como o quarto agente mais isolado nas hemoculturas, do qual as espécies mais prevalentes foram: *C. albicans* (35%), *C. parapsilosis* (25,6%) e *C. tropicalis* (12,8%)<sup>11</sup>.

### **1.3. Factores de Virulência**

As intervenções cirúrgicas e o aumento da natureza invasiva dos cuidados médicos, acompanhada do uso de cateteres ou outros dispositivos intravenosos, constituem uma oportunidade para a disseminação de microorganismos e formação de biofilmes<sup>21</sup>.

Em *C. parapsilosis* estão descritos diversos fatores de virulência que incluem, a capacidade de adesão às células dos hospedeiros, a produção de enzimas hidrolíticas (lipases, proteases) e a formação de biofilmes<sup>22</sup>.

A produção de enzimas hidrolíticas, nomeadamente lipases, representa um fator de virulência característico de várias estirpes do género *Candida*. Em *C. albicans* foram identificados 10 genes que codificam para lipases. Apenas dois genes foram identificados em *C. parapsilosis* (CpLIP1 e CpLIP2) como regiões codificantes para proteínas ativas, tendo sido demonstrado o seu papel na patogénese<sup>23</sup>. Em *C. parapsilosis*, as lipases foram relacionadas com o aumento da virulência, uma vez que reduzem a fagocitose da levedura por macrófagos circulantes, contribuindo também para a formação de biofilmes<sup>24</sup>.

As proteinases são enzimas características de estirpes fúngicas patogénicas. Estão muito bem descritas no género *Candida*, nomeadamente em *C. albicans*<sup>25</sup>. Nesta levedura contribuem para a degradação de proteínas do hospedeiro, com o objetivo de utilizar o nitrogénio daí resultante para o seu próprio metabolismo. Permitem ainda que a levedura degrade e desestabilize a membrana celular e algumas moléculas do sistema imunológico do hospedeiro (imunoglobulinas), permitindo a adesão e invasão celular<sup>26</sup>.

O principal fator associado à patogénica do género *Candida* deve-se à sua capacidade de proliferar formando biofilmes<sup>27</sup>. O biofilme constitui uma estrutura mais resistente aos

antifúngicos, comparativamente às células planctónicas. Representam um problema de saúde pública, por serem capazes de se desenvolver em superfícies não orgânicas, nomeadamente em dispositivos médicos implantados, sendo extremamente refratários à terapia antimicrobiana <sup>28</sup>.

Os biofilmes são estruturas compostas por microrganismos envolvidos por uma matriz de polissacarídeos, constituem comunidades complexas, interdependentes, podendo formar-se em qualquer superfície. Estes podem ser constituídos por microrganismos da mesma espécie, ou de diferentes espécies microbianas. Os microrganismos que se agregam em biofilmes fazem-no como estratégia ecológica, uma vez que o biofilme fornece proteção contra fatores ambientais, proporcionando maior disponibilidade de nutrientes, cooperação metabólica e troca de elementos genéticos, podendo constituir a principal forma de crescimento de microrganismos na natureza <sup>27,28</sup>.

A formação de biofilme em *C. albicans* foi bem caracterizada e ocorre em várias etapas. O primeiro passo envolve a adesão da levedura a uma superfície, o qual é seguido por um período de crescimento celular, ou iniciação de biofilme. Durante a fase de maturação, as hifas são produzidas e as células ficam envolvidas por uma matriz extracelular. A etapa final é a dispersão, que ocorre quando as leveduras se desprendem do biofilme e disseminam pela corrente sanguínea, podendo colonizar outros locais no hospedeiro <sup>27</sup>.

Uma vez que *C. parapsilosis* não forma hifas verdadeiras, os biofilmes consistem numa densa rede de células leveduriformes e pseudohifas envolvidas em grandes quantidades de carboidratos <sup>29</sup>.

#### **1.4. Terapia antifúngica**

Relativamente às infeções fúngicas na prática clínica, um dos grandes desafios reside no facto de haver limitações quanto à segurança dos fármacos, resistência, e perfis de efetividade. As terapias atuais para micoses invasivas englobam um número reduzido de fármacos em que os mais utilizados são a anfotericina B, fluconazole e itraconazole. No entanto, verifica-se um aumento do uso das equinocandinas como agentes terapêuticos <sup>30</sup>.

Apesar da pesquisa para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, apenas 4 classes de antifúngicos são utilizados para o tratamento de infeções fúngicas sistémicas, incluindo infeções por *C. parapsilosis* <sup>31</sup>.

A classe dos polienos engloba mais de cem compostos diferentes, embora os mais usados na prática clínica sejam a anfotericina B, nistatina e natamicina, uma vez que são os que possuem toxicidade clínica permitida. A ação antifúngica destes compostos, particularmente a anfotericina B é baseada na formação de complexos entre as moléculas do antifúngico com o ergosterol da membrana celular gerando alterações drásticas de permeabilidade membranar resultante da formação de canais de porinas, que conduzem à lise celular<sup>30,32</sup>.

A aquisição de resistência aos polienos é rara, especialmente em estirpes do género *Candida*, uma vez que estes compostos possuem pouca solubilidade e elevada toxicidade. Embora, os mecanismos de resistência ainda não estejam estudados especula-se que a resistência poderá ocorrer por: i) alteração dos esteróis da membrana celular; ii) aumento de atividade das catalases, com perda de susceptibilidade aos danos oxidativos; iii) mutações nos genes envolvidos na biossíntese do ergosterol, como o gene *ERG3* e *ERG6*; e iv) alteração no rácio dos esteróis<sup>32</sup>.

As flucitocinas são compostos análogos à base azotada pirimidina. Estes compostos entram nas células fúngicas através de transportadores específicos e ativam várias enzimas. Desta activação resulta a inibição da síntese do DNA e RNA, ficando a divisão celular severamente comprometida<sup>32</sup>. Algumas leveduras possuem resistência intrínseca às flucitocinas causada por mutações na enzima citosina permease, as quais reduzem significativamente a entrada destes compostos para o interior da célula. Por outro lado, mutações nas enzimas citosina desaminase ou uracilo fosforribosil transferase promovem alterações no metabolismo da flucitosina, constituindo assim um mecanismo de resistência adquirida<sup>32</sup>.

As equinocandinas (micafungina, caspofungina e anidulafungina) inibem, especificamente, a síntese da parede celular. A ação destes compostos envolve a inibição não competitiva da enzima  $\beta$ -1,3-glucano sintetase. Esta enzima é fundamental na estrutura e função da parede celular fúngica, e a sua inibição origina a formação de uma parede celular deficiente que pode culminar na rutura e lise das células fúngicas leveduriformes e no crescimento de hifas aberrantes em fungos filamentosos<sup>32,33</sup>. O mecanismo de resistência mais comum às equinocandinas é a alteração da afinidade das equinocandinas para a enzima  $\beta$ -1,3-glucano sintetase, que ocorre devido ao aparecimento de mutações no gene que codifica para esta enzima<sup>34,35</sup>.

Por último, a classe dos azoles é a mais utilizada na prática clínica. O fluconazole (FLC), voriconazole (VRC) e posaconazole (PSC) são alguns dos fármacos pertencentes a esta classe. Os azoles têm como alvo a via biossintética do ergosterol através da inibição direta da enzima lanosterol 14 $\alpha$ -demetilase, codificado pelo gene *ERG11*<sup>36</sup>. A inibição da enzima lanosterol 14 $\alpha$ -demetilase pelos azoles resulta na desregulação da via biossintética do ergosterol e na acumulação de 14 $\alpha$ metilergosta-8,24-dieno-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol (14 $\alpha$ -metil-3,6-diol). Este composto é um esterol metilado que inibe o crescimento das células fúngicas. Alterações na via biossintética, que têm como objetivo evitar a acumulação deste esterol, constitui um dos mecanismos de resistência a este tipo de antifúngicos<sup>30,36,37</sup>.

### **1.5. Resistência antifúngica de *C. parapsilosis* aos Azoles**

As leveduras, tal como todos os outros microrganismos, adaptam-se às condições ambientais. Em situações onde estão expostas a pressões seletivas, desencadeiam mecanismos de resposta de modo a superar o *stress*. Deste modo a resistência antifúngica representa uma resposta adaptativa ao *stress* causado pela exposição a um determinado antifúngico<sup>38,39</sup>.

O desenvolvimento de resistência deriva de alterações genéticas que se destinam a neutralizar os efeitos fungicidas ou fungistáticos dos antifúngicos. Dependendo do tipo de antifúngico, a resistência pode ser estabelecida através da: i) redução da acumulação do fármaco no interior da célula fúngica; ii) diminuição da afinidade do antifúngico à proteína alvo; iii) alteração do metabolismo<sup>38,39</sup>.

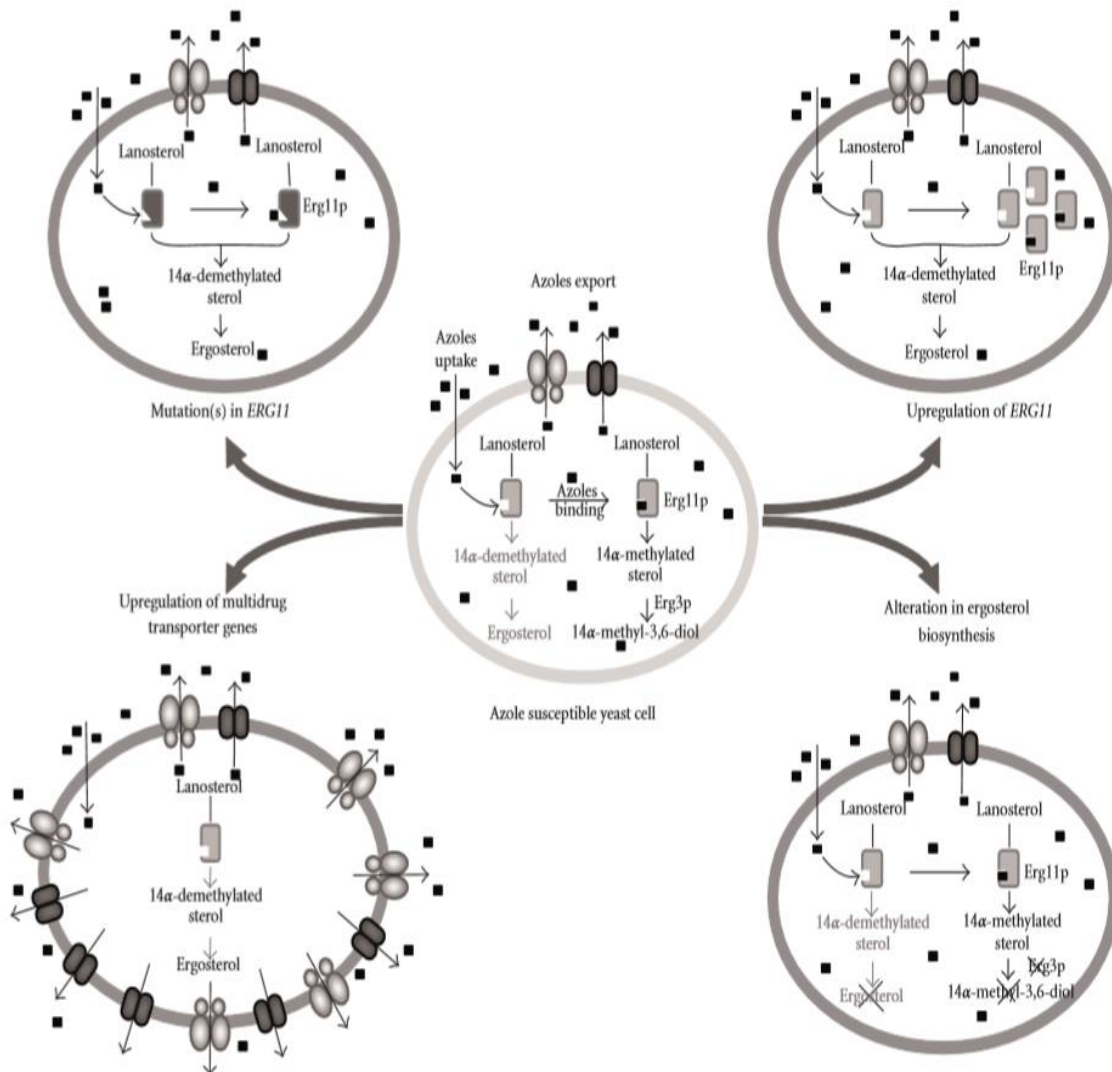
A resistência aos antifúngicos resulta no aumento das taxas de morbidade e mortalidade especialmente na população imunocomprometida<sup>32,40</sup>. A resistência clínica é definida como a persistência ou progressão de uma infeção, apesar da terapia antimicrobiana adequada. A resistência é considerada primária quando o organismo é resistente ao fármaco antes da exposição, enquanto a resistência secundária é aquela que se desenvolve em resposta à exposição ao fármaco. No caso de *C. parapsilosis*, o aparecimento de resistência aos azoles resulta da exposição ao longo dos últimos anos, por indicação terapêutica<sup>28</sup>.

Muito pouco se sabe acerca da cinética de aquisição de resistência em *C. parapsilosis*. Embora *C. parapsilosis* não seja considerada particularmente propensa a desenvolver resistência a antifúngicos, estudos realizados na última década sugerem que a sua baixa

sensibilidade às equinocandinas e a exposição continuada aos azoles pode vir a tornar-se motivo de preocupação clínica, isto porque o fluconazole é a terapia de escolha no tratamento de candidemias <sup>41,42</sup>.

Vários estudos têm sido realizados nos últimos anos com a finalidade de explorar os mecanismos moleculares responsáveis pela resistência aos azoles, em isolados clínicos. Em *C. albicans*, as alterações moleculares que conduzem ao desenvolvimento de resistência aos azoles resumem-se em quatro mecanismos distintos (Figura 1):

- Alterações na expressão do alvo dos azoles. Em *C. albicans* a exposição aos azoles, mesmo que de curta duração conduz à sobreexpressão do gene *ERG11*, que codificam para a enzima alvo, lanosterol 14 $\alpha$ -demetilase. O excesso de produção de moléculas alvo reduz significativamente a acção fungistática dos azoles conduzindo à resistência <sup>39,43</sup>.
- Efluxo ativo de fármacos resultante da sobreexpressão de genes que codificam para as bombas de efluxo, nomeadamente o *CDR1*, *CDR2* e *MDR1*, que realizam o transporte ativo dos azoles para o meio extracelular <sup>44-46</sup>.
- Mutações pontuais do gene *ERG11* que codifica para a enzima alvo dos azoles. Estas mutações são responsáveis pela diminuição ou perda de afinidade entre o fármaco e a enzima alvo <sup>39</sup>.
- Alterações da via biossintética do ergosterol, nomeadamente em genes *ERG*, que culminam no aumento da síntese do ergosterol, dificultando deste modo a penetração do fármaco para o meio intracelular <sup>44,46</sup>.



**Figura 1. Mecanismos de resistência aos azoles em *C. albicans***<sup>39</sup>: sobreexpressão do gene *ERG11*, que codifica para a molécula alvo dos azoles; mutações pontuais do gene *ERG11*; efluxo ativo de fármacos resultante da sobreexpressão de genes que codificam para as bombas de efluxo; alterações da via biossintética do ergosterol, nomeadamente nos genes *ERG*, que culminam no aumento do ergosterol membranar dificultando a penetração do fármaco para o meio intracelular.

### 1.5.1. A Biossíntese do ergosterol

Sendo a via biossintética do ergosterol um processo que está envolvido na resistência aos azoles, torna-se muito importante compreender os processos envolvidos na síntese do ergosterol celular.

Os esteróis são moléculas essenciais ao funcionamento celular, actuando como reguladores da fluidez e permeabilidade da membrana, da morfologia celular, actividade enzimática, e influenciando a taxa de crescimento celular. O ergosterol é o esterol predominante na membrana dos fungos e a sua perda resulta em lise celular. O ergosterol corresponde ao colesterol em células animais e ao fitoesterol nas plantas <sup>47</sup>.

Vários antifúngicos têm como alvo produtos de genes que actuam na via biossintética do ergosterol. Em resposta ao *stress* provocado pelos antifúngicos os microrganismos desenvolvem mecanismos compensatórios de modo a anular o efeito inibitório dos antifúngicos possibilitando a recuperação de funções celulares comprometidas <sup>48</sup>. Esses mecanismos compensatórios envolvem alterações em passos específicos da biossíntese do ergosterol composta por enzimas codificadas pelos genes *ERG* <sup>36,45,49</sup>.

Em *Saccharomyces cerevisiae* o processo de biossíntese do ergosterol é anaeróbico (Figura 2), embora seja necessária a presença de oxigénio para que ocorra a desmetilação do lanosterol. Sob condições anaeróbicas, a biossíntese do ergosterol inicia-se com a síntese da acetoacetil acetil-coenzima A (CoA) <sup>50</sup>. Posteriormente, ocorre a conversão da acetoacetil-CoA para hidroximetilglutaril-CoA (HMGCoA) pelo *ERG13* <sup>51</sup>. Posteriormente, dá-se a catalização da mevalonato cinase, que é codificada pelo gene *ERG12* <sup>52</sup>. O *ERG8* codifica para a fosfomevalonato cinase <sup>53</sup> e o *ERG19* codifica a mevalonato pirofostato descarboxilase que converte o mevalonato pirofostato em isopentenil pirofostato <sup>54,55</sup>. O passo seguinte envolve a conversão do isopentenil pirofostato em dimetilalil pirofostato. O dimetilalil pirofostato é convertido em farnesil e geranil pirofostato <sup>56,57</sup>.

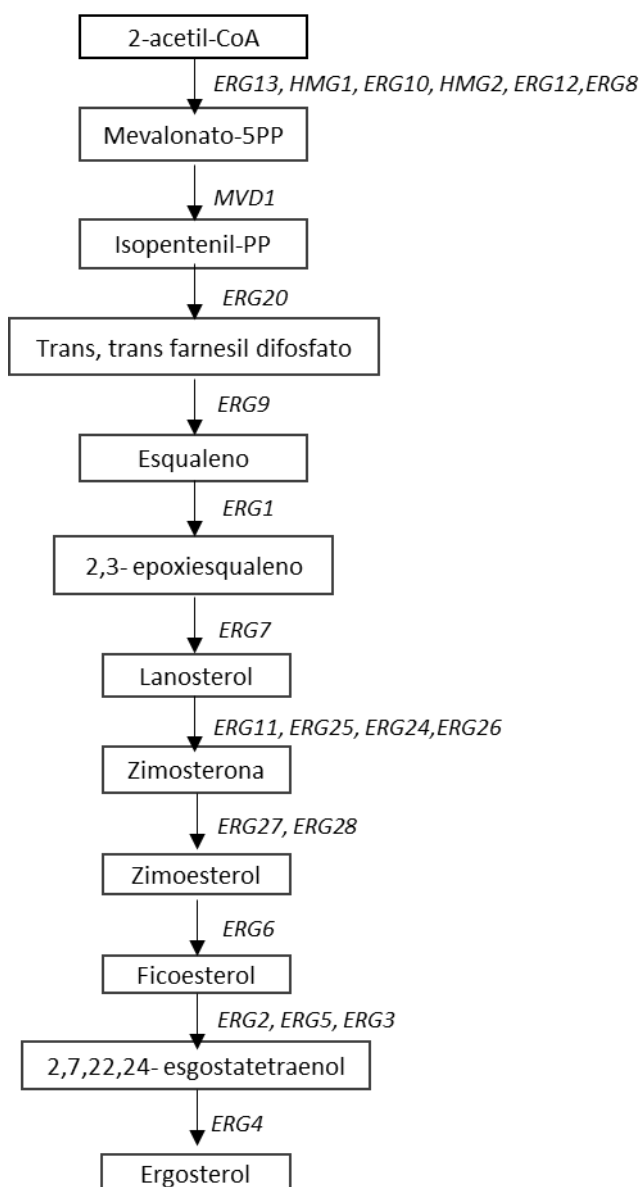
A segunda etapa para a formação do ergosterol inicia-se com a enzima esqualeno sintetase, produto do gene *ERG9*, que vai combinar duas moléculas de farnesil pirofostato para formar esqualeno <sup>58</sup>. A enzima esqualeno epoxidase é codificada pelo gene *ERG1* e converte o esqualeno em 2,3-oxidoesqualeno. Este passo requer oxigénio <sup>59</sup>. O próximo passo é a conversão 2,3-oxidoesqualeno em lanosterol com o auxílio da enzima lanosterol sintetase, que é produto do gene *ERG7* <sup>60</sup>.

Nesta fase da via biossintética, encontra-se formada uma molécula de esterol. Um bloqueio enzimático resultante da acção antifúngica nesta fase leva à acumulação de vários esteróis com estruturas anómalas <sup>61</sup>.

A enzima 14-alfa-demetilase é codificada pelo gene *ERG11*. O gene *ERG11* em *C. albicans* é composto por 528 aminoácidos e possui um centro ativo que está localizado no interior da proteína. O substrato interage com um canal de acesso longo e, em seguida, é desmetilado <sup>62-65</sup>. As moléculas dos azoles interrompem este processo e inibem a síntese do ergosterol. Mutações no gene *ERG11* que alterem a sequência de aminoácidos da proteína, e possivelmente a conformação da proteína, contribuem para a diminuição da afinidade entre os azoles e o seu alvo, conduzindo à resistência antifúngica <sup>66</sup>.

Um outro passo da biossíntese do ergosterol envolve a conversão do 4,4-dimetilcolesta-8,14,24-trienol em 4,4-dimetilcolesta-8,24-dienol realizada pela enzima C-14-redutase, codificada pelo gene *ERG24* <sup>61</sup>. Os genes *ERG25* e *ERG26* codificam as enzimas esterol C-4-redutase e o esterol C-3-desidrogenase que vão fazer a conversão do 4,4-dimetilcolesta-8,24-dienol em 4-metilzimosterol. Nesta fase ocorrem várias metilações complexas. O zimosterol resulta da desmetilação do C-4 e serve de substrato para a esterol C-24-metiltransferase (codificada pelo gene *ERG6*) levando à formação do fecosterol. A enzima C-8-isomerase, codificada pelo gene *ERG2*, permite a conversão do fecosterol em episterol. De seguida com o auxílio do produto do gene *ERG3*, ocorre a formação do ergosta-5,7,24(28)-trienol. A enzima C-22 esterol-desnaturase (codificada pelo gene *ERG5*) vai converter o ergosta-5,7,24 (28)-trienol em ergosta-5,7,22,24(28)-tetraenol. A produção do ergosterol resulta da acção do C-24 redutase, uma enzima codificada pelo gene *ERG4* <sup>61</sup>.





**Figura 2.** A via biossintética do ergosterol em *S. cerevisiae* conduz à transformação do acetil CoA em ergosterol, por acção de enzimas codificadas pelos genes *ERG* (Silva et al. 2011).

## 1.6. O papel dos fatores de transcrição *NDT80* e *UPC2* na resistência aos Azoles

Durante o tratamento prolongado com antifúngicos ocorre frequentemente o aparecimento sequencial de diferentes mecanismos de resistência, que atuam em sinergismo originando o desenvolvimento de estirpes altamente resistentes aos azoles <sup>67</sup>.

De modo a perceber quais os mecanismos de resistência desenvolvidos por exposição continuada aos azoles, uma estirpe clínica de *C. parapsilosis* (BC014) suscetível foi diariamente incubada com concentrações séricas de posaconazole, voriconazole e fluconazole <sup>68</sup>.

Verificou-se que a exposição ao fluconazole e ao voriconazole confere resistência cruzada a ambos os fármacos, mas não ao posaconazole para o qual, apesar do valor CIM (Concentração Mínima Inibitória) ter aumentado quatro diluições, o fenótipo susceptível manteve-se. Em contrapartida, a estirpe exposta diariamente ao posaconazole desenvolveu resistência cruzada aos três azoles, apresentando valores de CIM elevados: FLC – 128 µg/ml; VRC – 16 µg/ml e PSC – 32 µg/ml <sup>45</sup>.

Assim, a partir da indução *in vitro* de resistência aos azoles na estirpe BC014, surgiram 3 estirpes, BC014R\_FLC, BC014R\_VRC e a BC014R\_PSC, com perfis de susceptibilidade distintos. Os valores de CIM para a estirpe BC014R\_FLC foi de 128/R para o fluconazole, 4/R para o voriconazole e 0.03/S para o posaconazole, enquanto para a estirpe BC014R\_VRC os valores de CIM foram de 128/R para o fluconazole, 4/R para o voriconazole e 0.5/S para o posaconazole. Já para a estirpe BC014R\_PSC os valores de CIM foram de 128/R ao fluconazole, 16/R ao voriconazole e 32/R ao posaconazole <sup>68</sup>. Para perceber quais os mecanismos moleculares responsáveis pelo aparecimento de resistência aos azoles efectuou-se a análise comparativa do transcriptoma das três estirpes relativamente à estirpe controlo BC014 <sup>45</sup>. Nas estirpes BC014R\_FLC e BC014R\_VRC verificou-se que a resistência antifúngica estava relacionada com o aumento de expressão do gene *MDR1*, que codifica para bombas de efluxo, e seu regulador, o factor de transcrição *MRR1*. Esta sobreexpressão estava directamente associada com mutações *gain-of-function* no *MRR1*, as quais são responsáveis pela expressão constitutiva do factor de transcrição e, conseqüentemente, do seu gene alvo, o *MDR1* <sup>69</sup>. A extrusão do antifúngico pelas bombas de efluxo impede a sua acumulação intracelular, evitando os seus efeitos tóxicos <sup>45</sup>.

Por outro lado, na estirpe BC014R\_PSC detectou-se uma sobreexpressão dos genes da via biossintética do ergosterol, nomeadamente os genes *ERG6* e *ERG11*. Acompanhando a sobreexpressão dos genes *ERG*, verificou-se a sobreexpressão dos factores de transcrição *NDT80* e *UPC2* <sup>45</sup>.

O fator de transcrição *NDT80* foi identificado em *C. albicans* como sendo um dos factores de transcrição regulador dos genes *ERG*, através de ligação aos seus promotores. Em *C. albicans* o gene *NDT80* é crucial para a tolerância aos azoles e regula positivamente a expressão do gene *CDR1*, que codifica para uma bomba de efluxo. Em *S. cerevisiae* o seu homólogo regula a expressão de genes envolvidos na esporulação e na meiose celular <sup>45,70</sup>. De acordo com Dunkel et al. <sup>40</sup>, o gene *UPC2* está envolvido na via biossintética do ergosterol. O fator de transcrição Upc2 regula a expressão do gene *ERG11* e outros genes envolvidos na biossintese de ergosterol <sup>45</sup>. Em estudos recentes foram encontradas mutações no gene *UPC2* que contribuem para a diminuição da suscetibilidade ao fluconazole <sup>71</sup>.

Com estes resultados, Silva et al. <sup>45</sup> propôs que a resistência aos azoles, nomeadamente ao posaconazole pode ser conferida pela regulação positiva dos dois factores de transcrição, o Ndt80 e o Upc2. Uma vez que estes factores de transcrição são reguladores da via biossintética do ergosterol, a sua sobreexpressão resulta na sobreexpressão de genes *ERG*, nomeadamente os genes *ERG6* e *ERG11*. Por outro lado, a sobreexpressão destes genes conduz ao aumento do conteúdo de ergosterol membranar, contribuindo para o aparecimento de resistência <sup>45</sup>.

#### **1.6.1. O gene *UPC2* reconhece uma sequência *sterol response element* (SRE) e activa a expressão dos genes *ERG***

Na resistência aos azoles em *C. albicans*, o fator de transcrição Upc2 medeia a regulação positiva de genes da biossintese do ergosterol em resposta à diminuição do esteroide celular <sup>72</sup>. Para activar a transcrição dos genes *ERG* o factor de transcrição Upc2 liga-se à sequência consensus SRE. Foram identificadas sequências SRE nos genes *ERG1*, *ERG2*, *ERG3*, *ERG6*, *ERG8*, *ERG11*, *ERG12*, *ERG13* e *ERG25*, de *C. albicans*, sugerindo que este factor de transcrição é o principal regulador dos genes da biossintese do ergosterol <sup>73</sup>. Em *C. albicans* o SRE possui a sequência consensus 5` TCGTATAA 3´ e foi demonstrado por Oliver et al. <sup>74</sup> que a resistência induzida pelos azoles nesta levedura é dependente dos

motivos SRE. Macpherson et al.<sup>75</sup> demonstraram que o fator de transcrição Upc2 em *C.albicans* é homóloga ao fator Upc2 em *Sacharomyces cerevisiae*. Nesta levedura o Upc2 reconhece um elemento de reconhecimento composto por 11 pb tendo um núcleo conservado de 7 pb, 5` TCGTATA 3`. Em *C. albicans* Silver et al.<sup>76</sup> localizou este núcleo de 7 pb nas posições -232 a -236 do promotor do gene *ERG11*.

O factor de transcrição Upc2 pertence à superfamília *zinc cluster* e contribui para a regulação da biossíntese do ergosterol e na resistência ao azoles em *C. albicans* e em *C. parapsilosis*<sup>45,77</sup>.

Várias mutações *gain-of-function* no *UPC2* contribuem para a resistência aos azoles em *C. albicans* e em *S. cerevisiae*<sup>40,78</sup>. Mutações no domínio C-terminal do *UPC2* em *C. albicans* (A643V, A643T ou G648D) resultam na activação constitutiva deste, que leva à regulação positiva da via biossintética do ergosterol e ao aumento ergosterol celular, traduzindo-se na diminuição da susceptibilidade aos azoles<sup>72,79</sup>. A deleção do gene *UPC2* afecta a susceptibilidade aos azoles. Foi demonstrado por Silver et al.<sup>76</sup> e Macpherson et al.<sup>75</sup>, que mutantes de *C. albicans* com o gene *UPC2* deletado, quando expostos a azoles, apresentam hipersensibilidade aos azoles devido à reduzida expressão dos genes *ERG*.

Ainda, em *S. cerevisiae*, mutações *gain-of-function* (G888D) no gene *UPC2* resulta na activação do factor de transcrição e no aumento do esterol aeróbico, levando à resistência<sup>78,79,81</sup>.

### **1.6.2. O gene *NDT80* reconhece uma sequência *Middle Sporulation Element* (MSE)**

O factor de transcrição Ndt80 tem sido identificado como um regulador positivo do transportador do tipo ABC, *CDRI*, e é crucial na tolerância aos azoles<sup>82</sup>. O Ndt80 liga-se a regiões promotoras de 23% do ORFeoma de *C. albicans*<sup>82</sup>. A grande maioria dos locais de ligação do Ndt80, em *S. cerevisiae*<sup>83-86</sup> e em *C. albicans*<sup>87</sup>, encontram-se em regiões promotoras<sup>87,88</sup> denominadas de *Middle Sporulation Element* (MSE). O MSE corresponde a 7 pb de uma sequência consenso de 9 pares de bases 5'-gNCRCAAAY-3', onde as letras minúsculas correspondem a resíduos semiconservados, o resíduo R corresponde a uma purina, o N corresponde a um nucleotideo, e o Y corresponde a uma citocina ou a uma timina<sup>85,86</sup>. O motivo MSE em *C. albicans* é semelhante ao de *S. cerevisiae* o que indica que esta sequência é altamente conservada<sup>87</sup>.

Em *Sacharomyces cerevisiae* o fator de transcrição Ndt80 é essencial no *crossing over*, desmontagem do complexo sinaptonémico, na progressão do ciclo celular após a prófase I e regula a expressão de genes envolvidos na esporulação e recombinação meiótica <sup>70,86,89</sup>.

Em *C. albicans*, Sellam et al. <sup>87</sup> demonstraram que os genes *ERG1*, *ERG2*, *ERG3*, *ERG4*, *ERG5*, *ERG6*, *ERG7*, *ERG9*, *ERG10*, *ERG11*, *ERG13*, *ERG24*, *ERG25*, *ERG251* e *ERG26* são regulados pelo Ndt80, em resposta ao fluconazole. Para além destes, os genes-alvo do Ndt80 são genes envolvidos no metabolismo celular, resposta ao *stress*, desenvolvimento celular e resistência antifúngica, bem como outros factores de transcrição, dos quais se destacam factores que regulam: o crescimento de hifas (Efg1p, Nrg1p, Cph2p, Ume6p, Czf1p, Tec1p, Flo8p, Ssn6p, Rfg1p), o metabolismo de hidratos de carbono (Rgt1p, Tye7p, Gal4p, Mig1p), o ciclo celular (Swi4p, Ash1p), o metabolismo lipídico (Opi1p, Ino2p, Ctf1p), o metabolismo de aminoácidos (Cbf1p, Gln3p, Gcn4p), *stress* (Cat8p, Hac1p, Cas5p), e outros reguladores transcricionais, (Stp4p, Sua71p, Stp1p, Tbp1p, Stp2p, Stp3p,) <sup>87</sup>. Ainda, o Ndt80p liga-se a regiões promotoras de transportadores membranares, tais como o *MDR1*, *FLU1*, *NAG3* e *NAG4* bem como a flipazes *RTA* e *RTA2*.

## 1.7. Caso de estudo e objectivos

A aquisição de resistência por leveduras patogénicas a agentes antifúngicos, particularmente após exposições prolongadas, é um fenómeno bem conhecido em fungos.

No entanto, apesar de todos os avanços nos últimos 30 anos no ramo de investigação de novas terapias antifúngicas, a resistência ainda permanece como a principal preocupação na prática clínica <sup>39</sup>. Apesar da incidência crescente de *C. parapsilosis* <sup>46</sup>, pouco se sabe relativamente ao modo de actuação dos factores de transcrição *NDT80* e *UPC2* na resistência aos azoles.

Assim sendo, propõe-se com este estudo elucidar qual o papel destes factores de transcrição na resistência de *C. parapsilosis* aos azoles. Para tal proceder-se-á à deleção dos genes *NDT80* e *UPC2* nas estirpes BC014 e BC014R\_PSC, utilizando a ferramenta molecular *SAT1-Flipper* <sup>90</sup>, pretendendo-se posteriormente efectuar a caracterização dos mutantes relativamente ao seu perfil de suscetibilidade e à expressão génica.

## 2. Material e métodos

### 2.1. Estirpes e Condições de Crescimento

As estirpes de *C. parapsilosis* (BC014 e BC014R\_PSC) utilizadas neste estudo foram cedidas pela Doutora Ana Silva, Investigadora do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto (Pinto e Silva et al., 2009; Silva et al. 2011).

As estirpes foram cultivadas rotineiramente em meio *Yeast Peptone Dextrose* líquido (YPD) (extrato de levedura 1%, peptona 2%, dextrose 2%) a 30°C com agitação (180 rpm), ou em YPD agar (agar 2%). Para seleção dos transformantes, o meio YPD agar foi suplementado com nourseotricina (Nou; Werner Bioagents, Jena, Germany) na concentração final de 200 µg ml<sup>-1</sup>.

Para realizar a excisão da cassete *SAT1-Flipper*, os transformantes cresceram em meio *Yeast Peptone Maltose* líquido (extrato de levedura 1%, peptona 2%, maltose 2%) (YPM) a 30°C com agitação, durante a noite. A partir desta cultura, foram aproximadamente semeadas 100 células em YPD agar suplementado com Nou na concentração final de 20 µg ml<sup>-1</sup>.

Todas as estirpes de *C. parapsilosis* foram guardadas em meio YPD com 40% de glicerol, a -80°C.

### 2.2. Transformação por Eletroporação

*C. parapsilosis* foi transformada por eletroporação como descrito por Zemanova et al. (2004), com algumas modificações.

Após incubação durante a noite a 30°C, a cultura foi diluída em 50 ml de YPD para uma densidade óptica (DO) a 600 nm de 0.2, tendo sido novamente incubada até atingir uma DO<sub>600nm</sub> de aproximadamente 2.0. As células foram posteriormente recolhidas por centrifugação a 5000 g durante 10 minutos e ressuspensas em 10 ml de tampão Tris-EDTA (Tris-HCl 10mM pH 8, EDTA 1mM) contendo ditiotreitól (DTT) 10 mM. Após incubação a 30°C, durante 1 hora, com agitação (100 rpm), foi adicionado 40 ml de água fria à suspensão celular. Seguidamente, a suspensão foi sequencialmente lavada com 50 ml de água fria e 10 ml de sorbitol 1 M frio. Por último, as células foram ressuspensas em 125 µl de sorbitol 1 M frio e distribuídas em alíquotas de 50 µl de células competentes. A cada

alíquota de células competentes foi adicionado cerca de 1 µg de cassete de interrupção. Esta mistura foi de imediato transferida para uma cuvette de eletroporação de 1 mm. A transformação ocorreu num eletroporador Gene Pulser X-cell (Bio-Rad) a 1,25 kV, durante um tempo constante de 5 ms. Após eletroporação, foram adicionados 950 µl de meio YPD contendo sorbitol 1 M. A suspensão celular foi incubada a 30°C durante 4 horas com agitação. Após este período, 100 µl da suspensão foi distribuída em placas contendo YPD agar suplementado com Nou a 200 µg ml<sup>-1</sup>. Os transformantes foram obtidos após 48 horas de incubação a 30°C.

### 2.3. Detecção dos transformantes positivos e reciclagem da cassete

As colónias de maior dimensão crescidas em meio YPD agar suplementado com Nou 200 µg ml<sup>-1</sup>, foram repicadas para YPD agar, tendo crescido a 30°C durante a noite. De seguida, procedeu-se à extracção de DNA como descrito em 2.4.1.

Para verificar a integração da cassete de interrupção no locus genómico pretendido realizou-se um *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Na reacção foi utilizado um *primer* complementar à região anterior ao promotor do gene *NDT80* ou *UPC2* (cpUPC2 gen\_F, cpNdt80 gen\_F) e outro *primer* complementar a uma sequência do gene *FLP* localizado na cassete de interrupção (Tabela 1 e 2). A reacção de PCR foi preparada de acordo com o descrito na Tabela 1. As condições da reacção foram as seguintes: 95°C por 3 minutos, 30 ciclos a 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C durante 10 minutos, de acordo o protocolo descrito para a enzima KapaTaq Hot Start (Kapa Biosystems).

**Tabela 1.** *Primers* utilizados para confirmação da integração genómica da cassete de interrupção *SAT1 Flipper* para deleção dos genes *UPC2* e *NDT80* em *C. parapsilosis*.

<i>Primer</i>	<b>Sequência 5'-3'</b>
CpUPC2gen_up_F	CGCTATTCGTTTATTGTGTAGTCAAGC
CpNDT80gen_up_F	GCCTTTTACATCTATCGAAGTCAAAGTTG
FLP_R	TTTATGATGGAATGAATGGGATG

**Tabela 2.** Componentes da reacção de PCR.

<b>Reagentes</b>	<b>Volume de <i>stock</i></b>	<b>Concentração final</b>
H2O miliQ	Ajustado para 25µl	
Tampão (10x)	2.5 µl	1x
dNTPs (10 mM)	0.5 µl	0.2 mM
<i>Primer</i> F (100 pmol µl <sup>-1</sup> )	1 µl	4 pmol
FLP_R (100 pmol µl <sup>-1</sup> )	1 µl	4 pmol
DNA	1 µl	100 ng
KapaTaq Hot Start	0.2 µl	1 U

Os transformantes cujo primeiro alelo do gene alvo foi deletado, foram incubados em YPM, a 30°C com agitação, durante a noite. Pretende-se com este procedimento excisar a cassette de disrupção, de modo a que esta possa ser usada novamente para deleção do segundo alelo. Assim, foram retiradas desta cultura cerca de 100 células, que foram posteriormente semeadas em meio agar YPD suplementado com Nou 20 µg ml<sup>-1</sup>. Após 24 horas de crescimento a 30°C, as colónias mais pequenas foram selecionadas. O crescimento reduzido é um indicador de que a cassette de disrupção foi excisada, uma vez que as células deixam de possuir o marcador de resistência, ou seja, o gene *SAT1*. Deste modo, as colónias mais pequenas foram simultaneamente semeadas nos meios YPD agar e YPD agar suplementado com Nou 200 µg ml<sup>-1</sup>. A ausência de crescimento em YPD agar suplementado com Nou 200 µg ml<sup>-1</sup> constitui a prova fenotípica de que a cassette de deleção foi excisada. No entanto, a excisão da cassette de deleção foi posteriormente confirmada por métodos moleculares. Foi extraído DNA de acordo com o protocolo descrito em 2.4.1. O DNA foi utilizado como molde para a reacção de PCR com os seguintes *primers* NDT80gen\_up\_F/ NDT80\_down\_R e UPC2gen\_up\_F/ UPC2down\_R, e com os componentes elencados na Tabela 3. As condições da reacção de PCR foram as seguintes: desnaturação a 95°C por 2 minutos, 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 66°C durante 30 segundos e 72°C durante 3 minutos. A extensão final foi a 72°C durante 10 minutos.



**Tabela 3.** Componentes da reação de PCR realizada para confirmação da excisão da cassette de interrupção.

<b>Reagentes</b>	<b>Volume de <i>stock</i></b>	<b>Concentração final</b>
H2O milliQ	Ajustado para 25µl	
Tampão (10x)	2.5 µl	1x
dNTPs (10mM)	0.5 µl	0.2 mM
Primer gen_F (100 pmol µl <sup>-1</sup> )	1 µl	4 pmol
Primer R (100 pmol µl <sup>-1</sup> )	1 µl	4 pmol
DNA	1 µl	10 ng
Taq DNA Polimerase (5U µl <sup>-1</sup> )	0.2 µl	1 U

## **2.4. Extração de DNA Genômico de *C. parapsilosis*.**

### **2.4.1. Extração de DNA genômico pelo método de fervura**

A partir de uma cultura fresca de células crescida durante a noite a 30°C retirou-se uma pequena porção de células que foi colocada num microtubo contendo 30 µl de SDS 1%. O microtubo foi vortexado durante 15 segundos e colocado em banho seco a 90°C durante 4 minutos. Após incubação, a suspensão celular foi centrifugada durante 3 minutos a 15871g. O sobrenadante foi colhido para um novo microtubo contendo 50 µl de água *milliQ*. Logo de seguida, o DNA extraído foi usado numa reação de *PCR*.

### **2.4.2. Extração de DNA genômico pelo método fenol-clorofórmio**

A extração de DNA genômico de *C. parapsilosis* foi realizada de acordo com o método descrito por Hoffman e Winston (1987), com algumas adaptações.

A partir de uma cultura de células de *C. parapsilosis* em meio YPD líquido, crescida a 30°C, durante a noite, com agitação (180 rpm), foi retirado uma alíquota de 1.5 ml cujas células foram separadas do sobrenadante por centrifugação a 20000 g durante 5 minutos, à temperatura ambiente. As células foram posteriormente lavadas com 500 µl de água *milliQ* estéril e ressuspensas em 200 µl de tampão de lise (Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl pH 8 10 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM pH 8). À suspensão celular foram adicionados 0.3 g de esferas de vidro (diâmetro entre 0.45 e 0.52 mm; Sigma, St. Louis, MO) e 200 µl de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1; Fluka Biochemika). Por um

período total de 10 minutos, a suspensão celular foi sonicada, durante 30 segundos, intercalada com incubação em gelo, por igual período de tempo. Posteriormente foi adicionado ao lisado celular 200 µl de TE (EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.0) e procedeu-se, em seguida, a uma centrifugação a 18000 g, durante 5 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo contendo 1 ml de etanol absoluto (100%) frio e fez-se a mistura por inversão. Os ácidos nucleicos foram separados após centrifugação a 20000 g, a 4°C, durante 20 minutos, e ressuspensos em 200 µl de TE e 2 µl de RNase (10 mg ml<sup>-1</sup>; Sigma). Procedeu-se à incubação a 37°C, durante 1 hora, de modo a ocorrer a degradação do RNA. Para precipitar o DNA foram adicionados 0.1 volumes de acetato de amónio 4 M e 3 volumes de etanol absoluto (100%). Após 1 hora de incubação a -80°C, o DNA foi recolhido a 20000 g, durante 20 minutos, a 4°C. De seguida, o DNA foi lavado com etanol 70%. Após incubação a 37°C durante 30-60 minutos para eliminar vestígios de sobrenadante, o DNA foi ressuspenso em 50 µl de tampão TE. Por último, a concentração e qualidade do DNA foi avaliado por espectrofotometria ( $A_{260}/A_{280}$ ) no NanoDrop.

## **2.5. Eletroforese de DNA**

Os géis de agarose foram preparados nas percentagens de 0.5 a 0.8, utilizando agarose “*Ultra Pure Grade*” (NZYtech) dissolvida em tampão TAE 1x (Tris 0.04 M, ácido acético glacial 1 M, EDTA 50 mM pH 8), ao qual foi posteriormente adicionado brometo de etídeo (0.02 µg ml<sup>-1</sup>).

As amostras de DNA foram preparadas adicionando tampão de carregamento na concentração final de 1x (azul de bromofenol 0.25%, xilenocianol 0.25%, glicerol 30%). As eletroforeses decorreram a 70 V (Power Pac Basic, Bio-Rad) num sistema de eletroforese horizontal (Mini-Sub Cell GT, Bio-Rad). Após a corrida eletroforética, o DNA foi visualizado no sistema Chemi Doc XRS (Bio-Rad) e a imagem capturada através do software Image Lab (Bio-Rad).

## 2.6. Amplificação e Restrição do Gene *SADH*

De modo a identificar as estirpes manipuladas como pertencentes à espécie *C. parapsilosis sensu stricto*, amplificou-se o gene *SADH* como descrito por Tavanti et al. (2005). A reação de *PCR* foi preparada como descrito na Tabela 4 utilizando os primers descritos na Tabela 5.

**Tabela 4.** Componentes da reação de *PCR* para amplificação do gene *SADH*.

Reagentes	Volume de <i>stock</i>	Concentração final
H <sub>2</sub> O <i>milliQ</i>	Ajustado para 25µl	
Tampão (10x)	2.5 µl	1x
dNTPs (10mM)	0.5 µl	0.2 mM
SADH_F (100 pmol µl <sup>-1</sup> )	1 µl	4 pmol
SADH_R (100 pmol µl <sup>-1</sup> )	1 µl	4 pmol
DNA	1 µl	10 ng
Taq DNA Polimerase (5U µl <sup>-1</sup> )	0.2 µl	1 U

**Tabela 5.** Primers utilizados na amplificação do gene *SADH* de *C. parapsilosis* por *PCR*.

Primer	Sequência 5'-3'
SADH_F	GTTGATGCTGTTGGATTGT
SADH_R	CAATGCCAAATCTCCCAA

As condições de amplificação foram as seguintes: 94°C durante 2 minutos, 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 50°C durante 30 segundos e 72°C durante mais 30 segundos, e por fim um ciclo de extensão de 10 minutos a 72°C. O *PCR* foi realizado no aparelho Realplex Mastercycler (Eppendorf, Madrid, Espanha).

O produto da reação de *PCR* foi digerido com a enzima *BanI* 40 U (Fermentas) numa reação de 40 µl de volume final. Os produtos da digestão foram separados em gel de agarose de 2%, tal como descrito em 2.5.

## 2.7. Avaliação da Suscetibilidade

Os valores da concentração inibitória mínima (CIM) do antifúngico para cada estirpe foram determinados de acordo com protocolo M27-A3 do *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI) <sup>93</sup>. Após cultivo e incubação durante 16 horas em meio YPD agar, foi preparada uma suspensão celular de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$  em tampão fosfato salino (PBS pH=7.4; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany), o que corresponde a uma densidade celular de 0.5 MacFarland. Foram efetuadas 3 diluições seriadas em RPMI 1640 (Sigma) a fim de se obter uma suspensão final de  $1 \times 10^3$  de células  $\text{ml}^{-1}$ .

Os antifúngicos utilizados foram o posaconazole (PSC), voriconazole (VRC) e fluconazole (FLC). As concentrações testadas de FLC e PSC variaram de 0.125 a 64  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , enquanto as concentrações de VRC variaram de 0.03 a 16  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Os três antifúngicos foram diluídos seriadamente de 1:2 e foram dispensados 100  $\mu\text{l}$  em cada poço de uma microplaca de poliestireno de 96 poços. Em seguida adicionou-se o mesmo volume da suspensão celular. Como controlo positivo adicionou-se 100  $\mu\text{l}$  de RPMI 1640 a 100  $\mu\text{l}$  da suspensão celular. Como controlo negativo foi utilizado apenas o antifúngico na menor concentração. As microplacas foram incubadas durante a 30°C sem agitação e fez-se a leitura após 24 e 48 horas de incubação a 35°C.

Os valores de CIMs foram registados após 48 horas de incubação, tendo sido considerado o valor de CIM como a menor concentração onde foi possível observar uma redução de crescimento de aproximadamente 50%. Os critérios interpretativos foram os estabelecidos pelo CLSI. Para o FLC, o CIM para suscetível (S) foi de  $\leq 2 \mu\text{g ml}^{-1}$ , para suscetível dose-dependente (S-DD) de 4  $\mu\text{g ml}^{-1}$  e o CIM para resistente (R) de  $\geq 8 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Relativamente ao VRC, o CIM para S foi de  $\leq 1 \mu\text{g ml}^{-1}$ , o de S-DD igual a 2  $\mu\text{g ml}^{-1}$  e de R  $\geq 4 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Como ainda não estão descritos critérios interpretativos de CIM para o PSC, Pfaller et al. 2001 e Pfaller et al. 2003, sugeriram que estirpes que têm o crescimento inibido quando expostos à concentração de  $< 1 \text{mg mL}^{-1}$  de PSC são considerados susceptíveis.

## 2.8. Avaliação da taxa de crescimento

A avaliação da taxa de crescimento foi feita cultivando as estirpes BC014\_RPSC e *Andt80* em 50 ml de meio YPD líquido a 30°C e acompanhando o seu crescimento até atingirem a fase estacionária. O crescimento foi avaliado pela  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  da cultura celular e registado a cada hora.

## **2.9. Perfil de expressão génica**

### **2.9.1. Extração de RNA**

A extração de RNA foi efetuada de acordo com o protocolo descrito por Silva et al. (2007). As células foram recolhidas quando a cultura atingiu uma  $DO_{600nm}$  entre 0.6 e 0.8, após crescimento em meio YPD, a 30°C, com agitação. De seguida, as células foram congeladas a -80°C até posterior utilização. Para extração do RNA, as células foram ressuspensas em tampão TES (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 10 mM, SDS 0.5%) e fenol-clorofórmio (5:1, pH 4.7; Sigma, St. Louis, MO). Esta suspensão celular foi incubada a 65°C, durante 1 hora. A cada 10 minutos, vortexou-se a suspensão celular. Um sobrenadante aquoso, obtido após centrifugação de 20 minutos a 18407 *g* a 4°C, foi transferido para um microtubo com igual volume de fenol-clorofórmio (5:1, pH 4.7). A mistura fenólica foi novamente centrifugada por 10 minutos nas mesmas condições. O sobrenadante resultante foi posteriormente adicionado a um volume igual de clorofórmio-álcool isoamílico (25:1, pH 8.0; Sigma, St. Louis, MO) e centrifugado nas condições anteriores. A precipitação do RNA ocorreu após adição ao sobrenadante de 0.1 volumes de acetato de sódio (NaAc, 3M, pH 5.2) e 3 volumes de etanol (100%, -20 °C) e incubação a -20°C, pelo tempo máximo de 30 minutos. O RNA foi recolhido, lavado com etanol (80%, -20 °C) e ressuspenso em água *milliQ* estéril. A concentração, qualidade e integridade do RNA foram determinadas com o Nanodrop (Eppendorf). Apenas amostras que apresentaram valores de absorvância ( $A_{260}/A_{280}$ ) entre 1.6 e 2.2 e sem sinais de degradação foram utilizadas para análises subsequentes.

### **2.9.2. Síntese de DNA e RT-qPCR**

A partir de 100 ng de RNA total, foi sintetizado cDNA utilizando o kit *Maxima Reverse Transcriptase* (Thermo Scientific) de acordo com as instruções do fabricante.

Para cada gene foram feitas cinco réplicas para quantificação da expressão por *real-time quantitative PCR* (RT-qPCR). As condições da amplificação foram: um ciclo de desnaturação inicial a 95°C durante 1 minutos, seguido por 30 ciclos a 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos e 60°C durante 30 segundos (fases de desnaturação, emparelhamento e extensão respetivamente) e ainda fez-se uma extensão final a 60°C durante 5 minutos. Foi utilizada *PerfeCTa SYBR Green Fast Mix* (Quanta Biosciences,

Gaithersburg, MD) no equipamento Realplex Mastercycler. O sinal obtido para cada gene foi normalizado com o gene *TUB4*.

**Tabela 6.** *Primers* utilizados no RT-qPCR.

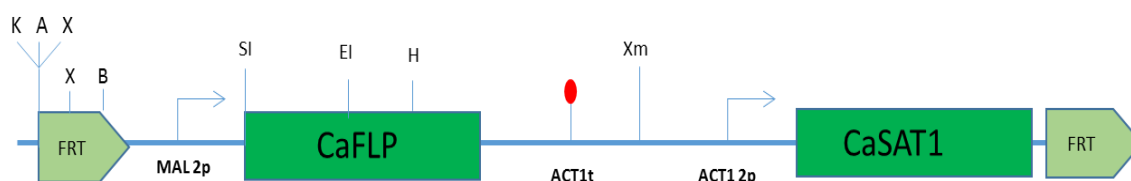
<b><i>Primer</i></b>	<b>Sequência 5'-3'</b>
<b>TUB4_F</b>	TGTATTCCACAATGATGCCT
<b>TUB4_R</b>	TGCCTTGAAACGAAGTAGC
<b>ERG11_F</b>	GGTTTACTTGTGTTTGCTCCT
<b>ERG11_R</b>	GTCCATAAGATACGGCTGAAC
<b>ERG25_F</b>	CCTTTATGGATGCTTACAAC
<b>ERG25_R</b>	AACATCTACCGAAATAAAAAAA
<b>ERG6_F</b>	GAAACAAAGAGATTGAGCGACT
<b>ERG6_R</b>	GAAAGAAGAACCCAGCC
<b>ERG2_F</b>	GAGTCTATCAAGCAACACCC
<b>ERG2_R</b>	GAAGCGTGGAGGATAAACAT
<b>ERG4_F</b>	GTGCTGAGTTTTACAATGGT
<b>ERG4_R</b>	AAGTGAAGAACAACCAAGTG

### 3. Resultados

#### 3.1. Disrupção dos genes *NDT80* e *UPC2*

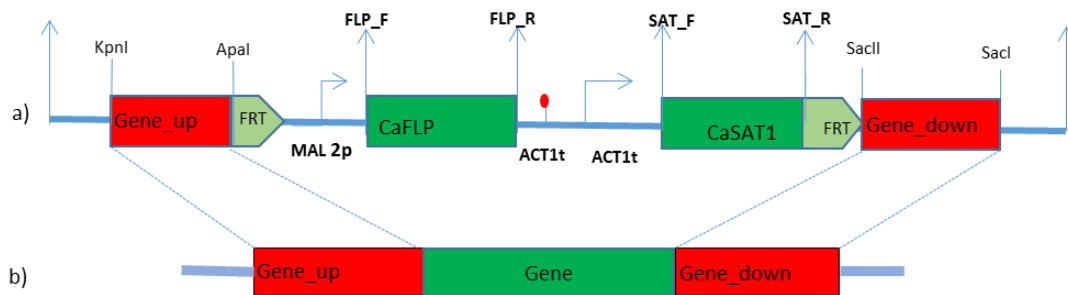
De forma a compreender o papel dos genes *UPC2* e *NDT80* na resistência de *C. parapsilosis* aos azoles, procedeu-se à deleção dos mesmos, utilizando a cassete de disrupção baseada no sistema *SAT1-Flipper* (Figura 2). Esta ferramenta molecular consiste na utilização de um marcador não auxotrófico dominante, codificado pelo gene *SAT1*, que confere resistência à nourseotricina. A nourseotricina é um antibiótico do grupo estreptomicina, produzido por *Streptomyces noursei*<sup>97</sup>.

O gene *SAT1* provém do transposição bacteriano *Tn1825* e codifica para a estreptomicina acetil-trasferase, que inativa a nourseotricina<sup>98</sup>. Esta ferramenta molecular foi inicialmente construída para *C. albicans* tendo sido posteriormente adaptada para *C. parapsilosis*<sup>90</sup>. A cassete *SAT1-Flipper* é composta pelo gene *SAT1*, codifica para o marcador de resistência, como mencionado anteriormente, cuja expressão é regulada pelo promotor do gene *ACT1*. Um outro componente da cassete é o gene *FLP*, que codifica para uma recombinase e que possibilita a reciclagem da cassete. Este gene é ativado pelo promotor do gene *MAL2*. A cassete é ainda flanqueada por duas regiões reconhecidas pela recombinase, denominadas de *FRTs* (*Flippase Recognition Target*).



**Figura 3. Esquema ilustrativo da cassete *SAT1-flipper***, que é composta pelo gene *SAT1* (*CaSAT1*), marcador de resistência à nourseotricina, e o gene *FLP* (*CaFLP*). A expressão desses genes é controlada pelos promotores *ACT1* (*ACT1p*) e *MAL2* (*MAL2p*), respectivamente.

As cassetes de disrupção para os genes *UPC2* e *NDT80*, foram construídas clonando no plasmídeo pCD8<sup>90</sup> as regiões promotores e terminadoras dos referidos genes. Após transformação, a recombinação homóloga destas regiões com regiões homólogas no genoma da *C. parapsilosis* permite a integração da cassete no locus correto e consequente deleção do gene (Figura 4).

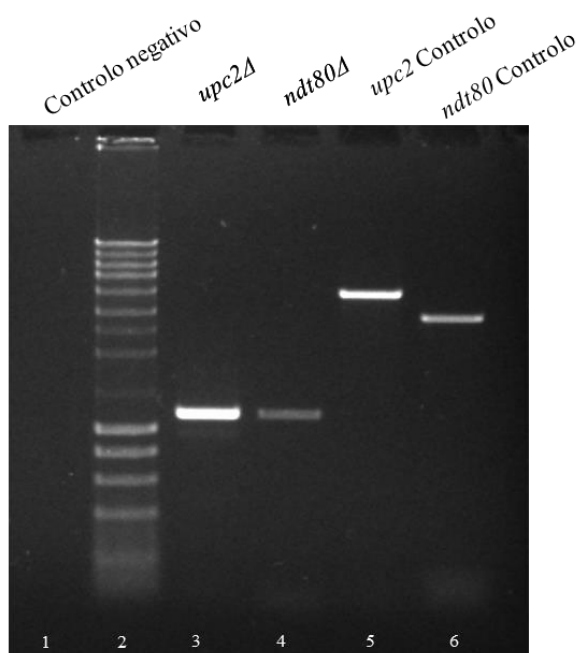


**Figura 4. Estratégia usada para efectuar a interrupção dos genes *NDT80* e *UPC2* em *C. parapsilosis* baseada na cassete *SAT1-Flipper*.** A construção da cassete de interrupção envolveu a clonagem das regiões promotora e terminadora dos genes a deletar na cassete *SAT1-Flipper* (a). *C. parapsilosis* foi transformada com a referida cassete. Após recombinação homóloga, a cassete de interrupção integrou o genoma substituindo o gene alvo (a e b). Após interrupção do primeiro alelo do gene alvo, procedeu-se à reciclagem da cassete. Os mecanismos de reparação do DNA unem as extremidades nas regiões FRTs. A segunda cópia do gene foi deletada seguindo o mesmo procedimento.

A estirpe BC014\_PSC foi transformada separadamente com as cassetes de interrupção pNG3 (para o gene *UPC2*) e pNG4 (para o gene *NDT80*) em duas rondas de deleção onde se obteve mutantes desprovidos dos respectivos genes. A deleção dos genes *UPC2* e *NDT80* implica que as respectivas cassetes de interrupção recombinem com as regiões promotoras e terminadoras dos genes, substituindo-os pela cassete *SAT1-Flipper* como descrito por Ding & Butler, 2007. Após a reciclagem da cassete obtiveram-se as estirpes de *C. parapsilosis upc2Δ* (EF8), *ndt80Δ* (EF12). Uma terceira estirpe, *upc2Δ/ndt80Δ* (EF14), foi construída após deleção do gene *NDT80* na estirpe *upc2Δ* (EF8), usando a mesma estratégia.

A confirmação da deleção foi feita por PCR (Figura 5) onde se amplificou um fragmento de 1,1 kb, que corresponde à amplificação da região promotora e terminadora do gene deletado.





**Figura 5. Construção dos mutantes de *C. parapsilosis upc2Δ*, *ndt80Δ* and *upc2Δ/ndt80Δ*.** Os genes *UPC2* e *NDT80* foram deletados na estirpe de *C. parapsilosis* resistente ao posaconazole BC014R\_PSC utilizando a cassete *SAT1-Flipper*. A confirmação da deleção foi realizada por PCR com a amplificação de fragmentos de 1.1 kb nas estirpes *upc2Δ* (linha 3) e *ndt80Δ* (linha 4). Como controlo positivo, o mesmo PCR amplificou as regiões adjacentes e os genes *UPC2* (linha 5) e *NDT80* (linha 6) na estirpe parental BC014R\_PSC. A confirmação da deleção na estirpe *upc2Δ/ndt80Δ* seguiu o mesmo protocolo. A linha 1 representa o controlo negativo e a linha 2 o marcador molecular (NZYDNA Ladder III).

### **3.2. A susceptibilidade de *C. parapsilosis* aos azoles é afetada pela deleção dos genes *UPC2* e *NDT80***

A deleção dos genes *UPC2* e *NDT80* na estirpe BC014R\_PSC resultou na alteração do fenótipo de susceptibilidade aos azoles, de resistente para suscetível (tabela 7). As estirpes *upc2Δ* (EF8), *ndt80Δ* (EF12) e *upc2Δ/ndt80Δ* (EF14) são suscetíveis ao fluconazole voriconazole e posaconazole, apresentando CIM com os seguintes valores: EF8 - <0.125; <0.015; <0.03; EF12 - 1; 0.03; <0.03; EF14 - 0.125; 0.015; <0.03, respetivamente. Os mutantes *upc2Δ* e *upc2Δ/ndt80Δ* apresentaram valores de CIM aos azoles 500 a 8000 vezes inferiores comparativamente com a estirpe *ndt80Δ* (tabela 7). Este resultado sugere que o factor de transcrição Upc2 desempenha um papel de maior preponderância na resistência aos azoles comparativamente ao Ndt80.

**Tabela 7.** Valores de CIM e fenótipo de suscetibilidade das estirpes de *C. parapsilosis*

Estirpe	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )   Fenótipo		
	Fluconazol	Voriconazol	Posaconazol
BC014	1/S	0.03/S	0.03/WT
BC014R <sub>PSC</sub>	>64/R	>8/R	>16/WT
<i>upc2</i> $\Delta$ (EF8)	<0.125/S	<0.015/S	<0.03/WT
<i>ndt80</i> $\Delta$ (EF12)	1 S	0.03/S	<0.03/WT
<i>upc2</i> $\Delta$ / <i>ndt80</i> $\Delta$ 0.25 S (EF14)	0.25 S	0.015/S	<0.03/WT

Susceptível (S), Resistente (R) e *Wild type* (WT).

### 3.3. Os promotores dos genes *ERG* possuem uma sequência de reconhecimento para os factores de transcrição Upc2 e Ndt80

Em *C. albicans*, o fator de transcrição Upc2 regula a expressão dos genes *ERG* reconhecendo a sequência SRE na região promotora <sup>40</sup>, composta por uma sequência consensus de 7 bp. SREs identificadas nos promotores dos genes *ERG* são reconhecidas pelo Upc2 que actua como um ativador desses genes, promovendo a regulação dos níveis de produção de ergosterol em resposta a mudanças nos níveis de esterol celular <sup>74,75</sup>.

De forma a compreender se os genes *ERG* estão sob regulação do Upc2 em *C. parapsilosis*, as regiões promotoras destes genes foram analisadas quanto à presença de SRE. Após análise, foram identificadas sequências SRE em todos os promotores dos genes *ERG* (Tabela 8).

Para além do Upc2, o fator de transcrição Ndt80, em *C. albicans*, está envolvido na resistência aos azoles, ao controlar a expressão de genes da biossíntese do ergosterol <sup>87</sup>. Em *C. albicans* foram identificadas sequências MSE em promotores dos genes *ERG*, que são reconhecidas pelo Ndt80. A sequência MSE corresponde a 7 pb de uma sequência consensus de 9 pb, que é encontrada em todos os genes-alvo do Ndt80 <sup>87</sup>. Em *C. parapsilosis*, as sequências MSE foram detetadas nas regiões promotoras dos genes *ERG25*, *ERG6*, *ERG2* e *ERG4*.

**Tabela 8.** Motivos SREs e MSEs encontrados nos promotores dos genes *ERG* de *C. parapsilosis*.

Promotores	Sequência 5'-3'	Posição relativa ao codão ATG
SRE		
<i>ERG11</i>	GTT <b>TATACG</b> ACA CG <b>TCGTATA</b> ACT	-213 -231
<i>ERG25</i>	TG <b>CTCGTATA</b> G CG <b>TCGTATAAAA</b> T	-682 -705
<i>ERG6</i>	TC <b>CTCGTATA</b> G	-682
<i>ERG2</i>	AC <b>TATACG</b> ATT	-118
<i>ERG4</i>	G <b>ATATACG</b> ACT T <b>ATATACG</b> ATA	-380 -387
MSE		
<i>ERG25</i>	TT <b>ACACAA</b> AGA AT <b>TTTGTG</b> GAA	-579 -832
<i>ERG6</i>	TA <b>ACACAA</b> ATCA AT <b>TTTGTG</b> TAA GT <b>ACACAA</b> AC	-39 -246 -602
<i>ERG2</i>	AA <b>ACACAA</b> AGG C <b>CTCGCAAAA</b>	-159 -175
<i>ERG4</i>	GT <b>TTTGTG</b> TGT C <b>CTCGCAAAA</b>	-147 -175

a) A sequência consensus está representada em negrito. As bases que não estão sublinhadas e que não estão em negrito são nucleotídeos que correspondem à sequência original. Algumas sequências foram identificadas em cadeia complementares.

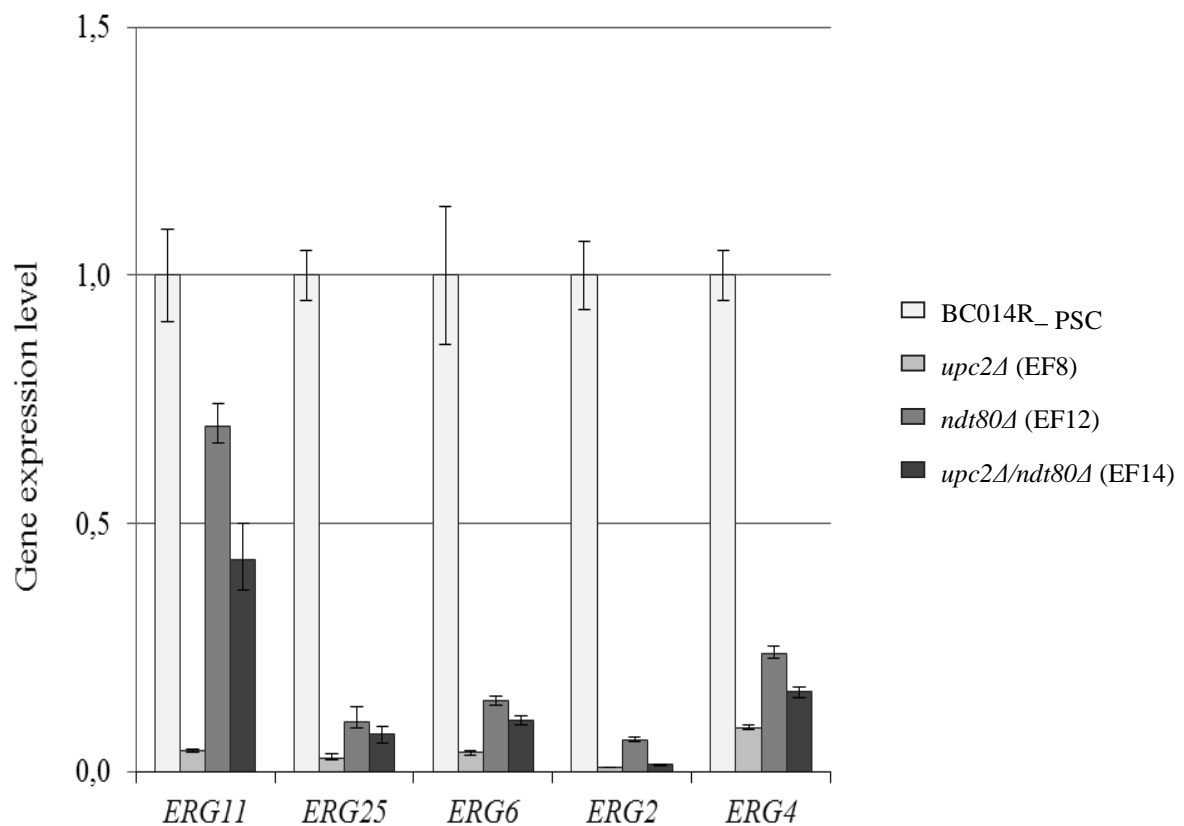
### 3.4. A expressão dos genes *ERG* é regulada pelos factores de transcrição Upc2 e Ndt80

De forma a compreender a funcionalidade dos factores de transcrição Upc2 e Ndt80 como mediadores na tolerância aos azoles foi feita a quantificação da expressão dos genes *ERG* envolvidos na biossíntese do ergosterol (Figura 6). Constatou-se que a expressão dos genes *ERG11*, *ERG25*, *ERG6*, *ERG2* nas estirpes mutantes estava consideravelmente reduzida em relação à estirpe original BC014R\_PSC. A redução de expressão dos genes *ERG* foi mais acentuada na estirpe *upc2Δ*, seguindo a mesma tendência que os valores de CIM (Tabela 7). A estirpe *upc2Δ* apresentou uma redução de expressão dos genes *ERG* que variou entre 91% para o gene *ERG4* e 99% para o gene *ERG2*.

No mutante *ndt80Δ*, a expressão dos genes *ERG* não foi tão afetada, embora se tenha verificado uma redução da expressão dos genes *ERG4*, *ERG6*, *ERG25*, e *ERG2* em 76%, 86%, 90% e 94%, respetivamente. A expressão do gene *ERG11* apresentou uma redução de apenas 30% relativamente à estirpe controlo.

Curiosamente, a expressão dos genes *ERG* na estirpe *upc2Δ/ndt80Δ* variou entre os valores obtidos para as estirpes *upc2Δ* e *ndt80Δ*, evidenciando uma taxa de redução de 84% para o gene *ERG4*, 99% para o gene *ERG2* e 57% para o gene *ERG11*.

Estes resultados evidenciam o papel crucial do gene *UPC2* na aquisição de resistência aos azoles em *C. parapsilosis*. Na resistência aos azoles, o fator de transcrição *NDT80* parece desempenhar um papel secundário, o que nos sugere que este fator de transcrição poderá desempenhar funções relevantes em outros processos celulares.

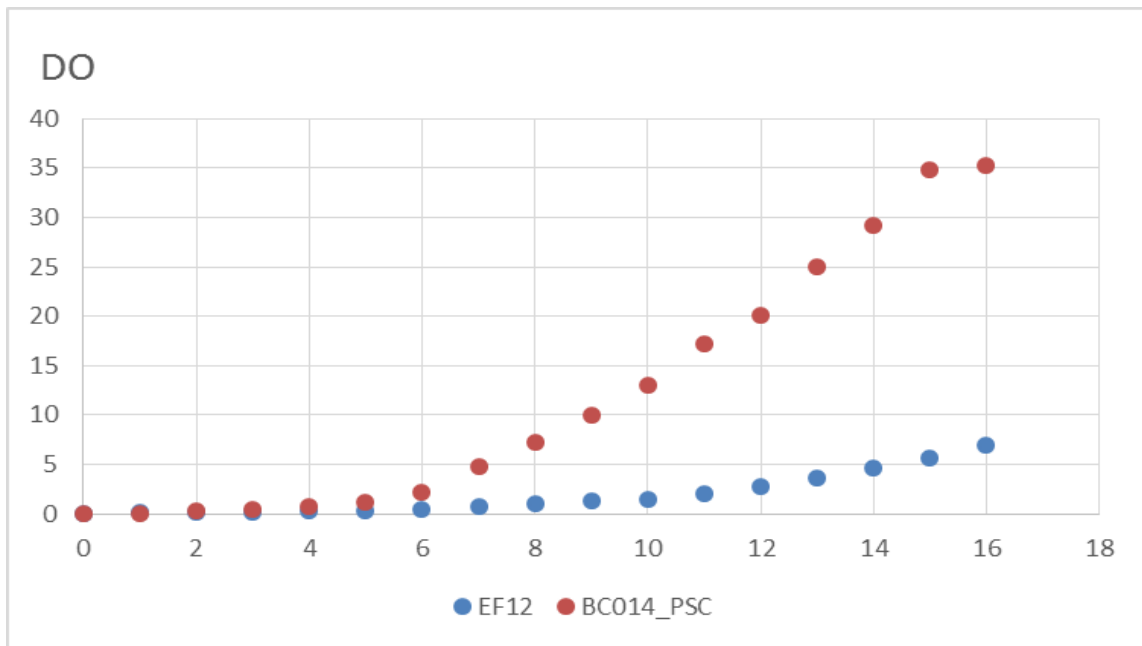


**Figura 6. Os genes *UPC2* e *NDT80* estão envolvidos na resistência aos azoles em *C. parapsilosis*.** A expressão dos genes *ERG11*, *ERG25*, *ERG2* e *ERG4* foram analisados por qRT-PCR na estirpe BC014R\_PSC e nos mutantes EF8, EF12 e EF14. O gene *TUB4* foi usado como gene normalizador. Os níveis de expressão apresentados correspondem à média de cinco ensaios diferentes.

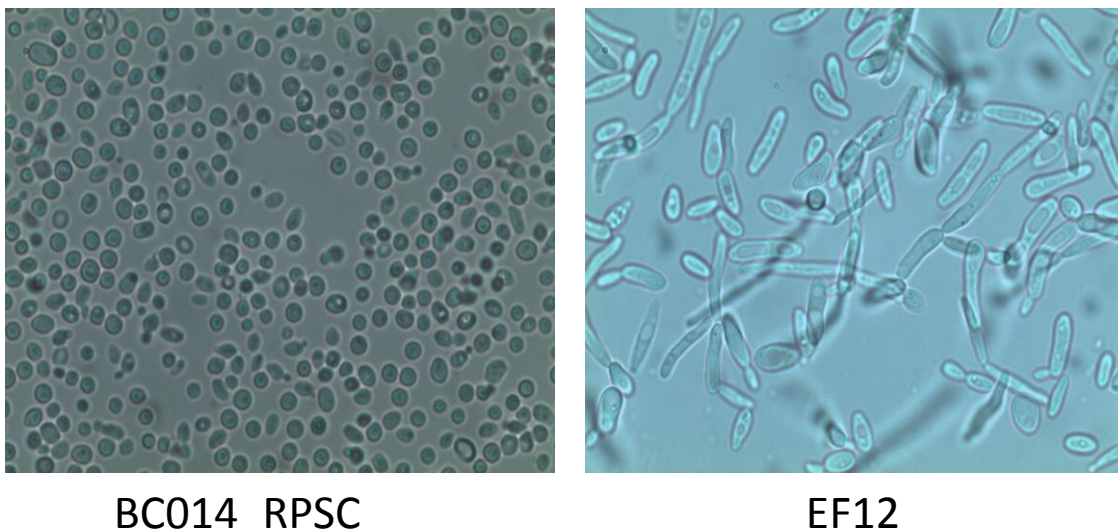
### 3.5. A deleção do gene *NDT80* afecta a taxa de crescimento e promove alterações de fenótipo celular

Tal como reportado por Holland et al. 2014 e ao contrário do que acontece em *C. albicans*, a deleção do gene *NDT80* em *C. parapsilosis* resulta num decréscimo acentuado da taxa de crescimento (Figura 7). A deleção do gene *NDT80* alterou o crescimento e a morfologia celular. As colónias da estirpe *ndt80Δ* são rugosas, compostas maioritariamente por pseudohifas (Figura 8). Verificou-se ainda um fenótipo de adesão célula-célula exacerbado.

Tendo em conta os resultados previamente descritos, pode-se dizer que o fator de transcrição Ndt80 tem um efeito pleiotrópico, o que sugere que este fator está envolvido na regulação de várias vias do metabolismo celular, o que o torna um alvo propício para estudos futuros.



**Figure 7.** Curva de crescimento do mutante *ndt80Δ* e da estirpe BC014\_RPSC em meio YPD. Medições da densidade óptica (DO), a 600 nm que foram realizadas de hora a hora.



**Figura 8. Alteração morfológica das células de *C. parapsilosis* resultantes da deleção do gene *NDT80*.** Observação ao microscópio ótico (amplificação 40x). A estirpe *ndt80Δ* apresenta um fenótipo rugoso, compostas maioritariamente por células alongadas e pseudohifas.

#### 4. Discussão

A sobreexpressão do ergosterol e/ou mutações do *ERG11* são apontados como os principais mecanismos de resistência aos azoles em fungos patogénicos como *C. albicans*<sup>99,100</sup>, *C. tropicalis*<sup>39</sup> e em *C. krusei*<sup>101</sup>.

Quando as estirpes de *C. parapsilosis* são expostas aos azoles, nomeadamente ao fluconazole, o produto do gene *ERG11*, a lanosterol dimetilase é inibida, levando à acumulação de precursores do esterol que são tóxicos para a célula. Estes esteróis tóxicos quando são integrados na membrana citoplasmática resultam numa membrana celular com integridade comprometida a nível de estrutura e função<sup>102</sup>.

Ao atuarem na via biossintética do ergosterol, os factores de transcrição Ndt80 e Upc2 desempenham um papel na resistência aos azoles. Em isolados clínicos de *C. albicans*, mutações *gain-of-function* no gene *UPC2* são responsáveis pela regulação positiva de 12 genes *ERG*, assim como o gene *UPC2* propriamente dito<sup>71</sup>. Facto este, demonstrado por Vasicek et al.<sup>103</sup>, que confirmou que o aumento da susceptibilidade de um mutante *upc2Δ* de *C. albicans*, anteriormente resistente aos azoles, não é devido a alterações da expressão de genes que codificam para transportadores membranares, mas está relacionada com a redução dos níveis de expressão dos genes *ERG*, particularmente do gene *ERG11*.

Em *C. parapsilosis*, a sobreexpressão de genes *ERG* foi acompanhada da sobexpressão dos factores de transcrição Ndt80 e Upc2 na estirpe BC014\_PSC, após exposição *in vitro* ao

posaconazole. Este resultado sugere que estes factores de transcrição estão associados com o desenvolvimento de resistência aos azoles, através da regulação dos genes da via biossintética do ergosterol, tal como descrito para *C. albicans*<sup>71,87</sup>.

A deleção dos genes *UPC2* e *NDT80* alterou a susceptibilidade de *C. parapsilosis* aos azoles. As estirpes *upc2Δ*, *ndt80Δ* e *upc2Δ/ndt80Δ* são susceptíveis ao voriconazole, fluconazole e ao posaconazole. No entanto, as estirpes *upc2Δ* e *upc2Δ/ndt80Δ* apresentaram valores de CIM 500 a 8000 vezes inferiores à estirpe *ndt80Δ*, o que realça a importância do gene *UPC2* na resistência antifúngica.

Como anteriormente referido, a expressão dos genes *ERG* é regulada pelos factores de transcrição *UPC2* e *NDT80*. Verificou-se que a expressão dos genes *ERG11*, *ERG25*, *ERG6*, *ERG2* nas estirpes mutantes estava consideravelmente reduzida em relação à estirpe original BC014R\_PSC o que tem como consequência a diminuição do nível de ergosterol celular. Também foi demonstrado que os promotores dos genes *ERG* possuem sequências de reconhecimento para o Ndt80 e Upc2. O gene *UPC2* codifica para um factor de transcrição do *Zinc Cluster* tendo sido bem caracterizado em *C. albicans* e *S. cerevisiae*<sup>80,103,104</sup> como um regulador fundamental no metabolismo do esterol, e consequentemente na resistência aos azoles. O fator de transcrição reconhece as sequências SREs nas regiões promotoras dos genes *ERG* em *C. albicans*.

O fator de transcrição Ndt80 regula os genes da biossíntese do ergosterol em *C. albicans*<sup>87</sup>, e regula também os genes *ERG25*, *ERG6*, *ERG2* e o *ERG4* em *C. parapsilosis*. Os mutantes *ndt80Δ* apresentaram reduções acentuadas na expressão destes genes e as sequências MSE foram identificadas nos seus promotores. Deste modo, os resultados de expressão génica foram concordantes com a presença de regiões de reconhecimento sob regulação do factor de transcrição Ndt80.

Contrariamente ao que acontece em *C. albicans*<sup>105</sup>, os resultados apontam que a expressão do gene *ERG11* não é controlado pelo *NDT80*, uma vez que nenhum motivo MSE foi identificado no seu promotor e os níveis de expressão do gene *ERG11* registados para a estirpe *ndt80Δ* foram de 70% quando comparado com a estirpe BC014R\_PSC.

A sequência consensus MSE é altamente conservada em *S. cerevisiae* e *C. albicans*, no entanto o Ndt80, nestes microorganismos, controla outros processos biológicos para além da biossíntese do ergosterol. Enquanto em *S. cerevisiae* o Ndt80 regula a meiose, em *C. albicans* é um factor de transcrição que regula cerca de 23% de todos os genes<sup>87</sup>.

Em *C. parapsilosis*, a deleção do gene *NDT80* afecta o crescimento celular e promove alterações no fenótipo. De acordo com Holland et al. <sup>27</sup>, ao contrário do que acontece em *C. albicans*, a deleção do gene *NDT80* em *C. parapsilosis* provoca uma redução acentuada do crescimento celular <sup>27</sup>. O Ndt80 é um fator de transcrição que possui um papel preponderante na regulação celular em *C. albicans*. Os alvos do Ndt80 são genes que codificam para reguladores de diversos processos biológicos, o que indica que este fator de transcrição desempenha um papel importante na regulação da morfogénese neste fungo <sup>87</sup>. Num estudo realizado por Sellam et al. <sup>106</sup>, foi constatado que a deleção do Ndt80 em *C. albicans* afeta a divisão e separação celular. As células fungicas apresentavam morfologia anormal com o citoplasma distendido. As células formavam cadeias conetadas por septos podendo as mesmas serem constituídas por mais de 6 células. Ainda neste estudo, a análise da expressão de genes indicou que 46 dos genes alvos do Ndt80 estavam ativados, enquanto outros 25 estavam inativos nos mutantes *ndt80Δ*, dos quais se destaca o gene *SUN41*, que codifica putativamente para uma glicosidase da parede celular, essencial na separação célula-célula <sup>107</sup>. No mesmo estudo foi ainda verificado que a ativação de genes associados ao crescimento sob a forma de hifas é regulado pelo Ndt80. O mutante *ndt80Δ* é incapaz de regular positivamente genes normalmente ativados durante a morfogénese, incluindo genes que codificam para componentes da parede celular como os genes *HWPI*, *ECE1*, *RBT4*, *ALS3*, *ALS10*, e *HYR1*, da superóxido dismutase (*SOD5*), bem como da aspartil proteinase (*SAP4* e *SAP5*) <sup>106</sup>.

Os resultados demonstram que os fatores de transcrição Upc2 e Ndt80 têm uma importância fulcral no desenvolvimento da resistência antifúngica, controlando a expressão dos genes pertencentes à via biossintética do ergosterol, sendo que o primeiro parece desempenhar um papel mais relevante na resistência antifúngica. Além disso, os dados sugerem ainda uma mudança de paradigma ao demonstrarem que os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de resistência sobre pressão seletiva do posaconazole são diferentes dos mecanismos de resistência ao fluconazole e voriconazole.



## 5. Conclusão

O objetivo principal deste trabalho consistia em compreender e elucidar o papel dos genes *NDT80* e *UPC2* na resistência de *C. parapsilosis* aos azoles. Com este trabalho conclui-se que os genes *UPC2* e *NDT80* desempenham um papel preponderante na resistência de *C. parapsilosis* aos azoles, uma vez que foi demonstrado que a deleção desses dois genes resulta no aumento da susceptibilidade a estes fármacos.

Os factores de transcrição Ndt80 e Upc2 regulam a expressão dos genes *ERG*, tendo sido verificado uma redução considerável da sua expressão nas estirpes mutantes (*upc2Δ* e *ndt80Δ*), estando estes intimamente relacionados com a resistência.

Conclui-se ainda que os promotores dos genes *ERG* possuem uma sequência de reconhecimento para os factores de transcrição Upc2 e Ndt80 e que estes não actuam somente na resistência. A deleção do gene *NDT80* afecta a taxa de crescimento e promove alterações de fenótipo celular, o que sugere que o mesmo desempenha funções importantes em outros mecanismos do metabolismo celular.

## 6. Referências bibliográficas

1. Odds, F. C. Candida infections: an overview. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **15**, 1–5 (1987).
2. Pfaller, M. A. & Diekema, D. J. Epidemiology of Invasive Candidiasis : a Persistent Public Health Problem. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**, 133–163 (2007).
3. Shao, P. L., Huang, L. M. & Hsueh, P. R. Recent advances and challenges in the treatment of invasive fungal infections. *Int. J. Antimicrob. Agents* **30**, 487–495 (2007).
4. Weems, J. J. Candida parapsilosis: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **14**, 756–766 (1992).
5. Trofa, D., Attila, G. & Nosanchuck, J. D. Candida parapsilosis, an emerging fungal pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**, 606–625 (2008).
6. Kato, M., Ozeki, M., Kikuchi, a & Kanbe, T. Phylogenetic relationship and mode of evolution of yeast DNA topoisomerase II gene in the pathogenic Candida species. *Gene* **272**, 275–281 (2001).
7. Tavanti, A., Davidson, A. D., Gow, N. a R., Maiden, M. C. J. & Odds, F. C. Candida parapsilosis Groups II and III. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 284–292 (2005).
8. Gomez-Lopez, a. *et al.* Prevalence and susceptibility profile of Candida metapsilosis and Candida orthopsilosis: Results from population-based surveillance of candidemia in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 1506–1509 (2008).
9. Silva, A. P., Miranda, I. M., Lisboa, C., Pina-Vaz, C. & Rodrigues, A. G. Prevalence, Distribution , and Antifungal Susceptibility Profiles of Candida parapsilosis , C . orthopsilosis , and C . metapsilosis in a Tertiary Care Hospital □. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 2392–2397 (2009).
10. Guinea, J. Global trends in the distribution of Candida species causing candidemia. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**, 5–10 (2014).
11. Costa-De-Oliveira, S., Pina-Vaz, C., Mendonça, D. & Gonçalves Rodrigues, a. A first Portuguese epidemiological survey of fungaemia in a university hospital. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **27**, 365–374 (2008).
12. Almirante, B. *et al.* Epidemiology , Risk Factors , and Prognosis of Candida parapsilosis Bloodstream Infections : Case-Control Population-Based Surveillance Study of Patients in Barcelona , Spain , from 2002 to 2003. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 1681–1685 (2006).
13. Fridkin, S. K., Kaufman, D., Edwards, J. R., Shetty, S. & Horan, T. Changing incidence of Candida bloodstream infections among NICU patients in the United States: 1995-2004. *Pediatrics* **117**, 1680–1687 (2006).

14. Wong, P. N., Mak, S. K., Lo, K. Y., Tong, G. M. W. & Wong, a K. M. A retrospective study of seven cases of *Candida parapsilosis* peritonitis in CAPD patients: The therapeutic implications. *Perit. Dial. Int.* **20**, 76–79 (2000).
15. Diekema, D. J., Messer, S. A., Hollis, R. J., Wenzel, R. P. & Pfaller, and M. A. An Outbreak of *Candida parapsilosis* Prosthetic Valve Endocarditis. *micology* **9**, 301–309 (2005).
16. Ali, G. Y., Algohary, E. H. S. S., Rashed, K. A., Almoghanum, M. & Khalifa, A. A. Prevalence of *Candida* colonization in preterm newborns and VLBW in neonatal intensive care unit: role of maternal colonization as a risk factor in transmission of disease. *J. Matern. Neonatal Med.* **25**, 789–795 (2012).
17. Bakir, M., Cerikcioglu, N., Barton, R. & Yagci, A. Epidemiology of Candidemia in a Turkish tertiary care hospital. *Apmis* **114**, 601–610 (2006).
18. Nakamura, T. & Takahashi, H. Epidemiological study of *Candida* infections in blood: Susceptibilities of *Candida* spp. to antifungal agents, and clinical features associated with the candidemia. *J. Infect. Chemother.* **12**, 132–138 (2006).
19. Barchiesi, F. *et al.* Outbreak of fungemia due to *Candida parapsilosis* in a pediatric oncology unit. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **49**, 269–271 (2004).
20. Pammi, M., Holland, L., Butler, G., Gacser, A. & Joseph M. Bliss. *Candida parapsilosis* is a significant Neonatal Pathogen: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Pediatr Infect Dis J.* **32**, 206–2016 (2013).
21. Méan, M., Marchetti, O. & Calandra, T. Bench-to-bedside review: *Candida* infections in the intensive care unit. *Crit. care* **12**, 204 (2008).
22. Ramage, G., Martínez, J. P. & López-Ribot, J. L. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: A clinically significant problem. *FEMS Yeast Res.* **6**, 979–986 (2006).
23. Singaravelu, K., Gácsér, A. & Nosanchuk, J. D. Genetic determinants of virulence - *Candida parapsilosis*. *Rev. Iberoam. Micol.* **31**, 16–21 (2014).
24. Gácsér, A., Trofa, D., Schäfer, W. & Nosanchuk, J. D. Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. *J. Clin. Invest.* **117**, 3049–3058 (2007).
25. Monod, M., Togni, G., Hube, B. & Sanglard, D. Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. *Mol. Microbiol.* **13**, 357–368 (1994).
26. Hube, B. & Naglik, J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology* **147**, 1197–2005 (2001).
27. Holland, L. M. *et al.* Comparative Phenotypic Analysis of the Major Fungal Pathogens *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*. *PLOS Pathog.* **10**, (2014).
28. Jabra-Rizk, M. A., Falkler, W. a. & Meiller, T. F. Fungal Biofilms and Drug Resistance. *Emerg. Infect. Dis.* **10**, 14–19 (2004).

29. Rossignol, T. *et al.* Correlation between biofilm formation and the hypoxic response in *Candida parapsilosis*. *Eukaryot. Cell* **8**, 550–559 (2009).
30. Carrillo-Muñoz, A. J., Giusiano, G., P.A. Ezkurra & Quindós, G. Antifungal agents: Mode of action in yeast cells. *Rev Esp Quimioter.* **19**, 130–139 (2006).
31. Kathiravan, M. K. *et al.* The biology and chemistry of antifungal agents: A review. *Bioorganic Med. Chem.* **20**, 5678–5698 (2012).
32. Kanafani, Z. a & Perfect, J. R. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin. Infect. Dis.* **46**, 120–128 (2008).
33. Moudgal, V., Little, T., Boikov, D. & Vazquez, J. a. Multiechinocandin- and Multiazole-Resistant *Candida parapsilosis* Isolates Serially Obtained during Therapy for Prosthetic Valve Endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 767–769 (2005).
34. Denning, D. W. Echinocandins: a new class of antifungal. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**, 889–891 (2002).
35. Denning, D. W. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* **362**, 1142–1151 (2003).
36. Sanglard, D. & Odds, F. C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect. Dis.* **2**, 73–85 (2002).
37. Shyadehi, a Z. *et al.* The mechanism of the acyl-carbon bond cleavage reaction catalyzed by recombinant sterol 14 alpha-demethylase of *Candida albicans* (other names are: lanosterol 14 alpha-demethylase, P-45014DM, and CYP51). *J. Biol. Chem.* **271**, 12445–12450 (1996).
38. Anderson, J. B. Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 547–556 (2005).
39. Vandeputte, P., Ferrari, S. & Coste, A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *Int. J. Microbiol.* **2012**, (2012).
40. Dunkel, N. *et al.* 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 (2008).
41. Pfaller, M. a & Diekema, D. J. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. *Clin. Microbiol. Infect.* **10 Suppl 1**, 11–23 (2004).
42. Kuhn, D. M. *et al.* *Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting. *Emerg. Infect. Dis.* **10**, 1074–1081 (2004).
43. Henry, K. W., Nickels, J. T. & Edlind, T. D. Upregulation of ERG genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 2693–2700 (2000).

44. White, T. C. Increased mRNA levels of ERG16, CDR, and MDR1 correlate, with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 1482–1487 (1997).
45. Silva, A. P. *et al.* Transcriptional profiling of azole-resistant *Candida parapsilosis* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 3546–3556 (2011).
46. Grossman, N. T., Pham, C. D., Cleveland, A. a. & Lockhart, S. R. Molecular Mechanisms of Fluconazole Resistance in *Candida parapsilosis* Isolates from a U.S. Surveillance System. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 1030–1037 (2015).
47. Kennedy, M. a, Barbuch, R. & Bard, M. Transcriptional regulation of the squalene synthase gene (ERG9) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1445**, 110–122 (1999).
48. Lupetti, a. Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol. Med.* **8**, 76–81 (2002).
49. Kelly, S. . *et al.* Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol  $\Delta 5,6$ -desaturation. *FEBS Lett.* **400**, 80–82 (1997).
50. Kornblatt, J. a. & Rudney, H. Two forms of acetoacetyl coenzyme A thiolase in yeast. *J. Biol. Chem.* **246**, 4417 (1971).
51. Servouse, M. & Karst, F. Regulation of early enzymes of ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **240**, 541–547 (1986).
52. Dorsey, J. K. & Porter, J. W. The inhibition of mevalonic kinase by geranyl and farnesyl pyrophosphates. *J. Biol. Chem.* **243**, 4667–4670 (1968).
53. Tsay, Y. H. & Robinson, G. W. Cloning and characterization of ERG8, an essential gene of *Saccharomyces cerevisiae* that encodes phosphomevalonate kinase. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 620–31 (1991).
54. Karst, F. & Lacroute, F. Ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **154**, 269–277 (1977).
55. SERVOUSE, M., Nicole MONS, J., Baillargeat, E.-L. & Karst, and F. Isolation and characterization of yeast mutants blocked in mevalonic acid formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **123**, 424–430 (1984).
56. Chambon, C. *et al.* Sterol pathway in yeast. Identification and properties of mutant strains defective in mevalonate diphosphate decarboxylase and farnesyl diphosphate synthetase. *Lipids* **26**, 633–636 (1991).
57. Anderson, M. S., Yarger, J. G., Burck, C. L. & Poulter, C. D. Farnesyl diphosphate synthetase. Molecular cloning, sequence, and expression of an essential gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **264**, 19176–84 (1989).

58. Jennings, S. M., Tsay, Y. H., Fisch, T. M. & Robinson, G. W. Molecular cloning and characterization of the yeast gene for squalene synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 6038–6042 (1991).
59. Jahnke, L. & Klein, H. P. Oxygen requirements for formation and activity of the squalene epoxidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **155**, 488–92 (1983).
60. Corey, E. J., Matsuda, S. P. & Bartel, B. Molecular cloning, characterization, and overexpression of ERG7, the *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding lanosterol synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 2211–5 (1994).
61. Daum, G., Lees, N. D., Bard, M. & Dickson, R. Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 1471–1510 (1998).
62. Ji, H. *et al.* A three-dimensional model of lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase of *Candida albicans* and its interaction with azole antifungals. *J. Med. Chem.* **43**, 2493–505 (2000).
63. Monk, B. C. *et al.* Architecture of a single membrane spanning cytochrome P450 suggests constraints that orient the catalytic domain relative to a bilayer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 3865–70 (2014).
64. Marichal, P. *et al.* Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 $\alpha$ -demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology* **59**, 450–60 (2015).
65. Podust, L. M., Poulos, T. L. & Waterman, M. R. Crystal structure of cytochrome P450 14 $\alpha$ -sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 3068–73 (2001).
66. Xu, Y., Sheng, F., Zhao, J., Chen, L. & Li, C. ERG11 mutations and expression of resistance genes in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates. *Arch. Microbiol.* **197**, 1087–1093 (2015).
67. Rogers, P. D. & Barker, K. S. Genome-Wide Expression Profile Analysis Reveals Coordinately Regulated Genes Associated with Stepwise Acquisition of Azole Resistance in *Candida albicans* Clinical Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 1220–1227 (2003).
68. Silva, A. T. P., Costa-De-Oliveira, S., Silva-Dias, A., Pina-Vaz, C. & Rodrigues, A. G. Dynamics of in vitro acquisition of resistance by *Candida parapsilosis* to different azoles. *FEMS Yeast Res.* **9**, 626–633 (2009).
69. Branco, J. *et al.* Fluconazole and voriconazole resistance in *Candida parapsilosis* is conferred by gain-of-function mutations in *MRR1* transcription factor. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, AAC.00842–15 (2015).
70. Hepworth, S. R., Friesen, H. & Segall, J. NDT80 and the meiotic recombination checkpoint regulate expression of middle sporulation-specific genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 5750–5761 (1998).

71. Flowers, S. A. *et al.* Gain-of-function mutations in UPC2 are a frequent cause of ERG11 upregulation in azole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* **11**, 1289–1299 (2012).
72. Heilmann, C. J., Schneider, S., Barker, K. S., Rogers, P. D. & Morschhauser, J. An A643T Mutation in the Transcription Factor Upc2p Causes Constitutive ERG11 Upregulation and Increased Fluconazole Resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 353–359 (2010).
73. Kruckeberg, A. L. & Dickinson, J. R. The Metabolism and Molecular Physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. The metabolism and molecular physiology of *Saccharomyces cerevisiae* (CRC Press, 2004). doi:10.1002/1521-3773(20010316)40:6<9823::AID-ANIE9823>3.3.CO;2-C
74. Oliver, B. G., Song, J. L., Choiniere, J. H. & White, T. C. cis-acting elements within the *Candida albicans* ERG11 promoter mediate the azole response through transcription factor Upc2p. *Eukaryot. Cell* **6**, 2231–2239 (2007).
75. Macpherson, S., Akache, B., Deken, X. De & Turcotte, B. *Candida albicans* Zinc Cluster Protein Upc2p Confers Resistance to Antifungal Drugs and Is an Activator of Ergosterol Biosynthetic Genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 1745–1752 (2005).
76. Silver, P. M., Oliver, B. G. & White, T. C. Role of *Candida albicans* Transcription Factor Upc2p in Drug Resistance and Sterol Metabolism. *Eukaryot. Cell* **3**, 1391–1397 (2004).
77. Znaidi, S. *et al.* Genomewide Location Analysis of *Candida albicans* Upc2p, a Regulator of Sterol Metabolism and Azole Drug Resistance. *Eukaryot. Cell* **7**, 836–847 (2008).
78. Lewis, T. L., Keesler, G. a, Fenner, G. P. & Parks, L. W. Pleiotropic mutations in *Saccharomyces cerevisiae* affecting sterol uptake and metabolism. *Yeast* **4**, 93–106 (1988).
79. Hoot, S. J., Smith, A. R., Brown, R. P. & White, T. C. An A643V amino acid substitution in Upc2p contributes to azole resistance in well-characterized clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 940–942 (2011).
80. Silver, P. M. *et al.* Role of *Candida albicans* Transcription Factor Upc2p in Drug Resistance and Sterol Metabolism. *Eukaryot. Cell* **3**, 1391–1397 (2004).
81. Valachovic, M. *et al.* Cumulative Mutations Affecting Sterol Biosynthesis in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Result in Synthetic Lethality That Is Suppressed by Alterations in Sphingolipid Profiles. *Genet. Soc. Am.* **173**, 1893–1908 (2006).
82. Chen, C., Yang, Y., Shih, H., Su, C. & Lo, H. CaNdt80 Is Involved in Drug Resistance in *Candida albicans* by Regulating CDR1. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 4505–4512 (2004).
83. Fingerman, I. M., Sutphen, K., Montano, S. P., Georgiadis, M. M. & Vershon, a K. Characterization of critical interactions between Ndt80 and MSE DNA defining a

- novel family of Ig-fold transcription factors. *Nucleic Acids Res* **32**, 2947–2956 (2004).
84. Montano, S. P. *et al.* Crystal structure of the DNA-binding domain from Ndt80, a transcriptional activator required for meiosis in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 14041–14046 (2002).
  85. Lamoureux, J. S., Stuart, D., Tsang, R., Wu, C. & Glover, J. N. M. Structure of the sporulation-specific transcription factor Ndt80 bound to DNA. *EMBO J.* **21**, 5721–5732 (2002).
  86. Pierce, M. *et al.* Sum1 and Ndt80 proteins compete for binding to middle sporulation element sequences that control meiotic gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 4814–4825 (2003).
  87. Sellam, A., Tebbji, F. & Nantel, A. Role of Ndt80p in sterol metabolism regulation and azole resistance in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* **8**, 1174–1183 (2009).
  88. Braun, B. R. *et al.* A human-curated annotation of the *Candida albicans* genome. *PLoS Genet.* **1**, 0036–0057 (2005).
  89. Winter, E. The Sum1/Ndt80 Transcriptional Switch and Commitment to Meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76**, 1–15 (2012).
  90. Ding, C. & Butler, G. Development of a gene knockout system in *Candida parapsilosis* reveals a conserved role for BCR1 in biofilm formation. *Eukaryot. Cell* **6**, 1310–1319 (2007).
  91. Zemanova, J., Nosek, J. & Tomaska, L. High-efficiency transformation of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Curr. Genet.* **45**, 183–186 (2004).
  92. Hoffman, C. S. & Winston, F. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**, 267–272 (1987).
  93. CLSI. Reference Method for Broth Dilution. (2008).
  94. PFALLER, M. A. *et al.* International Surveillance of Bloodstream Infections Due to *Candida* Species: Frequency of Occurrence and In Vitro Susceptibilities to Fluconazole, Ravuconazole, and Voriconazole of Isolates Collected from 1997 through 1999 in the SENTRY Antimicrobial Surv. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 3254–3259 (2001).
  95. Pfaller, M. a., Diekema, D. J., Messer, S. a., Hollis, R. J. & Jones, R. N. In vitro activities of caspofungin compared with those of fluconazole and itraconazole against 3,959 clinical isolates of *Candida* spp., including 157 fluconazole-resistant isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 1068–1071 (2003).
  96. Silva, R. M. *et al.* Critical roles for a genetic code alteration in the evolution of the genus *Candida*. *EMBO J.* **26**, 4555–4565 (2007).



97. Krügel, H., Fiedler, G., Haupt, I., Sarfert, E. & Simon, H. Analysis of the nourseothricin-resistance gene (*nat*) of *Streptomyces noursei*. *Gene* **62**, 209–217 (1988).
98. Joshi, P. B., Webb, J. R., Davies, J. E. & McMaster, W. R. The gene encoding streptothricin acetyltransferase (*sat*) as a selectable marker for *Leishmania* expression vectors. *Gene* **156**, 145–149 (1995).
99. Sasse, C. *et al.* The stepwise acquisition of fluconazole resistance mutations causes a gradual loss of fitness in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **86**, 539–556 (2012).
100. Xu, Y., Chen, L. & Li, C. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* species to fluconazole and detection of *Candida albicans* ERG11 mutations. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**, 798–804 (2008).
101. Ricardo, E. *et al.* In vivo and in vitro acquisition of resistance to voriconazole by *Candida krusei*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 4604–4611 (2014).
102. Watson, P. F., Rose, M. E., Ellis, S. W., England, H. & Kelly, S. L. Defective sterol C5-6 desaturation and azole resistance: a new hypothesis for the mode of action of azole antifungals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**, 1170–1175 (1989).
103. Vasicek, E. M., Berkow, E. L., Flowers, S. A., Barker, K. S. & David Rogers, P. UPC2 is universally essential for azole antifungal resistance in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* **13**, 933–946 (2014).
104. White, T. C. & Silver, P. M. Regulation of sterol metabolism in *Candida albicans* by the UPC2 gene. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 1215–1218 (2005).
105. Sasse, C. *et al.* The transcription factor Ndt80 does not contribute to Mrr1-, Tac1-, and Upc2-mediated fluconazole resistance in *Candida albicans*. *PLoS One* **6**, (2011).
106. Sellam, a. *et al.* Role of Transcription Factor CaNdt80p in Cell Separation, Hyphal Growth, and Virulence in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* **9**, 634–644 (2010).
107. Firon, A. *et al.* The SUN41 and SUN42 genes are essential for cell separation in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **66**, 1256–1275 (2007).