



IPICYT

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Análisis fenotípico y genotípico de aislados
clínicos secuenciales de *Candida glabrata***

Tesis que presenta

Ana Lizbeth López Marmolejo

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Codirectoras de la Tesis:

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro

Dra. Ma. Guadalupe Gutiérrez Escobedo

San Luis Potosí, S.L.P., Julio de 2021



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Análisis fenotípico y genotípico de aislados clínicos secuenciales de *Candida glabrata***” presentada para obtener el Grado de Maestro(a) en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Ana Lizbeth López Marmolejo** y aprobada el **11 de junio de 2021** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro
Codirectora de la tesis

Dra. Ma. Guadalupe Gutiérrez Escobedo
Codirectora de la tesis

Dra. Fabiola Jaimes Miranda
Miembro del Comité Tutorial



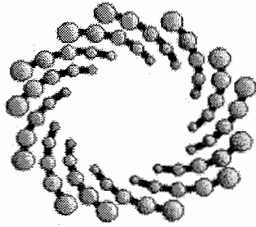
IPICYT

Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección de la Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro y de la Dra. Ma. Guadalupe Gutiérrez Escobedo.

Este trabajo fue apoyado por el proyecto No. 610281 de Ciencia de Frontera 2019 otorgado a Irene B. Castaño Navarro

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No.1004098) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 223 del Libro Segundo de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 13 días del mes de julio del año 2021, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Fabiola Jaimes Miranda	Presidenta	IPICYT
Dra. Ma. Guadalupe Gutiérrez Escobedo	Secretaria	IPICYT
Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Ana Lizbeth López Marmolejo

sobre la Tesis intitulada:

Análisis fenotípico y genotípico de aislados clínicos secuenciales de Candida glabrata

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro
Dra. Ma. Guadalupe Gutiérrez Escobedo

El Jurado, después de deliberar, determinó

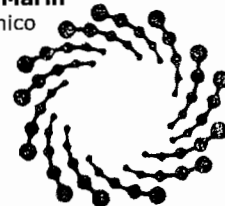
APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 18:28 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 13 días del mes de julio de 2021.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



IPICYT

SECRETARÍA ACADÉMICA
INSTITUTO POTOSINO DE
INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA
Y TECNOLÓGICA, A.C.

Dedicatorias

A mis padres

Josefina y Delfino, por todo su apoyo, sacrificio y sobre todo su amor incondicional, gracias a ustedes he podido cumplir cada una de mis metas y sueños. Todo mi trabajo y cada paso que doy son por y para ustedes, quiero ser el reflejo de todo su esfuerzo y amor.

Son mi inspiración y mi mayor motor. ¡Los adoro!

A mis hermanitos

José Eduardo y Cecilia, por su compañía y cariño, cada día me esfuerzo para ser un buen ejemplo para ustedes. Gracias por llenar de alegría cada minuto de mi vida.

A mi familia, amigos y todas las personas que me han apoyado y sobre todo han creído en mí, los llevo muy presentes y los quiero.

Agradecimientos

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada No. 1004098

A mi directora de tesis la Dra. Irene Castaño Navarro, por recibirme en su laboratorio y equipo de trabajo, por compartirme conocimientos y todo su apoyo para la realización de esta tesis.

A mi Co directora de tesis, la Dra. Guadalupe Gutiérrez Escobedo, por todo su apoyo, paciencia y soporte técnico para la realización de este estudio.

Al Dr. Alejandro de las Peñas Nava por sus aportes y comentarios para la mejora de esta tesis.

A la Dra. Fabiola Jaimes Miranda miembro de mi comité tutorial, por sus valiosos comentarios y contribuciones al manuscrito de esta tesis.

A los investigadores de la División de Biología Molecular por orientarme y compartirme una parte de sus conocimientos durante las clases, lo cual fue de gran importancia en mi formación académica.

A mis compañeros y amigos de mi generación de maestría 2019-2021, por su apoyo y compañía.

A todos los miembros del laboratorio 6: Laura, Cindy, Jazmín, Grecia, Norma, Selene, Ernesto, Manuel y Guillermo, por sus contribuciones, apoyo, comprensión y amistad dentro y fuera del laboratorio.

A Gloria López por su ayuda con el material de laboratorio.

A Nataly, Ariadne, Raosalba, Jazmin, Valorie y Nicholas por su valiosa amistad, cariño, confianza y apoyo.

A todos ustedes y aquellos que directa e indirectamente estuvieron conmigo en momentos buenos y malos, gracias a ustedes mi experiencia en el IPICyT y en SLP ha sido demasiado enriquecedora.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Resumen	
xi	
Abstract	
xii	
1. INTRODUCCION	1
1.1 <i>Candida glabrata</i> , de comensal a patógeno	1
1.2 Atributos de virulencia de <i>C. glabrata</i>	2
1.3 Cambios genotípicos y fenotípicos que <i>C. glabrata</i> experimenta dentro del hospedero	3
2. MATERIALES Y MÉTODOS	5
2.1 Selección de aislados clínicos de <i>C. glabrata</i>	5
2.2 Genotipificación de los aislados clínicos secuenciales por marcadores moleculares	5
2.3 Caracterización fenotípica de los aislados clínicos secuenciales de <i>C. glabrata</i>	6
2.3.1 Resistencia a estrés térmico	6

2.3.2 Resistencia a estrés oxidante: Exposición crónica a H ₂ O ₂ , menadiona y tBuOOH	7
2.3.3 Resistencia a estrés oxidante: Exposición aguda a H ₂ O ₂ , células en fase estacionaria y logarítmica	7
2.4 Actividad enzimática de la enzima catalasa (Cta1)	8
3. RESULTADOS	10
3.1 Selección de aislados clínicos secuenciales de <i>C. glabrata</i>	10
3.2 Relación genética de los aislados clínicos secuenciales de <i>C. glabrata</i>	10
3.3 Los aislados clínicos secuenciales de <i>C. glabrata</i> presentan diversidad fenotípica respecto a la respuesta a estrés, tanto entre los aislados de un mismo paciente como entre los de pacientes diferentes	11
3.3.1 Resistencia a estrés térmico	11
3.3.2 Resistencia a estrés oxidante: Exposición crónica a tBuOOH, menadiona y H ₂ O ₂	11
3.3.3 Resistencia a estrés oxidante: Exposición aguda a H ₂ O ₂ , células en fase estacionaria y logarítmica	12
3.4 La actividad enzimática de la enzima Cta1 es mayor en los aislados más resistentes a estrés oxidante	13
4. DISCUSIÓN	14
5. CONCLUSIONES	19
6. REFERENCIAS	20
7. TABLAS	25
8. PIES DE FIGURA	28
9. FIGURAS	30
10. MATERIAL SUPLEMENTARIO	37

Lista de tablas

Tabla 1: Cepas control y aislados clínicos secuenciales de <i>C. glabrata</i>	25
Tabla 2: Marcadores moleculares para genotipificación	27
Tabla 3: Condiciones de PCR para genotipificación con marcadores <i>RPM2</i> , <i>MT1</i> y <i>ERG3</i>	27

Lista de figuras

Figura 1. Dendograma Generado con los marcadores moleculares <i>RPM2</i> , <i>MT1</i> y <i>ERG3</i>	28
Figura 2. Dendograma Generado con los marcadores moleculares RPDs	28
Figura 3. Los aislados clínicos de <i>C. glabrata</i> son capaces de crecer en un amplio rango de temperaturas	28
Figura 4. Los aislados clínicos secuenciales de <i>C. glabrata</i> tienen una respuesta variable al estrés oxidante causado por diferentes agentes oxidantes	28
Figura 5. Los aislados clínicos del paciente 9 son resistentes a la exposición aguda a peróxido de hidrógeno	29
Figura 6. La actividad enzimática de la catalasa en los aislados de los pacientes 7 y 9	29

Resumen

“Análisis fenotípico y genotípico de aislados clínicos secuenciales de *Candida glabrata*”

C. glabrata es un patógeno fúngico emergente y oportunista que posee un conjunto de atributos de virulencia que le permiten sobrevivir dentro de su hospedero y colonizar diferentes nichos dentro de éste. El objetivo de este estudio es determinar patrones de variación a nivel fenotípico y genotípico en aislados clínicos secuenciales obtenidos de un mismo paciente que ocurren durante el curso de una infección. Analizamos 40 aislados clínicos secuenciales de *C. glabrata* provenientes de 11 pacientes, que inicialmente identificamos con oligonucleótidos especie-específicos y genotipificamos con los marcadores moleculares para microsatélites polimórficos *RPM2*, *MT1* y *ERG3*. Hemos caracterizado la respuesta de los aislados clínicos a estrés térmico y también la respuesta a estrés causado por diferentes agentes oxidantes en dos condiciones distintas: a) mediante exposición crónica a diferentes concentraciones de tres agentes oxidantes y b) por exposición aguda a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) de cultivos en fase estacionaria y fase logarítmica, por último analizamos la actividad enzimática de la catalasa.

Encontramos que los aislados clínicos de *C. glabrata* de cada paciente, provienen de un mismo episodio de infección (se derivan del aislado inicial). Estos aislados pueden crecer en un amplio rango de temperaturas y tienen la capacidad de crecer en presencia constante de diferentes concentraciones de menadiona, hidroperóxido de ter-butilo (tBuOOH) y H_2O_2 respecto a la cepa control BG14. Además observamos que los aislados del paciente 9 muestran una resistencia mayor que la cepa control BG14 a la exposición aguda a H_2O_2 y estos resultados se correlacionan la actividad de la enzima Cta1.

Con estos resultados concluimos que existe variación fenotípica entre aislados de diferentes pacientes y entre aislados provenientes del mismo paciente.

PALABRAS CLAVE. *C. glabrata*, respuesta a estrés, genotipificación, variación fenotípica, aislados clínicos secuenciales.

Abstract

Phenotypic and genotypic analysis of sequential clinical isolates from *Candida glabrata*

C. glabrata is an emerging and opportunistic fungal pathogen that possesses a set of virulence attributes that allow it to survive within its host and colonize new niches within it. The objective of this study is to determine patterns of variation at the phenotypic and genotypic level in sequential clinical isolates obtained from the same patient that occur during the course of an infection. We analyzed 40 sequential clinical isolates of *C. glabrata* from 11 patients, which we initially identified with species-specific primers and genotyped with polymorphic microsatellite markers *RPM2*, *MT1* and *ERG3*. We have characterized the response of clinical isolates to thermal stress and also the response to oxidative stress caused by different oxidizing agents in two different conditions: a) chronic exposure to three different oxidizing compounds and b) acute exposure to H₂O₂ of cultures in stationary phase and in logarithmic phase, finally we analyzed the enzymatic activity of the catalase.

We found that the clinical isolates of *C. glabrata* from each patient come from the same infection episode (they are derived from the initial isolate). These isolates can grow in a wide range of temperatures, and have the ability to grow in the constant presence of different concentrations of menadione, ter-butyl hydroperoxide and H₂O₂ compared to the control strain BG14. We found that the isolates from patient 9 show higher resistance to acute exposure to H₂O₂ in stationary phase with respect to the control strain BG14 and these results correlate with the activity of the Cta1 enzyme.

KEY WORDS. *C. glabrata*, stress response, genotyping, phenotypic variation, sequential clinical isolates

1. INTRODUCCION

1.1 *Candida glabrata*, de comensal a patógeno

El género *Candida* es un grupo heterogéneo de microorganismos que forman parte de la microbiota humana, se encuentra colonizando como comensal las superficies de las mucosas, incluyendo el tracto gastrointestinal, tracto urogenital, cavidad oral y piel (Nash et al. 2017). Las infecciones causadas por *Candida* se han convertido en una causa importante de morbilidad y mortalidad en ambientes intrahospitalarios donde se ha reportado a las especies *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* y *Candida krusei* como los principales agentes etiológicos causantes de infecciones invasivas (Pfaller et al. 2014).

C. glabrata es un patógeno fúngico emergente, que tiene una relación filogenética más cercana a *Saccharomyces cerevisiae* que a *C. albicans* y pertenece al clado *Saccharomycetaceae* que se agrupa con el género *Nakaseomyces* (Gabaldón y Carreté 2016). *C. glabrata* y otras especies del género *Candida* son patógenos oportunistas, ya que son virulentas bajo ciertas condiciones, como pueden ser durante un estado de inmunodeficiencia del hospedero a consecuencia de distintas enfermedades (Casadevall et al. 2011; Gabaldón y Carrete 2016), o tratamientos invasivos o prolongados con antibióticos, entre otros. En los últimos años *C. glabrata* ha emergido como uno de los principales agentes causantes de micosis, se ha observado un incremento importante en aislamientos de esta especie, la cual es la segunda más prevalente en Europa, Estados Unidos y Canadá (Pfaller et al. 2014, Guinea 2014, Pappas et al. 2018), en gran medida esto se puede relacionar con una serie de factores o atributos de virulencia que le permiten a *C. glabrata* sobrevivir dentro de su hospedero y colonizar diferentes nichos dentro de éste, entre estos se destaca: 1) La habilidad de crecer a una temperatura de 37°C o incluso mayor, 2) una gran plasticidad genómica y 3) una alta resistencia innata a estrés oxidante y a ciertos antifúngicos (López- Fuentes et al. 2018; Gabaldón y Carreté, 2016).

1.2 Atributos de virulencia de *C. glabrata*

1) La temperatura óptima de crecimiento de *C. glabrata* es muy cercana a los 37°C, lo que puede interpretarse como una adaptación para colonizar hospederos humanos (Gabaldón y Carreté, 2016). 2) *C. glabrata* muestra una gran plasticidad genómica, que se ha relacionado con la expansión de los genes *EPA*, que codifican para las adhesinas *Epa*, que le confieren la habilidad de adherirse a superficies bióticas y abióticas. *C. glabrata* es la especie del género *Nakaseomyces* que posee un mayor número de estos genes, entre 20 y 26 según la cepa (Xu et al. 2020; Xu et al. 2021), sin embargo este número puede incrementarse durante el proceso de una infección, aunado a esto se han reportado cambios rápidos en la organización genómica y cromosómica de *C. glabrata* en aislados clínicos, donde las variaciones en el cariotipo se dan en el lapso de tiempo en que se desarrolla la infección (un lapso de hasta 10 semanas), además del aumento o disminución de ciertos genes, que es una estrategia que *C. glabrata* aplica para sobrevivir a la presión selectiva a la que se expone durante el curso de una infección, tanto para evadir al régimen de tratamiento, como para adaptarse a las condiciones de su hospedero (Poláková et al. 2009; Ahmad et al. 2014, Gabaldón et al. 2013; Gabaldón y Carreté 2016). 3) La habilidad para eliminar eficientemente las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) producidas por las células fagocíticas (primera línea de defensa del hospedero) en *C. glabrata*, se encuentra regulada por dos sistemas, el sistema enzimático que involucra la acción de las enzimas antioxidantes, catalasa (*CgCta1*) y dos peroxiredoxinas *CgTsa1* y *CgTsa2* para eliminar H_2O_2 además de dos superóxidos dismutasas (*CgSod1* y *CgSod2*), que eliminan los radicales O_2^- , y por el sistema no enzimático donde participa el glutatión (antioxidante). La resistencia innata al estrés oxidante permite la supervivencia de las células fúngicas dentro de los macrófagos y la replicación de la levadura dentro de estos (Cuellar-Cruz et al. 2008; Briones-Martin-Del-Campo et al 2014; Kasper et al. 2014; Gutiérrez- Escobedo et al. 2020). 4) Durante los últimos años las infecciones causadas por *C. glabrata* han sido tratadas principalmente con antifúngicos de grupo de los azoles y de las equinocandinas; sin embargo, este hongo ha mostrado una rápida adaptación al tratamiento con estos fármacos y en consecuencia ha desarrollado resistencia a

estos tanto en entornos clínicos como *in vitro*, (Pfaller et al. 2014; Duxbury et al. 2019).

1.3 Cambios genotípicos y fenotípicos que *C. glabrata* experimenta dentro del hospedero

Para entender algunos de los mecanismos de adaptación de *C. glabrata* se han estudiado aislados clínicos obtenidos de un mismo paciente a diferentes tiempos de la infección (aislados secuenciales). En estos estudios es crítico determinar que los aislados obtenidos al final del curso de la infección, se derivan del mismo aislado inicial, es decir que el paciente sufrió una sola infección. Para demostrar que los aislados posteriores se derivan del inicial, se utiliza la tipificación genotípica. Esta provee información valiosa acerca de la variación de las cepas, tales como el reemplazamiento de cepas mejor adaptadas al entorno del paciente durante una infección, micro variaciones y el mantenimiento en el hospedero durante episodios consecutivos de una infección. Distintos métodos moleculares han sido utilizados con estos fines y muchos de ellos poseen un buen poder discriminatorio. Por ejemplo, el análisis de Polimorfismo de Longitud de Microsatélites (MLP) que es un método basado en PCR utilizado para la genotipificación de diferentes géneros fúngicos, incluyendo aislados clínicos de *C. glabrata* (Abbes et al. 2012). Aunado a esto, el estudio de los cambios a nivel fenotípico y genotípico de aislados clínicos secuenciales, resulta de gran relevancia para entender la adaptación de *C. glabrata* a su hospedero. En el trabajo realizado por Vale- Silva (2017), se analizó el genoma de dos aislados clínicos obtenidos del mismo paciente: el aislado DSY562 (sensible a azoles) y el segundo aislado DSY565, que fue aislado 50 días después de terapia con fluconazol y adquirió resistencia a azoles. Este fenotipo depende de la presencia de una mutación de ganancia de función (GOF) en el factor de transcripción Pdr1 codificado por el gen *PDR1* (Vale- Silva et al. 2017), Pdr1 se activa al unir fluconazol y de esa manera induce la transcripción de genes que codifican bombas de flujo de xenobióticos como Cdr1 (Thakur et al. 2008).

En nuestro laboratorio Herrera- Basurto (Tesis de maestría) determinó la relación genética de 34 aislados clínicos secuenciales de *C. glabrata* que provienen de 10

pacientes mediante la prueba de RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA), la cual consiste en la amplificación aleatoria de fragmentos de DNA basado en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando un solo oligonucleótido y temperaturas bajas de alineamiento (Williams et al. 1990). Con esto se estableció que los últimos aislados de cada paciente provienen del mismo aislado inicial. Todos los aislados se agruparon en cuatro genotipos distintos. Además, se escogieron dos aislados de cada paciente y se determinó la susceptibilidad a fluconazol. Se encontraron dos casos de dos pacientes donde el perfil de susceptibilidad a fluconazol cambió en el segundo aislado respecto al primero. En los aislados de uno de los pacientes (P7) el último aislado tiene una tendencia a ser más resistente a fluconazol que el aislado inicial y otro paciente del cual el último aislado disminuyó su resistencia a fluconazol respecto al primero.

En este trabajo nos interesa determinar la variación a nivel fenotípico y genotípico en aislados clínicos secuenciales obtenidos de un mismo paciente que ocurren durante el curso de una infección. Para esto elegimos 40 aislados clínicos secuenciales (provenientes de 11 pacientes que incluye a los 34 descritos arriba más los provenientes de un nuevo paciente), los genotipificamos con marcadores adicionales mediante la amplificación de microsatélites por la técnica modificada de MLP (Microsatellite Length Polymorphisms) con los pares de oligonucleótidos *RPM1*, *MT1* y *ERG3*, adicionalmente, genotipificamos los aislados del paciente 11 con la prueba de RAPDs utilizando los marcadores moleculares OPA-09, OPA-18 y OPE-18. Caracterizamos la respuesta de los aislados clínicos a estrés térmico mediante ensayos de crecimiento en medio rico YPD a diferentes temperaturas, y también la respuesta a estrés causado por diferentes agentes oxidantes. Con estos datos determinamos que efectivamente, todos los aislados de cada paciente provienen del inicial. Además mostramos que hay variabilidad fenotípica entre los aislados de diferentes pacientes e incluso entre los de un mismo paciente.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Selección de aislados clínicos de *C. glabrata*

Las cepas de referencia o control utilizadas en este estudio fueron la cepa de referencia del laboratorio de Microbiología Molecular de Hongos, DBM, IPICYT *C. glabrata* (BG14) (Cormack y Falkow, 1999), la cepa secuenciada CBS138 (ATCC2001) (candidagenome.org/download/sequence/C_glabrata_CBS138/), una mutante nula *hdf1Δ* que confiere un fenotipo de sensibilidad a 45°C, la mutante nula en *cta1Δ* que presenta un fenotipo sensible a peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y la doble mutante nula en *trr1Δ trr2Δ* que tiene un fenotipo sensible a menadiona e hidroperóxido de ter- butilo (tBuOOH) (Tabla 1).

Los aislados clínicos secuenciales analizados en este estudio fueron obtenidos de la colección con la que cuenta el laboratorio de Microbiología Molecular de Hongos, DBM, IPICYT y del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). Se seleccionaron en total 40 aislados clínicos secuenciales de *C. glabrata*, provenientes de 11 pacientes (Tabla 1), de los cuales se obtuvieron más de un aislado de cada paciente, obtenidos a diferentes tiempos de la infección. Corroboramos que dichos aislados son efectivamente *C. glabrata* utilizando 3 juegos de oligonucleótidos especie-específicos para *C. glabrata* (*Cg1*, *Cg2* y *Cg3*), diseñados en el laboratorio de Microbiología Molecular (este trabajo y Tesis de Maestría, Martha Selene Herrera Basurto, 2020).

2.2 Genotipificación de los aislados clínicos secuenciales por marcadores moleculares

Utilizamos 3 marcadores moleculares, para determinar si los aislados clínicos secuenciales provienen del aislado inicial o bien si provienen de más de un episodio de infección.

Utilizamos DNA genómico de cada aislado utilizando el protocolo de lisis celular (acoplado a Fast Prep™), extracción con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y precipitación con etanol (Ausubel, 2009). Para la tipificación genotípica de nuestros aislados de *C. glabrata* utilizamos los marcadores moleculares *RPM1*, *MT1* y *ERG3* para la amplificación de microsatélites polimórficos (Abbes et al. 2012; Kiasat et al.

2019). Utilizamos un par de oligonucleótidos por cada marcador (Tabla 2), dichos oligonucleótidos flanquean genes que presentan microsatélites. Se llevó a cabo una PCR punto final en un volumen de reacción de 30 μ L que contiene 1.5 μ L de DNAg, 3 μ L de cada oligonucleótido a 5 μ M; 0.5 μ L de dNTPs a 0.2 mM; 1.5 μ L de MgCl₂ a 1.95 mM; 3 μ L de Buffer de reacción 1X; 1 μ L de Taq DNA polimerasa (purificada en nuestro laboratorio) y agua MilliQ para completar el volumen final de 30 μ L. Estandarizamos las condiciones de PCR apropiadas para cada par de marcadores y la amplificación la llevamos a cabo en un termociclador C-100 Touch™ BIO-RAD (Tabla 3). Los productos de PCR los separamos por electroforesis en geles de agarosa al 2% y los visualizamos en un transiluminador, bajo luz UV (Gel Doc XR+ Gel Documentation System BIO-RAD). Para obtener el tamaño exacto de cada producto de PCR analizamos los geles con el programa ImageJ, con estos datos construimos una tabla y un dendograma utilizando la función *h clust* en el lenguaje de programación R.

De forma adicional, utilizamos la técnica de RAPD (amplificación aleatoria de DNA polimórfico) para la tipificación genotípica de los 5 aislados del paciente 11. Utilizamos los oligonucleótidos OPA-09, OPA-18 y OPE-18 (Tabla 2) con las condiciones de PCR reportadas en la tesis de maestría de Herrera- Basurto, 2019. Los productos de PCR los corrimos en geles de agarosa al 1.5% y los patrones de bandas obtenidos los analizamos en matrices binarias (0: ausencia de banda y 1: presencia de banda), y con estos datos generamos un dendograma utilizando la función *h clust* en el lenguaje de programación R.

2.3 Caracterización fenotípica de los aislados clínicos secuenciales de *C. glabrata*

2.3.1 Resistencia a estrés térmico

Determinamos la capacidad de los aislados clínicos secuenciales de *C. glabrata* para crecer en diferentes temperaturas, utilizamos como control dos cepas termosensibles: la CBS138 (sensible a 42°C) y la cepa mutante nula *hdf1Δ* (sensible a 45°C) y una cepa resistente a 45°C, la cepa BG14. Los 40 aislados clínicos y los controles se cultivaron por 48 hrs medio líquido YPD a 30°C (temperatura permisiva) para obtener células en fase estacionaria. Estos cultivos

se ajustaron a una DO_{600} de 1 y posteriormente se hicieron diluciones logarítmicas seriadas en agua Milli Q estéril (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5}) en placas de 96 pozos. Utilizamos un replicador para inocular gotas de aproximadamente $7\mu\text{L}$ en placas de medio YPD (una placa para cada temperatura) 25°C , 30°C , 37°C , 42 y 45°C respectivamente, se incubaron durante 72 hrs y se registró su crecimiento cada 24 hrs tomando fotos con un fotodocumentador (Gel Doc XR+ Gel Documentation System BIO-RAD).

2.3.2 Resistencia a estrés oxidante: Exposición crónica a H_2O_2 , menadiona y tBuOOH

Para determinar la capacidad de respuesta de los aislados clínicos de *C. glabrata* al estrés causado por 3 agentes oxidantes, utilizamos los aislados clínicos de los 11 pacientes y las cepas control (BG14 resistente a estrés causado por diferentes oxidantes y las mutantes nulas en *cta1 Δ* y la doble mutante *trr1 Δ trr2 Δ* : sensibles a estrés causado por H_2O_2 , y menadiona y tBuOOH respectivamente.

Cultivamos los aislados clínicos y las cepas control durante 48 hrs (células en fase estacionaria), posteriormente se ajustó a una DO_{600} de 1, se hicieron diluciones logarítmicas seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5}) y se inocularon gotas de aproximadamente $7\mu\text{L}$ en placas de medio YPD suplementadas con uracilo y diferentes concentraciones de uno de los agentes oxidantes probados: a) 0.9 mM, 1.5 mM y 2 mM de tBuOOH, b) 60 μM , 90 μM y 120 μM de menadiona y c) 5, 10 y 15 mM de H_2O_2 (Sigma-Aldrich, numero de catálogo: 349887). Además inoculamos una placa sin agente oxidante que se utilizó como control de cuenta viable. Los cultivos se incubaron a 30°C durante 72 hrs y se documentó su crecimiento cada 24 hrs (Gel Doc XR+ Gel Documentation System BIO-RAD).

2.3.3 Resistencia a estrés oxidante: Exposición aguda a H_2O_2 , células en fase estacionaria y logarítmica

Para estos ensayos, elegimos los aislados de los pacientes 7 y 9; como control utilizamos la cepa BG14.

Para la exposición aguda a células en fase estacionaria, los cultivos se crecieron en 5 mL de medio YPD por 48 hrs a 30°C en agitación constante, de este cultivo se

tomó 1 mL para inocular un matraz con 50 mL de medio YPD, se dejaron crecer a 30°C y en agitación constante durante 48 hrs para que las células lleguen a fase estacionaria. Se tomó una alícuota de 1 mL y el cultivo restante se centrifugó para obtener el medio usado de la misma cepa. El medio usado se dividió en alícuotas de 5 mL que se inocularon con la cantidad de células necesarias para obtener una $DO_{600} = 0.5$ (las células se obtuvieron de la alícuota de 1 mL antes de centrifugar) para ser tratadas con diferentes concentraciones del agente oxidante: 100 mM, 500 mM, 800 mM, 1000 mM y 1500 mM de H_2O_2 y un tubo control sin oxidante. Los cultivos se expusieron durante 3 hrs a 30°C y en agitación constante, una vez transcurrido este tiempo se retiró el H_2O_2 por centrifugación, nuevamente se midió la DO_{600} y se volvieron a ajustar a una DO_{600} de 0.5. Las células se resuspendieron en 1 mL de agua Milli Q, a partir de esto se hicieron diluciones logarítmicas seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5}) en una placa de 96 pozos y se inoculan gotas de aproximadamente 7 uL en placas de medio YPD suplementado con uracilo, estas se dejaron incubar a 30°C durante 72 hrs, las lecturas se hicieron cada 24 hrs.

Para los ensayos de sensibilidad en fase logarítmica, se siguió el mismo protocolo de exposición excepto que los cultivos de 48 hrs de crecimiento fueron diluidos en 50 mL de medio YPD, estos cultivos se incubaron a 30°C y en agitación constante hasta llegar a una $DO_{600} = 0.5$ después de 18 duplicaciones, posteriormente los cultivos fueron divididos en alícuotas de 5 mL y expuestos a 5mM, 10mM, 25mM, 50mM y 100mM de H_2O_2 e incubadas a 30°C y en agitación constante por 3 hrs, posteriormente se retiró el agente oxidante, se midió la DO y se reajustaron a la DO inicial en agua Milli Q, se hicieron diluciones logarítmicas seriadas y se inocularon gotas en medio sólido YPD.

2.4 Actividad enzimática de la enzima catalasa (Cta1)

Para este ensayo elegimos a los aislados provenientes de los pacientes 7 y 9, tomamos a la cepa BG14 como control y la mutante nula en *cta1* Δ como negativo. Los aislados clínicos y las cepas control se crecieron en medio líquido YPD por 24 hrs, estos cultivos se diluyeron en 50 mL de medio YPD y se incubaron a 30°C y en agitación constante hasta llegar a una DO_{600} 0.5 después de 18 duplicaciones. Posteriormente los cultivo se centrifugaron por 5 min, las células se lavaron con

agua estéril y se resuspendieron en buffer PB con inhibidor de proteasas (transferimos las células a tubos Eppendorf y se mantuvieron en hielo durante todo el proceso), las células se lisaron utilizando el equipo Fast Prep™ (5 veces, 6 m/s durante 1 minuto y con intervalos de 5 minutos) y perlas de zirconia, se centrifugaron para remover los restos celulares y recuperar el sobrenadante que contiene las proteínas totales. Posteriormente hicimos la cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford (reactivo de Bradford, Sigma- Aldrich, numero de catálogo: B6916), la absorbancia se midió a DO₅₉₅ en un nanodrop (Nanodrop 2100 spectrophotometer, LANBAMA-IPICYT). Para medir la actividad de la enzima catalasa todas las muestras se ajustaron a una concentración de 100 µg/mL, la medición se hizo mediante un método espectrofotométrico (UV/Vis Spectrophotometer (Shimadzu, modelo: UV-1700, numero de catálogo: 206-55401-92) y para la medición se utilizaron celdas de cuarzo donde mezclamos 1 mL de buffer PB, 1 mL de una solución de H₂O₂ [30mM] y 1 mL del extracto de proteínas provenientes de cada cepa. Durante la reacción se observa una disminución de la absorbancia a DO₂₄₀ y se registra la absorbancia inicial y final, a partir de estos datos calculamos la actividad de la catalasa, usando la fórmula:

$$U/mg = \frac{(A_0 - A_{60}) \times V_t}{\epsilon_{240} \times d \times V_s \times C_t \times 0.001}$$

Los datos se analizaron con el software GraphPad Prism (GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA. Versión 8.0) (Metodología retomada y modificada de Orta-Zavalza et al. 2014).

3. RESULTADOS

3.1 Selección de aislados clínicos secuenciales de *C. glabrata*

En este trabajo analizamos 40 aislados clínicos secuenciales (provenientes de 11 pacientes). Inicialmente confirmamos que los aislados provenientes del paciente 11 pertenecen a la especie *C. glabrata*, mediante la identificación molecular con oligonucleótidos especie-específicos para *C. glabrata* (*Cg1*, *Cg2* y *Cg3*) (Figura S1) al igual que los aislados de los pacientes 1-10, previamente identificados (Tesis de Maestría, Martha Selene Herrera Basurto, 2020). Los aislados clínicos fueron genotipificados con los marcadores moleculares *RPM1*, *MT1*, *ERG3* y con la prueba de RAPDs utilizando los marcadores moleculares OPA-09, OPA-18 y OPE-18 (Figura 1 y Figura 2).

3.2 Relación genética de los aislados clínicos secuenciales de *C. glabrata*

Para la genotipificación de los aislados clínicos de *C. glabrata*, utilizamos 3 marcadores moleculares: *RPM2*, *MT1* y *ERG3*, dichos genes poseen secuencias de “microsatélites” repetidas en tándem, las cuales varían en tamaño dependiendo de la cepa. Observamos diferencias en el tamaño de los productos de PCR entre los aislados de cada paciente (Figura S2), con los datos obtenidos de cada aislado y por cada marcador construimos una matriz tomando en cuenta el tamaño de cada amplificación (banda en el gel de agarosa al 2%) (Tabla S1), para generar un dendograma con la función *h clust* en el lenguaje de programación R, los aislados se agruparon por paciente y se generaron 6 genotipos principales (Figura 1). El genotipo I agrupó a los aislados de los pacientes 8, 4 y la cepa BG14, en el genotipo II se agruparon los aislados del paciente 9 y la cepa CBS138, en el genotipo III se agruparon los aislados del paciente 10, en el genotipo IV se agruparon los aislados de los pacientes 6 y 11, en el genotipo V los aislados de los pacientes 1 y 2 y por último en el genotipo VI los aislados del paciente 3 y 7. Cabe destacar que, con base en estos resultados podemos inferir que los aislados de cada paciente provienen de un mismo episodio de infección.

En cuanto al paciente 11, analizamos estos aislados con la prueba RAPD los patrones de los productos de PCR obtenidos con los marcadores moleculares OPA-

09, OPA-18 y OPE-18, y a partir de los patrones de bandas obtenidos (Figura S3), construimos matrices binarias (Tabla S2), incorporando el total de los aislados (40 aislados) para construir un dendograma utilizando la función *h clust* en el lenguaje de programación R (Figura 2). El dendograma obtenido revela que los 5 aislados del paciente 11 se agrupan en la misma rama y por lo tanto estos aislados provienen de un mismo episodio de infección y son secuenciales, además se agruparon en el genotipo número V.

3.3 Los aislados clínicos secuenciales de *C. glabrata* presentan diversidad fenotípica respecto a la respuesta a estrés, tanto entre los aislados de un mismo paciente como entre los de pacientes diferentes

3.3.1 Resistencia a estrés térmico

Iniciamos la caracterización fenotípica de los aislados clínicos secuenciales de *C. glabrata* con la determinación de su capacidad para crecer en diferentes temperaturas, para esto hicimos ensayos de crecimiento en medio sólido YPD, los aislados fueron sometidos a 25°C 30°C, 37°C y 45°C y se monitoreo su crecimiento por 72 hrs (Figura S4). A partir de estos ensayos detectamos que los aislados de los pacientes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 y 10 crecen en todas las temperaturas probadas a las que fueron sometidos 25°C, 30°C, 37°C y 45°C al igual que la cepa control de laboratorio BG14. En los aislados del paciente 7 detectamos que el aislado #3 crece más lento a 25°C respecto a los demás aislados de este paciente y es totalmente sensible a 45°C, mientras que los aislados #1, 2, 4 y 5 del mismo paciente crecen bien en todas las temperaturas. Todos los aislados de los pacientes 9 y 11 son termosensibles a 45°C tal como los controles de termosensibilidad, pero pueden crecer bien en las otras temperaturas probadas (Figura 3 y Figura S4).

3.3.2 Resistencia a estrés oxidante: Exposición crónica a tBuOOH, menadiona y H₂O₂

Con el objetivo de determinar la capacidad de respuesta de los aislados clínicos de los 11 pacientes al estrés causado por 3 agentes oxidantes, realizamos ensayos de

crecimiento en medio sólido. Se inocularon gotas de aproximadamente 7 μ L en placas de medio YPD suplementadas con uracilo y diferentes concentraciones de un agente oxidante: a) 0.9 mM, 1.5 mM y 2 mM de tBuOOH, b) 60, 90 y 120 μ M de menadiona y c) 5, 10 y 15 mM de H₂O₂ y una placa sin agente oxidante como control de cuenta viable.

Encontramos que todos los aislados clínicos (Paciente1-11) resistieron hasta la concentración de 90 μ M de menadiona y fueron sensibles a la concentración más alta de este agente oxidante (120 μ M), al igual que las cepas control BG14 y CBS138, y todas las cepas fueron resistentes hasta la concentración más alta que probamos de tBuOOH, de manera similar a las cepas control (Figura 4a y 4b, Figura S6 y S7). En cuanto a la exposición a H₂O₂, los aislados clínicos y las cepas control BG14 y CBS138 tienen la capacidad de crecer hasta una concentración de 10 mM (Figura S5). Se destacan los fenotipos de los aislados de los pacientes 7 y 9. El aislado #3 del paciente 7, muestra un crecimiento más lento (colonias más pequeñas en la caja sin agente oxidante), y es ligeramente más sensible a la concentración más alta de H₂O₂ respecto a los demás aislados de este paciente. Por otro lado, los aislados del paciente 9 pueden crecer en todas las concentraciones probadas de H₂O₂, incluso en la más alta (15mM H₂O₂), lo cual indica que estos aislados son los más resistentes de los estudiados (Figura 4c).

3.3.3 Resistencia a estrés oxidante: Exposición aguda a H₂O₂, células en fase estacionaria y logarítmica

Para caracterizar a una mayor profundidad la respuesta a estrés oxidante de los aislados clínicos de *C. glabrata*, investigamos la resistencia a H₂O₂ de células en fase estacionaria y logarítmica. Elegimos los aislados del paciente 9 que presentaron resistencia a estrés crónico y los del paciente 7 que mostraron sensibilidad a H₂O₂ y como control a la cepa BG14 para llevar a cabo estos experimentos.

Encontramos que los aislados del paciente 7, en los ensayos de exposición aguda en células en fase estacionaria los aislados #1, #2, #3 y #4 pueden crecer hasta la concentración de 500 mM al igual que la cepa control BG14, mientras que el aislado #5 que es el último de este paciente es ligeramente más sensible respecto a los

otros aislados de este paciente. En cambio, en los ensayos en fase logarítmica todos los aislados de este paciente se muestran más sensibles que la cepa control (Figura 5a). En cuanto a los aislados del paciente 9, los ensayos en fase estacionaria muestran que los aislados de este paciente crecen bien hasta la concentración de 1000 mM y muestran sensibilidad a 1500 mM de H₂O₂. Estos resultados muestran que estos aislados son más resistentes que la cepa control y los demás aislados probados. En los ensayos en fase logarítmica los aislados de este paciente muestran un crecimiento muy parecido a la cepa control, ya que son capaces de crecer hasta la concentración de 50 mM y la sensibilidad es más evidente a los 100 mM de H₂O₂ (Figura 5b).

3.4 La actividad enzimática de la enzima Cta1 es mayor en los aislados más resistentes a estrés oxidante

La enzima catalasa 1 (Cta1) juega un papel importante en la regulación y resistencia al estrés oxidante en *C. glabrata*. Elegimos los aislados de los pacientes 7 y 9, los cuales presentan sensibilidad y resistencia al estrés causado por H₂O₂ respectivamente, por lo que medimos la actividad de la enzima Cta1 en estos aislados (Figura 6). Comparamos los datos con una prueba de ANOVA de 1 vía y comparaciones múltiples de Tukey, con el paquete estadístico GraphPad Prism. Se detectó una mayor actividad de la Cta1 en nuestra cepa control BG14 respecto a la mutante nula en *cta1*Δ (P<0.05), los aislados del paciente 7 muestran una actividad parecida a la cepa BG14 (P>0.05), de forma contraria, los aislados #1, #2 y #3 del paciente 9 (aislados P9-1, P9- 2, P9-3) muestran una actividad mayor respecto a la cepa control BG14 y la mutante nula en *cta1*Δ (P<0.05). Estos resultados se relacionan con los ensayos de resistencia a H₂O₂, además confirma el papel central de la enzima Cta1 en la regulación del estrés oxidante.

4. DISCUSIÓN

C. glabrata es un patógeno fúngico oportunista y emergente, es considerado como el segundo agente etiológico causante de candidiasis sistémica en diferentes partes del mundo (Pappas et al. 2018). Esta especie posee características que le permiten adaptarse y colonizar hospederos humanos como por ejemplo: la temperatura óptima de crecimiento de *C. glabrata* es cercana a los 37°C, muestra una alta resistencia a diferentes tipos de estrés como el estrés oxidante y estrés nutricional, el genoma de esta levadura posee una gran plasticidad, misma que le permite expresar genes de manera diferencial según los requerimientos de la célula, además le permite remodelar los componentes de la pared celular lo que se refleja en una gran capacidad de adhesión a superficies bióticas y abióticas y por último, *C. glabrata* muestra de manera innata una menor susceptibilidad a los antifúngicos azólicos (Gabaldón y Carreté, 2016; Roetzer et al. 2011; López- Fuentes et al. 2018; Barbosa- Salazar et al. 2018). *C. glabrata* puede experimentar algunos cambios dentro de su hospedero con el fin de adaptarse a este, estos pueden ocurrir de forma gradual o espontánea, lo que les puede conferir alguna ventaja para sobrevivir dentro del hospedero humano (Singh-Babak et al. 2012; Guo et al. 2020). Con base en esto, el estudio de aislados clínicos secuenciales obtenidos durante el curso de una infección puede ayudar a la comprensión de las variaciones a nivel genético y fenotípico que pudieran ser relevantes para la adaptación de la levadura al hospedero y su posible impacto en el tratamiento de la infección.

En este estudio analizamos 40 aislados clínicos de *C. glabrata* obtenidos de 11 pacientes, empleamos 3 marcadores para microsátélites polimórficos *RPM2*, *MT1* y *ERG3*, nuestros aislados clínicos se clasificaron en 6 genotipos. En el estudio realizado por Abbas et al. (2012) emplearon estos mismos marcadores para la tipificación de 118 aislados clínicos provenientes de 36 pacientes, reportaron aislamientos con el mismo genotipo, aislamientos con microvariaciones y aislamientos con diferentes genotipos, en nuestro caso el genotipo más frecuente es el I, donde se agruparon los aislados de 3 pacientes (Pacientes 4, 5 y 8) y no reportamos aislados del mismo paciente con diferentes genotipos. Por otro lado, estos marcadores también se han utilizado para la tipificación de aislados no

relacionados, donde analizaron 61 aislados clínicos de *C. glabrata* no relacionados provenientes de episodios de infección vulvovaginal, estos fueron clasificados en 35 genotipos diferentes (Kiasat et al. 2019). El uso de los marcadores *RPM2*, *MT1* y *ERG3* para la genotipificación de aislados clínicos se ha determinado como un buen método de tipificación para la clasificación y discriminación de aislados relacionados y no relacionados, además de detectar variaciones y reemplazamiento de cepas durante el curso de una infección.

De forma adicional se utilizó la técnica de RAPD para determinar que los aislados del paciente 11 provinieran de un mismo episodio de infección y obtuvimos un mismo patrón de bandas en los 5 aislados de este paciente, con base en el dendrograma realizado (Figura 2), observamos que estos aislados se agruparon en la misma rama y forma el genotipo número V, previamente Herrera–Basurto (tesis de maestría, 2020) realizó el mismo análisis pero con los aislados de los pacientes 1- 10 y reportó al genotipo IV como el más divergente (agrupa a los aislados del paciente 3) , sin embargo anexando los datos del paciente 11, ahora el genotipo número V al que pertenecen estos aislados se observa como el más divergente.

En cuanto al análisis fenotípico, determinamos que la mayoría de los aislados clínicos pueden crecer en un amplio rango de temperaturas incluso en la temperatura más alta probada (45°C) (Figura 3). Resultados similares fueron reportados por Carreté et al (2019) donde analizaron el crecimiento de un trío de aislados clínicos secuenciales de *C. glabrata* a una temperatura de 41°C, estos 3 aislados muestran un crecimiento rápido y similar entre ellos, a diferencia de la cepa control CBS138 que mostró un crecimiento lento y un fenotipo menos tolerante a esta temperatura. Además, en nuestro estudio detectamos que los aislados de los pacientes 9 y 11 son termosensibles a 45°C, mientras que en los aislados del paciente 7 observamos que el aislado #3 crece más lento a 25°C respecto a los demás aislados de este paciente y es totalmente sensible a 45°C. Estos resultados muestran que los aislados clínicos tienen una gran capacidad de adaptarse y desarrollarse en altas temperaturas, incluyendo temperaturas cercanas a los 37°C (temperatura corporal humana). Se ha estudiado en la levadura *S. cerevisiae* que la respuesta al estrés por calor se encuentra regulada por las vías de señalización de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) (Rodríguez- Peña et al. 2010)

y que en respuesta a temperaturas elevadas se activan las vías de integridad de la pared celular (CWI por sus siglas en inglés) y de alta osmolaridad por glicerol (HOG por sus siglas en inglés) (Mensonides et al. 2005; Winkler et al. 2002). Aunado a esto Huang et al (2019) realizó un estudio donde sometió a *C. glabrata* a un desafío hipertérmico periódico, se centró en la relación genotipo-fenotipo de clones adaptativos aislados a partir de 2 poblaciones de *C. glabrata* cepa CBS138, algunas de estas mutantes son capaces de crecer después de un choque térmico de hasta 50°C, demostrando que las mutaciones en el gen *CgSTE11* son la causa de la mayor tolerancia térmica observada y a otros factores estresantes ambientales, por lo que este gen juega un papel importante en múltiples cascadas de transducción de señales MAPK para mejorar la resistencia celular y en consecuencia una mejor adaptación a altas temperaturas.

C. glabrata ha desarrollado una variedad de estrategias para adaptarse a las condiciones dentro del hospedero, una de estas estrategias es la resistencia al estrés causado por las especies reactivas de oxígeno. La respuesta a estrés oxidante incluye a una sola catalasa Cta1 y a los factores de transcripción Yap1, Skn7, Msn2 y Msn4, además de la capacidad de sobrevivir dentro de las células fagocíticas (Cuellar- Cruz et al. 2008).

En este estudio investigamos la capacidad de resistencia al estrés oxidante de 40 aislados clínicos secuenciales de *C. glabrata* provenientes de 11 pacientes, mediante la exposición crónica a 3 agentes oxidantes: menadiona, tBuOOH y H₂O₂. Encontramos que los 40 aislados clínicos (Paciente1-11) resistieron hasta la concentración de 90 µM de menadiona y fueron sensibles a 120µM al igual que la cepa BG14 (Figura 4a). La menadiona es una quinona citotóxica que genera superóxido, la eliminación enzimática de los iones superóxido generados se lleva a cabo mediante enzimas superóxido dismutasas, Briones – Martin del Campo et al (2015) describió el rol de SODs en la virulencia y el metabolismo de *C. glabrata*, ellos reportaron la presencia de dos superóxido dismutasas, Sod1 que es citoplasmática y Sod2 que es una proteína mitocondrial, además las SODs son importantes en la colonización de un modelo murino y juegan un papel importante en la respuesta a estrés oxidativo y confieren protección contra el daño oxidativo. Por su parte Cuellar- Cruz et al (2009) investigaron la resistencia de *C. glabrata*, *C.*

albicans y *S. cerevisiae* a diferentes concentraciones de menadiona, en este estudio reportan que la especie *C. albicans* es más resistente al estrés causado por este agente oxidante ya que es capaz de crecer hasta una concentración 120 μ M de menadiona, mientras que *C. glabrata* y *S. cerevisiae* muestran sensibilidad a esta concentración al igual que nuestros aislados clínicos. La sensibilidad que muestra *C. glabrata* puede estar relacionada una baja capacidad de eliminar a los iones superóxido, ya que cuentan con solo 2 superóxido dismutasas, *SOD1* y *SOD2*, mientras que *C. albicans* posee 6, *SOD1-SOD6* (Martchenko et al. 2004, Gleason et al. 2014, Briones- Martin del Campo et al. 2014, Roetzer et al. 2011). Por otro lado Gutiérrez- Escobedo et al (2013) propuso que el glutatión (GSH) es importante para la respuesta a estrés oxidante generado por menadiona.

En cuanto a lo obtenido a la exposición aguda al tBuOOH, todas las cepas fueron resistentes hasta la concentración más alta que probamos de este agente oxidante, de manera similar a las cepas control (Figura 4b). El tBuOOH, es un peróxido orgánico cuya toxicidad se atribuye a la generación de radicales butoxilo que provocan alteraciones en la membrana plasmática y en procesos celulares. Se ha reportado que la cepa BG14 es capaz de crecer hasta una concentración de 5mM de tBuOOH (Gutiérrez- Escobedo et al. 2013). La vía de desintoxicación de este oxidante continua investigándose, ya que a diferencia de la especie *S. cerevisiae*, *C. glabrata* posee un mecanismo alternativo a GSH para la desintoxicación causada por este agente oxidante. Con base en estos reportes previos podemos inferir que en nuestros aislados clínicos se están llevando a cabo procesos muy parecidos para la desintoxicación por especies reactivas de oxígeno que en la cepa BG14, ya que no encontramos diferencias entre los aislados clínicos y esta cepa control.

Por último, nos enfocamos en investigar la sensibilidad al estrés causado por H₂O₂ en los aislados clínicos secuenciales de *C. glabrata*. En general detectamos que los aislados clínicos muestran una amplia capacidad para soportar el estrés causado por este agente oxidante (Figura 4c), esto coincide con reportes previos, donde se analizaron 3 aislados clínicos y se detectó que el tercer aislado fue capaz de crecer más rápido respecto a los dos anteriores en una concentración de 10mM de H₂O₂ (Carreté et al. 2013). De forma importante, detectamos variaciones entre los aislados del mismo paciente y entre pacientes. Los aislados de paciente 7 muestran

variación entre ellos, ya que el aislado #3 es más sensible a la exposición a H_2O_2 tanto en fase estacionaria como logarítmica y crece más lento respecto a los demás aislados de este paciente (figura 5a), mientras que los aislados del paciente 9 muestran una mayor resistencia al estrés causado por H_2O_2 tanto en fase estacionaria como logarítmica (figura 5b). *C. glabrata* muestra una gran resistencia natural al estrés causado por H_2O_2 , esto está regulado principalmente por la única Cta1, cuya función es catalizar la conversión de H_2O_2 en H_2O y una molécula de oxígeno, además de jugar un papel importante en la desintoxicación intracelular por H_2O_2 tanto en fase estacionaria como logarítmica (Cuellar- Cruz et al. 2008).

El análisis de la actividad de la Cta1 realizado con los aislados de los pacientes 7 y 9 (Figura 6), no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los aislados del paciente 7 respecto a nuestra cepa control BG14, es decir la actividad de la catalasa es parecida a la cepa control, lo que se podría relacionar con la sensibilidad al H_2O_2 , en cuanto a los aislados del paciente 9, se registraron diferencias estadísticamente significativas entre los aislados 1-3 respecto a la cepa control BG14 y a los aislados del paciente 7, lo que indica una mayor actividad de esta enzima en la desintoxicación por H_2O_2 en estos aislados y se puede relacionar con su resistencia al estrés causado por este agente oxidante, además confirmamos el papel central que juega la Cta1 en la respuesta a estrés oxidante en la especie *C. glabrata* (Cuellar- Cruz et al. 2009).

La mayoría de los aislados analizados en este estudio provienen de hemocultivos, estos presentan resistencia al estrés causado por altas temperaturas y al estrés oxidante, lo que podría estar relacionado con una mayor tasa de supervivencia en los macrófagos humanos y una mayor persistencia dentro de su hospedero, cabe destacar que el aislado #3 del paciente 7 proviene de un urocultivo, y presenta características diferentes respecto a los demás aislados del paciente 7 y de los aislados clínicos en general, lo que sugiere que el sitio anatómico de aislamiento se relaciona con sus características fenotípicas y su capacidad de respuesta a diferentes tipos de estrés (Kasper et al. 2014; Carreté et al. 2019).

5. CONCLUSIONES

Identificamos que los aislados provenientes de cada paciente tienen un origen clonal, es decir provienen de un aislado inicial y de un mismo episodio de infección, esto se demostró mediante la genotipificación con 6 marcadores moleculares: OPA-18, OPE-18, OPA-09, *RPM2*, *MT1* y *ERG3*.

Mediante la genotipificación con los marcadores de microsatélites polimórficos, *RPM2*, *MT1* y *ERG3*, clasificamos a los 40 aislados clínicos en 6 genotipos.

Los aislados del paciente 11 se clasificaron en el genotipo V en el dendograma generado mediante la prueba de RAPD, por lo tanto estos aislados provienen de un mismo episodio de infección.

Existe variación fenotípica y genotípica entre aislados de diferentes pacientes y entre aislados provenientes del mismo paciente.

Los aislados clínicos tienen la capacidad de crecer en un amplio rango de temperaturas, desde 25°C a 45°C.

Los aislados provenientes del paciente 9 muestran un fenotipo altamente resistente al estrés oxidante causado por H₂O₂, lo que se relaciona con una mayor actividad de la enzima catalasa 1 (Cta1).

6. REFERENCIAS

- Abbes, S., Sellami, H., Sellami, A., Hadrich, I., Amouri, I., Mahfoudh, N., Neji, S., Makni, F., Makni, H., Ayadi, A., 2012. *Candida glabrata* strain relatedness by new microsatellite markers. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31, 83–91. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1280-4>
- Ahmad, K.M., Kokošar, J., Guo, X., Gu, Z., Ishchuk, O.P., Piškur, J., 2014. Genome structure and dynamics of the yeast pathogen *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res.* 14, 529–535. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12145>
- Ausubel, F. M., 2009. *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley.
- Briones-Martin-Del-Campo, M., Orta-Zavalza, E., Cañas-Villamar, I., Gutiérrez-Escobedo, G., Juárez-Cepeda, J., Robledo-Márquez, K., Arroyo-Helguera, O., Castaño, I., De Las Peñas, A., 2015. The superoxide dismutases of *Candida glabrata* protect against oxidative damage and are required for lysine biosynthesis, DNA integrity and chronological life survival. *Microbiol. (United Kingdom)* 161, 300–310. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000006>
- Carreté, L., Ksiezopolska, E., Gómez-Molero, E., Angoulvant, A., Bader, O., Fairhead, C., Gabaldón, T., 2019. Genome comparisons of *Candida glabrata* serial clinical isolates reveal patterns of genetic variation in infecting clonal populations. *Front. Microbiol.* 10, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00112>
- Cuéllar-Cruz, M., Briones-Martin-del-Campo, M., Cañas-Villamar, I., Montalvo-Arredondo, J., Riego-Ruiz, L., Castaño, I., De Las Peñas, A., 2008. High resistance to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida glabrata* is mediated by a single catalase, Cta1p, and is controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p. *Eukaryot. Cell* 7, 814–825. <https://doi.org/10.1128/EC.00011-08>

- Cuéllar-Cruz, M., Castaño, I., Arroyo-Helguera, O., de las Peñas, A., 2009. Oxidative stress response to menadione and cumene hydroperoxide in the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 649–654. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000400020>
- Duxbury, S.J.N., Bates, S., Beardmore, R.E., Gudelj, I., 2020. Evolution of drug-resistant and virulent small colonies in phenotypically diverse populations of the human fungal pathogen *Candida glabrata*: Drug-resistance and virulence. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 287. <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.0761>
- Gabaldón, T., Carreté, L., 2016. The birth of a deadly yeast: Tracing the evolutionary emergence of virulence traits in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res.* 16, 1–9. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov110>
- Gabaldón, T., Martin, T., Marcet-Houben, M., Durrens, P., Bolotin-Fukuhara, M., Lespinet, O., Arnaise, S., Boissard, S., Aguilera, G., Atanasova, R., Bouchier, C., Couloux, A., Creno, S., Almeida Cruz, J., Devillers, H., Enache-Angoulvant, A., Guitard, J., Jaouen, L., Ma, L., Marck, C., Neuvéglise, C., Pelletier, E., Pinard, A., Poulain, J., Recoquillay, J., Westhof, E., Wincker, P., Dujon, B., Hennequin, C., Fairhead, C., 2013. Comparative genomics of emerging pathogens in the *Candida glabrata* clade. *BMC Genomics* 14. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-623>
- Guinea, J., 2014. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 5–10. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12539>
- Gutiérrez-Escobedo, G., Hernández-Carreón, O., Morales-Rojano, B., Revuelta-Rodríguez, B., Vázquez-Franco, N., Castaño, I., De Las Peñas, A., 2020. *Candida glabrata* peroxiredoxins, Tsa1 and Tsa2, and sulfiredoxin, Srx1, protect against oxidative damage and are necessary for virulence. *Fungal Genet. Biol.* 135, 103287. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.103287>

- Gutiérrez-Escobedo, G., Orta-Zavalza, E., Castaño, I., De Las Peñas, A., 2013. Role of glutathione in the oxidative stress response in the fungal pathogen *Candida glabrata*. *Curr. Genet.* 59, 91–106. <https://doi.org/10.1007/s00294-013-0390-1>
- Huang, M., Khan, J., Kaur, M., Vanega, J.D.T., Patiño, O.A.A., Ramasubramanian, A.K., Kao, K.C., 2019. CgSTE11 mediates cross tolerance to multiple environmental stressors in *Candida glabrata*. *Sci. Rep.* 9, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53593-5>
- Kiasat, N., Rezaei-Matehkolaei, A., Mahmoudabadi, A.Z., 2019. Microsatellite Typing and Antifungal Susceptibility of *Candida glabrata* Strains Isolated from Patients with *Candida* Vaginitis. *Front. Microbiol.* 10, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01678>
- López-Fuentes, E., Gutiérrez-Escobedo, G., Timmermans, B., Dijck, P. Van, Peñas, A.D. Las, Castaño, I., 2018. *Candida glabrata*'s genome plasticity confers a unique pattern of expressed cell wall proteins. *J. Fungi* 4. <https://doi.org/10.3390/jof4020067>
- Mensonides, F.I.C., Brul, S., Klis, F.M., Hellingwerf, K.J., De Mattos, M.J.T., 2005. Activation of the protein kinase C1 pathway upon continuous heat stress in *Saccharomyces cerevisiae* is triggered by an intracellular increase in osmolarity due to trehalose accumulation. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4531–4538. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4531-4538.2005>
- Nash, A.K., Auchtung, T.A., Wong, M.C., Smith, D.P., Gesell, J.R., Ross, M.C., Stewart, C.J., Metcalf, G.A., Muzny, D.M., Gibbs, R.A., Ajami, N.J., Petrosino, J.F., 2017. The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. *Microbiome* 5, 153. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0373-4>
- Pappas, P.G., Lionakis, M.S., Arendrup, M.C., Ostrosky-Zeichner, L., Kullberg, B.J., 2018. Invasive candidiasis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 4, 1–20. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.26>

- Pfaller, M.A., Andes, D.R., Diekema, D.J., Horn, D.L., Reboli, A.C., Rotstein, C., Franks, B., Azie, N.E., 2014. Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-albicans species of *Candida* in 2,496 patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004-2008. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101510>
- Poláková, S., Blume, C., Zárate, J.Á., Mentel, M., Jørck-Ramberg, D., Stenderup, J., Piškur, J., 2009. Formation of new chromosomes as a virulence mechanism in yeast *Candida glabrata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 2688–2693. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809793106>
- Roetzer, A., Klopff, E., Gratz, N., Marcet-Houben, M., Hiller, E., Rupp, S., Gabaldón, T., Kovarik, P., Schüller, C., 2011. Regulation of *Candida glabrata* oxidative stress resistance is adapted to host environment. *FEBS Lett.* 585, 319–327. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.12.006>
- Salazar, S.B., Wang, C., Münsterkötter, M., Okamoto, M., Takahashi-Nakaguchi, A., Chibana, H., Lopes, M.M., Güldener, U., Butler, G., Mira, N.P., 2018. Comparative genomic and transcriptomic analyses unveil novel features of azole resistance and adaptation to the human host in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res.* 18, 1–11. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox079>
- Thakur, J.K., Arthanari, H., Yang, F., Pan, S.J., Fan, X., Breger, J., Frueh, D.P., Gulshan, K., Li, D.K., Mylonakis, E., Struhl, K., Moye-Rowley, W.S., Cormack, B.P., Wagner, G., Näär, A.M., 2008. A nuclear receptor-like pathway regulating multidrug resistance in fungi. *Nature* 452, 604–609. <https://doi.org/10.1038/nature06836>
- Vale-Silva, L., Beaudoin, E., Tran, V.D.T., Sanglard, D., 2017. Comparative genomics of two sequential *Candida glabrata* clinical isolates. *G3 Genes, Genomes, Genet.* 7, 2413–2426. <https://doi.org/10.1534/g3.117.042887>

- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S. V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18, 6531–6535. <https://doi.org/10.1093/nar/18.22.6531>
- Winkler, A., Arkind, C., Mattison, C.P., Burkholder, A., Knoche, K., Ota, I., 2002. Heat stress activates the yeast high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway, and protein tyrosine phosphatases are essential under heat stress. *Eukaryot. Cell* 1, 163–173. <https://doi.org/10.1128/EC.1.2.163-173.2002>
- Xu, Z., Green, B., Benoit, N., Schatz, M., Wheelan, S., Cormack, B., 2020. De novo genome assembly of *Candida glabrata* reveals cell wall protein complement and structure of dispersed tandem repeat arrays. *Mol. Microbiol.* 113, 1209–1224. <https://doi.org/10.1111/mmi.14488>
- Xu, Z., Green, B., Benoit, N., Sobel, J.D., Schatz, M.C., Wheelan, S., Cormack, B.P., 2021. Cell wall protein variation, break-induced replication, and subtelomere dynamics in *Candida glabrata*. *Mol. Microbiol.* 1–17. <https://doi.org/10.1111/mmi.14707>

7. TABLAS

Tabla 1: Cepas control y aislados clínicos secuenciales de *C. glabrata*

Cepa	Parental	Genotipo	Fenotipo
BG14	BG2	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418R	Resistente a 45°C Resistente a estrés oxidante No adherente
CBS138	Cepa secuenciada ATCC2001		Sensible a 45°C y a estrés oxidante Hiperadherente
CGM709	BG14	<i>hdf1Δ</i>	Resistente a 45°C
CGM392	CGM295	<i>cta1Δ</i>	Sensible a estrés oxidante
CGM3085	BG14	<i>trr1 trr2Δ</i>	Sensible a estrés oxidante

Paciente	Sexo	Código	No. Colección	Fecha	Origen
P1	M	P1-1	MC45	07-feb-05	NE
		P1-2	MC47	15-feb-05	NE
P2	F	P2-1	MC64	22-abr-08	UROCULTIVO
		P2-2	MC65	23-abr-08	UROCULTIVO
P3	F	P3-1	MC70	26-abr-08	UROCULTIVO
		P3-2	MC67	27-abr-08	UROCULTIVO
		P3-3	MC74	30-abr-08	UROCULTIVO
P4	F	P4-1	AN765	04-jun-12	CULTIVO DE SANGRE
		P4-2	AN766	04-jun-12	CULTIVO DE SANGRE
		P4-3	AN767	23-jun-12	CULTIVO DE SANGRE
P5		P5-1	AN230	16-nov-13	NE
		P5-2	AN234	22-nov-13	NE
		P5-3	AN236	01-dic-13	NE

P6	NE	P6-1	AN264	17-mar-14	NE
		P6-2	AN359	17-mar-14	NE
		P6-3	AN360	17-mar-14	NE
		P6-4	AN362	17-mar-14	NE
		P6-5	AN363	17-mar-14	NE
		P6-6	AN364	17-mar-14	NE
		P6-7	AN365	22-mar-14	NE
		P6-8	AN366	22-mar-14	NE
P7		P7-1	AN374	08-abr-15	CULTIVO DE SANGRE
		P7-2	AN375	08-abr-15	CULTIVO DE SANGRE
		P7-3	AN376	10-abr-15	UROCULTIVO
		P7-4	AN377	10-abr-15	CULTIVO DE SANGRE
		P7-5	AN378	10-abr-15	CULTIVO DE SANGRE
P8	F	P8-1	AN509	17-feb-16	CULTIVO DE SANGRE
		P8-2	AN483	20-feb-16	CULTIVO DE SANGRE
		P8-3	AN504	26-feb-16	CULTIVO DE SANGRE
P9	M	P9-1	AN511	01-jun-16	CULTIVO DE SANGRE
		P9-2	AN512	03-jun-16	CULTIVO DE SANGRE
		P9-3	AN542	03-jun-16	CULTIVO DE SANGRE
		P9-4	AN551	01-jun-16	CULTIVO DE SANGRE
P10	F	P10-1	AN755	04-may-18	CULTIVO DE SANGRE
		P10-2	AN759	07-may-18	CULTIVO DE SANGRE
P11	NE	P11-1	AN768	3-sep-20	CULTIVO DE SANGRE
		P11-2	AN769	3-sep-20	CULTIVO DE SANGRE

P11-3	AN770	5-sep-20	CULTIVO DE SANGRE
P11-4	AN771	5-sep-20	CULTIVO DE SANGRE
P11-5	AN772	7-sep-20	CULTIVO DE SANGRE

*NE: No Especificado

Tabla 2: Marcadores moleculares para genotipificación

Marcador	Secuencia	Localización del marcador
<i>RPM2</i>	Fw ATCTCCCAACTTCTCGTAGCC Rv ACTTGAACGACTTGAACGCC	Cromosoma I
<i>MT1</i>	Fw CAGCAATAATAGCTTCTGACTATGAC Rv GACAGGAGCAACCGTTAGGA	Cromosoma D
<i>ERG3</i>	Fw AGTGCGAGTGTATGTAAAGAATG Rv CGTATACCTTATCTCCGTTCAA	Cromosoma F
OPA-09	5'-GGG TAA CGC C-3'	Aleatorio en el genoma
OPA-18	5'-AGC TGA CCG T-3'	Aleatorio en el genoma
OPE-18	5'-GGA CTG CAG A3'	Aleatorio en el genoma

Tabla 3: Condiciones de PCR para genotipificación con marcadores *RPM2*, *MT1* y *ERG3*

	Marcadores moleculares		
	<i>RPM2</i>	<i>MT1</i>	<i>ERG3</i>
Temperatura de desnaturalización	93°C	93°C	93°C
Temperatura de alineamiento	56°C	56°C	54°C
Temperatura de extensión	72°C	72°C	72°C
Número de ciclos	30	30	30
Tamaño de producto esperado (pb)	116-140	227-241	184-353

pb: pares de bases

8. PIES DE FIGURA

Figura 1. Dendograma Generado con los marcadores moleculares *RPM2*, *MT1* y *ERG3*

Tipificación genotípica de los aislados clínicos provenientes de 11 pacientes, utilizando los marcadores moleculares para microsatélites polimórficos *RPM2*, *MT1* y *ERG3*, se obtuvo el tamaño en pares de bases de la amplificación de los productos de PCR utilizando el programa ImageJ. Los aislados se agruparon en 6 genotipos.

Figura 2. Dendograma Generado con los marcadores moleculares RPDs

Tipificación genotípica utilizando los marcadores moleculares OPA18, OPA09 y OPE18, los 5 aislados del paciente 11 muestran el mismo patrón de bandas obtenidas a partir de la prueba de RAPDs, los aislados clínicos secuenciales de *C. glabrata* se agrupan en 5 genotipos diferentes y todos los aislados del paciente 11 se agruparon en el mismo genotipo V.

Figura 3. Los aislados clínicos de *C. glabrata* son capaces de crecer en un amplio rango de temperaturas

Ensayos de resistencia a estrés térmico: Ensayos de crecimiento en medio sólido YPD a diferentes temperaturas. Las cepas utilizadas como controles son: BG14: cepa de referencia en nuestro laboratorio; cepa secuenciada CBS138; cepa *hdf1Δ*: cepa control de termosensibilidad a 45°C. Cada cepa y los aislados clínicos provenientes de los pacientes 7 y 9 se crecieron a 30°C por 48 hrs y gotas de 7 µL se inocularon en cajas de YPD y se incubaron a las temperaturas indicadas. Se tomaron fotografías a las 48 hrs de incubación.

Figura 4. Los aislados clínicos secuenciales de *C. glabrata* tienen una respuesta variable al estrés oxidante causado por diferentes agentes oxidantes

Ensayos de resistencia a exposición crónica a tres agentes oxidantes: a) Resistencia a tBuOOH: Los aislados clínicos de *C. glabrata* de los pacientes 7 y 9

son resistentes a 1.5 mM y 2 mM de tBuOOH. Todos los aislados clínicos y las cepas control (BG14, CBS138 y una cepa sensible (*trr1Δtrr2Δ*), se crecieron hasta fase estacionaria y gotas de 7 μL se inocularon en cajas de YPD con las concentraciones indicadas de tBuOOH, se incubaron a 30°C por 48 hrs y se fotografiaron. b) Resistencia a menadiona: los aislados clínicos indicados y las cepas control se cultivaron como en a) y se inocularon en las concentraciones indicadas. c) Resistencia a H₂O₂: los aislados clínicos indicados y las cepas control (como control sensible utilizamos la cepa la mutante nula en *cta1Δ*) se cultivaron como en a) y se inocularon en las concentraciones indicadas.

Figura 5. Los aislados clínicos del paciente 9 son resistentes a la exposición aguda a peróxido de hidrógeno

Ensayos de sensibilidad a exposición aguda a H₂O₂ en fases estacionaria y logarítmica. **a)** Los aislados del paciente 7 y la cepa control se cultivaron por 18 duplicaciones (fase logarítmica) o durante 48 hrs (fase estacionaria) y una cantidad fija de células de cada cultivo se expusieron a las concentraciones indicadas de H₂O₂ por 3 hrs. Las células se lavaron, diluyeron y 7 μL de cada dilución se gotearon en cajas de YPD, se incubaron 48 hrs a 30°C y se fotografiaron. **b):** Los aislados del paciente 9 se cultivaron y trataron como en a) a las concentraciones indicadas de H₂O₂.

Figura 6. La actividad enzimática de la catalasa en los aislados de los pacientes 7 y 9

Aislados de los pacientes 7 y 9, cepa BG14 control de la laboratorio y control negativo la cepa CGM392 (*cta1Δ*). Las cepas control y los aislados se cultivaron por 18 duplicaciones (fase logarítmica) en medio YPD. La actividad de la catalasa fue normalizada al lisado de proteínas totales y se expresa en unidades por mg de proteína. Una unidad es definida como la cantidad de catalasa requerida para la degradación de 0.1 μmol de H₂O₂ por minuto. Los datos se presentan como la media ± S.D. de 3 ensayos independientes (**** p< 0.0001; *** p< 0.001)

9. FIGURAS

Figura 1. Dendograma Generado con los marcadores moleculares *RPM2*, *MT1* y *ERG3*

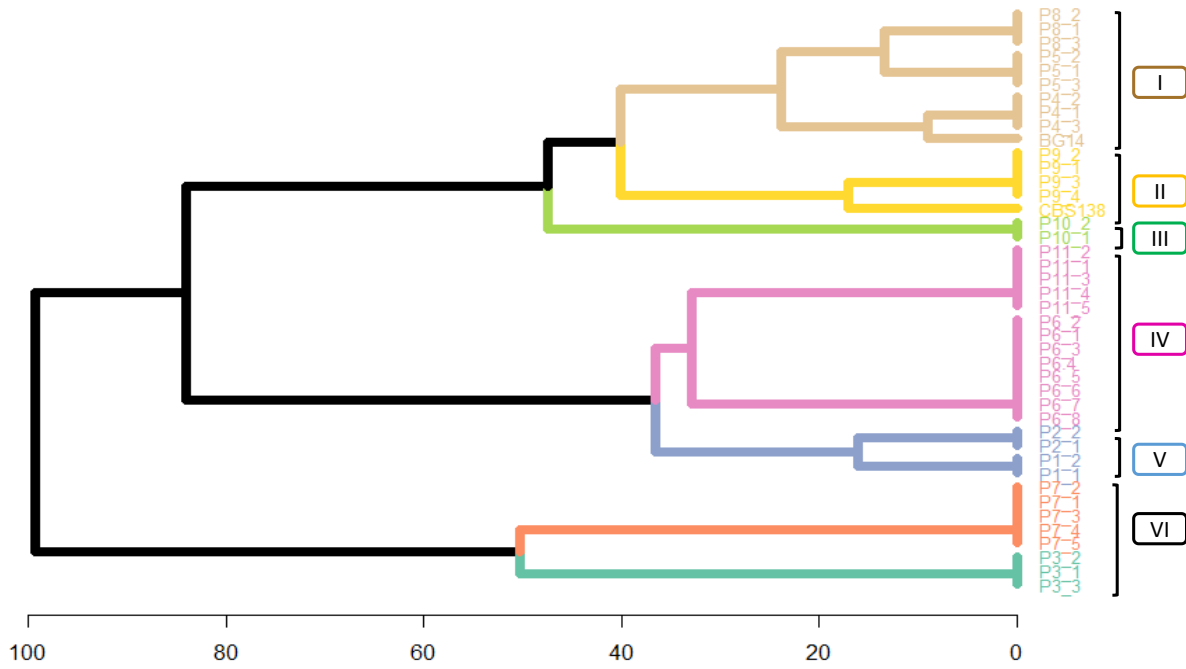


Figura 2. Dendograma Generado con los marcadores moleculares RAPDs

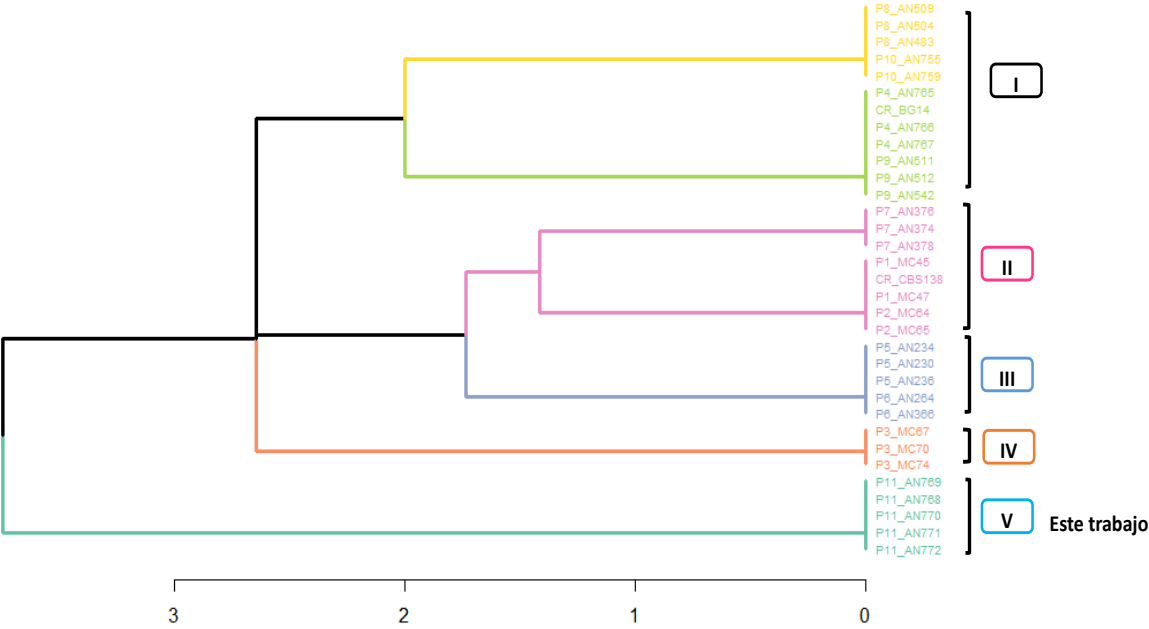


Figura 3. Los aislados clínicos de *C. glabrata* son capaces de crecer en un amplio rango de temperaturas

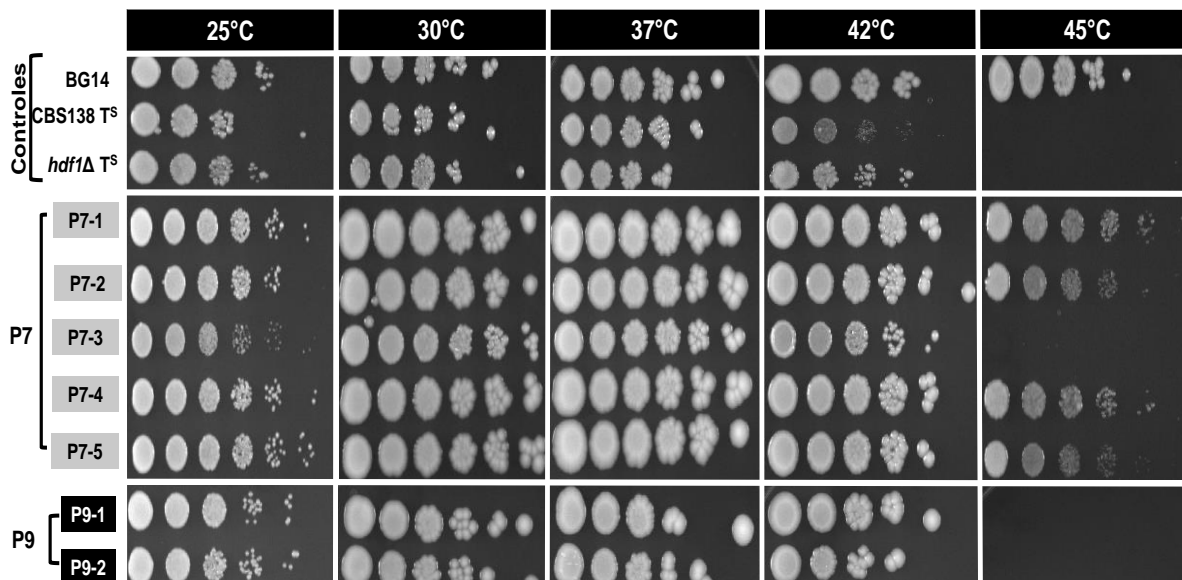
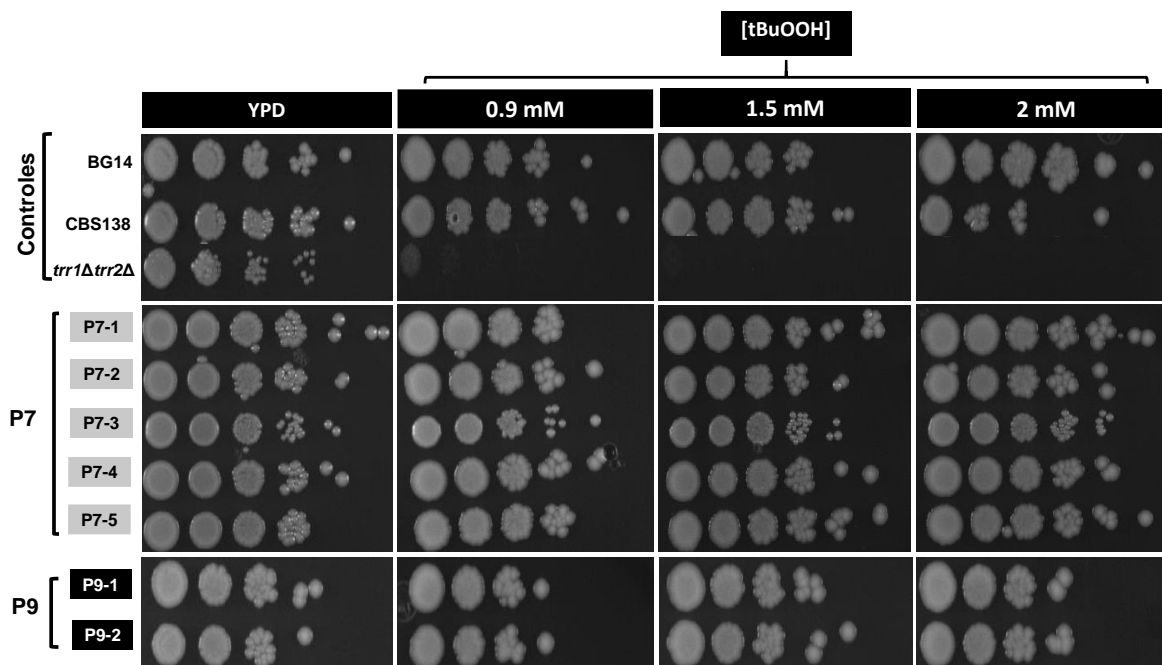
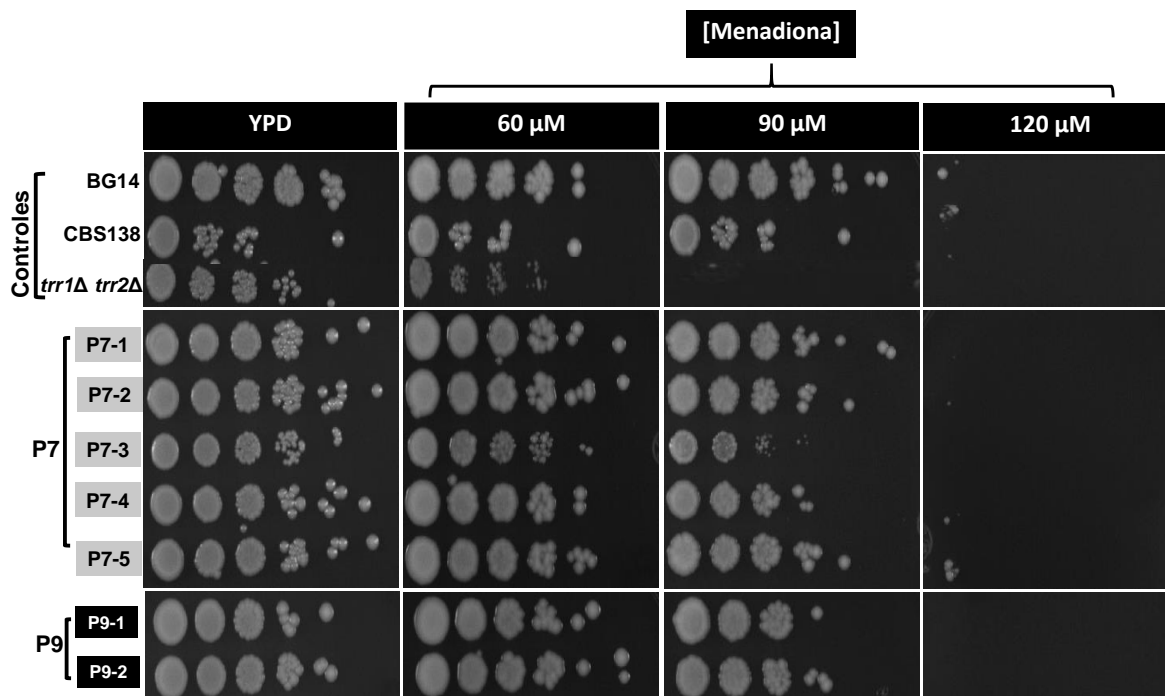


Figura 4. Los aislados clínicos secuenciales de *C. glabrata* tienen una respuesta variable al estrés oxidante causado por diferentes agentes oxidantes

4 a. Exposición crónica a Hidroperóxido de ter-butilo



4b. Exposición crónica a menadiona



4c. Exposición crónica a H₂O₂

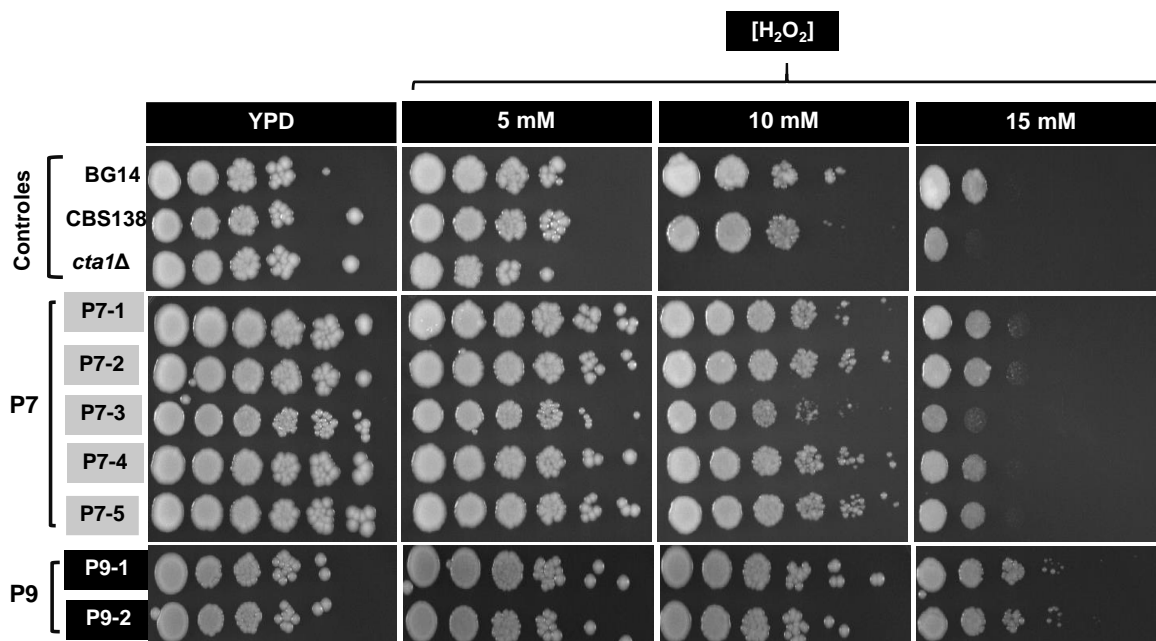


Figura 5. Los aislados clínicos del paciente 9 son resistentes a la exposición aguda a H₂O₂

Figura 5a. Exposición aguda a H₂O₂ aislados del paciente 7

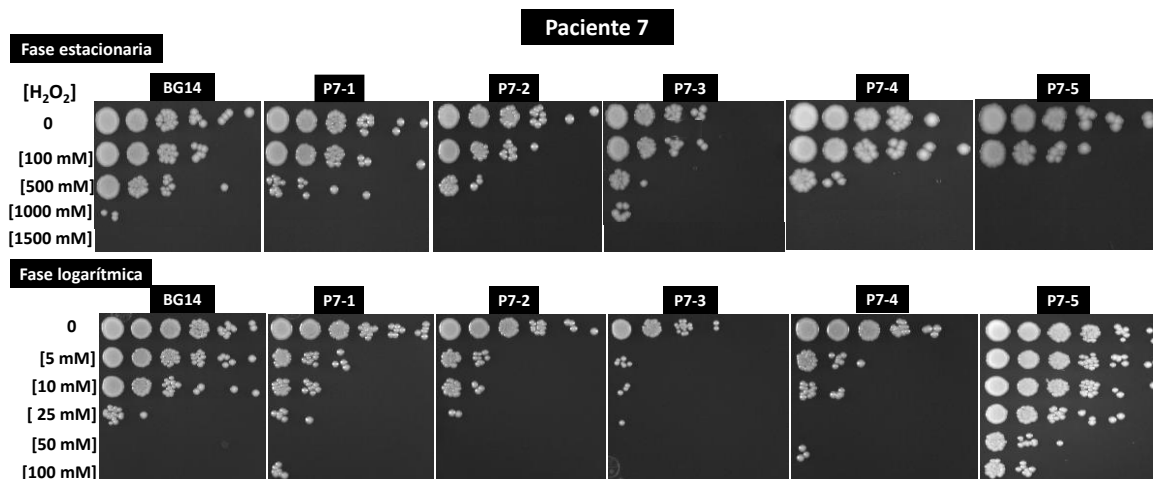


Figura 5b. Exposición aguda a H₂O₂ aislados del paciente 9

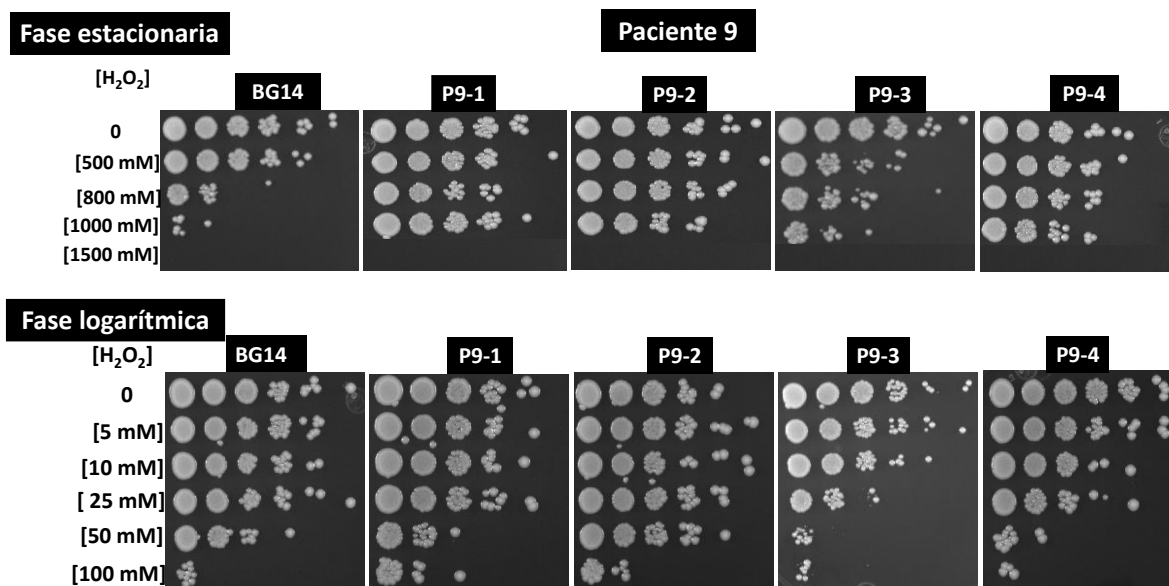
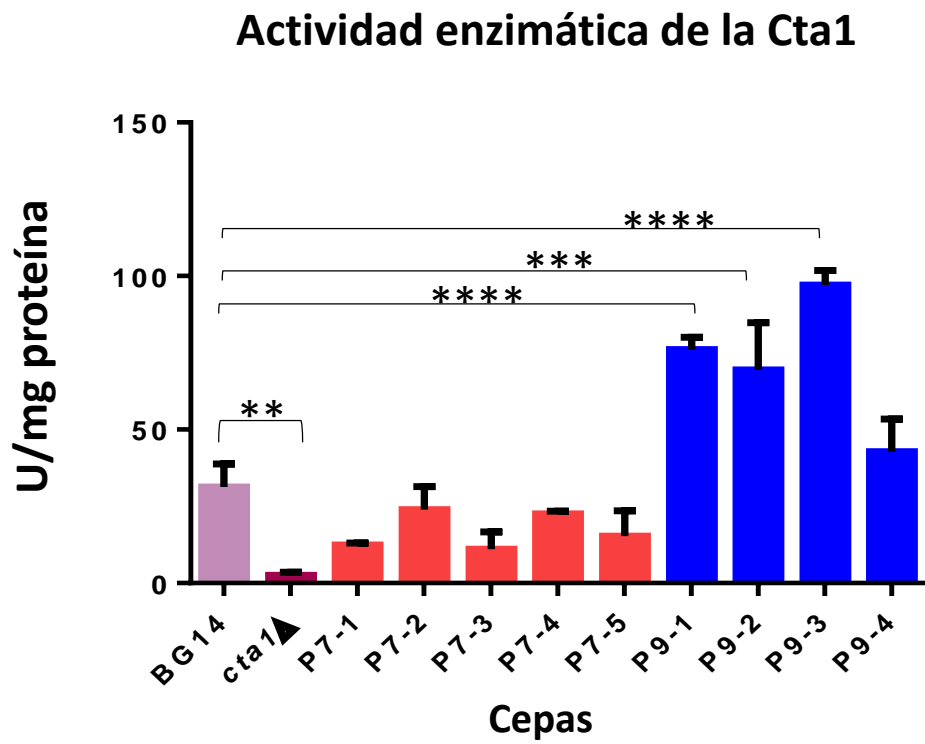


Figura 6. Actividad enzimática de la catalasa 1 en los aislados de los pacientes 7 y 9



10. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla suplementaria 1. Datos generados con los marcadores moleculares *RPM2*, *MT1* y *ERG3*, se calculó el promedio en pares de bases (pb) de cada producto de PCR obtenido

Paciente	RPM2	MT1	ERG3	Paciente	RPM2	MT1	ERG3	Paciente	RPM2	MT1	ERG3
CR_BG14	116	224	209	P6_1	137	249	220	P9_1	130	210	180
CR_CBS138	114	213	185	P6_2	137	249	220	P9_2	130	210	180
P1_1	112	271	235	P6_3	137	249	220	P9_3	130	210	180
P1_2	112	271	235	P6_4	137	249	220	P9_4	130	210	180
P2_1	113	255	233	P6_5	137	249	220	P10_1	156	231	198
P2_2	113	255	233	P6_6	137	249	220	P10_2	156	231	198
P3_1	109	217	236	P6_7	137	249	220	P11_1	128	279	210
P3_2	109	217	236	P6_8	137	249	220	P11_2	128	279	210
P3_3	109	217	236	P7_1	135	215	279	P11_3	128	279	210
P4_1	123	221	204	P7_2	135	215	279	P11_4	128	279	210
P4_2	123	221	204	P7_3	135	215	279	P11_5	128	279	210
P4_3	123	221	204	P7_4	135	215	279				
P5_1	122	235	207	P7_5	135	215	279				
P5_2	122	235	207	P8_1	116	243	198				
P5_3	122	235	207	P8_2	116	243	198				
				P8_3	116	243	198				

Tamaño de la amplificación de PCR en pares de bases (pb)

Tabla suplementaria 2. Matriz binaria generada con el patrón de bandas obtenido con los marcadores moleculares OPA-18, OPE19 Y OPA 09, mediante la prueba de RAPD

Perfil de bandeo	BG14	CBS138	Perfil de bandeo	P1_1	P1_2	P2_1	P2_2		
OPA-18_1400pb	1	1	OPA-18_1400pb	1	1	1	1		
OPA-18_1300pb	0	0	OPA-18_1300pb	0	0	0	0		
OPA-18_1200pb	0	1	OPA-18_1200pb	1	1	1	1		
OPA-18_1100pb	0	0	OPA-18_1100pb	0	0	0	0		
OPA-18_1000pb	1	1	OPA-18_1000pb	1	1	1	1		
OPA-18_900pb	0	1	OPA-18_900pb	1	1	1	1		
OPA-18_800pb	1	1	OPA-18_800pb	1	1	1	1		
OPA-18_625pb	0	0	OPA-18_625pb	0	0	0	0		
OPA-18_600pb	1	1	OPA-18_600pb	1	1	1	1		
OPA-18_500pb	0	0	OPA-18_500pb	0	0	0	0		
OPA-18_200pb	0	0	OPA-18_200pb	0	0	0	0		
OPE-18_1750pb	1	0	OPE-18_1750pb	0	0	0	0		
OPE-18_1100pb	0	0	OPE-18_1100pb	0	0	0	0		
OPE-18_1000pb	1	1	OPE-18_1000pb	1	1	1	1		
OPE-18_500pb	1	1	OPE-18_500pb	1	1	1	1		
OPA-09_2000pb	0	0	OPA-09_2000pb	0	0	0	0		
OPA-09_1500pb	0	1	OPA-09_1500pb	1	1	1	1		
OPA-09_1100pb	0	1	OPA-09_1100pb	1	1	1	1		
OPA-09_900pb	1	1	OPA-09_900pb	1	1	1	1		
OPA-09_800pb	1	1	OPA-09_800pb	1	1	1	1		
OPA-09_700pb	1	1	OPA-09_700pb	1	1	1	1		
OPA-09_500pb	1	1	OPA-09_500pb	1	1	1	1		
OPA-09_350pb	1	1	OPA-09_350pb	1	1	1	1		
OPA-09_200pb	1	1	OPA-09_200pb	1	1	1	1		
OPA-09_150pb	0	1	OPA-09_150pb	1	1	1	1		
Perfil de bandeo	P3_1	P3_2	P3_3	P4_1	P4_2	P4_3	P5_1	P5_2	P5_3
OPA-18_1400pb	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA-18_1300pb	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA-18_1200pb	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA-18_1100pb	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA-18_1000pb	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA-18_900pb	1	1	1	0	0	0	1	1	1
OPA-18_800pb	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA-18_625pb	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA-18_600pb	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA-18_500pb	1	1	1	0	0	0	0	0	0

OPA-18_200pb	1	1	1	0	0	0	0	0	0
OPE-18_1750pb	1	1	1	1	1	1	0	0	0
OPE-18_1100pb	1	1	1	0	0	0	1	1	1
OPE-18_1000pb	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPE-18_500pb	0	0	0	1	1	1	1	1	1
OPA-09_2000pb	0	0	0	0	0	0	1	1	1
OPA-09_1500pb	1	1	1	0	0	0	1	1	1
OPA-09_1100pb	1	1	1	0	0	0	1	1	1
OPA-09_900pb	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA-09_800pb	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA-09_700pb	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA-09_500pb	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA-09_350pb	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA-09_200pb	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA-09_150pb	0	0	0	0	0	0	1	1	1

Perfil de bandeo	P6_1	P6_2	P7_1	P7_2	P7_3	P8_1	P8_2	P8_3
OPA-18_1400pb	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA-18_1300pbB	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA-18_1200pb	0	0	1	1	1	0	0	0
OPA-18_1100pb	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA-18_1000pb	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA-18_900pb	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA-18_800pb	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA-18_625pb	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA-18_600pb	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA-18_500pb	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA-18_200pb	0	0	0	0	0	0	0	0
OPE-18_1750pb	0	0	0	0	0	0	0	0
OPE-18_1100pb	1	1	0	0	0	1	1	1
OPE-18_1000pb	1	1	1	1	1	1	1	1
OPE-18_500pb	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA-09_2000pb	1	1	1	1	1	0	0	0
OPA-09_1500pb	1	1	1	1	1	0	0	0
OPA-09_1100pb	1	1	1	1	1	0	0	0
OPA-09_900pb	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA-09_800pb	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA-09_700pb	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA-09_500pb	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA-09_350pb	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA-09_200pb	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA-09_150pb	1	1	0	0	0	1	1	1

Perfil de bandeo	P9_1	P9_2	P9_4	P10_1	P10_2
OPA-18_1400pb	1	1	1	1	1
OPA-18_1300pbB	0	0	0	0	0
OPA-18_1200pb	0	0	0	0	0
OPA-18_1100pb	0	0	0	0	0
OPA-18_1000pb	1	1	1	1	1
OPA-18_900pb	0	0	0	1	1
OPA-18_800pb	1	1	1	1	1
OPA-18_625pb	0	0	0	0	0
OPA-18_600pb	1	1	1	1	1
OPA-18_500pb	0	0	0	0	0
OPA-18_200pb	0	0	0	0	0
OPE-18_1750pb	1	1	1	0	0
OPE-18_1100pb	0	0	0	1	1
OPE-18_1000pb	1	1	1	1	1
OPE-18_500pb	1	1	1	1	1
OPA-09_2000pb	0	0	0	0	0
OPA-09_1500pb	0	0	0	0	0
OPA-09_1100pb	0	0	0	0	0
OPA-09_900pb	1	1	1	1	1
OPA-09_800pb	1	1	1	1	1
OPA-09_700pb	1	1	1	1	1
OPA-09_500pb	1	1	1	1	1
OPA-09_350pb	1	1	1	1	1
OPA-09_200pb	1	1	1	1	1
OPA-09_150pb	0	0	0	1	1

Perfil de bandeo	P11_1	P11_2	P11_3	P11_4	P11_5
OPA-18_1400pb	1	1	1	1	1
OPA-18_1300pbB	1	1	1	1	1
OPA-18_1200pb	0	0	0	0	0
OPA-18_1100pb	1	1	1	1	1
OPA-18_1000pb	0	0	0	0	0
OPA-18_900pb	0	0	0	0	0
OPA-18_800pb	1	1	1	1	1
OPA-18_625pb	1	1	1	1	1
OPA-18_600pb	0	0	0	0	0
OPA-18_500pb	0	0	0	0	0
OPA-18_200pb	0	0	0	0	0
OPE-18_1750pb	0	0	0	0	0
OPE-18_1100pb	0	0	0	0	0

OPE-18_1000pb	1	1	1	1	1
OPE-18_500pb	1	1	1	1	1
OPA-09_2000pb	1	1	1	1	1
OPA-09_1500pb	1	1	1	1	1
OPA-09_1100pb	1	1	1	1	1
OPA-09_900pb	1	1	1	1	1
OPA-09_800pb	1	1	1	1	1
OPA-09_700pb	1	1	1	1	1
OPA-09_500pb	1	1	1	1	1
OPA-09_350pb	0	0	0	0	0
OPA-09_200pb	0	0	0	0	0
OPA-09_150pb	0	0	0	0	0

0= ausencia de banda

1= presencia de banda

Tabla suplementaria 3. Actividad enzimática de la catalasa de los aislados de los pacientes 7 y 9

Cepa	MEDIA (U/ mg de proteína)	± DS
BG14	31.3	7.4
<i>cta1</i>Δ	2.5	1.04
P7-1	12.4	0.6
P7-2	23.9	7.4
P7-3	11	5.6
P7-4	22.53	0.9
P7-5	15.2	8.2
P9-1	76.04	4
P9-2	69.4	15.3
P9-3	97.1	4.7
P9-4	42.8	10.5

Media ± desviación estándar

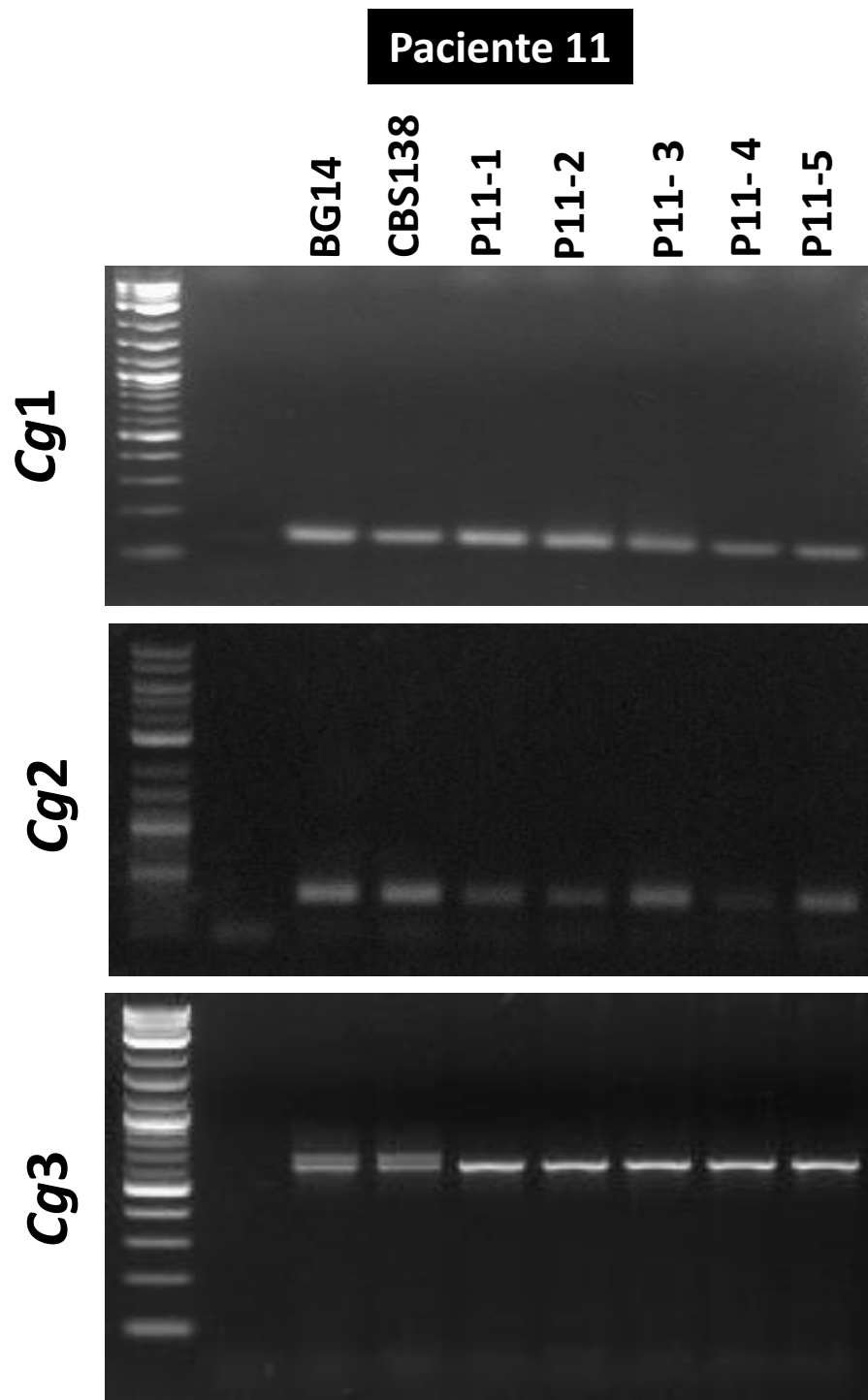
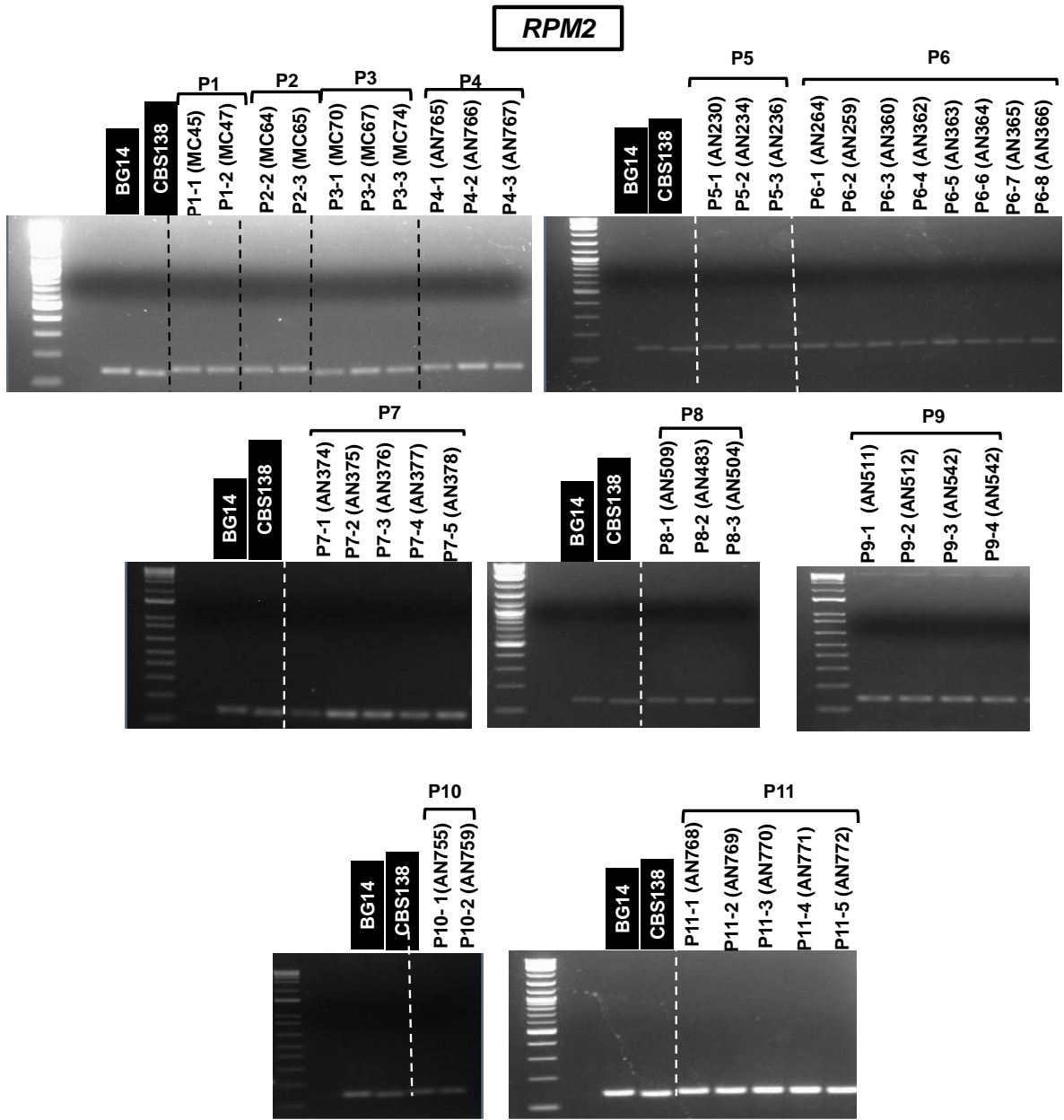
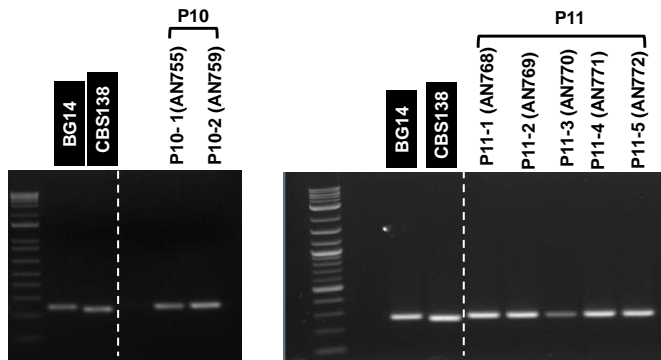
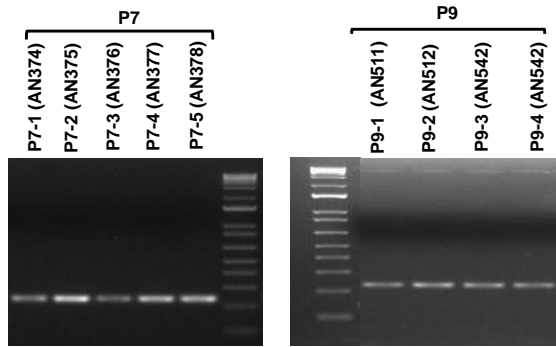
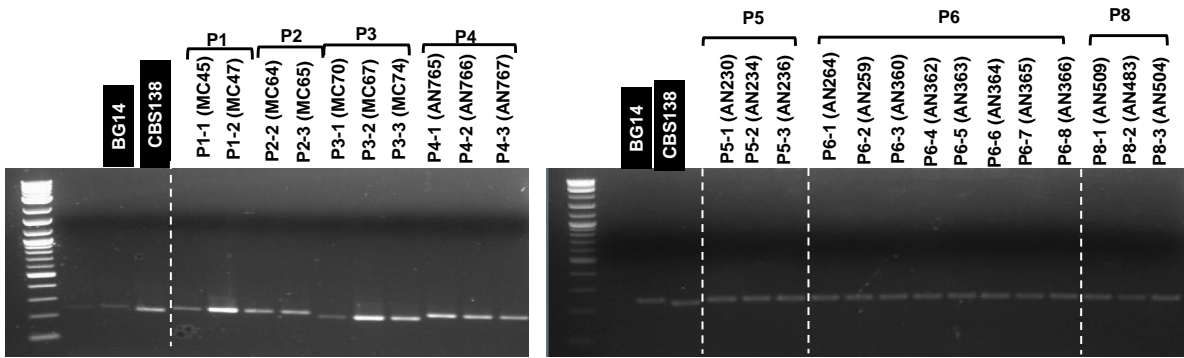


Figura suplementaria 1. Identificación de los aislados del paciente 11

Los aislados del paciente 11 se identificaron con 3 pares de oligos especie-específicos para *C. glabrata*: Cg1, Cg2 y Cg3.



MT1



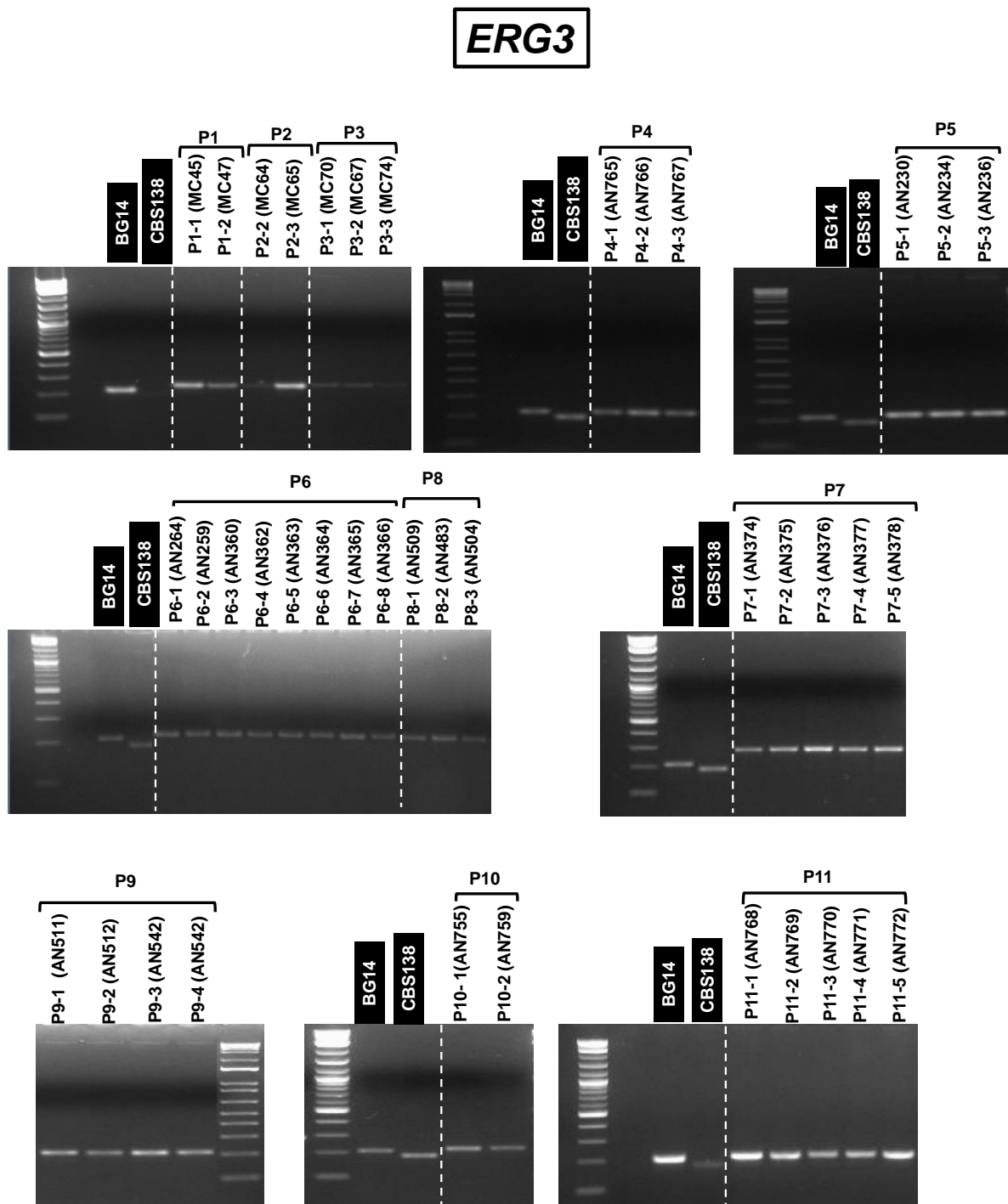


Figura suplementaria 2. Amplificación de marcadores moleculares *RPM2*, *MT1* y *ERG3* para la detección de polimorfismos en microsatélites

Se hizo una PCR punto final para cada par de oligonucleótidos por marcador, los productos de PCR se revelaron en geles de agarosa al 2%, se determinó el tamaño exacto (pb) de cada producto de PCR con el programa ImageJ para detectar diferencias en el tamaño de estos fragmentos de PCR.

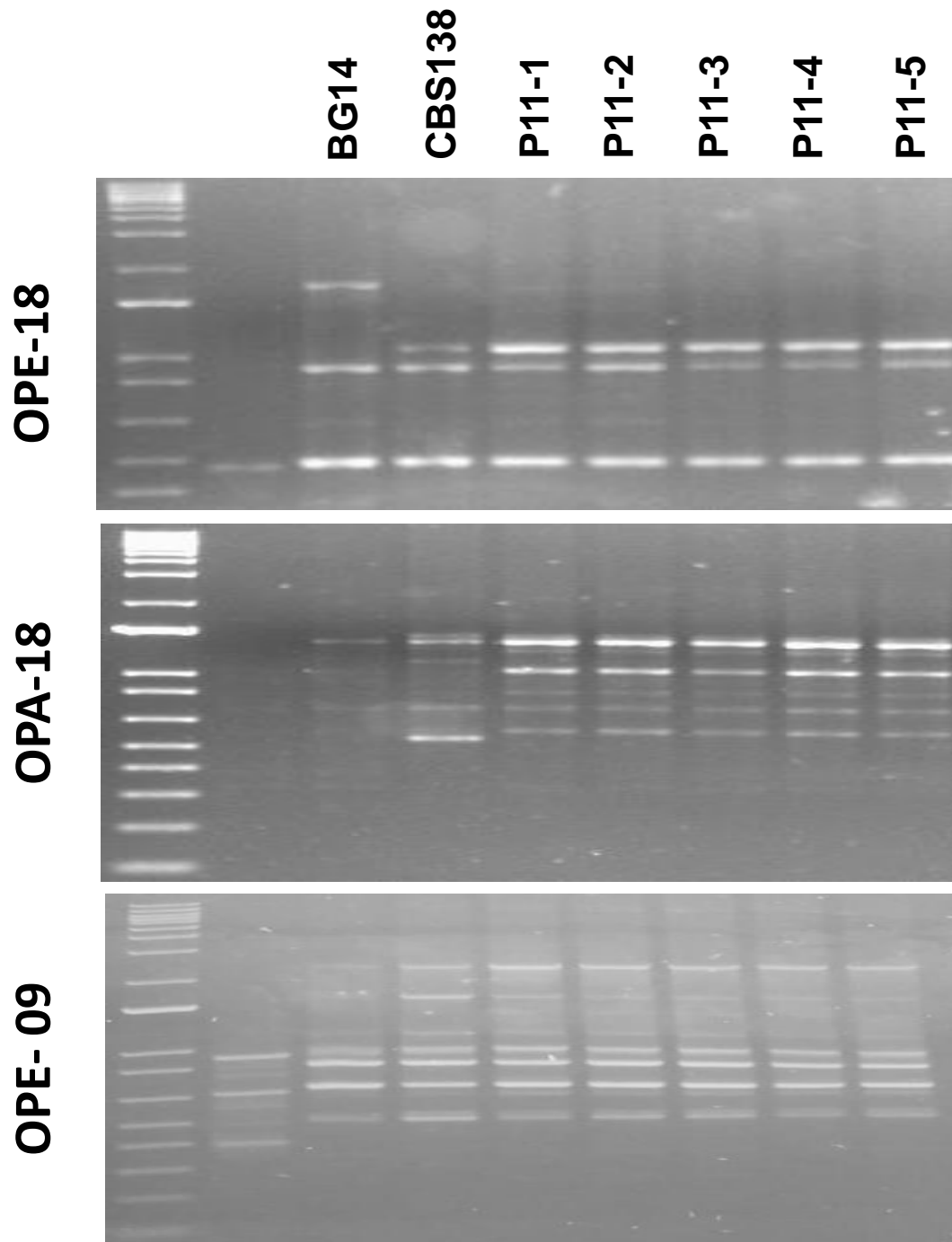
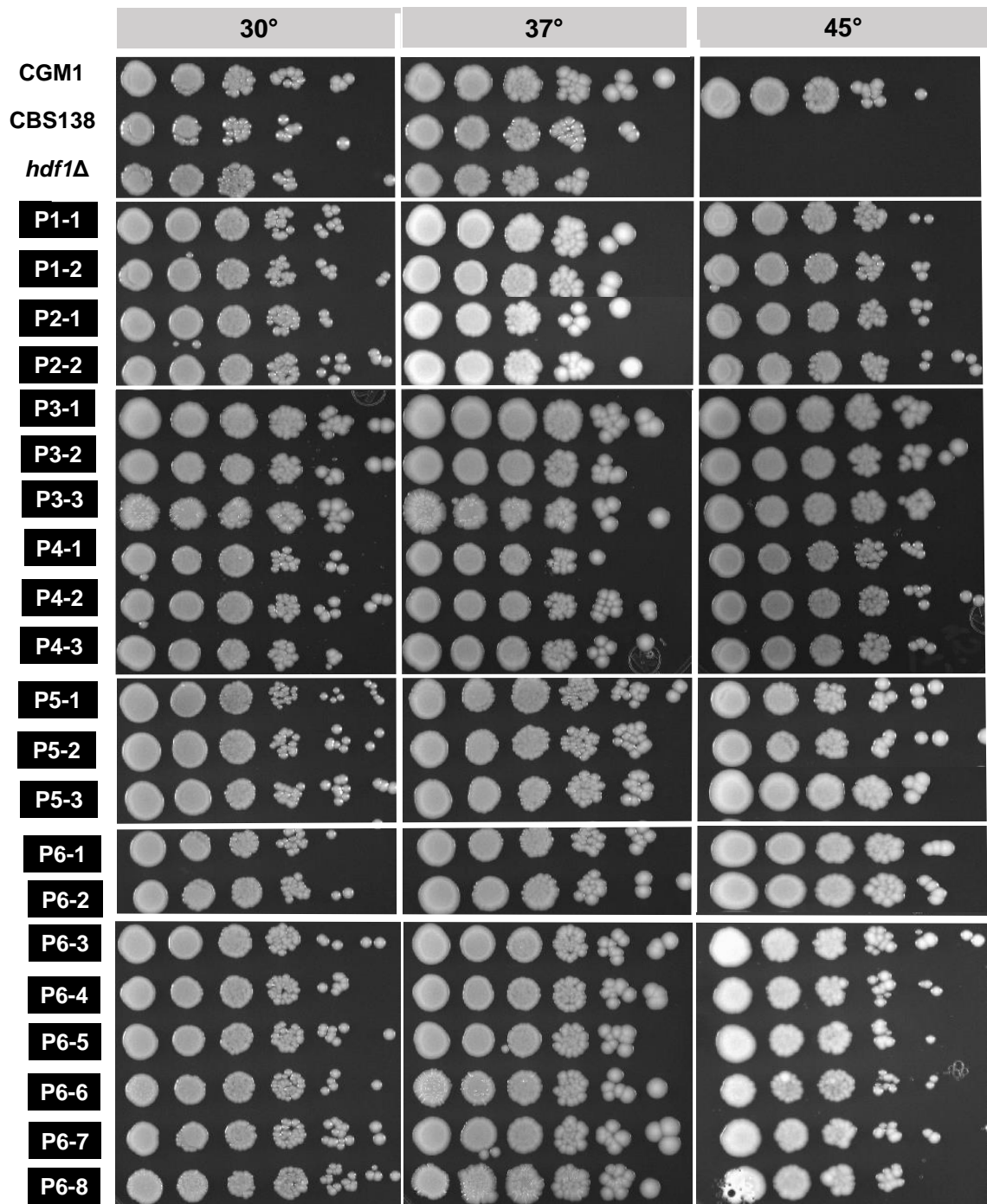


Figura suplementaria 3. Los aislados clínicos del paciente 11 provienen de un mismo episodio de infección

Los aislados provenientes del paciente 11 muestran el mismo patrón molecular con los marcadores de RAPDs



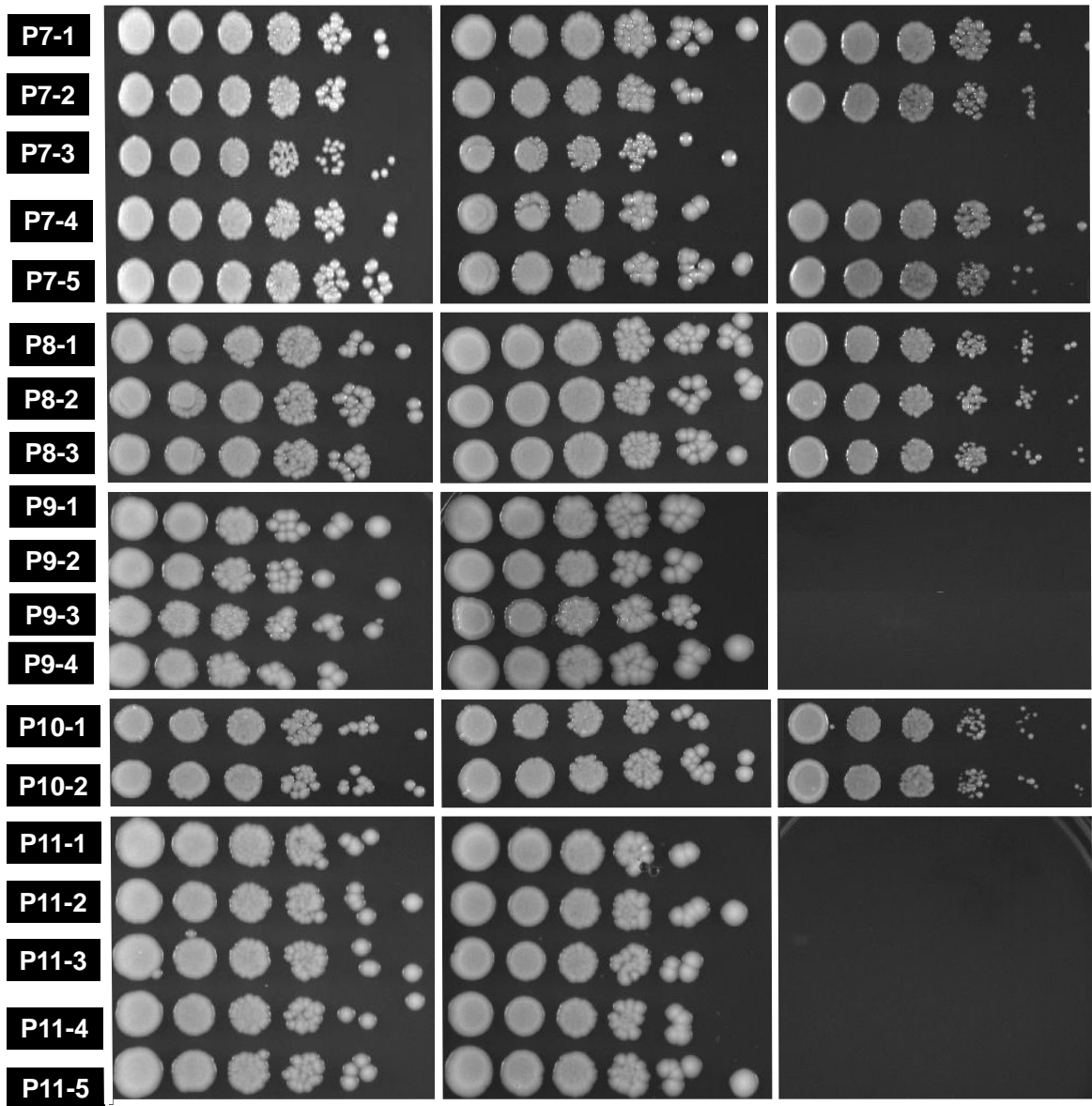
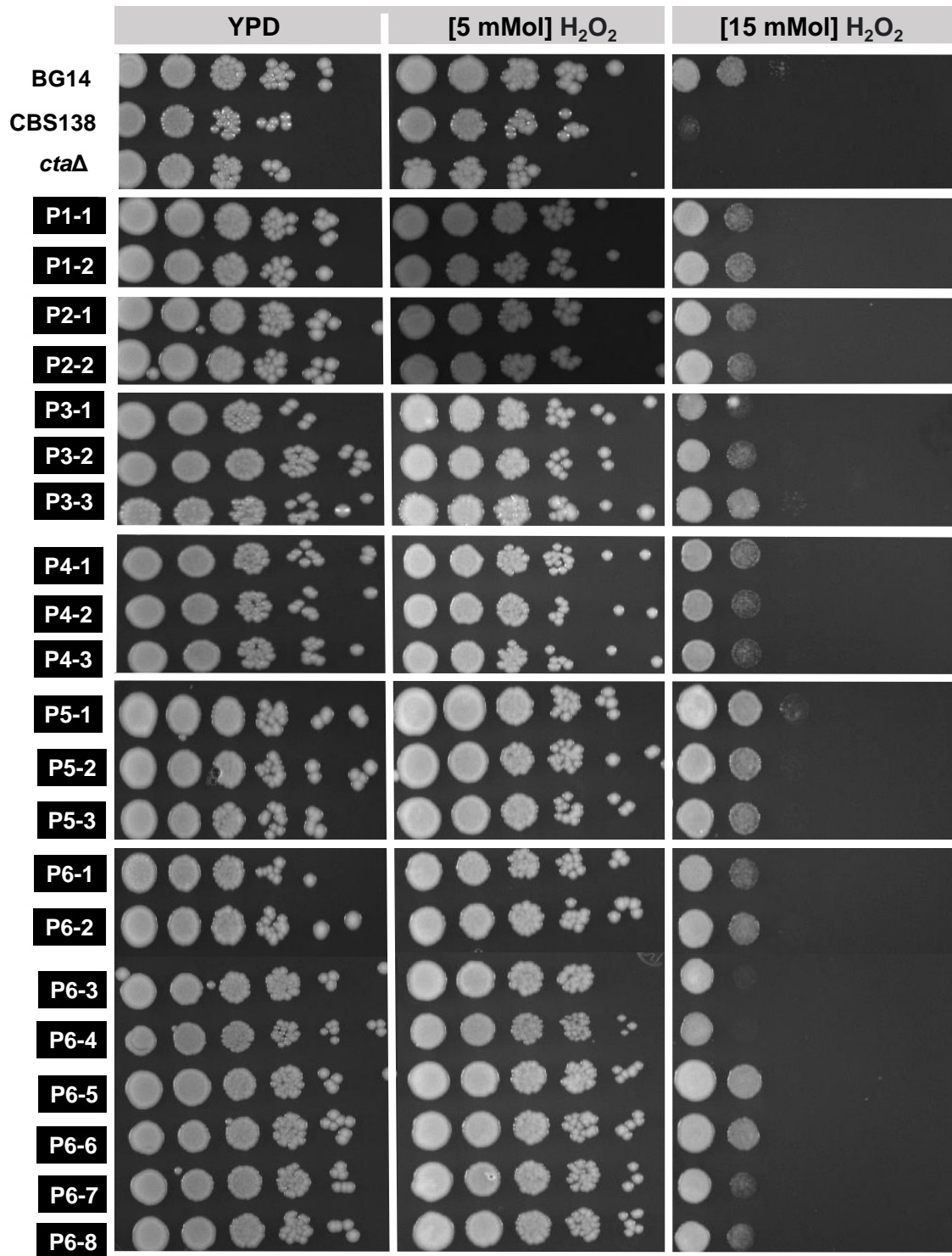


Figura suplementaria 4. Ensayos de resistencia a estrés térmico

Ensayos de crecimiento en medio solido YPD a diferentes temperaturas. Las cepas utilizadas como controles son: BG14: cepa de referencia en nuestro laboratorio; cepa secuenciada CBS138; cepa *hdf1Δ*: cepa control de termosensibilidad a 45°C. Cada cepa y los aislados clínicos provenientes de los 11 pacientes se crecieron a 30°C por 48 hrs y gotas de 7 μL se inocularon en cajas de YPD y se incubaron a las temperaturas indicadas. Se tomaron fotografías a las 48 hrs de incubación.



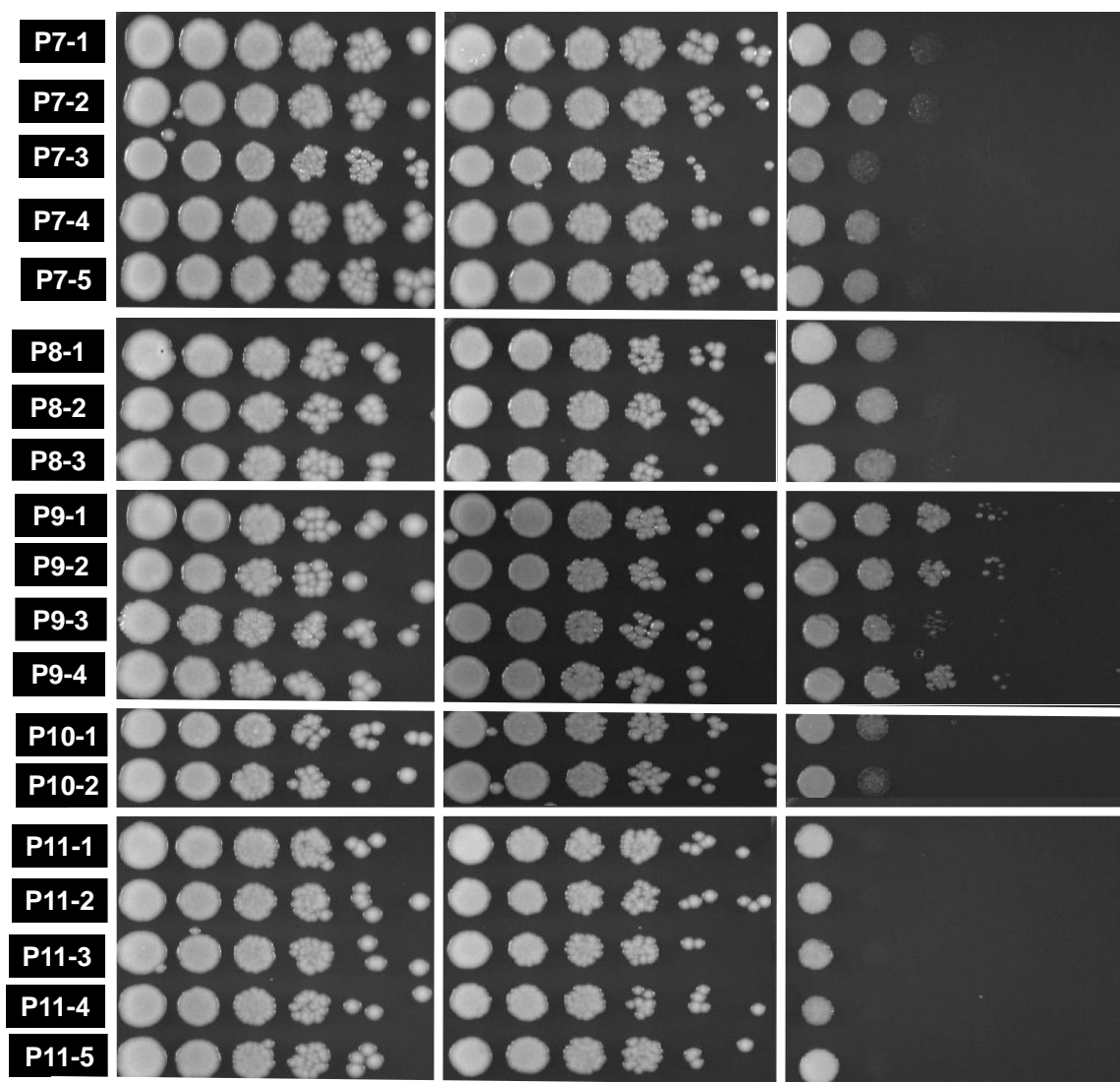
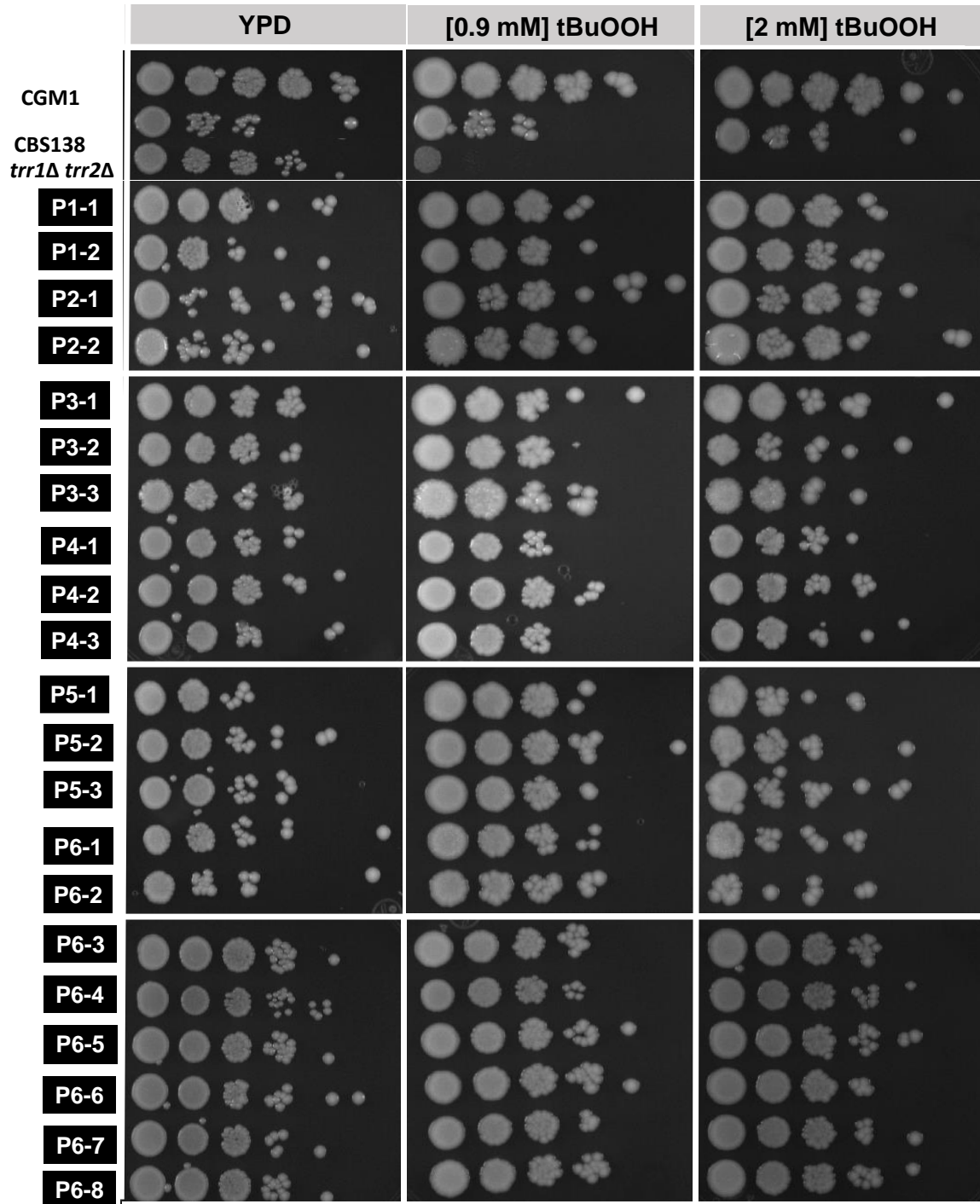


Figura suplementaria 5. Exposición crónica a peróxido de hidrógeno

Ensayos de resistencia a exposición crónica a H_2O_2 : los aislados clínicos indicados y las cepas control (como control sensible utilizamos la cepa la mutante nula en *cta1Δ*) se cultivaron por 48 hrs y se inocularon en las concentraciones indicadas, se tomaron fotografías a las 48 hrs de crecimiento.



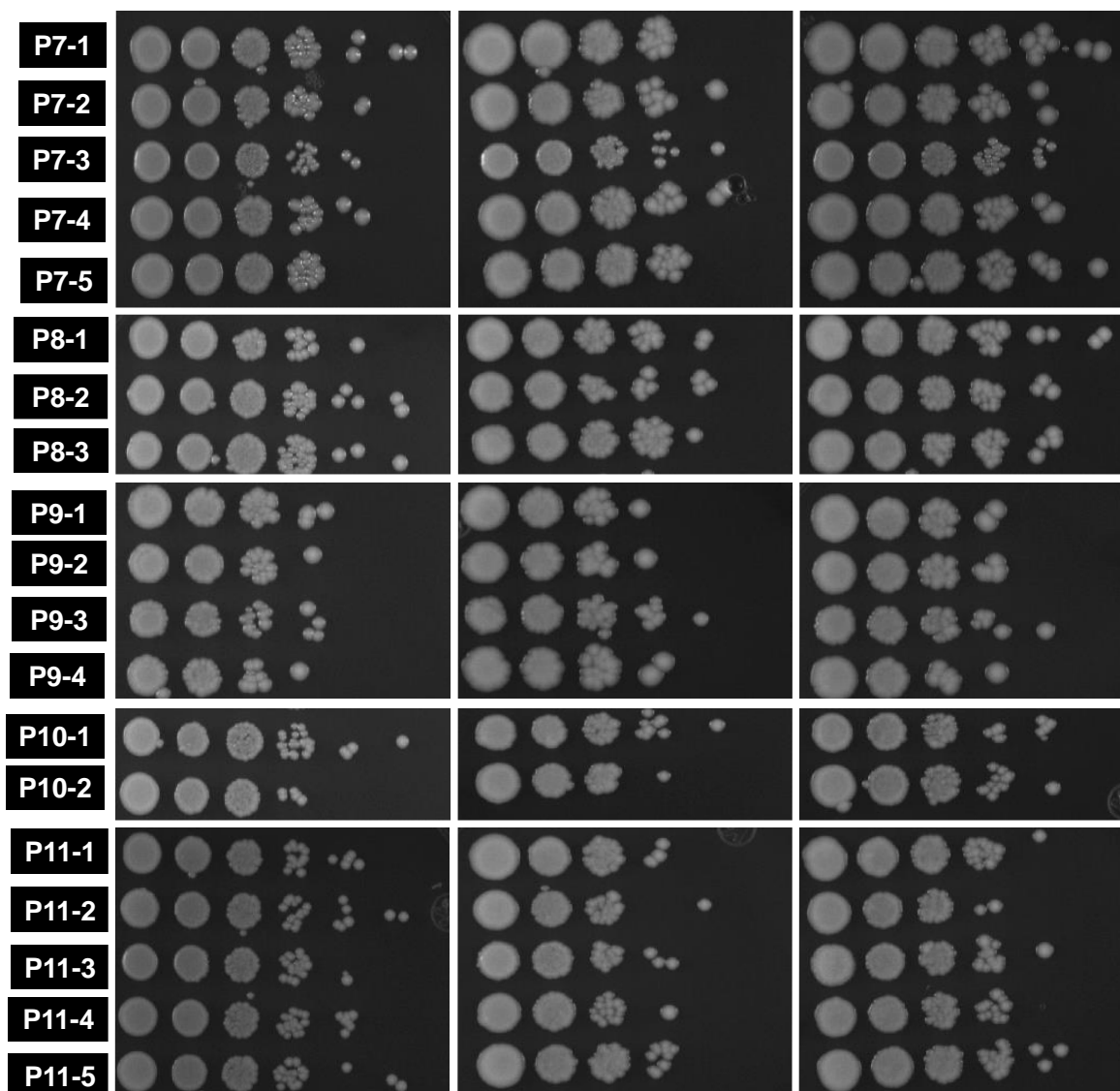
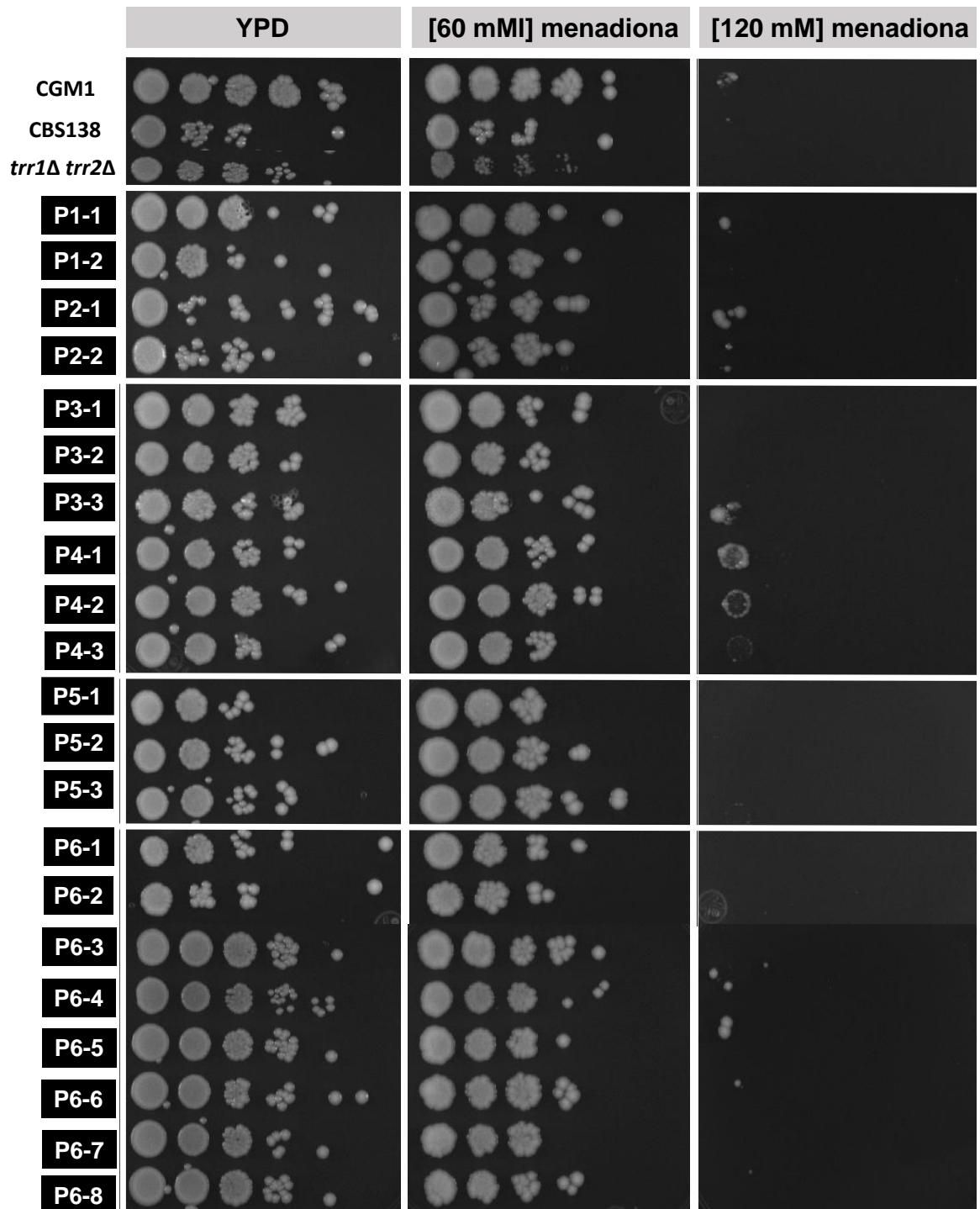


Figura suplementaria 6. Exposición crónica a Hidroperóxido de ter-butilo

Ensayos de resistencia a exposición crónica a tBuOOH: los aislados clínicos indicados y las cepas control (como control sensible utilizamos la cepa la mutante nula en *trr1Δtrr2Δ*) se cultivaron por 48 hrs y se inocularon en las concentraciones indicadas, se tomaron fotografías a las 48 hrs de crecimiento.



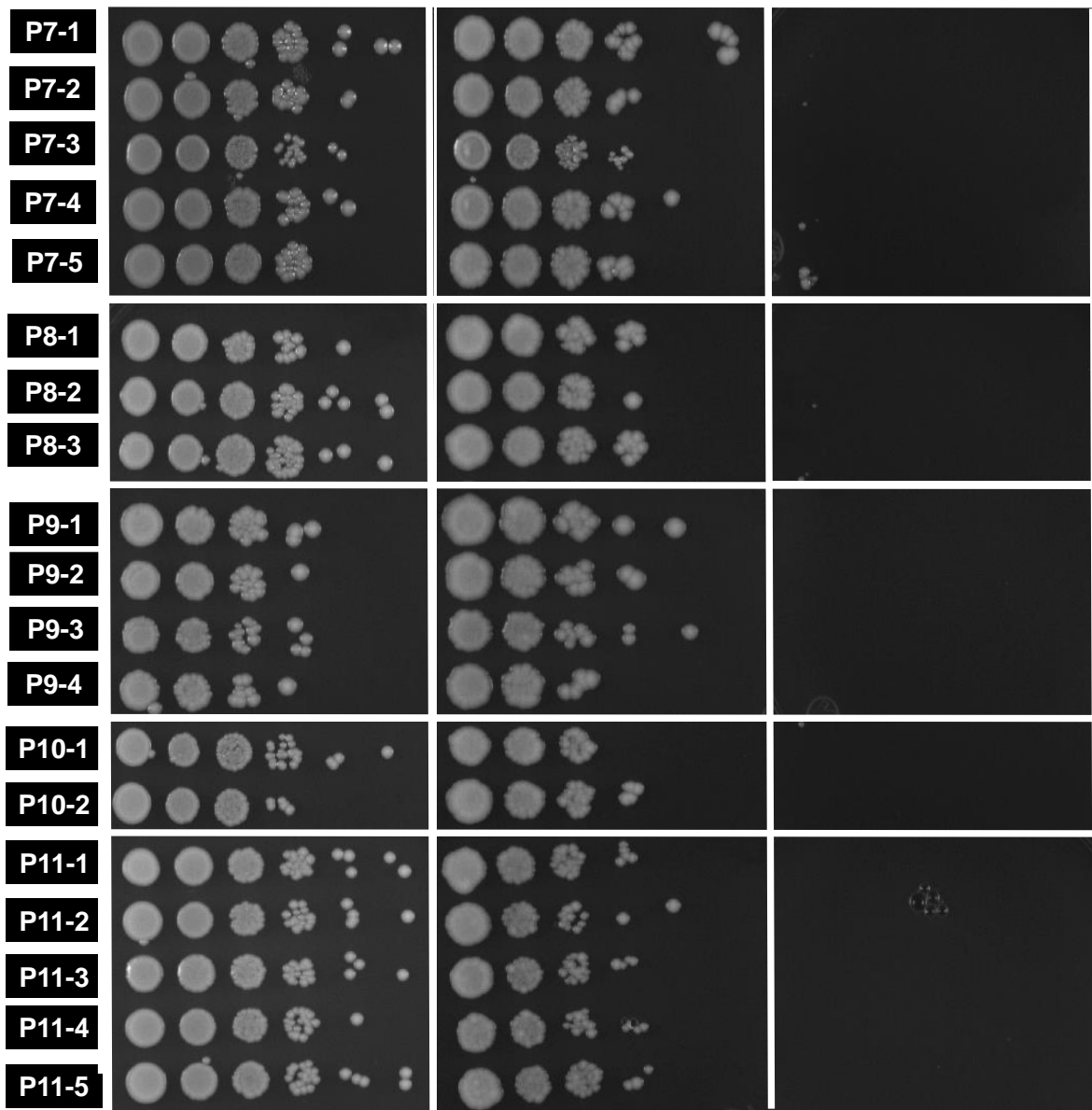


Figura suplementaria 7. Exposición crónica a menadiona

Ensayos de resistencia a exposición crónica a menadiona: los aislados clínicos indicados y las cepas control (como control sensible utilizamos la cepa la mutante nula en *trr1* Δ *trr2* Δ) se cultivaron por 48 hrs y se inocularon en las concentraciones indicadas, se tomaron fotografías a las 48 hrs de crecimiento.