



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Análisis de la evolución *in vitro* de *Candida
glabrata* bajo condiciones de estrés**

Tesis que presenta

Guillermo de Jesús Flores Alvarez

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Directora de la Tesis:

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro

San Luis Potosí, S.L.P., enero de 2023



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Análisis de la evolución *in vitro* de *Candida glabrata* bajo condiciones de estrés**” presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Guillermo de Jesús Flores Alvarez** y aprobada el **día 4 de enero de 2023** 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
Directora de la tesis

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Antonio De León Rodríguez
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

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

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (1079738) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.
Este trabajo fue apoyado por el proyecto No. 610281 de Ciencia de Frontera 2019 otorgado a Irene B. Castaño Navarro.

Esta tesis contó con el apoyo del Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA), así como del Laboratorio de Microscopía para Muestras Biológicas de la División de Biología Molecular del IPICYT.

Acta de examen

Dedicatoria

A mis padres, Juan Antonio y Consuelo:

Con su esfuerzo y apoyo incondicional me impulsaron y motivaron a cumplir uno de mis mayores objetivos en esta vida.

A mis hermanos, Alejandro, Rocío, Araceli y Dibanhi:

Por su comprensión y apoyo durante esta etapa de mi crecimiento profesional.

Agradecimientos

Al **Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica**.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por la beca otorgada.

Infinito agradecimiento a la **Dra. Irene Castaño** por abrirme las puertas de su laboratorio y dejarme ser parte de su equipo de trabajo, por su paciencia y por todo el conocimiento compartido.

A la **Dra. Guadalupe Gutiérrez** por todo el apoyo técnico y consejos que me brindó durante mi estancia en el laboratorio.

A los miembros de mi comité tutorial, la **Dra. Lina Riego** y el **Dr. Antonio De León** por sus valiosos consejos para la realización de este trabajo.

Al **Dr. Alejandro De Las Peñas** por sus comentarios y contribuciones a este proyecto.

A la **Dra. Araceli Patrón** por el apoyo técnico en la microscopia de fluorescencia.

Al **LANBAMA**.

A todos los **profesores de la División de Biología Molecular** que compartieron su conocimiento y experiencia durante mi formación.

A **Gloria López** por la gran labor que hace en el laboratorio.

A **Yazmín, Ana, Laura, Grecia, Norma, Ricardo y Ernesto** por su apoyo, consejos y experiencias que nunca olvidaré.

Contenido

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE LA TESIS	ii
CRÉDITOS INSTITUCIONALES	iii
ACTA DE EXAMEN	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
CONTENIDO	vii
LISTA DE FIGURAS	xi
ANEXOS	x
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUCCIÓN	1
MATERIALES Y MÉTODOS	5
Cepas y aislados clínicos de <i>C. glabrata</i>	5
Plásmidos	5
Oligonucleótidos	5
Evolución in vitro de poblaciones de <i>C. glabrata</i> en diferentes concentraciones de FLC	5
Nomenclatura de las mutantes aisladas	5
Caracterización de las mutantes resistentes a FLC	6
Purificación de colonias con un fenotipo respiratorio competente y respiratorio deficiente	6
Ensayos de estabilidad del fenotipo deficiente para la respiración (Gly ⁻) y de resistencia a FLC	6
Subcultivos en serie o pases	6
Ensayos de reversibilidad del fenotipo Gly ⁻	6
Resistencia a FLC	6
Extracción de ADN plasmídico de <i>Escherichia coli</i>	7
Transformación genética de cepas y aislados clínicos <i>C. glabrata</i>	7

Extracción de ADN genómico de <i>C. glabrata</i>	7
Análisis del ADN mitocondrial de <i>C. glabrata</i>	7
Microscopía de fluorescencia	8
Citometría de flujo	8
RESULTADOS	9
<i>C. glabrata</i> se vuelve más resistente a FLC después de una exposición continua y prolongada: cepas evolucionadas	9
La exposición crónica a FLC induce la evolución de <i>C. glabrata</i> hacia dos poblaciones	10
Las mutantes evolucionadas en FLC pueden tener un fenotipo competente o deficiente para la respiración	11
El fenotipo Gly ⁻ casi siempre es estable en ausencia de la presión selectiva	12
Las mutantes Gly ⁻ evolucionadas tienen diferentes mecanismos de resistencia a FLC	13
Las mutantes Gly ⁺ evolucionadas tienen un mecanismo de resistencia a FLC estable	15
El fenotipo Gly ⁻ en las mutantes evolucionadas está relacionado con la pérdida de ADN mitocondrial	16
La pérdida de ADN mitocondrial por exposición crónica a FLC casi siempre es estable	17
Las mutantes Gly ⁻ evolucionadas en FLC carecen de estructuras mitocondriales	19
DISCUSIÓN	22
CONCLUSIONES	25
BIBLIOGRAFÍA	26
MATERIAL SUPLEMENTARIO	30

Lista de figuras

Figura 1. Crecimiento final (DO_{600nm}) de las distintas cepas después de 24 h de crecimiento en pozos con medio YPD con las concentraciones indicadas de FLC.	9
Figura 2. Las variantes de colonia pequeña surgen en distintas concentraciones de FLC.	10
Figura 3. La exposición crónica a diferentes concentraciones de FLC genera dos tipos de mutantes resistentes (cepas evolucionadas).	11
Figura 4. Las cepas evolucionadas resistentes a FLC y de fenotipo Gly ⁻ no siempre son estables.	12
Figura 5. El mecanismo de resistencia a FLC en las mutantes Gly ⁻ no se pierde del todo después de subcultivos seriados (3 pases) en ausencia del fármaco.	13
Figura 6. El mecanismo de resistencia a FLC en las mutantes Gly ⁺ es estable después de los subcultivos seriados (3 pases) en ausencia del fármaco.	15
Figura 7. Detección de ADN mitocondrial (gen <i>COX3</i>) en cepas de <i>C. glabrata</i> resistentes a FLC.	17
Figura 8. Amplificación del gen mitocondrial <i>COX3</i> de <i>C. glabrata</i> en las mutantes evolucionadas Gly ⁻ y Gly ⁺ y subcultivadas repetidamente (3 pases) en ausencia de FLC.	18
Figura 9. Micrografías de <i>C. glabrata</i> para observar la morfología y la estructura mitocondrial.	20
Figura 10. Detección de los niveles de fluorescencia en las mutantes evolucionadas en FLC y en los aislados parentales.	21

Anexos

Tabla S1. Tipos de mutantes con deficiencia respiratoria descritas en levaduras.	32
Tabla S2. Cepas utilizadas en este estudio	32
Tabla S3. Plásmidos utilizados en este estudio.	34
Tabla S4. Oligonucleótidos utilizados en este estudio.	35
Tabla S5. Detección de los niveles de fluorescencia de las cepas de <i>C. glabrata</i> que contienen el plásmido con la fusión traduccional Prx1-GFP.	35
Figura S1. Evolución <i>in vitro</i> de poblaciones de <i>C. glabrata</i> resistentes a FLC	37
Figura S2. Genealogía de las cepas de <i>C. glabrata</i> evolucionadas en un gradiente de concentraciones de FLC.	38
Figura S3. Crecimiento final (DO _{600nm}) de las distintas cepas después de 24 h de crecimiento en pozos con medio YPD con las concentraciones indicadas de FLC	39
Figura S4. Perfil de susceptibilidad a FLC de la cepa Gly ⁺ revertante.	40
Figura S5. Amplificación de GFP en las mutantes evolucionadas en FLC que derivan de la cepa de referencia BG14.	41
Figura S6. Genotipificación de mutante Gly revertante.	42

Abreviaturas

ABC	<u>C</u>asete de <u>U</u>nión a <u>A</u>TP
BSI	<u>I</u>nfecciones de <u>T</u>orrente <u>S</u>anguíneo
CSP	<u>C</u>aspofungina
FLC	<u>F</u>luconazol
FLC^R	<u>R</u>esistente a <u>f</u>luconazol
FCL^S	<u>S</u>ensible a <u>f</u>luconazol
Gly⁺	Mutantes competentes para la función respiratoria (capaces de utilizar fuentes no fermentables de carbono como glicerol)
Gly⁻	Mutantes deficientes para la función respiratoria (incapaces de utilizar glicerol como única fuente de carbono)
GOF	<u>M</u>utaciones de <u>G</u>anancia de <u>F</u>unción
MFS	<u>S</u>uperfamilia <u>F</u>acilitadora <u>P</u>rincipal
Pdr1	Regulador transcripcional 1 de la <u>R</u>espuesta <u>P</u>leiotrópica a <u>F</u>ármacos
VCP	<u>V</u>ariante de <u>C</u>olonia <u>P</u>equeña
VCR	<u>V</u>ariante de <u>C</u>olonia <u>R</u>egular

Resumen

Análisis de la evolución *in vitro* de *Candida glabrata* bajo condiciones de estrés

C. glabrata es una levadura que se detecta y se aísla con frecuencia de muestras de pacientes inmunocomprometidos, por lo que se le considera un patógeno oportunista de importancia médica. La patogénesis de *C. glabrata* se atribuye, entre otros factores, a una menor susceptibilidad innata a los antifúngicos en comparación con otras especies comunes de *Candida*, en especial al fluconazol (FLC), el principal antifúngico utilizado para tratar las infecciones por levaduras del género *Candida*. Se ha observado que las terapias prolongadas con este fármaco permiten que *C. glabrata* desarrolle una mayor resistencia a los azoles. Tomando en cuenta lo anterior, utilizamos un modelo de evolución adaptativa y selección *in vitro* en presencia del antifúngico FLC, para exponer a FLC e inducir la evolución de dos aislados clínicos de *C. glabrata* y nuestra cepa de referencia en el laboratorio, BG14, que difieren en su susceptibilidad a FLC. Al finalizar 15 pases diarios observamos que las tres cepas evolucionadas crecieron en un gradiente de concentraciones subletales y letales de FLC las cuales fueron de 8 a 256 µg/mL de FLC. Mostramos que la exposición crónica a FLC en los tres aislados resultó en la aparición de mutantes que no lograron crecer en glicerol como única fuente de carbono no fermentable (Gly⁻), así como en la aparición de células competentes para la respiración (Gly⁺). La estabilidad de los fenotipos de resistencia y Gly⁻ en ausencia de la presión selectiva, se mantuvo estable en todas las colonias analizadas con excepción de una mutante evolucionada derivada del aislado sensible FLC. El análisis del genoma mitocondrial mostró que, en las mutantes evolucionadas en FLC, el fenotipo Gly⁻ se relaciona con la pérdida del ADN mitocondrial, pero no así en las mutantes evolucionadas Gly⁺ o en los aislados originales (sin evolucionar). Asimismo, en las mutantes Gly⁻ no fue posible detectar la señal fluorescente de una proteína mitocondrial fusionada con GFP. En conjunto, estos datos indican que la resistencia incrementada a FLC está estrechamente relacionada no solo con la pérdida de funciones mitocondriales, sino también con otros mecanismos que no necesariamente comprometen la función respiratoria.

PALABRAS CLAVE: Fluconazol, Variantes fenotípicas, Microevolución adaptativa, Resistencia a antifúngicos, Mutantes Gly⁻.

Abstract

Analysis of *in vitro* evolution of *Candida glabrata* under stress conditions

C. glabrata is a yeast frequently isolated from samples of immunocompromised patients. For this reason, it is considered a medically relevant opportunistic fungal pathogen. The pathogenesis of *C. glabrata* is largely attributed to different characteristics called virulence factors, such as low susceptibility to antifungals in comparison with other common *Candida* species, specifically to fluconazole (FLC), the major drug used for treating infections caused by *Candida* spp. The long therapies with FLC frequently used in the clinic, allows *C. glabrata* to develop higher resistance to azoles. Taking this into consideration, we used an experimental strategy based on adaptative evolution *in vitro* using increasing concentrations of FLC to expose and induce the evolution of two *C. glabrata* isolates and our standard strain BG14, that differ in the susceptibility profile to FLC. After 15 daily passes, three strains grew under sublethal and lethal FLC concentrations which ranged from 8 to 256 µg/mL FLC. We found that chronic exposure to FLC resulted in the appearance of some mutants unable to grow in glycerol as a sole, non-fermentable carbon resource (Gly⁻). We determined the stability of Gly⁻ and FLC resistance phenotypes by growing repeatedly the strains in the absence of selective pressure. We found that the respiratory incompetence phenotype was stable for all the colonies derived from strains BG14 and A. However, in one case, a derivative from strain B reverted to respiratory competence (Gly⁺). Mitochondrial DNA analysis showed that in the Gly⁻ FLC evolved strains, the inability to grow on glycerol as carbon source, is related to the loss of mitochondrial DNA. Instead, the Gly⁺ FLC evolved strains as well as the parental strains (not evolved), all contained mitochondrial DNA. In addition, we could not detect a mitochondrial protein fused with GFP in Gly⁻ strains, but it was easily observed in the Gly⁺ evolved strains. The results indicate that increased resistance to FLC is closely related to loss of respiratory functions, and to other mechanisms that do not necessarily compromise the mitochondrial function.

KEY WORDS: Fluconazole, Phenotypic variants, Adaptive microevolution, Antifungal resistance, Gly⁻ mutants.

Introducción

El éxito de los microorganismos patógenos de humanos depende de su capacidad para modificar la expresión de su genoma ya sea a través de mecanismos en los que suceden cambios en la secuencia del ADN como el intercambio genético, la recombinación, la duplicación génica o las mutaciones puntuales, o bien por cambios que no involucran cambios en la secuencia del ADN (cambios epigenéticos) que favorezcan la aparición de poblaciones genética y fenotípicamente diversas (poblaciones evolucionadas) capaces de responder a las condiciones fluctuantes en los diferentes nichos dentro del hospedero. Por ejemplo, algunos hongos patógenos del género *Candida* expresan de manera diferencial genes que incrementan su virulencia a través de un aumento en la expresión de genes que confieren resistencia a diferentes antifúngicos, una mayor capacidad de adherencia a las células y tejidos del huésped o mediante la activación de vías de respuesta a estrés. En este sentido, en el género *Candida* se encuentran especies de interés médico que han evolucionado estrategias para colonizar ciertos mamíferos como el humano y posteriormente, pueden provocar infecciones oportunistas superficiales (candidiasis mucocutánea) o invasivas. La candidiasis invasiva es la enfermedad fúngica más común entre los pacientes hospitalizados y se clasifica en candidemia (infección en el torrente sanguíneo) y candidiasis tisular profunda (infecciones en órganos internos) [1].

Si bien se han descrito alrededor de 15 especies de importancia médica para el humano, solamente 5 de ellas son agentes etiológicos de las infecciones invasivas: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* y *Candida krusei*. Un programa de vigilancia médica llevado a cabo de 1997 a 2016 en hospitales de diversas partes del mundo, incluido América Latina, determinó que, aunque *C. albicans* es la especie predominante que causa infecciones fúngicas invasivas, las especies no-*albicans* también han ganado importancia médica en distintas regiones geográficas [2].

Mediante estudios moleculares y evolutivos se ha demostrado que *C. glabrata* tiene una relación filogenética más cercana con *Saccharomyces cerevisiae* que con *C. albicans*, lo cual ha permitido clasificar a *C. glabrata* en el clado Saccharomycetaceae dentro del que se agrupa con el género *Nakaseomyces* del que también forman parte *Candida castelli*, *Nakaseomyces bacillisporus*, *Nakaseomyces delphensis*, *Candida nivariensis* y *Candida bracarensis* [3,4]. Estas últimas tres especies junto con *C. glabrata* conforman el llamado grupo *glabrata* [5], las cuales son especies patógenas de humanos excepto *N. delphensis*. De las especies que conforman el grupo *glabrata*, *C. glabrata* posee la mayor cantidad de genes EPA (*Adhesina Epitelial*). 20 en la cepa secuenciada CBS138 que pertenecen

a la primera y más grande familia de adhesinas en *C. glabrata* (Clúster I) [5,6]. La mayoría de los genes de adhesinas en *C. glabrata* se localizan cerca de las regiones subteloméricas en donde están sujetos a la regulación transcripcional por distintos mecanismos [7,8,9]. Además de la adherencia a un amplio repertorio de células epiteliales y endoteliales [10,11,12,13], otro factor de virulencia importante que le permite a *C. glabrata* ser un patógeno oportunista exitoso, es una menor susceptibilidad a ciertos tipos de antifúngicos como el fluconazol (FLC) en comparación con otras especies del género *Candida* [14,15].

Existen distintas clases de compuestos que componen el arsenal utilizado para tratar las infecciones por *Candida* como los polienos, azoles, equinocandinas, análogos de nucleósidos y alilaminas. De estos, los azoles y las equinocandinas son los medicamentos antifúngicos más utilizados en la clínica. Las equinocandinas interrumpen la biosíntesis del β -1,3-D-glucano por inhibición de la enzima β -(1,3) D-glucano sintasa. El complejo β -(1,3)-D-glucano sintasa es necesario para la síntesis de 1,3- β -D-glucano, un componente esencial de la pared celular de las especies de *Candida*. Se ha observado que la disminución de la susceptibilidad a las equinocandinas está asociada con mutaciones en dos regiones de nueve y ocho aminoácidos, designados “hot spot” 1 (HS1) y “hot spot” 2 (HS2) respectivamente, presentes en las dos subunidades que componen este complejo, Fks1 y Fks2 [16,17].

En tanto los azoles, su modo de acción se centra en la unión de los átomos de nitrógeno del anillo azol al grupo hemo en el sitio activo de la enzima lanosterol 14- α desmetilasa. Esta unión bloquea la conversión de lanosterol a ergosterol, un componente esencial de la membrana plasmática de los hongos patógenos [18]. Se ha demostrado que el agotamiento del ergosterol en la membrana plasmática, así como la acumulación de esteroides tóxicos son capaces de detener el crecimiento de las células tratadas con FLC [19]. Sin embargo, *C. glabrata*, de entre los aislados clínicos de *Candida*, exhibe una susceptibilidad intrínsecamente disminuida a estos compuestos azólicos. Adicionalmente, *C. glabrata* es capaz de desarrollar aún mayor resistencia adquirida después de la exposición prolongada a los antifúngicos de tipo azol [20].

Los mecanismos asociados con la resistencia a azoles en *C. glabrata* incluyen la duplicación completa del cromosoma que contiene la secuencia de *ERG11*, la expresión diferencial de los genes que componen la vía de biosíntesis de ergosterol, las mutaciones sin sentido en la enzima lanosterol 14- α desmetilasa que la vuelven no funcional, la expresión de transportadores de esteroles cuando se bloquea la vía de biosíntesis de este compuesto, las mutaciones de ganancia de función (GOF) en el factor de transcripción Pdr1, que incrementan la expresión de sus genes blanco algunos de los cuales codifican para bombas de flujo de fármacos,

así como la pérdida de funciones mitocondriales que provocan una deficiencia en la respiración y genera mutantes fenotípicamente conocidas como mutantes *petite* (llamadas aquí mutantes Gly⁻) que son incapaces de crecer en fuentes de carbono no fermentables como glicerol o etanol [18,19,21,22,23,24].

En este sentido, se ha observado que la gran mayoría de los aislados clínicos de *C. glabrata*, caracterizados como resistentes a azoles expresan en mayor cantidad los genes que codifican para transportadores de casetes de unión a ATP (ABC), como *CgCDR1* y *CgCDR2* [25]. Este incremento en la transcripción está mediado por el factor de transcripción denominado *CgPdr1* que pertenece a la familia de factores de transcripción de dedos de zinc con dominios Zn(2)Cys(6) [25]. *CgPdr1* requiere de unirse al FLC (u otros xenobióticos) para activar la transcripción de sus genes blanco [26]. La alta expresión de los transportadores ABC en aislados resistentes a azoles se debe principalmente a las diversas mutaciones tipo GOF que abarcan principalmente tres dominios de esta proteína: 1) la región similar al dominio inhibidor (ID) transcripcional de *Pdr1* de *S. cerevisiae*, 2) la región de homología media (MHR) y 3) un dominio putativo de activación transcripcional (AD) [27,28].

Además de las mutaciones GOF, en *C. glabrata* también se ha demostrado la adquisición de una mayor resistencia a azoles a través de la inducción de transportadores de fármacos debido a la pérdida de funciones mitocondriales [29,30]. Este fenómeno fue identificado y descrito por primera vez en *S. cerevisiae* y puede surgir de forma espontánea (tasa de 1% en muchas especies) o en respuesta a fármacos dirigidos hacia diferentes componentes celulares. A la fecha, se han descrito al menos tres clases de mutantes con deficiencia respiratoria que difieren de una cepa silvestre (ρ^+) (Tabla S1) [31,32,33].

Se ha demostrado que las mutaciones en los genes nucleares *CgMIP1*, *CgSUV3*, *CgMRPL4* y *CgSHE9* que codifican para una polimerasa de ADNmt, una ARN helicasa dependiente de ATP ubicada en la mitocondria, una proteína estructural de la subunidad grande del ribosoma mitocondrial y una proteína de la membrana interna mitocondrial respectivamente, confieren a *C. glabrata* una alta resistencia a FLC cuando también pierden la función mitocondrial (fenotipo Gly⁻) [18,34,35]. Sin embargo, únicamente las mutantes *mrpl4* Δ y *she9* Δ que por sí solas no tienen fenotipo Gly⁻, pueden revertir del fenotipo respiratorio deficiente a respiratorio competente al retirar la exposición a FLC [18].

Por otro lado, en presencia de Caspofungina (CSP), un antifúngico que pertenece a las equinocandinas, *C. glabrata* evoluciona hacia dos poblaciones, una de ellas con un fenotipo de colonia regular y la otra población con un fenotipo de

colonia pequeño. Las variantes pequeñas se caracterizan por tener una baja tasa de crecimiento, así como una elevada resistencia al antifúngico y, a diferencia de la exposición a FLC, estas variantes pequeñas no tienen un fenotipo Gly⁻. De manera interesante, en ausencia del fármaco, se demostró que el mecanismo de resistencia a Caspofungina podía ser estable o inestable en estas poblaciones evolucionadas [36].

En este trabajo nos interesó investigar si la exposición crónica a FLC es suficiente para inducir la aparición de células más resistentes a FLC con un fenotipo de crecimiento en particular que nos permitiera conocer más a fondo los procesos involucrados en la resistencia a este antifúngico en los aislados clínicos de *C. glabrata*. Diseñamos un experimento de evolución *in vitro* que consistió en subcultivar 15 veces seguidas en diferentes concentraciones de FLC, a tres aislados clínicos de *C. glabrata*, caracterizados como sensible y resistente, y nuestra cepa de referencia en el laboratorio (cepa BG14) clasificada como sensible dosis-dependiente. Encontramos que la exposición continua a FLC induce en las células mecanismos que permiten la adaptación a concentraciones relativamente elevadas del fármaco en las cuales hay inhibición del crecimiento.

Además, observamos la aparición de dos poblaciones llamadas aquí Variante de Colonia Pequeña (SCV) y Variante de Colonia Regular (RCV) con fenotipo Gly⁻ y Gly⁺, respectivamente. También demostramos que después de subcultivos continuos en ausencia de la presión selectiva, la resistencia a FLC se mantiene estable en casi todas las mutantes evolucionadas que analizamos. Sin embargo, el fenotipo Gly⁻ si bien fue estable también en la mayoría de los casos, en una cepa observamos que fue inestable y revirtió a Gly⁺. Finalmente, análisis más detallados del ADN y la estructura mitocondrial revelaron que las mutantes Gly⁻ no presentan mitocondrias visibles ni se detecta ADNmt. En cambio, las mutantes Gly⁺ y los aislados originales no tienen ninguna afectación en la estructura o el ADN mitocondrial. Por lo tanto, el incremento en la resistencia a FLC en algunas cepas de *C. glabrata* está relacionado con la pérdida del ADN mitocondrial y las funciones respiratorias.

Materiales y Métodos

Cepas y aislados clínicos de *C. glabrata*

Las cepas utilizadas en este estudio se describen en la Tabla S2.

Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este estudio se describen en la Tabla S3.

Oligonucleótidos

Las secuencias de oligonucleótidos se describen en la Tabla S4.

Evolución *in vitro* de poblaciones de *C. glabrata* en diferentes concentraciones de FLC

Para inducir la evolución *in vitro* de poblaciones de *C. glabrata* más resistentes a FLC, utilizamos la cepa de referencia BG14, así como dos aislados clínicos de nuestra colección del laboratorio: AN378 (de ahora en adelante llamado A) y AN755 (de ahora en adelante llamado B). Previamente en el laboratorio determinamos la dosis mínima inhibitoria a FLC y clasificamos a la cepa de referencia BG14 como sensible dosis-dependiente ($MIC_{50} 7.49 \pm 1.19$); el aislado A como resistente ($MIC_{50} 61.92 \pm 13.02$) y el aislado B como sensible ($MIC_{50} 2.45 \pm 0.37$) [37,38]. Los cultivos se crecieron en medio líquido YPD durante 48 h a 30 °C con agitación constante y partimos de cultivos en fase estacionaria ajustados a una DO_{600nm} de 0.75. Hicimos diluciones seriadas para inocular por triplicado una placa de 96 pocillos con aproximadamente 1,500 células por pozo. Utilizamos siete concentraciones diferentes de FLC más la condición libre de fármaco, e incubamos la placa a 30 °C con agitación muy suave y cada 24 h transferimos 2 μ L de cada cultivo del día anterior a medio fresco con la concentración correspondiente de FLC. Las concentraciones de FLC en YPD se prepararon a partir de una solución concentrada a 2 mg/mL (DIFLUCAN) (Figura S1). Para conocer el patrón de crecimiento de nuestra cepa de referencia *C. glabrata* BG14, así como de los aislados A (resistente) y B (sensible) conforme aumentamos la concentración de FLC, medimos la DO_{600nm} en un espectrofotómetro de Luz UV Visible (Shimadzu, modelo: UV-1700) los días 0, 5, 10 y 15. Para determinar si las distintas concentraciones del fármaco causan la muerte de las células, realizamos experimentos de viabilidad celular cada cinco días hasta el final del experimento.

Nomenclatura de las mutantes aisladas

Para investigar los procesos moleculares relacionados con la adquisición de una resistencia incrementada a FLC en la cepa de referencia y en los aislados parentales A y B, al terminar nuestro experimento de evolución *in vitro* en FLC, seleccionamos dos colonias de cada población FLC^R, una de ellas con fenotipo Gly⁻ y la otra con fenotipo Gly⁺, y las denominamos: [BG14 (1)], [BG14 (2)], A1, A2, B1 y B2, respectivamente. Para evaluar la estabilidad los fenotipos de resistencia a FLC

e incompetencia respiratoria, subcultivamos en YPD sin FLC a cada una de las mutantes por tres días consecutivos y generamos las cepas [BG14 (1-1)], [BG14 (2-1)], A1-1, A2-1, B1-1, B1-2 y B2-1 (Figura S2).

Caracterización de las mutantes resistentes a FLC

Purificación de colonias con un fenotipo respiratorio competente y respiratorio deficiente

Después de la exposición crónica a FLC tomamos muestras de los cultivos que se realizaron a diferentes concentraciones del fármaco tanto de la cepa de referencia BG14 como de los dos aislados clínicos resistente y sensible de *C. glabrata*. Las colonias se purificaron dos veces (mediante crecimiento de colonias aisladas a partir de estrías en cajas de YPD) y, posteriormente, confirmamos la presencia o ausencia de la función respiratoria mediante un ensayo de crecimiento en medio sólido con glicerol como única fuente de carbono (fuente de carbono no fermentable). Las colonias que mostraron un fenotipo respiratorio deficiente (RD) conocido como cepa Gly⁻ o un fenotipo respiratorio competente (RC) o Gly⁺, se almacenaron en glicerol a -70 °C para futuros análisis.

Ensayos de estabilidad del fenotipo deficiente para la respiración (Gly⁻) y de resistencia a FLC

Subcultivos en serie o pases

Para evaluar si las mutantes deficientes para la respiración de la cepa de referencia BG14 y los dos aislados clínicos de *C. glabrata* A y B mantienen el fenotipo de resistencia a FLC, realizamos subcultivos en serie (pases) en medio fresco en ausencia de la presión selectiva. Los cultivos se crecieron a 30 °C con agitación constante durante una noche. Cada 24 horas y durante tres días diluimos las células 100 veces en medio fresco. Posteriormente, hicimos diluciones seriadas para obtener colonias aisladas en medio sólido YPD.

Ensayos de reversibilidad del fenotipo Gly⁻

Determinamos si las mutantes Gly⁻ de la cepa BG14 y de los aislados, resistente (A) y sensible (B) de *C. glabrata* obtenidas tras la exposición crónica a FLC, revierten al fenotipo silvestre (Gly⁺). Para ello utilizamos las colonias aisladas obtenidas después de pases en serie descritos en el punto 2.4.2 e hicimos parches en cajas con medio rico con glicerol como fuente de carbono: YPG y también en cajas de YPD. Las cepas Gly⁻ (RD) no pueden crecer en YPG, pero sí en YPD.

Resistencia a FLC

Analizamos si las células deficientes para respiración (Gly⁻) mantienen la resistencia a FLC después de los pases continuos en medio rico. Utilizamos como controles la cepa de referencia BG14, una mutante nula *pdr1Δ* (sensible a FLC) y una mutante

nula *hst1Δ* (resistente a FLC). Los cultivos se crecieron hasta la fase estacionaria en medio líquido YPD a 30 °C con agitación constante. Estos cultivos se ajustaron a una DO_{600nm} de 0.5 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 3 μ L en cajas de medio YPD suplementado con FLC a las concentraciones de 8, 16, 32, 64 y 128 μ g/mL (una caja por cada concentración) y se incubaron durante 48 h. Posterior a esto se registró el crecimiento de los cultivos tomando fotografías con un fotodocumentador (Gel Doc XR+ Gel Documentation System BIO-RAD).

Extracción de ADN plasmídico de *Escherichia coli*

Para la extracción de plásmidos contenidos en las células DH10 de *E. coli* utilizamos el kit comercial Zippy Plasmid Miniprep (Zymo Research).

Transformación genética de cepas y aislados clínicos *C. glabrata*

Para la transformación de *C. glabrata* crecimos las cepas de interés en medio fresco a 30 °C toda la noche. Posteriormente tomamos 800 μ L de este cultivo y lo transferimos a 30 mL de YPD e incubamos a 30 °C hasta alcanzar una DO de entre 0.6 a 1.0. Colectamos y lavamos las células con 25 mL de agua Milli Q estéril. Resuspendimos la pastilla celular en 1 mL de Acetato de Litio 100mM (LiOAc), centrifugamos y adicionamos nuevamente 300 μ L de LiOAc. A continuación, transferimos 50 μ L de este cultivo a tubos Eppendorf y añadimos una mezcla de transformación hecha con polietilenglicol (PEG) 50%; LiOAc 1M; ssDNA 2 mg/mL y ADN plasmídico. Cada tubo, con su respectivo control, lo incubamos a 30 °C por 45 minutos. Luego adicionamos 43 μ L de DMSO y sometimos a las células a choque térmico en un bloque a 42 °C por 15 minutos. Centrifugamos para quitar el PEG y según el medio de selección utilizado, realizamos lo siguiente. Para la selección de células protótrofas a uracilo (marcador de selección *URA3*), resuspendimos suavemente la pastilla celular en 600 μ L de agua Milli Q estéril, inoculamos cajas de casaminoácidos e incubamos a 30 °C por 48 h. Para la selección con antibióticos, resuspendimos las células en 900 μ L de YPD y el cultivo lo incubamos con agitación constante a 30 °C por 4 h. Transcurrido este tiempo, tomamos una parte del cultivo e inoculamos cajas de YPD suplementadas con nourseotricina (NAT) a 100 μ g/mL.

Extracción de ADN genómico de *C. glabrata*

Para obtener el ADN genómico de las levaduras utilizamos el método de extracción rápida por FastPrep estandarizado en el laboratorio como se describe a continuación. Inoculamos 5 mL de medio YPD con nuestras cepas de interés (Tabla S1) y las crecimos a 30 °C durante 24 h con agitación continua. Transcurrido este tiempo, colectamos las células por centrifugación y adicionamos 500 μ L de buffer A con detergente y añadimos otro volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico. Posteriormente colocamos las muestras en el FastPrep (MP biomedical) 1s a 4m/s, centrifugamos y a la fase acuosa adicionamos 15 μ L de

NaCl 5M y 1 mL de etanol frío al 100%. Mezclamos por inversión y lavamos el pellet de ADN con 1 mL de etanol al 70%. Finalmente, resuspendimos las muestras en 250 μ L de Buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 0.1 mM, pH 8), adicionamos 0.2 μ L de un cóctel de RNAsas e incubamos a 37 °C durante 30 minutos.

Análisis del ADN mitocondrial de *C. glabrata*

Para diagnosticar la presencia o ausencia de ADN mitocondrial en *C. glabrata*, diseñamos un juego de oligonucleótidos directo y reverso que alinean en una región interna del gen mitocondrial *COX3* que codifica para la subunidad III del citocromo C oxidasa, miembro terminal de la cadena de transporte de electrones (Tabla S3). Mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), amplificamos un fragmento de aproximadamente 318 pb.

Microscopía de fluorescencia

Para la detección de ADN y de mitocondrias marcadas utilizamos el fluoróforo 4', 6-diamidino-2-fenilindo (DAPI) y dos plásmidos con expresión constitutiva (Tabla S2) que contienen una fusión traduccional conformada por el gen *PRX1* que codifica para la proteína mitocondrial Prx1 de *C. glabrata* y el gen reportero GFP. Crecimos las cepas mutantes de *C. glabrata* a 30 °C por 24 h en medio casaminoácidos (sin uracilo) o suplementado con el antifúngico NAT. Luego diluimos las células y las crecimos en el medio correspondiente durante 3 h. Colectamos las células por centrifugación, lavamos con PBS 1X y resuspendimos en 500 μ L de PBS. Las células fueron observadas en un microscopio Axio imager.M2 marca Zeiss.

Citometría de flujo

Las cepas evolucionadas Gly⁻ y Gly⁺ y las cepas originales transformadas con los plásmidos pCg*PRX1-GFP.URA3* (pGE316) y pCg*PRX1-GFP NAT^R* (pGFA1) se inocularon en 5 mL de medio Casaminoácidos (CAA) con los respectivos marcadores de selección, en agitación constante durante 24 horas a 30 °C. Los cultivos se diluyeron 50x en 5 mL de CAA y se colocaron en agitación constante a 30 °C. Determinamos la expresión de GFP en un citómetro BD FACS CaliburTM a las 0 (cultivos sin diluir), 2, 4 y 24 horas después de la dilución en medio fresco.

Resultados

***C. glabrata* se vuelve más resistente a FLC después de una exposición continua y prolongada: cepas evolucionadas**

Después de inducir la resistencia *in vitro* a FLC de poblaciones de *C. glabrata* bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos y en la Figura S1, encontramos que nuestros tres aislados se adaptan a las diferentes concentraciones de FLC. En este sentido, la cepa BG14 mantiene un crecimiento constante aún en las concentraciones más altas de FLC (128 y 256 $\mu\text{g/mL}$) mientras que el aislado A (resistente) es capaz de crecer hasta una concentración de 128 $\mu\text{g/mL}$. Por otro lado, el aislado B (sensible) crece a 32 $\mu\text{g/mL}$, pero no a 64 $\mu\text{g/mL}$. Sin embargo, sorprendentemente sí hubo crecimiento a las dos concentraciones más altas (128 y 256 $\mu\text{g/mL}$) lo que indica la aparición y selección de mutantes o variantes adaptativas (Figura 1).

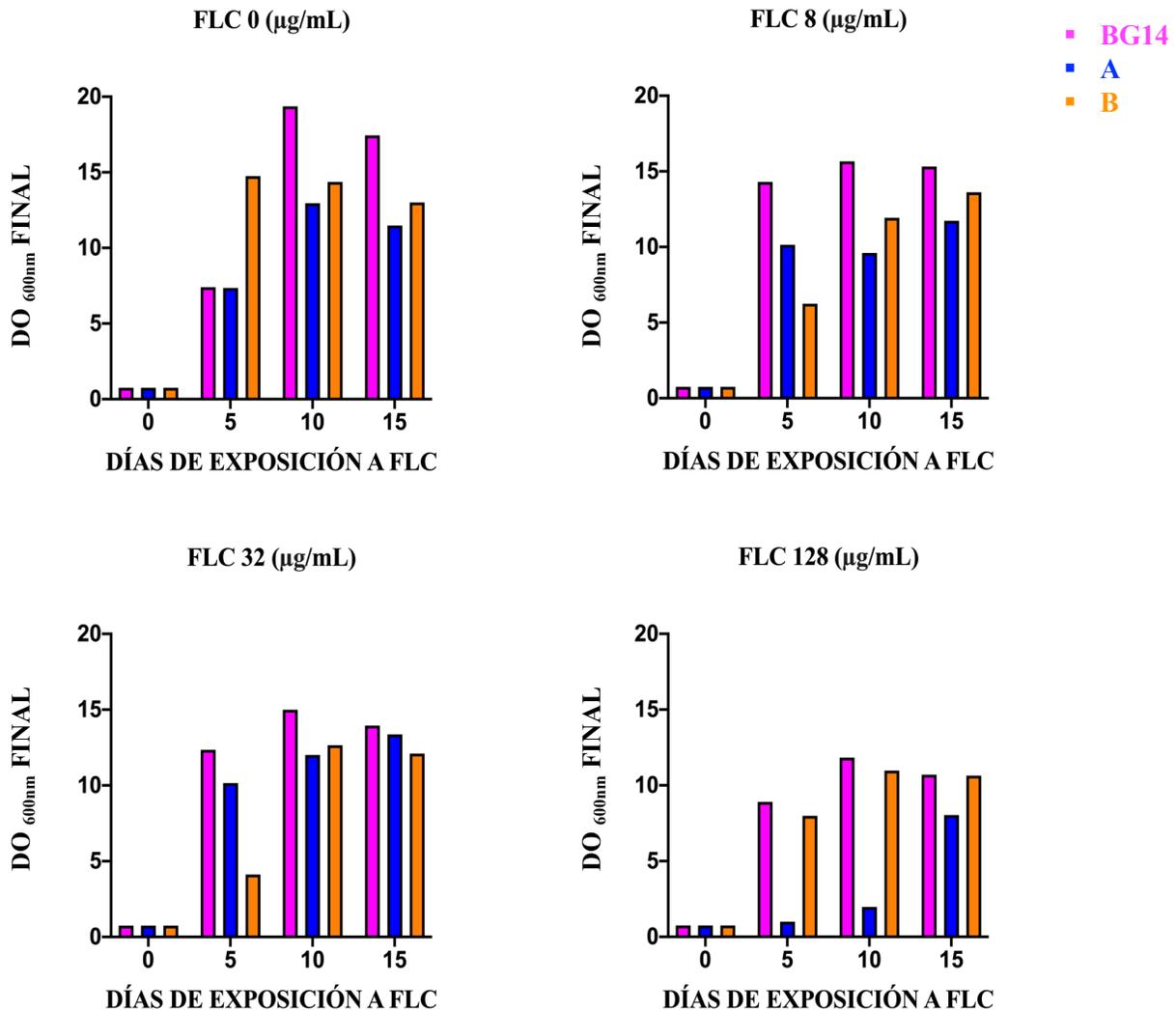


Figura 1. Crecimiento final (DO_{600nm}) de las distintas cepas después de 24 h de crecimiento en pozos con medio YPD con las concentraciones indicadas de FLC. Se utilizaron las cepas BG14 (cepa estándar del laboratorio) (barras rosas); aislado A (resistente a FLC) (barras azules) y el aislado B (sensible a FLC) (barras anaranjadas) y las muestras se tomaron a los 0, 5, 10 y 15 días para determinar la DO_{600nm} . Se muestra un experimento representativo.

La exposición crónica a FLC induce la evolución de *C. glabrata* hacia dos poblaciones

Con el objetivo de investigar los tipos de mutantes o variantes que se obtienen después de realizar 15 pases seriados en FLC (poblaciones evolucionadas), hicimos diluciones logarítmicas seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) y sembramos en medio rico sólido YPD 100 μ L de la dilución 10^{-5} de cada población evolucionada en las distintas concentraciones de FLC para obtener colonias aisladas. Después de 15 pases continuos, encontramos que para la cepa de referencia BG14 y para el aislado B, a una concentración de 8 μ g/mL, casi el 100% de mutantes resistentes a FLC corresponden a Variantes de Colonia Regular (RCV, por sus siglas en inglés); sin embargo, a una concentración de 32 μ g/mL de FLC, las cepas que crecen corresponden a Variantes de Colonia Pequeña (SCV, por sus siglas en inglés). Con respecto al aislado A, las SCVs surgen a partir de una concentración de 64 μ g/mL de FLC (datos no mostrados) y son más frecuentes en la concentración de 128 μ g/mL de FLC (Figura 2). Con la exposición continua a FLC observamos que estas variantes aparecen con mayor frecuencia a medida que incrementa el tiempo de exposición al fármaco hasta obtener casi un 100% con respecto a las variantes de colonia regular después de 15 días.

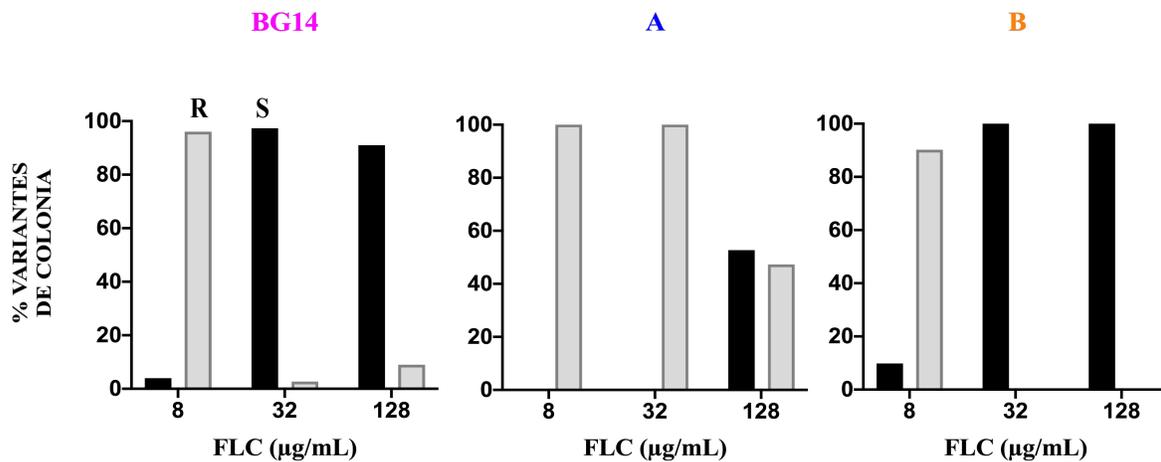


Figura 2. Las variantes de colonia pequeña surgen en distintas concentraciones de FLC. “S” se refiere a las variantes pequeñas (SCV) (columnas negras) y “R” a las variantes regulares (RCV) (columnas grises). Los datos mostrados corresponden a un promedio de 150 colonias obtenidas después de 15

pases continuos (15 días) en presencia de diferentes concentraciones de FLC (indicadas en el eje de las X).

Las mutantes evolucionadas en FLC pueden tener un fenotipo competente o deficiente para la respiración

Debido a que la pérdida de funciones mitocondriales se ha relacionado con la resistencia a FLC en *C. glabrata*, nos preguntamos si las mutantes resistentes que generamos después de una exposición crónica a FLC tienen una función respiratoria competente. Para esto, realizamos una prueba de crecimiento en glicerol como única fuente de carbono, que es una fuente no fermentable, y en la cual solo las células cuya función mitocondrial es silvestre crecen eficientemente. De esta manera clasificamos las variantes como resistentes a FLC en dos tipos: a) Gly⁻ (pérdida de la función mitocondrial) y b) Gly⁺ (función mitocondrial silvestre). Encontramos que para la cepa BG14 y el aislado B, las SCVs corresponden a un fenotipo Gly⁻ en las concentraciones de 8 y 32 µg/mL de FLC, pero no así del aislado A, del cual, solo a partir de una concentración de 128 µg/mL se generan estas mutantes Gly⁻. También encontramos mutantes más resistentes a FLC derivadas de todas las cepas, que no tienen ningún defecto en las funciones mitocondriales (Figura 3).

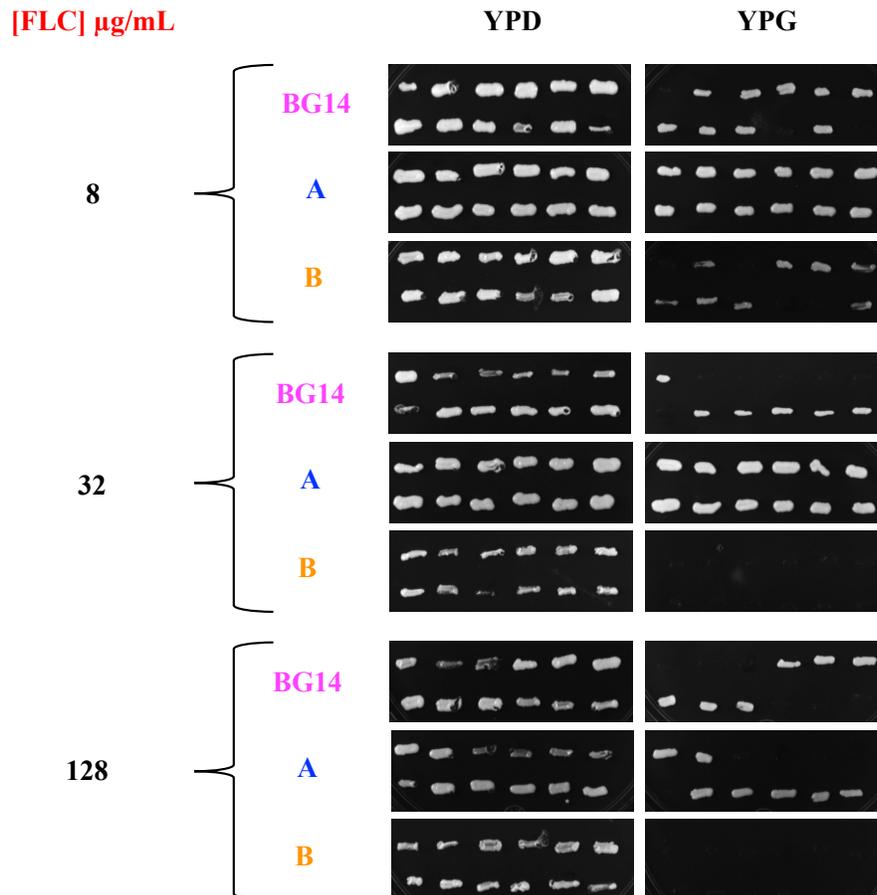


Figura 3. La exposición crónica a diferentes concentraciones de FLC genera dos tipos de mutantes resistentes (cepas evolucionadas). Después de 15 pases continuos en FLC aparecen mutantes Gly⁻ (cepas que no pueden utilizar fuentes no fermentables de carbono) de la cepa BG14 y del aislado B en concentraciones de 8 y 16 µg/mL de FLC, pero no del aislado A. En este aislado A, las mutantes Gly⁻ solo aparecen a 128 µg/mL. Se muestra el crecimiento de 12 colonias de cada aislado en medio rico con una fuente no fermentable de carbono, glicerol (YPG) y en medio con 8 µg/mL, 32 µg/mL y 128 µg/mL de FLC como se indica.

El fenotipo Gly⁻ casi siempre es estable en ausencia de la presión selectiva

Con la finalidad de evaluar la estabilidad del fenotipo Gly⁻, tomamos una colonia Gly⁻ de cada cepa y realizamos subcultivos (pases) diarios durante tres días en medio líquido YPD en ausencia del antifúngico para después determinar la competencia mitocondrial mediante ensayos de crecimiento en medio sólido con glicerol (YPG). Los resultados de este análisis (Figura 4) muestran que las mutantes evolucionadas Gly⁻ que derivan de la cepa BG14 y del aislado A no recuperan la función mitocondrial en este periodo de tiempo, es decir el fenotipo Gly⁻ es estable. De manera interesante, para el aislado B encontramos que la incompetencia respiratoria es inestable; es decir, algunas de las células Gly⁻ de este aislado pueden volver a tener una función mitocondrial silvestre (Gly⁺) (B1-2; revertante).

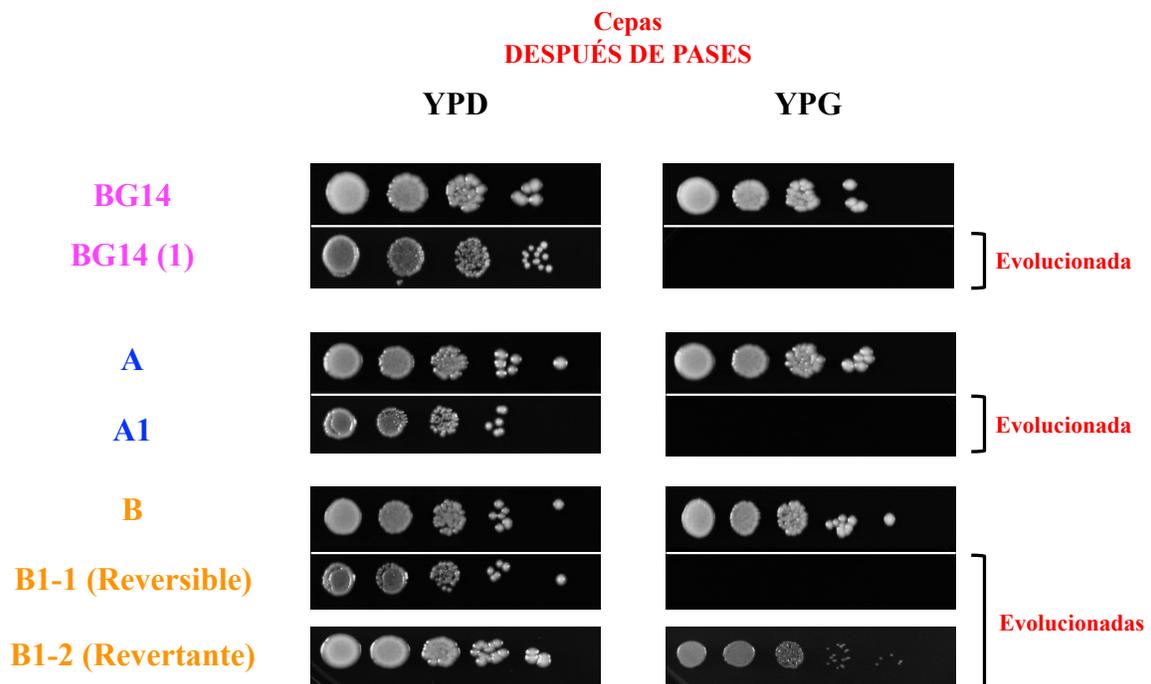
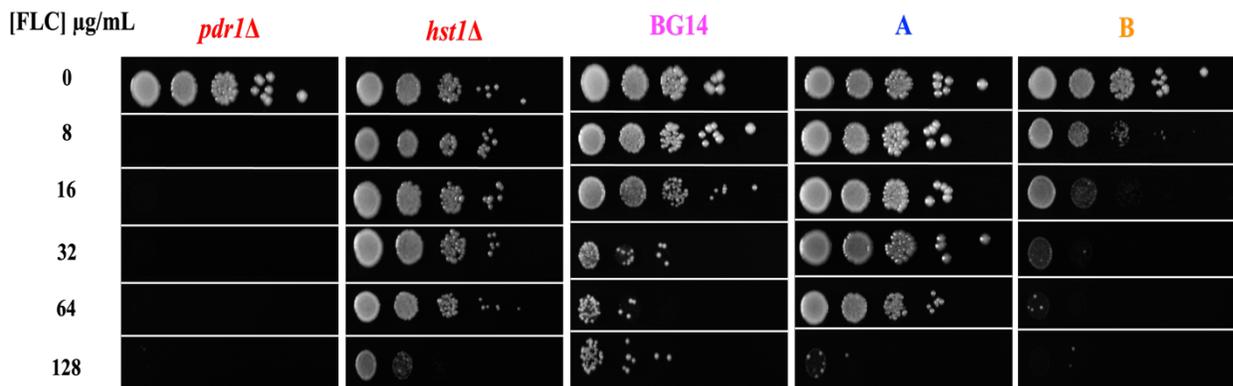


Figura 4. Las cepas evolucionadas resistentes a FLC y de fenotipo Gly⁻ no siempre son estables. El fenotipo Gly⁻ (incapacidad de crecer en una fuente no fermentable de carbono) en las mutantes evolucionadas de los aislados BG14 y A (resistente) es estable; es decir, no revierte después de subcultivar continuamente (3 pases) a las células en ausencia de FLC. Contrario a esto, las células del aislado B (sensible) pueden (cepa B1-2 revertante) o no (cepa B1), volver a ser competentes para la respiración en este mismo periodo de tiempo.

Las mutantes Gly⁻ evolucionadas tienen diferentes mecanismos de resistencia a FLC

Como se mencionó más arriba, en *C. glabrata* la pérdida de funciones respiratorias se relaciona positivamente con una mayor resistencia a FLC. Debido a esto, nos interesó investigar el perfil de susceptibilidad a FLC luego de tres pases en medio fresco para las mutantes Gly⁻ mediante ensayos de crecimiento en medio sólido YPD suplementado con FLC a las concentraciones de 8, 16, 32, 64 y 128 µg/mL. A partir de estos ensayos encontramos que en las mutantes derivadas de la cepa BG14 y del aislado A, el mecanismo que permite a las mutantes Gly⁻ ser resistentes a FLC no revierte en este periodo de tiempo (Figura 5b). Las dos mutantes analizadas mantienen una alta resistencia al fármaco, mayor incluso que la cepa usada como control resistente (*hst1Δ*) y las cepas parentales de las cuales derivan (Figura 5a). De manera interesante, la mutante B-1 que deriva del aislado B, pierde casi por completo la resistencia a FLC (Figura 5b). En cambio, la mutante B1-2 (revertante) de este mismo aislado mantiene el perfil de resistencia a FLC aún después de retirar la exposición al fármaco (Figura S3).

a) Aislados originales



b) Cepas evolucionadas

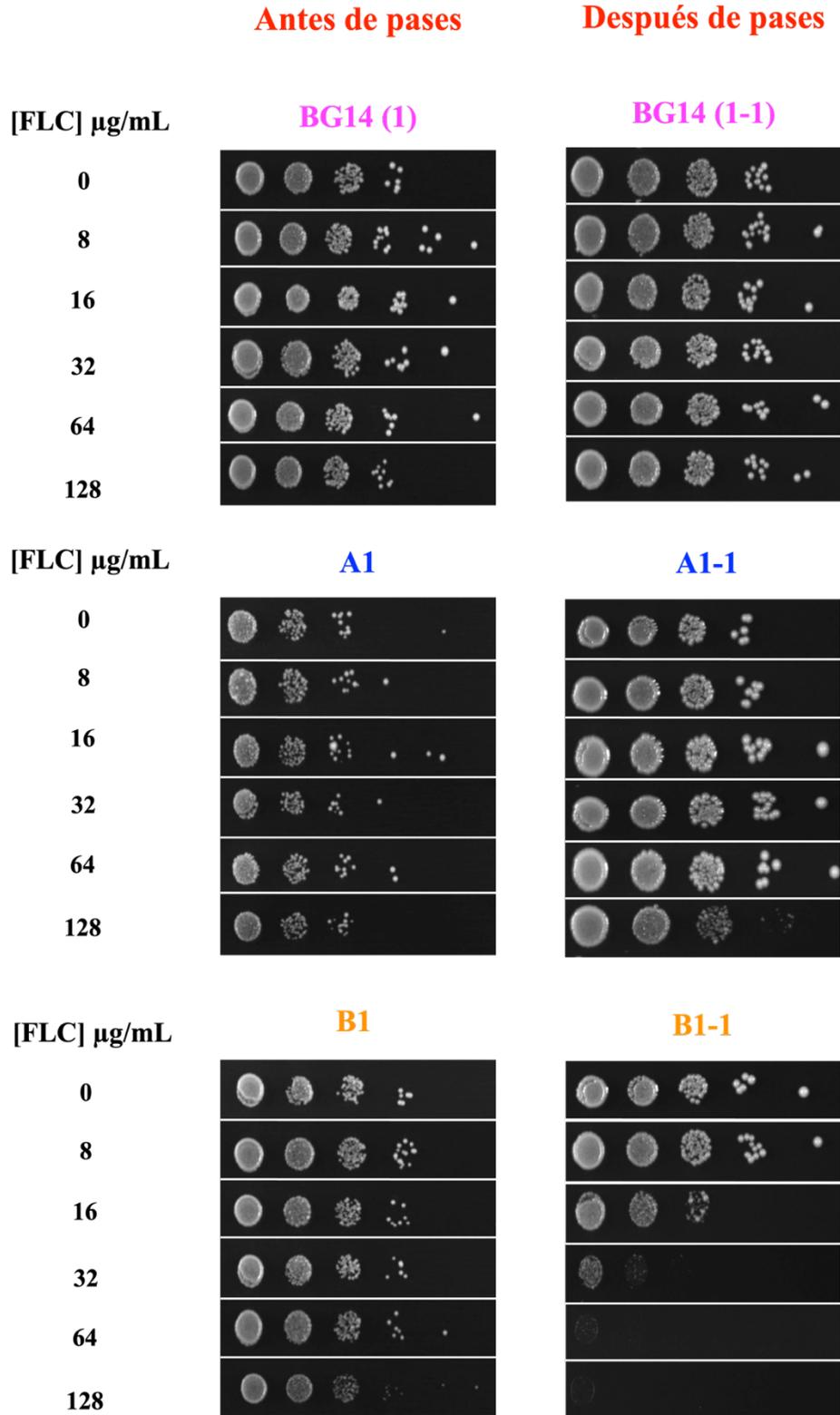
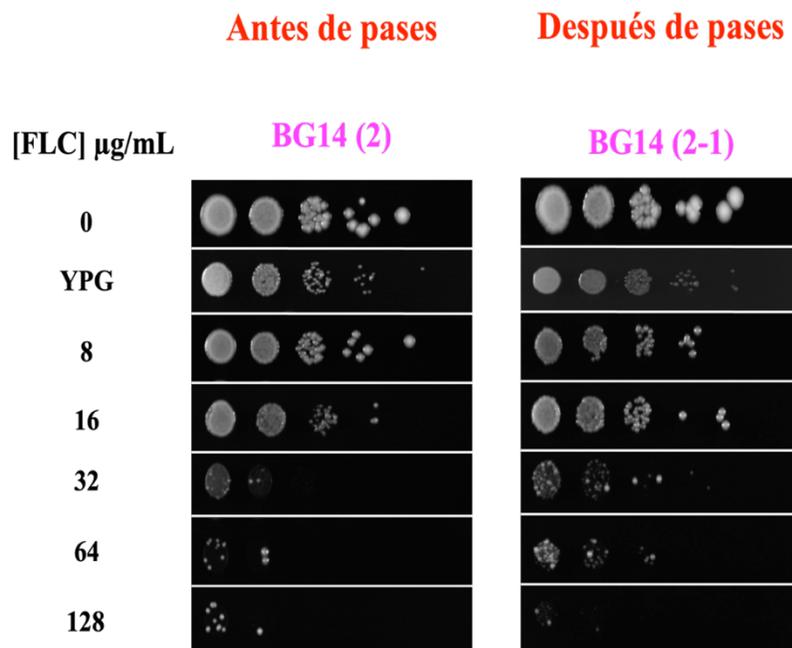


Figura 5. El mecanismo de resistencia a FLC en las mutantes Gly⁻ no se pierde del todo después de subcultivos seriados (3 pases) en ausencia del fármaco.

a) Se utilizaron como controles una mutante nula *pdr1Δ* (FLC^S) y una mutante *hst1Δ* (FLC^R). Además de las cepas parentales (no evolucionadas) de cada mutante Gly⁻. Se muestra un experimento representativo. b) Las tres mutantes Gly⁻ evolucionadas en FLC tienen una mayor resistencia al fármaco en comparación con los aislados originales de los que derivan. Las mutantes Gly⁻ que derivan de la cepa BG14 y el aislado A (resistente) mantienen la resistencia a FLC después de quitar la presión selectiva. En cambio, bajo las mismas condiciones, la mutante (B1-1) (Gly⁻) del aislado B (sensible) se vuelve menos resistente a FLC. Se muestra un experimento representativo.

Las mutantes Gly⁺ evolucionadas tienen un mecanismo de resistencia a FLC estable

Otro mecanismo que involucra una mayor resistencia a FLC son las mutaciones de ganancia de función en el regulador transcripcional *CgPdr1*. Así, con la exposición continua a FLC logramos obtener células más resistentes a este antifúngico que no tienen afectadas las funciones mitocondriales (mutantes Gly⁺ evolucionadas). Por tanto, nos interesó conocer la estabilidad del fenotipo de resistencia a FLC que se induce en estas variantes como respuesta a FLC después de subcultivarlas tres veces seguidas en medio fresco YPD sin la presión selectiva. Las tres mutantes evolucionadas que derivan de la cepa BG14 y de los aislados parentales A y B (resistente y sensible a FLC, respectivamente) mantuvieron el perfil de susceptibilidad aumentado a FLC después de subcultivarlas en medio fresco YPD (Figura 6).



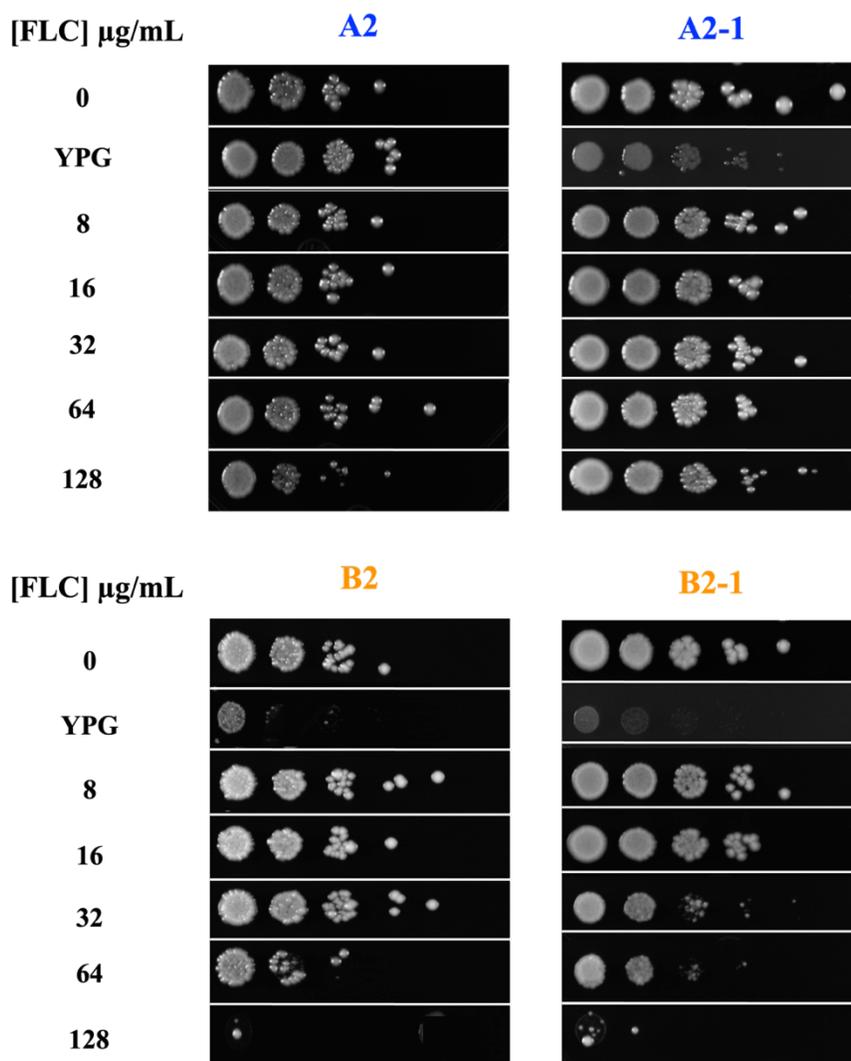


Figura 6. El mecanismo de resistencia a FLC en las mutantes Gly⁺ es estable después de los subcultivos seriados (3 pases) en ausencia del fármaco. Las tres cepas evolucionadas Gly⁺ mantienen la resistencia incrementada a FLC después de crecer en medio fresco sin la presencia del fármaco. Se muestra un experimento representativo. Los controles de las cepas de las cuales derivan (no evolucionadas) son los mismos de la Figura 5a.

El fenotipo Gly⁻ en las mutantes evolucionadas está relacionado con la pérdida de ADN mitocondrial

Se ha demostrado que diferentes especies de levaduras, entre ellas *C. glabrata* y *S. cerevisiae*, pierden el genoma mitocondrial como un mecanismo de respuesta a la exposición a FLC. Por esta razón, decidimos detectar la presencia del gen COX3 codificado en el genoma mitocondrial, que se asocia con pérdida del genoma mitocondrial, en las mutantes evolucionadas Gly⁻ y Gly⁺ que generamos después de

exponer de a FLC a nuestros aislados clínicos y a nuestra cepa de referencia en el laboratorio. A diferencia de los aislados parentales y de las mutantes derivadas competentes para la respiración (Gly⁺), las mutantes con fenotipo Gly⁻ pierden casi por completo el genoma mitocondrial después de la exposición prolongada a FLC. La Figura 7 muestra en los carriles 3, 6 y 9 una banda muy tenue que corresponde a las muestras de ADN aisladas de las mutantes Gly⁻ de la cepa BG14 y los aislados A y B; sin embargo, esta banda no es perceptible en carril 11 que corresponde a las células Gly⁻ de la cepa BG14 obtenidas previamente en nuestro laboratorio mediante el tratamiento con Bromuro de Etidio (EtBr).

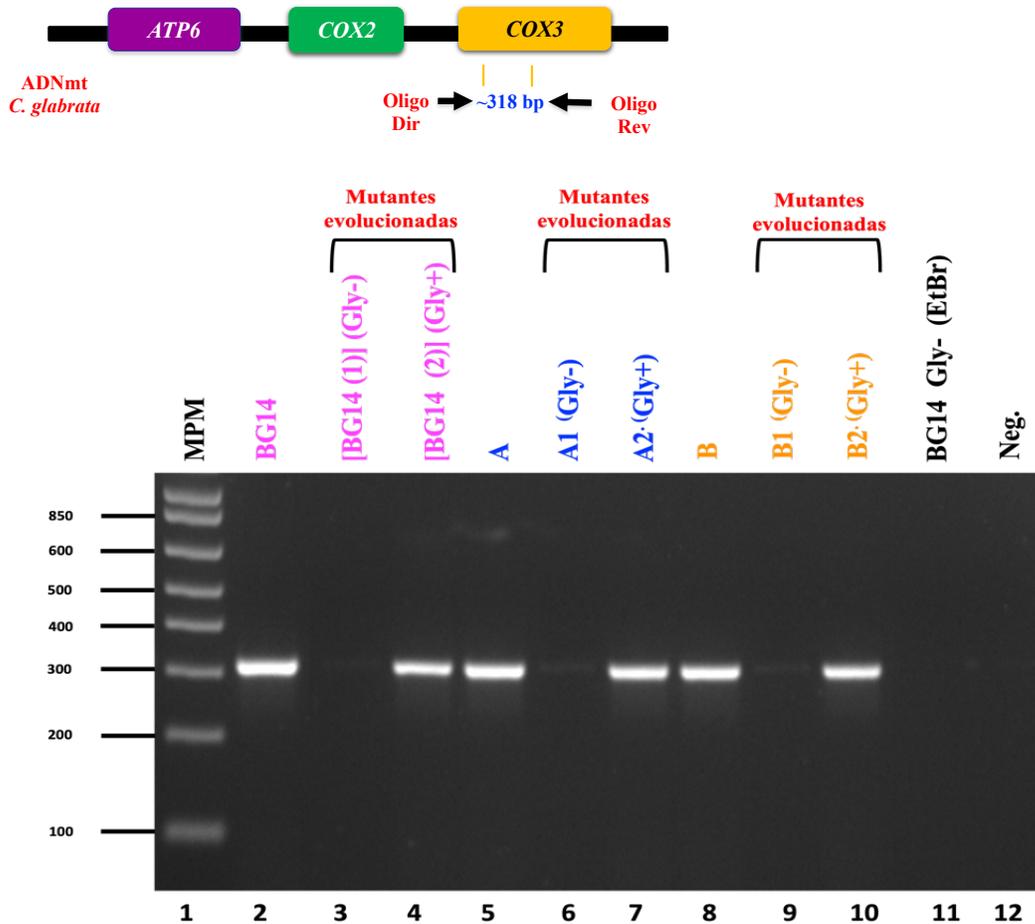
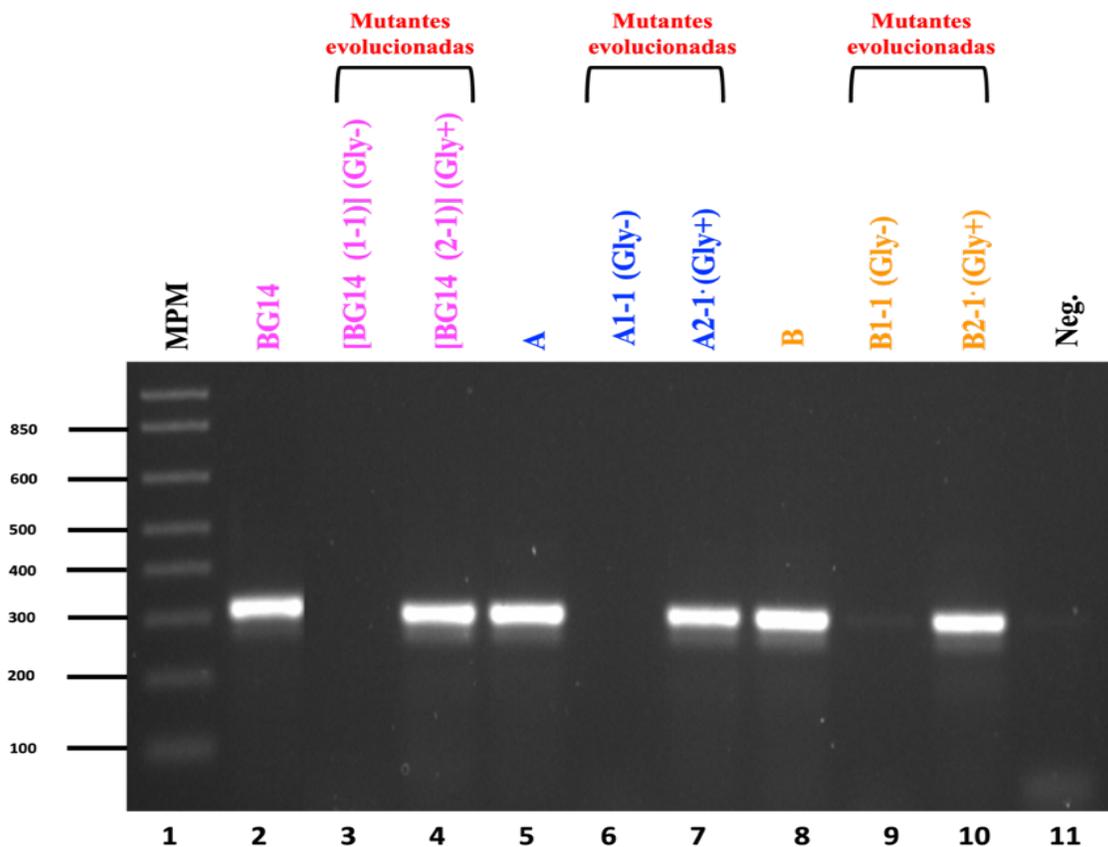


Figura 7. Detección de ADN mitocondrial (gen *COX3*) en cepas de *C. glabrata* resistentes a FLC. Un fragmento del gen *COX3* codificado en el genoma mitocondrial se amplificó mediante PCR utilizando como molde ADN genómico purificado de los aislados clínicos parentales de *C. glabrata* y sus derivados evolucionados en FLC con fenotipos Gly⁻ y Gly⁺ (no competentes para la respiración y competentes para respiración respectivamente) como se indica.

La pérdida de ADN mitocondrial por exposición crónica a FLC casi siempre es estable

En otras especies de hongos como *Schizosaccharomyces pombe*, se demostró que la resistencia adquirida a un xenobiótico es reversible cuando una población resistente se cultiva en ausencia del compuesto. Por lo tanto, nos interesó analizar la presencia o ausencia de ADN mitocondrial (gen COX3) en las mutantes resistentes a FLC con fenotipo Gly⁻ después de hacer tres pases en serie en medio fresco y en ausencia del fármaco. Como lo muestra la Figura 8a, las mutantes Gly⁻ derivadas de los aislados A y B, así como de nuestra cepa de referencia, no recuperan el ADN mitocondrial después de retirar la presión selectiva del medio, como era de esperarse. Sin embargo, la mutante que revirtió al fenotipo Gly⁺, que provenía del aislado B evolucionado Gly⁻ (reversible) muestra presencia de ADN mitocondrial una vez que dejó de estar expuesta a FLC (Figura 8b).

a) Cultivos en fase logarítmica



b) Cepas derivadas del aislado B

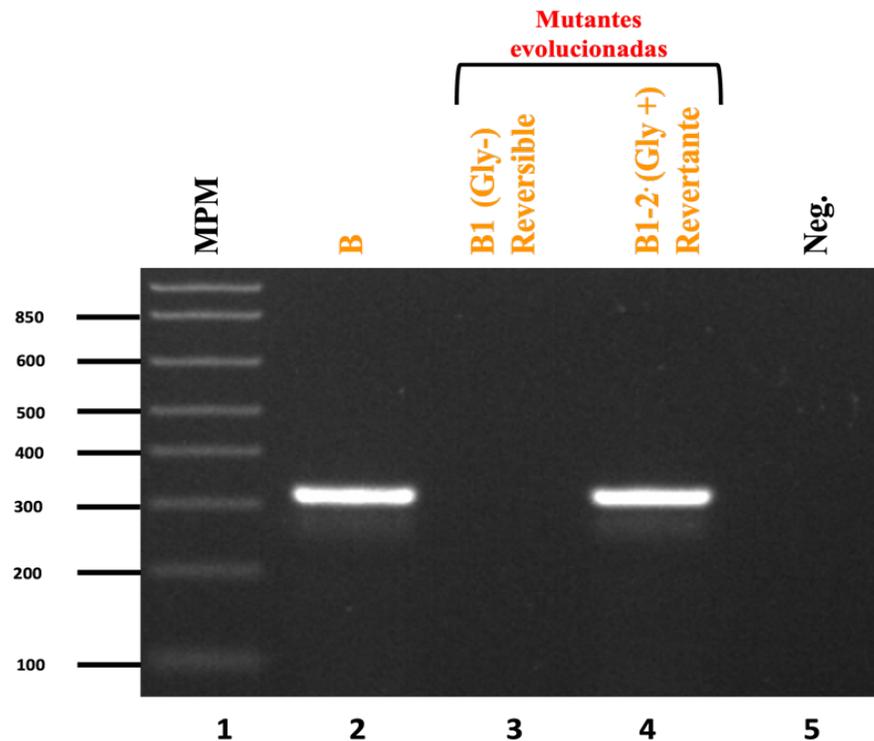


Figura 8. Amplificación del gen mitocondrial COX3 de *C. glabrata* en las mutantes evolucionadas Gly⁻ y Gly⁺ y subcultivadas repetidamente (3 pases) en ausencia de FLC. a) Luego de subcultivar sucesivamente en medio fresco sin FLC, las mutantes Gly⁻ derivadas de cada aislado no recuperan el ADN mitocondrial. b) Una mutante Gly⁻ que revirtió a Gly⁺, derivada del aislado B muestra presencia de ADN mitocondrial después de los pases secuenciales en medio YPD sin FLC.

Las mutantes Gly⁻ evolucionadas en FLC carecen de estructuras mitocondriales

Debido a los resultados obtenidos en nuestros experimentos para determinar el contenido de ADNmt, nos interesó realizar un análisis más a detalle de la estructura mitocondrial de las mutantes Gly⁻ evolucionadas. Tal como se describe en Materiales y Métodos, utilizamos un plásmido que expresa constitutivamente una proteína mitocondrial (Prx1) que en *S. cerevisiae* se localiza en el espacio intermembranal de la mitocondria, fusionada traduccionalmente en el C-terminal a GFP. Los resultados de este análisis en *C. glabrata* se muestran en la Figura 9 y se observa que la señal de GFP se localiza correctamente en las mitocondrias de las mutantes evolucionadas Gly⁺ y en los aislados originales. Sin embargo, en ninguna de las mutantes Gly⁻ es posible observar la proteína fluorescente.

Para descartar que la pérdida del plásmido fuera una posible causa de este resultado, realizamos dos ensayos: 1) ensayo de citometría de flujo para evaluar los niveles de fluorescencia en cultivos en fase logarítmica (tiempos 0, 2 y 4 h después de inocular en medio fresco) y en fase estacionaria (24 h de cultivo) en las mutantes Gly⁻ y Gly⁺, además de los aislados parentales (A y B), y 2) ensayos de PCR para amplificar las secuencias del vector que contiene la proteína de fusión Prx1-GFP. Encontramos que solo las células Gly⁺ poseen fluorescencia mientras que las células Gly⁻ no presentan fluorescencia detectable (Figura 10). Cabe destacar que los niveles de fluorescencia durante la fase estacionaria se mantuvieron muy similares a los de la fase logarítmica para todas las cepas (Tabla S5). Además, utilizamos un juego de oligonucleótidos (Tabla S3) para amplificar la secuencia completa de GFP y, como molde, el ADN genómico aislado de las mutantes evolucionadas Gly⁻ y Gly⁺ que derivan de la cepa de referencia BG14. Únicamente en las muestras correspondientes a la cepa Gly⁺ y el aislado original BG14 fue posible visualizar el producto de PCR esperado de aproximadamente 717 pb (Figura S5).

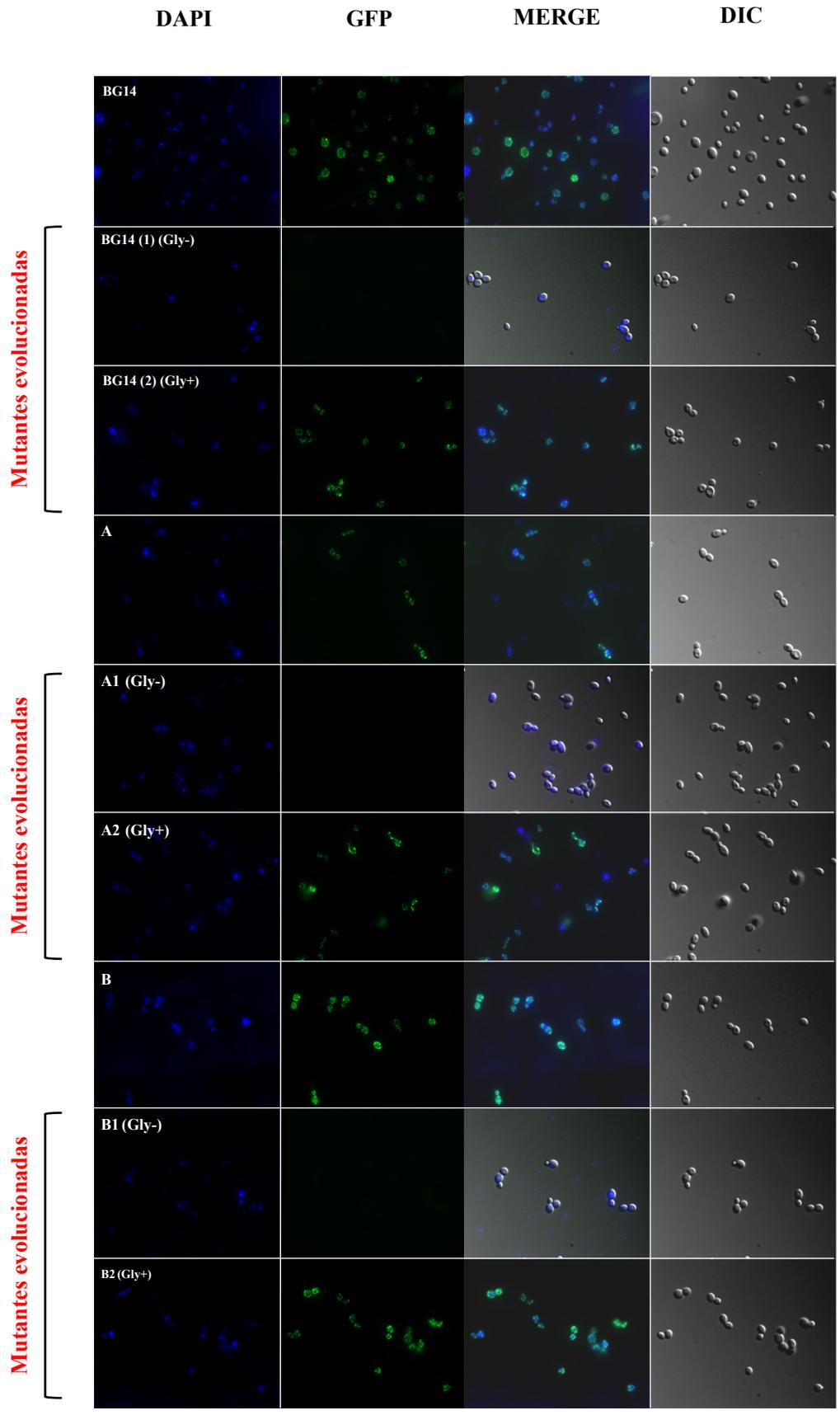
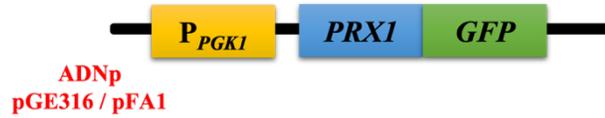


Figura 9. Micrografías de *C. glabrata* para observar la morfología y la estructura mitocondrial. Células de *C. glabrata* con tinción DAPI, GFP, DIC y el sobrelape. Las mutantes Gly⁺ y los aislados originales se observa la señal de GFP que localiza en las mitocondrias, pero no así en las mutantes Gly⁻ evolucionadas en FLC.



a) Cepas después de los pases

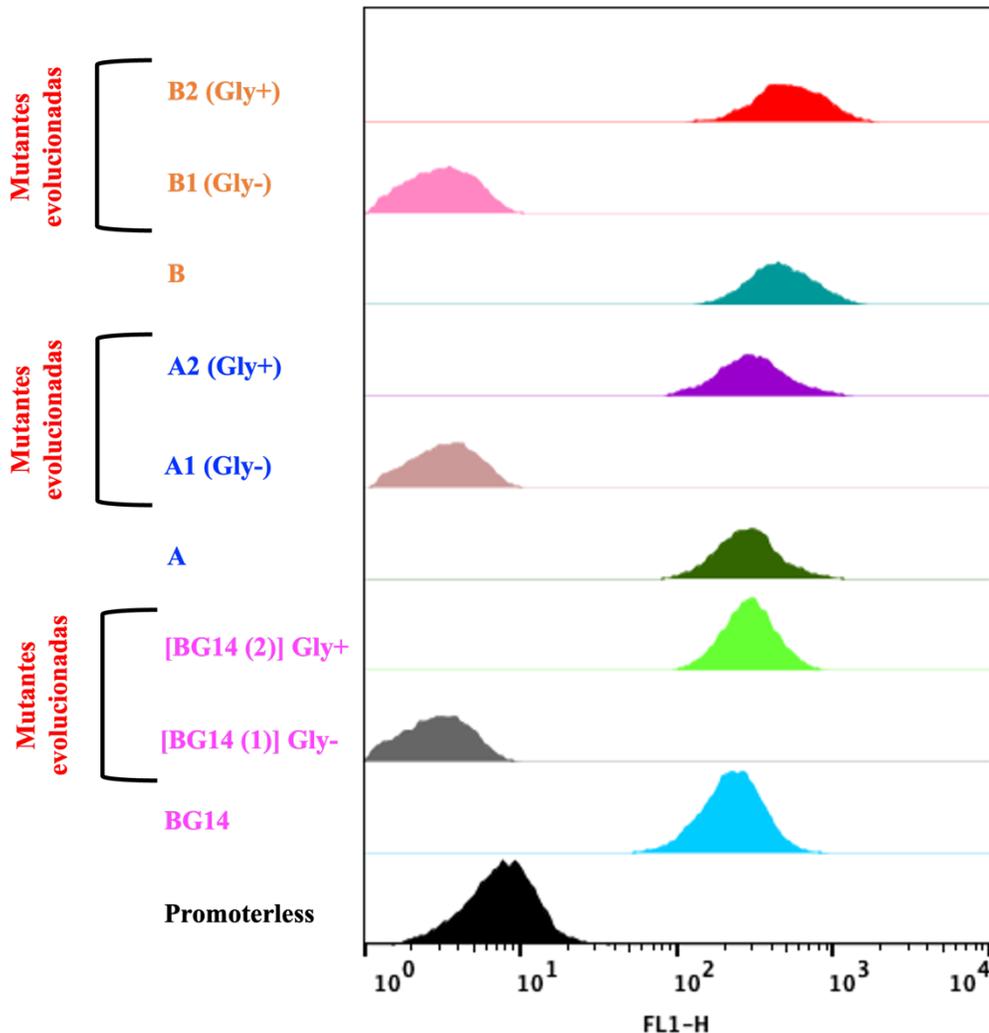


Figura 10. Detección de los niveles de fluorescencia en las mutantes evolucionadas en FLC y en los aislados parentales. Se muestran los histogramas correspondientes a los cultivos de 24 h sin diluir (a) y estos mismos cultivos en fase logarítmica (2 h) (b). Para la cepa BG14 y sus derivados se utilizó el plásmido pGE316 con el marcador de selección *URA3*, mientras que para los aislados A (resistente) y B (sensible), y sus derivados, se utilizó el plásmido pFA1 con marcador de selección NAT.

Discusión

Si bien *C. glabrata* habita de manera natural en los individuos sanos, el incremento en el uso de antifúngicos, principalmente de aquellos basados en moléculas de tipo azol como el FLC, han permitido la aparición y selección de aislados de *C. glabrata* más resistentes. Cabe resaltar que, entre las especies de este género, *C. glabrata* tiene una menor susceptibilidad innata contra los compuestos de esta clase [14,15]. En este trabajo nos interesó conocer los procesos relacionados con la adquisición de resistencia a FLC que se desarrollan en aislados clínicos de *C. glabrata*. Para ello, diseñamos un experimento de evolución *in vitro* en el cual subcultivamos repetidamente durante 15 días tres cepas de *C. glabrata* en distintas concentraciones de FLC.

Demostramos que la exposición prolongada a FLC permite la selección y aparición de poblaciones de *C. glabrata* que se caracterizan por tener una resistencia incrementada a este fármaco. Nuestros resultados coinciden con los de estudios anteriores sobre una mayor resistencia a FLC en *C. glabrata* después de una exposición crónica. En este sentido, pese a la MIC₅₀ determinada anteriormente en nuestro laboratorio [37,38], los tres aislados de *C. glabrata* tienen un crecimiento distintivo en el gradiente de concentraciones FLC que utilizamos. Lo anterior sugiere que las células de *C. glabrata* activan mecanismos distintos para adaptarse a la actividad fungistática del FLC. Esto resalta la importancia de conocer más a fondo los procesos relacionados con la resistencia, sobre todo, en ambientes intrahospitalarios en donde la mayoría de los pacientes dejan de responder al tratamiento debido a la aparición de variantes más resistentes.

Encontramos dos tipos de poblaciones de *C. glabrata* más resistentes a FLC: 1) variantes de colonia pequeña (SCVs) y 2) variantes de colonia regular (RCVs). Las SCVs surgen a partir de concentraciones relativamente bajas de FLC y la frecuencia de aparición de estas variantes va en aumento a medida que incrementa la concentración de FLC (Figura 2). De manera interesante, la evolución de *C. glabrata* hacia poblaciones fenotípicamente distintas no es exclusivo para FLC. Recientemente se demostró que en presencia de CSP, esta levadura evoluciona hacia dos poblaciones con fenotipos de variantes de colonia regular y pequeña [36].

A este respecto, la exposición continua de los tres aislados a dosis subletales de FLC generó células incapaces de crecer en glicerol, las cuales corresponden a las células con fenotipo SCV (Figura 3) y las denominamos cepas evolucionadas Gly⁻. El fenotipo de la pérdida de las funciones mitocondriales ya se ha asociado con la resistencia a FLC en *C. glabrata*. En algunos casos, se ha demostrado que las células Gly⁻ de *C. glabrata* reversionan a una función respiratoria silvestre una vez

que se ha retirado la presión selectiva del medio de cultivo [18], y a este respecto nosotros encontramos que nuestras mutantes Gly⁻ evolucionadas que derivan de la cepa BG14 y del aislado A no fueron capaces de revertir el fenotipo Gly⁻ después de subcultivar sin FLC. En cambio, en el aislado B encontramos cepas evolucionadas Gly⁻ estables (que permanecen Gly⁻ después de los pases como los derivados de la cepa BG14 y el aislado resistente), pero también encontramos una mutante evolucionada que sí revertió el fenotipo Gly⁻ a Gly⁺ (denominada B1-2). Esta mutante B1-2 (revertante) sí es una cepa derivada del aislado sensible y no una contaminación, dado que el patrón de los marcadores de ADN minisatélites en el gen *EPA1* es igual al patrón característico del aislado parental (Figura S6).

También encontramos células evolucionadas resistentes a FLC que mantienen una función respiratoria competente y las denominamos mutantes evolucionadas Gly⁺. En este sentido, las mutantes resistentes a CSP aisladas por Duxbury y colaboradores son similares, ya que las SCVs que surgen por la exposición continua a CSP no tienen comprometidas las funciones respiratorias [36]. En estas mutantes que no tienen defectos en la respiración, es probable que la resistencia incrementada a FLC se deba a la regulación al alza de los transportadores de fármacos, posiblemente por mutaciones de ganancia de función en el factor de transcripción Pdr1.

También la estabilidad del fenotipo de resistencia a FLC en las mutantes Gly⁻ y Gly⁺ y el de la cepa revertante es diferente en cada caso. A diferencia de las mutantes Gly⁻ evolucionadas de la cepa BG14 y del aislado A, la mutante B1-1 (Gly⁻ no reversible) perdió parcialmente la resistencia al fármaco (Figura 5c). Esto sugiere que esta mutante posee mecanismos epigenéticos para mediar la resistencia a FLC, a diferencia de las mutantes Gly⁻ de la cepa BG14 y del aislado A. Sorprendentemente, la mutante B1-2 (revertante Gly⁺) mantuvo la resistencia a FLC en comparación con el aislado parental (Figura S3). Por otro lado, ninguna de las tres mutantes evolucionadas Gly⁺ que analizamos perdió la resistencia a FLC después de crecer en ausencia del fármaco (Figura 6b). En conjunto, estos datos indican que la resistencia a FLC adquirida en *C. glabrata* se puede deber a al menos dos mecanismos: a) un estado respiratorio deficiente, y b) a alguna mutación, posiblemente del tipo de ganancia de función en *CgPdr1* tal como se ha descrito con anterioridad en *C. glabrata* [18,28,39,24,35].

Como es de esperarse, a diferencia de las mutantes Gly⁺ y de los aislados originales, la ausencia de funciones respiratorias se relaciona con la ausencia de ADN mitocondrial. Hasta ahora se han descrito tres tipos de mutantes *petite* (Gly⁻) (Tabla S4) [33] y, de acuerdo con los resultados mostrados en la Figura 7, nuestras

mutantes Gly⁻ evolucionadas corresponden a un fenotipo ρ^0 (ausencia de ADN mitocondrial).

En *S. cerevisiae* se ha demostrado que existe una vía de comunicación retrógrada entre la mitocondria y el núcleo, en la cual un estado funcional de la mitocondria es esencial para la activación (o no) de los genes de respuesta a fármacos [40,41,42]. Nosotros proponemos que en presencia de FLC, algunas células de *C. glabrata* tienen una delección del ADN y/o una pérdida de la función mitocondrial y estas mutantes Gly⁻ de *C. glabrata* activan una vía de señalización similar a la de *S. cerevisiae* para inducir en el núcleo la expresión de genes de respuesta a FLC, como son los que codifican las bombas de transporte de fármacos *CgCDR1*, *CgCDR2* y *CgSNQ2*. Cabe señalar que las mutantes Gly⁻ evolucionadas carecen de mitocondrias funcionales al menos al caracterizarlas por microscopía usando la fusión de la proteína mitocondrial Prx1 con GFP, pero no así las mutantes Gly⁺ evolucionadas ni los aislados parentales.

Además, es interesante que pese a que la mayoría de las mutantes Gly⁻ no pueden volver a tener una función respiratoria silvestre (Figura 8a), la presencia de una banda de amplificación del gen *COX3* muy tenue en las muestras que corresponden a las mutantes Gly⁻ de los tres aislados nos sugiere que en estas poblaciones hay algunas células que no han perdido el genoma mitocondrial como suponemos, lo cual explicaría nuestro hallazgo de una revertante, que después de tres pases en serie recuperó el ADN mitocondrial y la capacidad de crecer en glicerol como fuente de carbono (Figura 8b). Es posible que las pocas células que aún conservan el ADN mitocondrial empezaron a crecer más rápido durante los pases, que las que lo han perdido y, al final, las células con ADN mitocondrial conformaron la mayoría del cultivo. Así mismo, se ha demostrado que algunos procesos epigenéticos están involucrados en la regulación de la resistencia a xenobióticos [43,44]. Este podría ser el caso de la mutante B1-2 proveniente del aislado B cuya resistencia a FLC se perdió después de subcultivos continuos en ausencia del fármaco (Figura 5).

Anteriormente se ha reportado que la susceptibilidad reducida a FLC en *C. glabrata* se debe una mutación en genes codificados en el núcleo que tienen papeles importantes para la función mitocondrial [18,34,35]. Algunas de estas variantes deficientes en la función mitocondrial pueden revertir del fenotipo deficiente para la respiración a uno competente al retirar la exposición a FLC. Por tanto, sería interesante investigar más a fondo si *C. glabrata* posee un mecanismo para perder de manera reversible la función mitocondrial y, puesto que no siempre implica la pérdida del genoma mitocondrial, esto le permitiría a esta levadura cambiar exitosamente de un estado de competencia mitocondrial a uno de

incompetencia para responder de forma adecuada a concentraciones letales de FLC.

En este trabajo encontramos que la exposición prolongada a FLC permite la selección de subpoblaciones de *C. glabrata* más resistentes a este medicamento. Es importante mencionar que se ha reportado la existencia de aislados de *C. glabrata* resistentes a FLC con resistencia cruzada a otros antifúngicos de la misma clase, como voriconazol y posaconazol o la resistencia cruzada a equinocandinas, como anidulafungina y CSP [45,46,47]. Pese a estos hallazgos, aún no está claro cómo funcionan los procesos involucrados en la multiresistencia en *C. glabrata*. Por ello es de vital importancia estudiar más a fondo los procesos relacionados con la adquisición de resistencia a fármacos, así como la participación de otros factores de virulencia que *C. glabrata* desarrolla para adaptarse a los microambientes dentro de su hospedero mamífero.

Conclusiones

- La exposición prolongada a FLC permite la selección y aparición de variantes de colonia que se caracterizan por tener una resistencia incrementada a este fármaco.
- La frecuencia de aparición SCVs en la cepa BG14 y el aislado B aumenta conforme aumenta la concentración de FLC.
- La exposición continua de los tres aislados a dosis subletales de FLC generó mutantes incapaces de crecer en glicerol (Gly⁻) y mutantes con función respiratoria competente (Gly⁺).
- La resistencia incrementada a FLC está ligada principalmente a la pérdida de funciones mitocondriales y a las mutaciones estables.
- El fenotipo Gly⁻ no siempre es estable.
- El fenotipo FLC-R de las mutantes Gly⁻ de la cepa BG14 y del aislado A es estable.
- Las mutantes Gly⁻ evolucionadas en FLC de los tres aislados de *C. glabrata* carecen de mitocondrias funcionales.

Bibliografía

1. Kullberg, B.J.; Arendrup, M.C. Invasive Candidiasis. *New England Journal of Medicine* 2015, 373, 1445–1456.
2. Zhang, W.; Song, X.; Wu, H.; Zheng, R. Epidemiology, Risk Factors and Outcomes of Candida Albicans vs. Non-Albicans Candidaemia in Adult Patients in Northeast China. *Epidemiol Infect* 2019, 147.
3. Kurtzman, C.P. Phylogenetic Circumscription of Saccharomyces, Kluyveromyces and Other Members of the Saccharomycetaceae, and the Proposal of the New Genera Lachancea, Nakaseomyces, Naumovia, Vanderwaltozyma and Zygorhizula. *FEMS Yeast Res* 2003, 4, 233–245.
4. Gabaldón, T.; Carreté, L. The Birth of a Deadly Yeast: Tracing the Evolutionary Emergence of Virulence Traits in Candida Glabrata. *FEMS Yeast Res* 2016, 16.
5. Gabaldón, T.; Martin, T.; Marcet-Houben, M.; Durrens, P.; Bolotin-Fukuhara, M.; Lespinet, O.; Arnais, S.; Boissard, S.; Aguilera, G.; Atanasova, R.; et al. Comparative Genomics of Emerging Pathogens in the Candida Glabrata Clade. *BMC Genomics* 2013, 14.
6. Xu, Z.; Green, B.; Benoit, N.; Schatz, M.; Wheelan, S.; Cormack, B. De Novo Genome Assembly of Candida Glabrata Reveals Cell Wall Protein Complement and Structure of Dispersed Tandem Repeat Arrays. *Mol Microbiol* 2020, 113, 1209–1224.
7. de Las Peñas, A.; Pan, S.J.; Castaño, I.; Alder, J.; Cregg, R.; Cormack, B.P. Virulence-Related Surface Glycoproteins in the Yeast Pathogen Candida Glabrata Are Encoded in Subtelomeric Clusters and Subject to RAP1- and SIR-Dependent Transcriptional Silencing. *Genes Dev* 2003, 17, 2245–2258.
8. Castaño, I.; Pan, S.J.; Zupancic, M.; Hennequin, C.; Dujon, B.; Cormack, B.P. Telomere Length Control and Transcriptional Regulation of Subtelomeric Adhesins in Candida Glabrata. *Mol Microbiol* 2005, 55, 1246–1258.
9. López-Fuentes, E.; Gutiérrez-Escobedo, G.; Timmermans, B.; Dijck, P. van; Peñas, A.D. las; Castaño, I. Candida Glabrata's Genome Plasticity Confers a Unique Pattern of Expressed Cell Wall Proteins. *Journal of Fungi* 2018, 4.
10. Cormack, B.P.; Melillo, J.M.; Kicklighter, D.W.; McGuire, A.D.; Ghori, N. *An Adhesin of the Yeast Pathogen Candida Glabrata Mediating Adherence to Human Epithelial Cells*; CRC Press, 1999; Vol. 16.
11. De Groot, P.W.J.; Kraneveld, E.A.; Qing, Y.Y.; Dekker, H.L.; Groß, U.; Crielaard, W.; de Koster, C.G.; Bader, O.; Klis, F.M.; Weig, M. The Cell Wall of the Human Pathogen Candida Glabrata: Differential Incorporation of Novel Adhesin-like Wall Proteins. *Eukaryot Cell* 2008, 7, 1951–1964.
12. Martínez-Jiménez, V.; Ramírez-Zavaleta, C.Y.; Orta-Zavalza, E.; Díaz de León, G.; Gutiérrez-Escobedo, G.; Ponce de León, A.; Sifuentes-Osornio, J.; Bobadilla del Valle, M.; de Las Peñas, A.; Castaño, I. Sir3 Polymorphisms in Candida Glabrata Clinical Isolates. *Mycopathologia* 2013, 175, 207–219.
13. Torres-Tirado, D.; Knabb, M.; Castaño, I.; Patrón-Soberano, A.; de Las Peñas, A.; Rubio, R. Candida Glabrata Binds to Glycosylated and Lectinic Receptors on the Coronary Endothelial Luminal Membrane and Inhibits Flow Sense and Cardiac Responses to Agonists. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2016, 310, R24–R32.

14. González, G.M.; Elizondo, M.; Ayala, J. Trends in Species Distribution and Susceptibility of Bloodstream Isolates of *Candida* Collected in Monterrey, Mexico, to Seven Antifungal Agents: Results of a 3-Year (2004 to 2007) Surveillance Study. *J Clin Microbiol* 2008, *46*, 2902–2905.
15. Martínez-Herrera, E.; Frías-De-león, M.G.; Hernández-Castro, R.; García-Salazar, E.; Arenas, R.; Ocharan-Hernández, E.; Rodríguez-Cerdeira, C. Antifungal Resistance in Clinical Isolates of *Candida Glabrata* in Ibero-America. *Journal of Fungi* 2022, *8*.
16. Zimbeck, A.J.; Iqbal, N.; Ahlquist, A.M.; Farley, M.M.; Harrison, L.H.; Chiller, T.; Lockhart, S.R. FKS Mutations and Elevated Echinocandin MIC Values among *Candida Glabrata* Isolates from U.S. Population-Based Surveillance. *Antimicrob Agents Chemother* 2010, *54*, 5042–5047.
17. Alexander, B.D.; Johnson, M.D.; Pfeiffer, C.D.; Jiménez-Ortigosa, C.; Catania, J.; Booker, R.; Castanheira, M.; Messer, S.A.; Perlin, D.S.; Pfaller, M.A. Increasing Echinocandin Resistance in *Candida Glabrata*: Clinical Failure Correlates with Presence of FKS Mutations and Elevated Minimum Inhibitory Concentrations. *Clinical Infectious Diseases* 2013, *56*, 1724–1732.
18. Kaur, R.; Castaño, I.; Cormack, B.P. Functional Genomic Analysis of Fluconazole Susceptibility in the Pathogenic Yeast *Candida Glabrata*: Roles of Calcium Signaling and Mitochondria. *Antimicrob Agents Chemother* 2004, *48*, 1600–1613.
19. Vu, B.G.; Thomas, G.H.; Moye-Rowley, W.S. Evidence That Ergosterol Biosynthesis Modulates Activity of the Pdr1 Transcription Factor in *Candida Glabrata*. *mBio* 2019, *10*.
20. Pfaller, M.A.; Andes, D.R.; Diekema, D.J.; Horn, D.L.; Reboli, A.C.; Rotstein, C.; Franks, B.; Azie, N.E. 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* 2014, *9*.
21. Marichal, P.; vanden Bossche, H.; Odds, F.C.; Nobels, G.; Warnock, D.W.; Timmerman, V.; van Broeckhoven, C.; Fay, S.; Mose-Larsen, P. *Molecular Biological Characterization of an Azole-Resistant Candida Glabrata Isolate*; 1997; Vol. 41.
22. Nakayama, H.; Tanabe, K.; Bard, M.; Hodgson, W.; Wu, S.; Takemori, D.; Aoyama, T.; Kumaraswami, S.N.; Metzler, L.; Takano, Y.; et al. The *Candida Glabrata* Putative Sterol Transporter Gene CgAUS1 Protects Cells against Azoles in the Presence of Serum. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007, *60*, 1264–1272.
23. Hull, C.M.; Parker, J.E.; Bader, O.; Weig, M.; Gross, U.; Warrillow, A.G.; Kelly, D.E.; Kelly, S.L. Facultative sterol uptake in an ergosterol-deficient clinical isolate of *Candida glabrata* harboring a missense mutation in ERG11 and exhibiting cross-resistance to azoles and amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012, *8*, 4223-32.
24. Ni, Q.; Wang, C.; Tian, Y.; Dong, D.; Jiang, C.; Mao, E.; Peng, Y. CgPDR1 Gain-of-Function Mutations Lead to Azole-Resistance and Increased Adhesion in Clinical *Candida Glabrata* Strains. *Mycoses* 2018, *61*, 430–440.
25. Vale-Silva, L.A.; Moeckli, B.; Torelli, R.; Posteraro, B.; Sanguinetti, M.; Sanglard, D. Upregulation of the Adhesin Gene EPA1 Mediated by PDR1 in *Candida Glabrata* Leads to Enhanced Host Colonization . *mSphere* 2016, *1*.
26. Thakur, J.K.; Arthanari, H.; Yang, F.; Pan, S.J.; Fan, X.; Breger, J.; Frueh, D.P.; Gulshan, K.; Li, D.K.; Mylonakis, E.; et al. A Nuclear Receptor-like Pathway Regulating Multidrug Resistance in Fungi. *Nature* 2008, *452*, 604–609.

27. Vermitsky, J.P.; Earhart, K.D.; Smith, W.L.; Homayouni, R.; Edlind, T.D.; Rogers, P.D. Pdr1 Regulates Multidrug Resistance in *Candida Glabrata*: Gene Disruption and Genome-Wide Expression Studies. *Mol Microbiol* 2006, *61*, 704–722.
28. Ferrari, S.; Ischer, F.; Calabrese, D.; Posteraro, B.; Sanguinetti, M.; Fadda, G.; Rohde, B.; Bauser, C.; Bader, O.; Sanglard, D. Gain of Function Mutations in CgPDR1 of *Candida Glabrata* Not Only Mediate Antifungal Resistance but Also Enhance Virulence. *PLoS Pathog* 2009, *5*.
29. Brun, S.; Bergés, T.; Poupard, P.; Vauzelle-Moreau, C.; Renier, G.; Chabasse, D.; Bouchara, J.P. Mechanisms of Azole Resistance in Petite Mutants of *Candida Glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004, *48*, 1788–1796.
30. Tsai, H.F.; Krol, A.A.; Sarti, K.E.; Bennett, J.E. *Candida Glabrata* PDR1, a Transcriptional Regulator of a Pleiotropic Drug Resistance Network, Mediates Azole Resistance in Clinical Isolates and Petite Mutants. *Antimicrob Agents Chemother* 2006, *50*, 1384–1392.
31. Sanglard, D.; Ischer, F.; Bille, J. Role of ATP-Binding-Cassette Transporter Genes in High-Frequency Acquisition of Resistance to Azole Antifungals in *Candida Glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001, *45*, 1174–1183.
32. Brun, S.; Aubry, C.; Lima, O.; Filmon, R.; Bergès, T.; Chabasse, D.; Bouchara, J.P. Relationships between Respiration and Susceptibility to Azole Antifungals in *Candida Glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003, *47*, 847–853.
33. Day, M. Yeast Petites and Small Colony Variants: For Everything There Is a Season. In *Advances in Applied Microbiology*; Academic Press Inc., 2013; Vol. 85, pp. 1–41.
34. Chabrier-Roselló, Y.; Giesselman, B.R.; de Jesús-Andino, F.J.; Foster, T.H.; Mitra, S.; Haidaris, C.G. Inhibition of Electron Transport Chain Assembly and Function Promotes Photodynamic Killing of *Candida*. *J Photochem Photobiol B* 2010, *99*, 117–125.
35. Siscar-Lewin, S.; Gabaldón, T.; Aldejohann, A.M.; Kurzai, O.; Hube, B.; Brunke, S. Transient Mitochondria Dysfunction Confers Fungal Cross-Resistance against Phagocytic Killing and Fluconazole. 2021.
36. Duxbury, S.J.N.; Bates, S.; Beardmore, R.E.; Gudelj, I. Evolution of Drug-Resistant and Virulent Small Colonies in Phenotypically Diverse Populations of the Human Fungal Pathogen *Candida Glabrata*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 2020, *287*.
37. Herrera-Basurto, M.S.; Gutiérrez-Escobedo, M.G.; Castaño-Navarro, I.B. Caracterización molecular y fenotípica de aislados clínicos secuenciales de *Candida glabrata* pertenecientes a un mismo paciente. Tesis de Maestría. 2020.
38. López-Marmolejo, A.L.; Gutiérrez-Escobedo, M.G.; Castaño-Navarro, I.B. Análisis fenotípico y genotípico de aislados clínicos secuenciales de *Candida glabrata*. Tesis de Maestría. 2021.
39. Vale-Silva, L.; Ischer, F.; Leibundgut-Landmann, S.; Sanglard, D. Gain-of-Function Mutations in PDR1, a Regulator of Antifungal Drug Resistance in *Candida Glabrata*, Control Adherence to Host Cells. *Infect Immun* 2013, *81*, 1709–1720.
40. Hallstrom, T.C.; Moye-Rowley, W.S. Multiple Signals from Dysfunctional Mitochondria Activate the Pleiotropic Drug Resistance Pathway in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 2000, *275*, 37347–37356.
41. Zhang, X.; Moye-Rowley, W.S. *Saccharomyces Cerevisiae* Multidrug Resistance Gene Expression Inversely Correlates with the Status of the F0 Component of the Mitochondrial ATPase. *Journal of Biological Chemistry* 2001, *276*, 47844–47852.

42. Vowinckel, J.; Hartl, J.; Marx, H.; Kerick, M.; Runggatscher, K.; Keller, M.A.; Mülleder, M.; Day, J.; Weber, M.; Rinnerthaler, M.; et al. The Metabolic Growth Limitations of Petite Cells Lacking the Mitochondrial Genome. *Nat Metab* 2021, 3, 1521–1535.
43. Chang, Z.; Yadav, V.; Lee, S.C.; Heitman, J. Epigenetic Mechanisms of Drug Resistance in Fungi. *Fungal Genetics and Biology* 2019, 132.
44. Torres-Garcia, S.; Yaseen, I.; Shukla, M.; Audergon, P.N.C.B.; White, S.A.; Pidoux, A.L.; Allshire, R.C. Epigenetic Gene Silencing by Heterochromatin Primes Fungal Resistance. *Nature* 2020, 585, 453–458.
45. Posteraro, B.; Sanguinetti, M.; Fiori, B.; la Sorda, M.; Spanu, T.; Sanglard, D.; Fadda, G. Caspofungin Activity against Clinical Isolates of Azole Cross-Resistant *Candida Glabrata* Overexpressing Efflux Pump Genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2006, 58, 458–461.
46. Pfaller, M.; Neofytos, D.; Diekema, D.; Azie, N.; Meier-Kriesche, H.U.; Quan, S.P.; Horn, D. Epidemiology and Outcomes of Candidemia in 3648 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance®) Registry, 2004-2008. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012, 74, 323–331.
47. Denardi, L.B.; Keller, J.T.; Oliveira, V.; Mario, D.A.N.; Santurio, J.M.; Alves, S.H. Activity of Combined Antifungal Agents Against Multidrug-Resistant *Candida Glabrata* Strains. *Mycopathologia* 2017, 182, 819–828.
48. Calvin, N.M.; Hanawalt, P.C. High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol* 1988, 170, 2796-801.
49. Orta-Zavala, E., Guerrero-Serrano, G., Gutiérrez-Escobedo, G., Cañas- Villamar, I., Juárez-Cepeda, J., Castaño, I., & De Las Peñas, A. Local Silencing Controls the Oxidative Stress Response and the Multidrug Resistance in *Candida Glabrata*. *Mol Microbiol* 2013, 88, 1135-48.
50. Yáñez-Carrillo, P.; Orta-Zavalza, E.; Gutiérrez-Escobedo, G.; Patrón-Soberano, A.; De Las Peñas A.; Castaño I, B. Expression vectors for C-terminal fusions with fluorescent proteins and epitope tags in *Candida glabrata*. *Fungal Genet Biol.* 2015, 80, 43-52.

Material Suplementario

Tabla suplementaria 1. Tipos de mutantes con deficiencia respiratoria descritas en levaduras.

Fenotipo (Gly ⁻)	Descripción
ρ^-	Células con deleciones extensas del ADNmt que han perdido la capacidad de sintetizar proteínas.
ρ^0	Células que carecen completamente de ADNmt.
mit	Células con genoma mitocondrial defectuoso debido a mutaciones puntuales.

Tabla suplementaria 2. Cepas utilizadas en este estudio.

Organismo	Cepa parental	Genotipo o Fenotipo relevante	Referencia	Comentarios
<i>Escherichia coli</i>				
DH10		F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 endA1 araD139</i> Δ (<i>ara,leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ - <i>rpsL nupG</i>	48	
<i>Candida glabrata</i>				
BG14	BG2	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418R	10	
<i>pdr1</i> Δ	BG14	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R <i>pdr1</i> Δ :: <i>hph</i> - PCR de fusión	49	
<i>hst1</i> Δ	BG14	<i>ura3</i> Δ ::Tn903 G418 ^R <i>hst1</i> Δ	49	
CGM514	BG14	pMC14 (<i>GFP</i> ::3 <i>UTR.URA3</i> ⁺) (<i>GFP</i> sin promotor)	Colección del laboratorio	
CGM1938	BG14	Gly ⁻ obtenida por el tratamiento con EtBr	Colección del laboratorio	

CGM4389	BG14	pP _{PGK1} :: CgPRX1-GFP.URA3	Colección del laboratorio	
Aislados clínicos y derivados evolucionados utilizados en este estudio				
Cepas evolucionadas de la BG14				
CGM4602	BG14	Gly/FLC ^R [BG14 (1)]	Este trabajo	Evolucionada obtenida directamente de FLC
CGM4603	BG14	Gly ⁺ /FLC ^R [BG14 (2)]	Este trabajo	Evolucionada obtenida directamente de FLC
CGM4609	CGM4602	Gly/FLC ^R [BG14 (1-1)]	Este trabajo	Evolucionada obtenida después de pases en YPD
CGM4610	CGM4603	Gly ⁺ /FLC ^R [BG14 (2-1)]	Este trabajo	Evolucionada obtenida después de pases en YPD
CGM4621	CGM4602	Gly/FLC ^R [BG14 (1)/ pGE316]	Este trabajo	CGM4602/pGE316
CGM4623	CGM4603	Gly ⁺ /FLC ^R [BG14 (2)/ pGE316]	Este trabajo	CGM4603/pGE316
CGM4666	CGM1938	Gly [BG14 (3)/ pGE316]	Este trabajo	CGM1938/pGE316
Cepas evolucionadas del aislado FLC-R (A)				
AN378	Cultivo de sangre	Gly ⁺ /FLC-R (A)	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ)	
CGM4604	AN378	Gly/FLC ^R (A1)	Este trabajo	Evolucionada obtenida directamente de FLC
CGM4605	AN378	Gly ⁺ /FLC ^R (A2)	Este trabajo	Evolucionada obtenida directamente de FLC
CGM4611	CGM4604	Gly ⁺ /FLC ^R (A1-1)	Este trabajo	Evolucionada obtenida después de pases en YPD
CGM4612	CGM4605	Gly ⁺ /FLC ^R (A2-1)	Este trabajo	Evolucionada obtenida después de pases en YPD
CGM4646	AN378	Gly ⁺ /FLC ^R (A/pFA1)	Este trabajo	AN378/pFA1
CGM4648	CGM4604	Gly ⁺ /FLC ^R (A1/pFA1)	Este trabajo	CGM4604/pFA1
CGM4650	CGM4605	Gly ⁺ /FLC ^R (A2/pFA1)	Este trabajo	CGM4605/pFA1

Cepas evolucionadas del aislado FLC-S (B)				
AN755	Cultivo de sangre	Gly ⁺ /FLC-S (B)	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ)	
CGM4606	AN755	Gly ⁻ /FLC ^R (B1)	Este trabajo	Evolucionada obtenida directamente de FLC
CGM4607	AN755	Gly ⁺ /FLC ^R (B2)	Este trabajo	Evolucionada obtenida directamente de FLC
CGM4613	CGM4606	Gly ⁻ /FLC ^R (B1-1)	Este trabajo	Evolucionada obtenida después de pases en YPD
CGM4614	CGM4607	Gly ⁺ /FLC ^R (B2-1)	Este trabajo	Evolucionada obtenida después de pases en YPD
CGM4645 (Revertante)	CGM4606	Gly ⁺ /FLC ^R (B1-2)	Este trabajo	Evolucionada que revierte al fenotipo Gly ⁺ después de pases en YPD
CGM4652	AN755	Gly ⁺ /FLC-S (B /pFA1)	Este trabajo	AN755/pFA1
CGM4654	CGM4606	Gly ⁻ /FLC ^R (B1/pFA1)	Este trabajo	CGM4606/pFA1
CGM4656	CGM4607	Gly ⁺ /FLC ^R (B2/pFA1)	Este trabajo	CGM4607/pFA1

Tabla suplementaria 3. Plásmidos utilizados en este estudio.

Plásmido	Genotipo relevante	Referencia
pMJ22	pCg <i>CEN ARS NAT^R Amp^R</i>	50
pGE316	pP _{PGK1} :: Cg <i>PRX1-GFP.URA3</i>	Colección de laboratorio
pFA1	pP _{PGK1} :: Cg <i>PRX1-GFP.NAT^R</i>	Este trabajo

Tabla suplementaria 4. Oligonucleótidos utilizados en este estudio.

Número	Nombre	Secuencia 5' → 3'	Sitios de corte
130	GFP@1bp FW	GCGGATCCTAATGTCTAAAGGTGAAGAATTATTC	<i>Bam</i> HI
131	GFP@717bp REV	CGCGAATTCTTATTTGTACAATTCATCCATACCATGG	<i>Eco</i> RI
2059	EPA1@INT FW	CGACTTCAATGCATACTTCCTCCG	-
2060	EPA1@INT REV	GGGTGCTATGTACCTTGCGACATG	-
3072	COX3@47bp FW	GGTATTACCATCACCATGACCAATG	-
3073	COX3@365bp REV	GCTCCTAATACAATATCTGGACTCA	-

Tabla suplementaria 5. Detección de los niveles de fluorescencia de las cepas de *C. glabrata* que contienen el plásmido con la fusión traduccional Prx1-GFP.

Transformantes con el plásmido con la fusión Prx1-GFP	No. de eventos	Unidades de fluorescencia-Media geométrica	Desviación estándar
Cultivo de 24 h			
Promoterless	11215	7.41	4.15
BG14	10017	223	108
[BG14 (1)] (Gly ⁻)	6747	2.93	1.48
[BG14 (2)] (Gly ⁺)	7402	286	116
A	6108	280	146
A1 (Gly ⁻)	6359	3.29	1.62
A2 (Gly ⁺)	5502	302	180
B	5418	457	234
B1 (Gly ⁻)	7014	3.12	1.62
B2 (Gly ⁺)	5415	512	272
Fase logarítmica (2h)			
Promoterless	7383	14	7.73
BG14	7648	1121	538
[BG14 (1)] (Gly ⁻)	7061	11	6.94
[BG14 (2)] (Gly ⁺)	7651	1190	502
A	5943	1231	616

A1 (Gly⁻)	6738	11.5	8.55
A2 (Gly⁺)	5687	1229	727
B	6282	1689	924
B1 (Gly⁻)	7290	11.2	8.66
B2 (Gly⁺)	6096	1777	968
Fase logarítmica (4h)			
Promoterless	9352	15.5	8.79
BG14	5847	1130	439
[BG14 (1)] (Gly⁻)	5954	13.1	7.38
[BG14 (2)] (Gly⁺)	8227	1122	343
A	6845	1053	473
A1 (Gly⁻)	4974	15.2	8.22
A2 (Gly⁺)	5869	1029	453
B	6370	1396	705
B1 (Gly⁻)	5756	14.7	8.30
B2 (Gly⁺)	6354	1497	807
Fase estacionaria (48h)			
Promoterless	7993	12	6.05
BG14	7702	724	381
[BG14 (1)] (Gly⁻)	6277	8.08	4.73
[BG14 (2)] (Gly⁺)	7895	881	406
A	6554	892	465
A1 (Gly⁻)	7703	52.7	25.1
A2 (Gly⁺)	5708	1071	531
B	5728	1094	564
B1 (Gly⁻)	5224	9.71	5.23
B2 (Gly⁺)	5585	1216	627

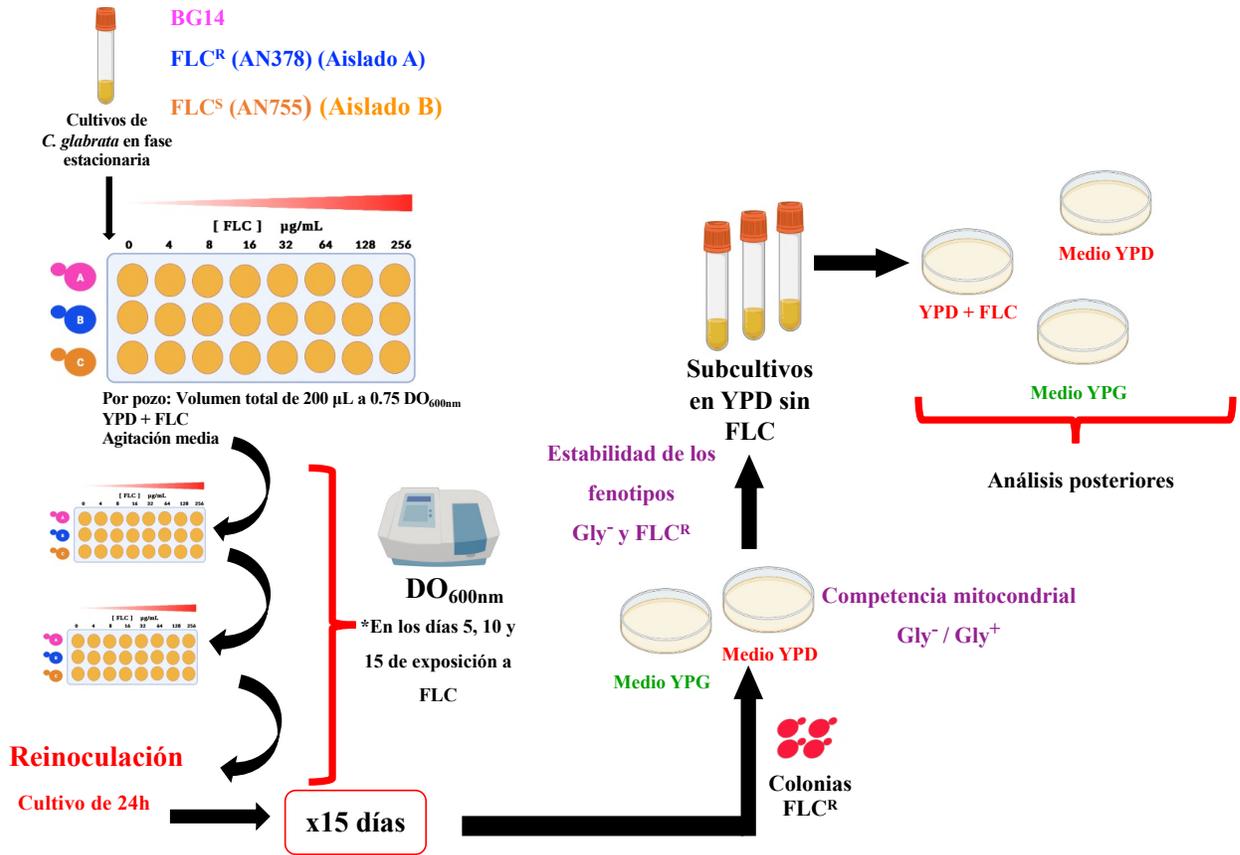


Figura S1. Evolución *in vitro* de poblaciones de *C. glabrata* resistentes a FLC. La cepa de referencia BG14, un aislado clínico resistente (A) y otro sensible (B) a FLC se cultivaron en un gradiente creciente de concentraciones del fármaco. Cada 24 horas se subcultivaron 5 µL de cada uno en medio fresco con las concentraciones correspondientes de FLC. Este procedimiento se repitió durante 15 días y se midió la DO_{600nm} los días 0, 5, 10 y 15 en las distintas concentraciones utilizadas.

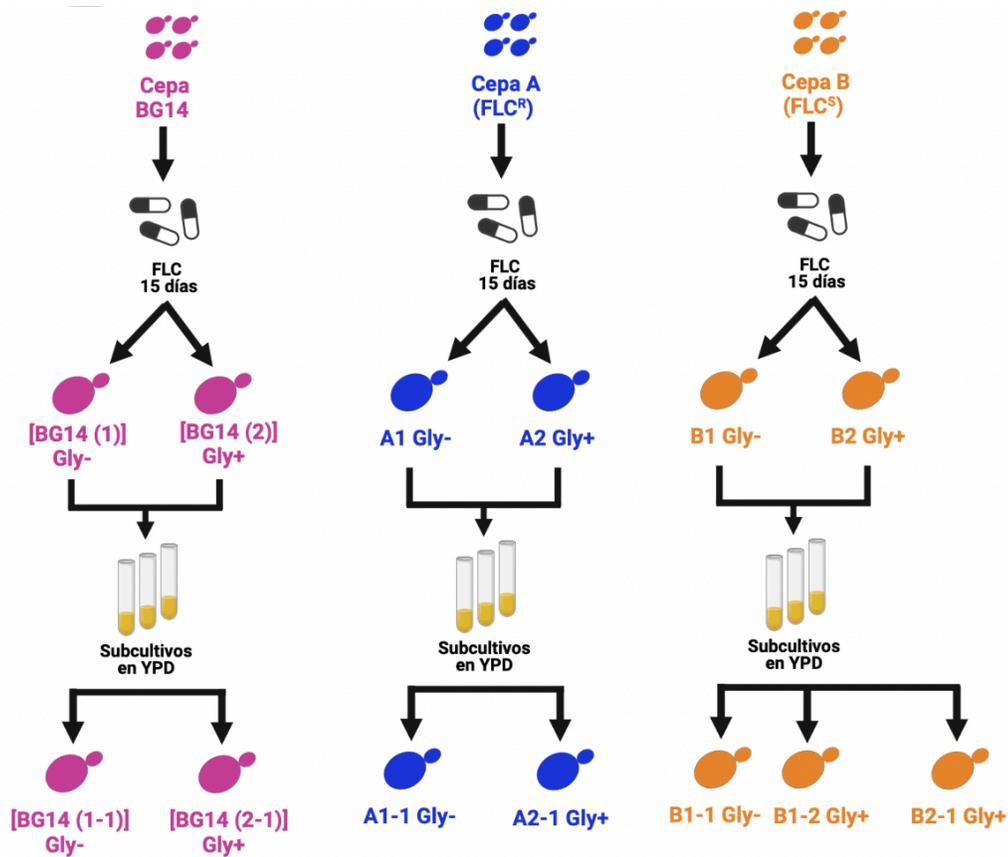


Figura S2. Genealogía de las cepas de *C. glabrata* evolucionadas en un gradiente de concentraciones de FLC. La cepa de referencia BG14, así como los aislados A (resistente a FLC) y B (sensible a FLC) se crecieron durante 15 días en FLC. Seleccionamos derivados evolucionados más resistentes (FLC^R) y capaces o no de crecer en glicerol como única fuente carbono no fermentable (Gly⁺ o Gly⁻). Para evaluar la estabilidad de los fenotipos Gly⁻ y FLC^R realizamos subcultivos en YPD sin FLC.

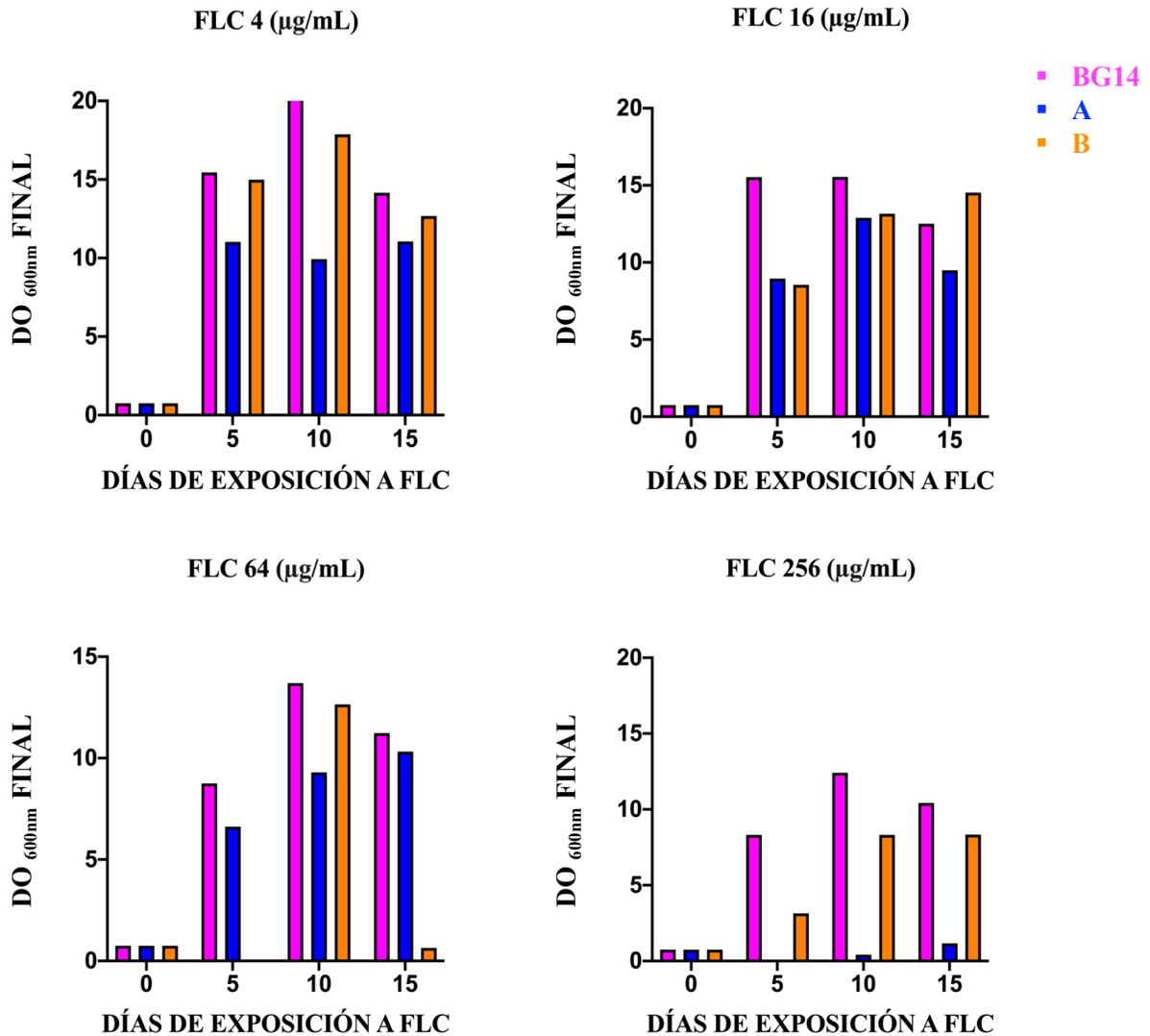


Figura S3. Crecimiento final (DO_{600nm}) de las distintas cepas después de 24 h de crecimiento en pozos con medio YPD con las concentraciones indicadas de FLC. Se utilizaron las cepas BG14 (cepa estándar del laboratorio) barras rosas; aislado A (resistente a FLC) (barras azules) y aislado B (sensible a FLC) (barras anaranjadas). Las muestras se tomaron a los 0, 5, 10 y 15 días para determinar la DO_{600nm}. Se muestra un experimento representativo.

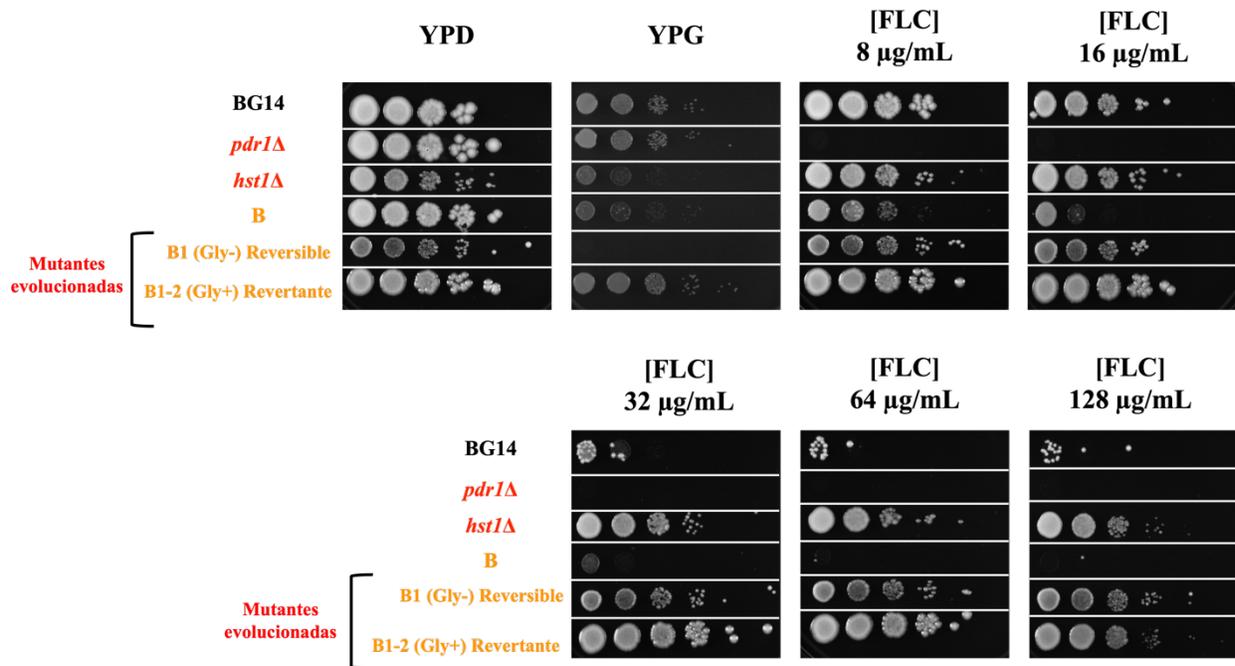


Figura S4. Perfil de susceptibilidad a FLC de la cepa Gly⁺ revertante. La cepa Gly⁺ revertante (derivada de la cepa B^S Gly⁻), recuperó su función respiratoria (crecimiento en YPG) después de 3 subcultivos en serie en medio fresco sin FLC. Sin embargo, es igual de resistente que una cepa FLC^R (*hst1Δ*). La cepa de referencia BG14, una cepa sensible (*pdr1Δ*) y otra resistente a FLC (*hst1Δ*) se utilizaron como controles. Se muestra un experimento representativo.

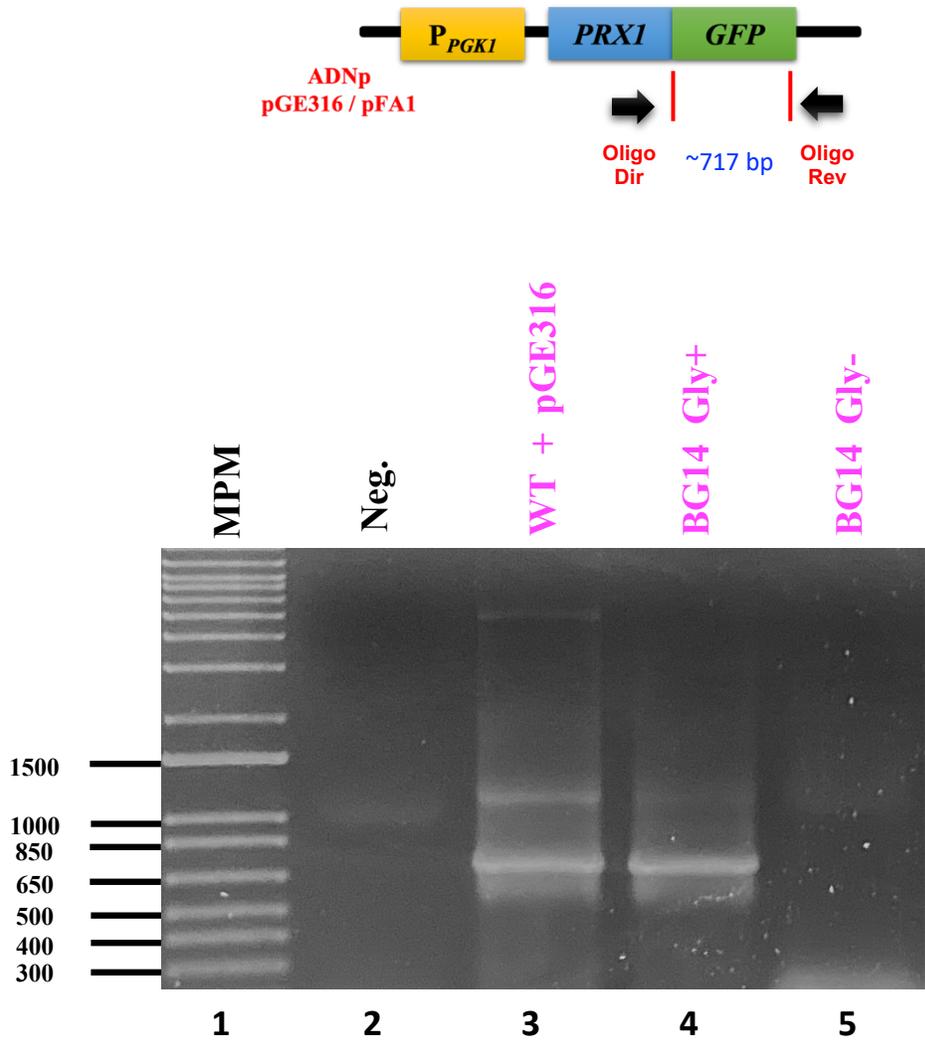


Figura S5. Amplificación de GFP en las mutantes evolucionadas en FLC que derivan de la cepa de referencia BG14. Se utilizó un par de oligonucleótidos que amplifican la secuencia completa de GFP de 717 pares de bases. El patrón de bandas esperado es igual en la cepa silvestre y en la mutante evolucionada Gly⁺, lo que demuestra la presencia del plásmido que contiene la fusión traduccional de la proteína mitocondrial Prx1 con la proteína fluorescente en estas células, a diferencia de aquellas células con fenotipo Gly⁻.

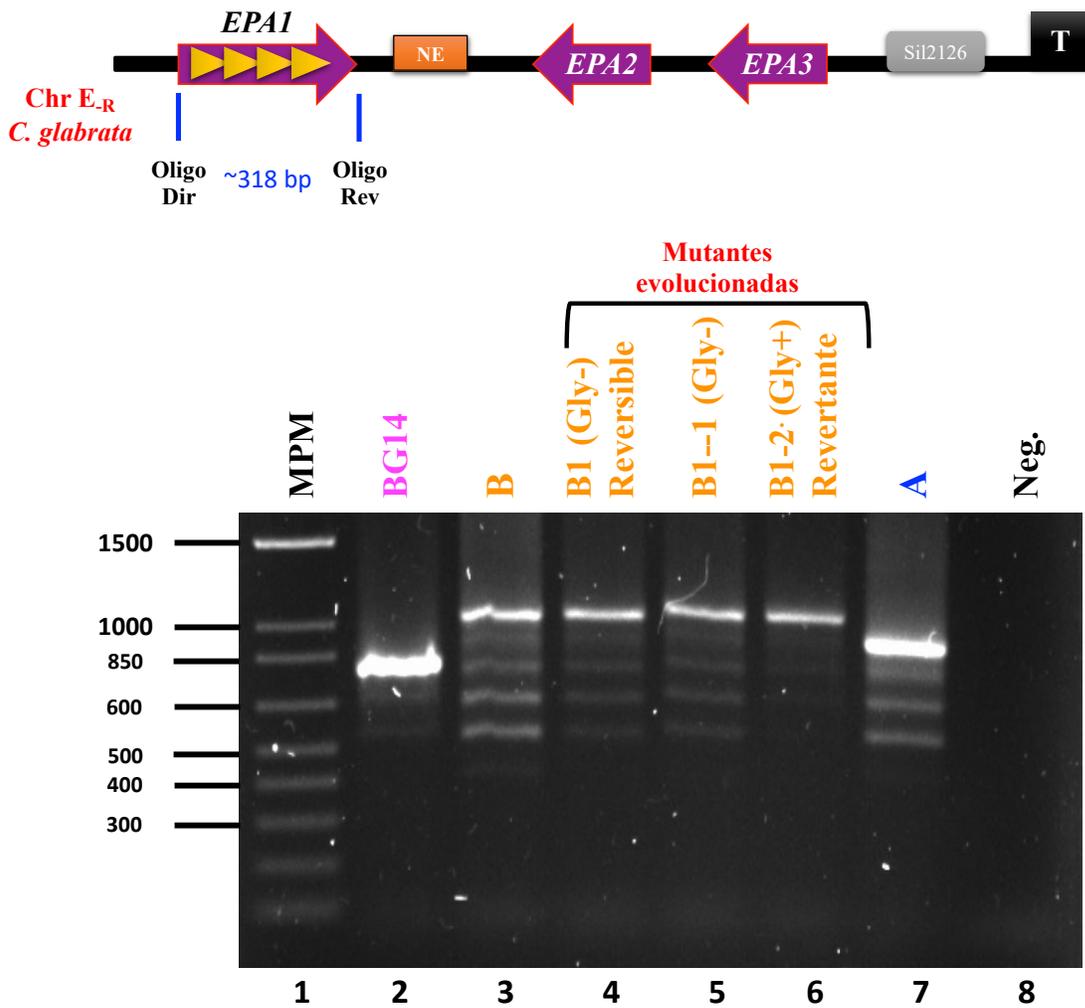


Figura S6. Genotipificación de la mutante Gly revertante. Se utilizó un par de oligonucleótidos que amplifica minisatélites en el gen *EPA1* de *C. glabrata* para corroborar que la cepa Gly revertante (carril 6) deriva del aislado sensible (B). El patrón de bandas es igual en todas las mutantes que derivan del aislado B y difiere del patrón que se obtiene para la cepa BG14 y el aislado resistente (A).