


TESIS DOCTORAL



Adquisición de resistencia secundaria en levaduras. Aproximación mediante mutagénesis activada por estrés (SLAM) bajo la hipótesis de *Mutagénesis Adaptativa*

David Quinto Alemany

La Laguna, 2017

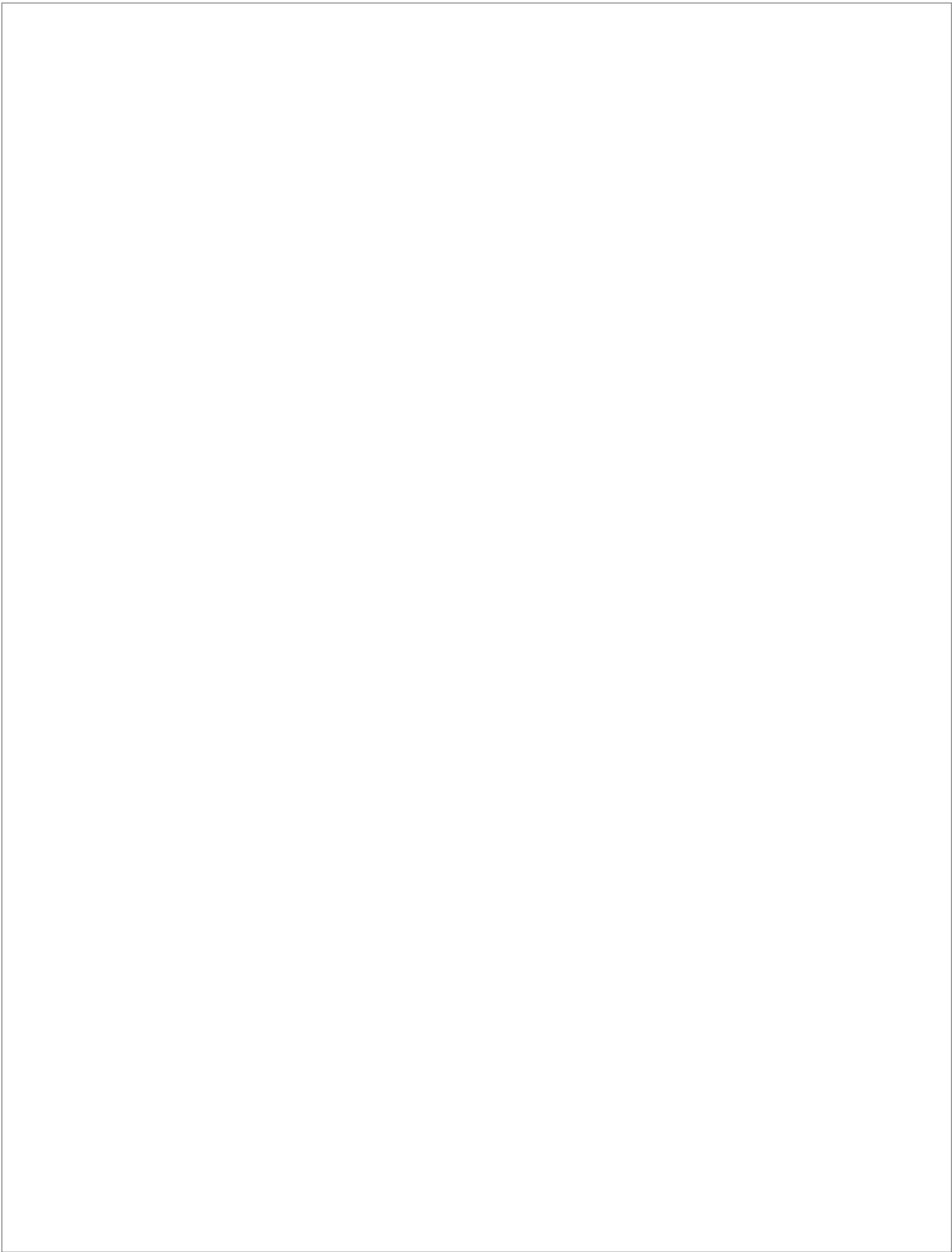
Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511		Código de verificación: nnAZcF1T
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511		Código de verificación: nnAZcF1T
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Identificador del documento:	Código de verificación:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	974511	nnAZcF1T	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			11/07/2017 18:00:48



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

Universidad de La Laguna

TESIS DOCTORAL

ADQUISICIÓN DE RESISTENCIA SECUNDARIA EN LEVADURAS.
APROXIMACIÓN MEDIANTE MUTAGÉNESIS ACTIVADA POR ESTRÉS
(SLAM) BAJO LA HIPÓTESIS DE *MUTAGÉNESIS ADAPTATIVA*

Directores de la Tesis

Dr. Mario Díaz González

Catedrático de Zoología y Profesor Titular del Departamento de Biología
Animal, Edafología y Geología

Dra. Cristina Gil Lamaignere

Investigadora Principal del grupo de Resistencia en Eucariotas, de la
Unidad de Investigación del Complejo Hospitalario Nuestra Señora de
Candelaria

Dr. Félix Machín Concepción

Investigador Principal del grupo Inestabilidad Genética y Cáncer, de la
Unidad de Investigación del Complejo Hospitalario Nuestra Señora de
Candelaria,

Memoria de Tesis Doctoral presentada por el
licenciado **David Quinto Alemany**
para optar a la titulación de Doctorado en Biomedicina.

La Laguna, junio de 2017



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
	Identificador del documento: 974511	Código de verificación: nnAZcF1T
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511		Código de verificación: nnAZcF1T
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

Dr. D. Mario Díaz González, como Catedrático de Zoología y Profesor Titular del Departamento de Biología Animal, Edafología y Geología,

Dra. Dña. Cristina Gil Laignere, como Investigadora Principal del grupo de Resistencia en Eucariotas, de la Unidad de Investigación del Complejo Hospitalario Nuestra Señora de Candelaria, y

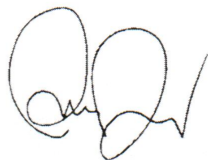
Dr. D. Félix Machín Concepción, como Investigador Principal del grupo Inestabilidad Genética y Cáncer, de la Unidad de Investigación del Complejo Hospitalario Nuestra Señora de Candelaria,

HACEN CONSTAR:

Que Don David Quinto Alemany, Licenciado en Biología, ha realizado bajo nuestra dirección y supervisión el trabajo contenido en la presente memoria titulada **“Adquisición de resistencia secundaria en levaduras. Aproximación mediante mutagénesis activada por estrés (SLAM) bajo la hipótesis de Mutagénesis Adaptativa”**.

Revisada la presente memoria, consideramos que la misma reúne las condiciones de calidad y rigor científico para que pueda ser presentada y defendida ante el tribunal correspondiente, con el fin de optar al título de Doctor por la Universidad de La Laguna.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmamos la presente en La Laguna, a 30 de junio de 2017,



Fdo.: Mario Díaz González



Fdo: Cristina Gil Laignere



Fdo: Félix Machín Concepción

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511		Código de verificación: nnAZcF1T
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

FINANCIACIÓN

El desarrollo del presente trabajo ha sido posible gracias a la financiación del doctorando por parte de un contrato a cargo del proyecto PI08/1624, una beca de investigación de la Fundación Cajacanarias, una beca de Investigación de Obra Social La Caixa-Fundación CajaCanarias, y de un contrato como Personal Investigador a cargo del proyecto SAF2014-52582-R., y a la financiación derivada de los siguientes Proyectos de Investigación:

Título:

MECANISMOS DE ADQUISICIÓN DE RESISTENCIA A ANTIFÚNGICOS: NUEVAS DIANAS TERAPÉUTICAS (PI08/1624).

Entidad financiadora: Instituto de Salud Carlos III (Acción Estratégica en Salud).

Periodo de vigencia: 2009-2012 I.P.: Cristina Gil Lamaignere

Título:

BÚSQUEDA DE DEFECTOS GENÉTICOS Y AGENTES QUÍMICOS QUE PROMUEVEN LA APARICIÓN DE PUENTES CROMOSÓMICOS EN ANAFASE Y ESTUDIO QUE LOS MISMOS TIENEN EN LA PROGENIE CELULAR (PI12/00280).

Entidad financiadora: Instituto de Salud Carlos III (Acción Estratégica en Salud).

Periodo de vigencia: 2013-2017 I.P.: Félix Machín Concepción

Título: CAMBIOS ASOCIADOS AL ENVEJECIMIENTO EN LOS MICRODOMINIOS DE LA MEMBRANA NEURONAL COMO FACTORES SEMINALES EN PROCESOS DE NEURODEGENERACIÓN (SAF2014-52582-R).

Entidad financiadora: Ministerio de Economía y Competitividad

Periodo de vigencia: 2015-2017 I.P.: Mario Díaz González

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511 Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

*“If there is one thing the history of evolution has taught us
it's that life will not be contained. Life breaks free, it expands to
new territories and crashes through barriers, painfully, maybe
even dangerously. Life finds a way”*

Dr. Ian Malcom – *Jurassic Park*

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

A toda mi familia,
a mis padres y mi hermano,
y en especial: a La Mama.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Identificador del documento:	Código de verificación:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	974511	nnAZcF1T	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			11/07/2017 18:00:48



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

AGRADECIMIENTOS

Una vez le dije a un amigo en un momento difícil que la vida es un trabajo en equipo. Hoy me hallo redactando estas líneas tras años soñando con llegar hasta aquí, recorrido que jamás hubiera logrado solo...

En primer lugar quiero agradecer a mis directores que lo esté haciendo. Cristina me abrió las puertas de su grupo de investigación y las de la ciencia que tanto soñaba, Félix ha sido un soporte fundamental y un referente en todo mi desarrollo profesional, y Mario me rescató para este mundo del conocimiento cuando ya lo daba por perdido, me hizo recobrar la ilusión y la pasión, y llevó mi visión de este mundo a otra dimensión. Estas tres personas ya no son sólo mis directores, puedo decir que para mí son y serán amigos.

Pero no sólo ellos me han marcado, hoy siento que son tantas las personas que me han acompañado que pido de antemano disculpas por no poder describir todo lo que llevo de cada uno de ellos, daría para una memoria entera...

A los compañeros de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria donde empecé. A Ana Canerina, casi empezamos juntos y has sido tan importante que espero que siempre sigas estando tan cerca. A Javi y a Ernesto que han sido apoyo incondicional y se han convertido en amigos. A Cristina Ramos que siempre me ha ayudado en lo que hiciera falta.

A Raquel, un pilar y fuente de confianza cuando las cosas se han podido torcer.

A los compañeros de la U.D.I. de Fisiología Animal de la antigua Facultad de Biología. Me recibieron desde que llegué como uno más, y así me siento, como en casa.

A los amigos que he hecho en la Junta Directiva de la Asociación de Jóvenes Investigadores de Tenerife, que unos locos constituímos en 2013. En especial a Guido, a Antonio Morell, a Inés, a Christopher por preocuparse tanto por mí.

A los amigos de toda la vida, y a los que hice al venir a La Laguna. Aunque las circunstancias obliguen por momentos a perder el contacto, cuando nos volvemos a

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAINERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

ver es como si el tiempo no hubiera pasado. Son tantos y tan buenos que no puedo nombrarlos a todos, pero tengo que recordar a alguien que no ha podido acompañarme en persona... Antonio, te fuiste hace 10 años, pero nunca has dejado de caminar conmigo.

A los colegas del Limbo, que se han convertido en una pequeña familia. A Floro, que me ha aguantado alegrías y penas estos años. A Jony, que lo nombro aquí porque no sé si hemos echado más horas jugando a la Play o en el Limbo.

A Fátima, compañera en todos los sentidos, que me hizo volver a sentir yo mismo. No soy capaz de imaginar estos 3 últimos años sin ti. Gracias por tu apoyo y tus tirones de orejas para que me pusiera a escribir. Esta tesis es también tuya.

A toda mi familia, mis tíos, mis primos y sus hijos, todos son lo que soy. A los que no están, mi abuelo Pedro, mi abuelo Domingo, mis tíos Pedro y Javier, y en especial a La Mama quien alimentó mi estómago y mi alma.

A mi hermano, por completar mi persona. Y a mis padres que me han dado la vida y se han desvidido desde que nací para que tuviera siempre lo mejor. Mamá, papá, gracias eternas.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

ÍNDICE

ABREVIATURAS	3
INTRODUCCIÓN	7
1. La mutagénesis adaptativa	7
2. Infecciones por hongos	9
3. Antifúngicos	11
3.1 5- fluorocitosina	12
3.2 Caspofungina	13
3.3 Fluconazol	15
4. Uso de levaduras como organismos modelo	16
JUSTIFICACIÓN	23
OBJETIVOS	27
MATERIALES Y MÉTODOS	31
1. Cepas de levadura	31
2. Medios de cultivo microbiológico y antifúngicos	32
3. Estimaciones de concentración mínima inhibitoria (CMI)	32
4. Determinación de viabilidad y frecuencias de adquisición de resistencia: experimentos de SLAM	33
5. Recolección de resistentes y experimentos de reconstrucción	37
6. Análisis genético	37
6.1 Extracción de ADN	38
6.2 Amplificación por PCR	38
6.3 Electroforesis en gel de agarosa	39
6.4 Secuenciación de genes	40

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

Índice

6.5 Electroforesis en gel de campo pulsado	43
7. Análisis del ciclo celular por FACS	44
8. Análisis microscópico	45
8.1 Seguimiento microscópico de <i>S. cerevisiae</i> expuesta a 5-FC	45
8.2. Análisis microscópico de la división nuclear	46
9. Determinación de actividades enzimáticas antioxidantes	46
9.1 Tratamiento con antifúngicos y obtención de extractos celulares	47
9.2 Determinación de la actividad superóxido dismutasa	48
9.3 Determinación de la actividad catalasa	49
9.4 Cuantificación de la cantidad de proteína de las muestras	50
10. Análisis estadístico de los datos	50
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
Capítulo 1. Implicación del gen <i>FCY2</i> en la adquisición de resistencia a 5-FC en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55
1.1 Efectos de la exposición prolongada a 5-FC en la frecuencia de mutación en <i>S. cerevisiae</i>	55
1.2 Análisis del espectro de posibles mutaciones que causan la resistencia	57
1.3 Análisis del Ciclo Celular y seguimiento microscópico	63
Capítulo 2. Extensión del modelo de SLAM de adquisición de resistencia a Otro antifúngico y otra especie	71
Capítulo 3. Aplicación del modelo de SLAM en aislados clínicos de <i>C. albicans</i> y <i>C. glabrata</i>	77
3.1 Viabilidad de <i>Candida spp.</i> expuestas de forma prolongada a CSP	77
3.2 Adquisición de resistencia al tratamiento con CSP en <i>Candida spp.</i>	78
Capítulo 4. Actividad del sistema antioxidante genérico en la respuesta fisiológica celular a ROS inducidas por la exposición a antifúngicos	85

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

	<i>Índice</i>
4.1 Actividades SOD y CAT en <i>S. cerevisiae</i>	87
4.2 Actividades SOD y CAT en los aislados clínicos <i>C. albicans</i> y <i>C. glabrata</i>	91
4.2.1 Actividades SOD y CAT en <i>C. albicans</i> CA48	91
4.2.2 Actividades SOD y CAT en <i>C. glabrata</i> CG57	94
REFLEXIÓN FINAL	99
CONCLUSIONES	105
BIBLIOGRAFÍA	109
ARTÍCULO	123

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

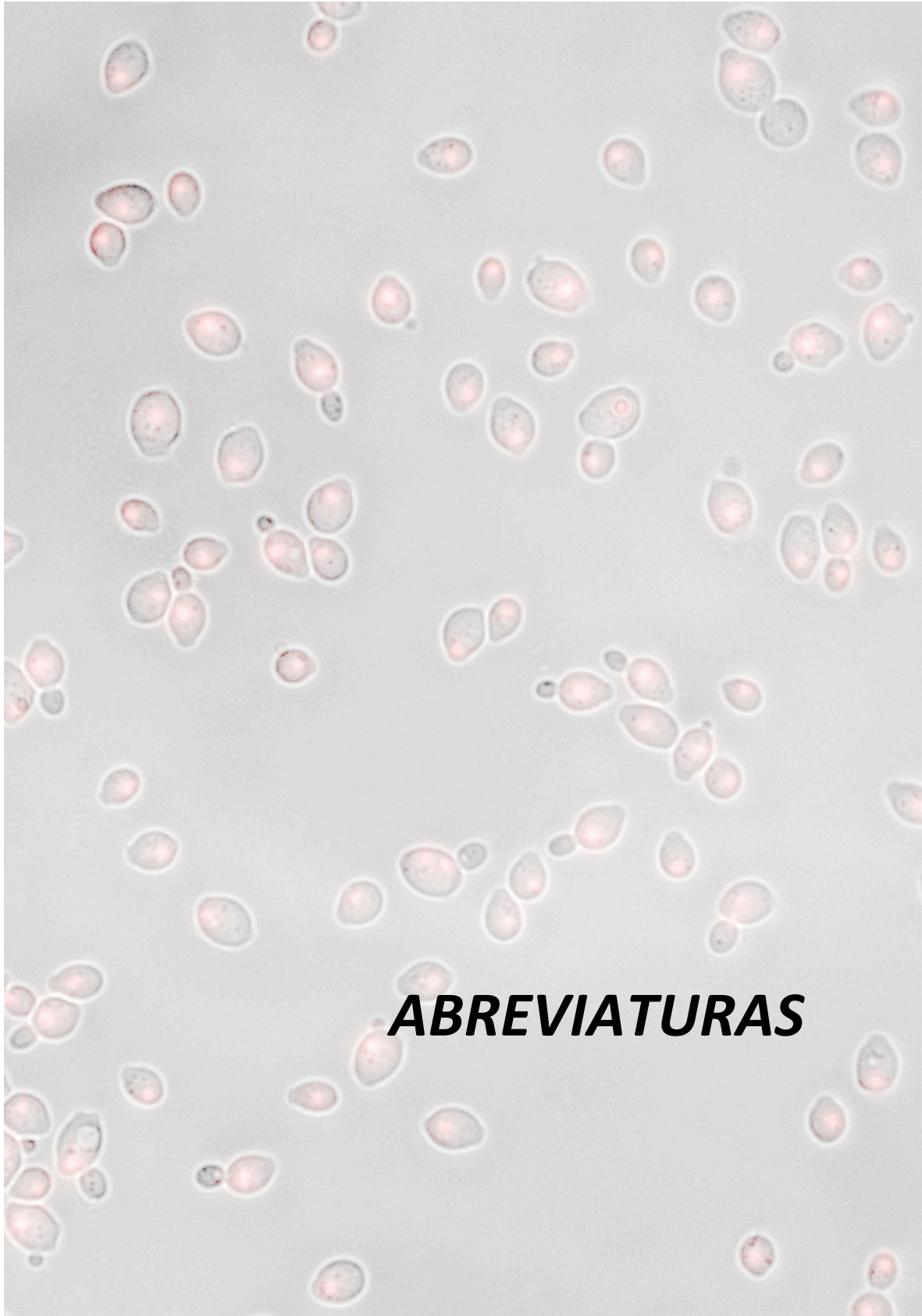


Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Identificador del documento:	Código de verificación:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	974511	nnAZcF1T	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			11/07/2017 18:00:48



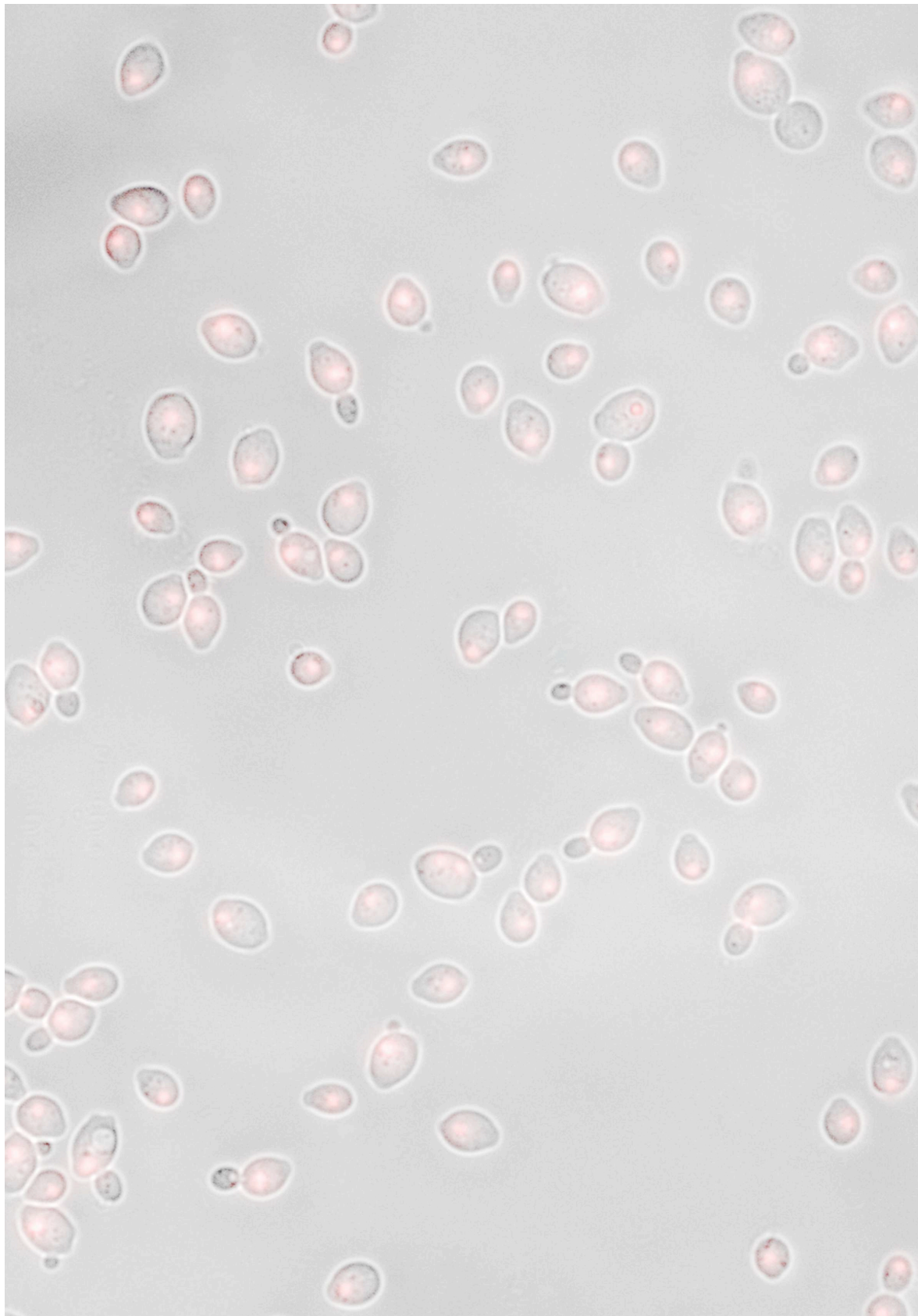
ABREVIATURAS

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

ABREVIATURAS

(p)ppGpp	Guanosina pentafofato (5'-trifosfato 2'(3')-difosfato)
5-FC	5-fluorocitosina
5-FdUDP	5-fluorodesoxiuridina difosfato
5-FU	5-fluorouracilo
5-FUMP	5-fluorouridina-5'-monofosfato
5-FUTP	5-fluorouridina trifosfato
AnB	Anfotericina B
AR	Receptor de andrógenos (<i>Androgen Receptor</i>)
ARNt	ARN transferente
BSA	Albúmina de suero bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CAT	Catalasa
CDC21	Gen de la timidilato sintasa Cdc21p (<i>Cell Division Cycle 21</i>)
CGD	Base de datos del genoma de <i>Candida albicans</i> (<i>Candida Genome Database</i>)
CHEF	Electroforesis de campo eléctrico homogéneo restringido al contorno (<i>Contour-clamped Homogeneous Electric Field</i>)
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CSP	Casporfungina
FACS	Clasificación de células activada por fluorescencia (<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>)
FCY1	Gen de la citosina deaminasa Fcy1p (<i>FluoroCYtosine resistance 1</i>)
FCY2	Gen de la purina-citosina permeasa Fcy2p (<i>FluoroCYtosine resistance 2</i>)
FCY22	Gen putativo de la purina-citosina permeasa Fcy2p (<i>FluoroCYtosine resistance 22</i>)
FKS1	Gen 1 de la subunidad catalítica de la 1,3-β-D-glucano sintasa (<i>FK506 Sensitivity</i>)
FKS2	Gen 2 de la subunidad catalítica de la 1,3-β-D-glucano sintasa (<i>FK506 Sensitivity</i>)
FKS3	Gen 3 de la subunidad catalítica de la 1,3-β-D-glucano sintasa (<i>FK506 Sensitivity</i>)
FLU	Fluconazol
FUR1	Gen de la uracil fosforribosiltransferasa Fur1p (<i>5-FluoroURidine resistant 1</i>)
HSs	Regiones de hipermutabilidad (<i>HotSpots</i>)
LOH	Pérdidas de heterozigosidad (<i>Loss Of Heterozygosity</i>)
MMR	Reparación de bases despareadas (<i>MisMatch Repair</i>)

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511	Código de verificación: nnAZcF1T	Fecha:
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

Abreviaturas

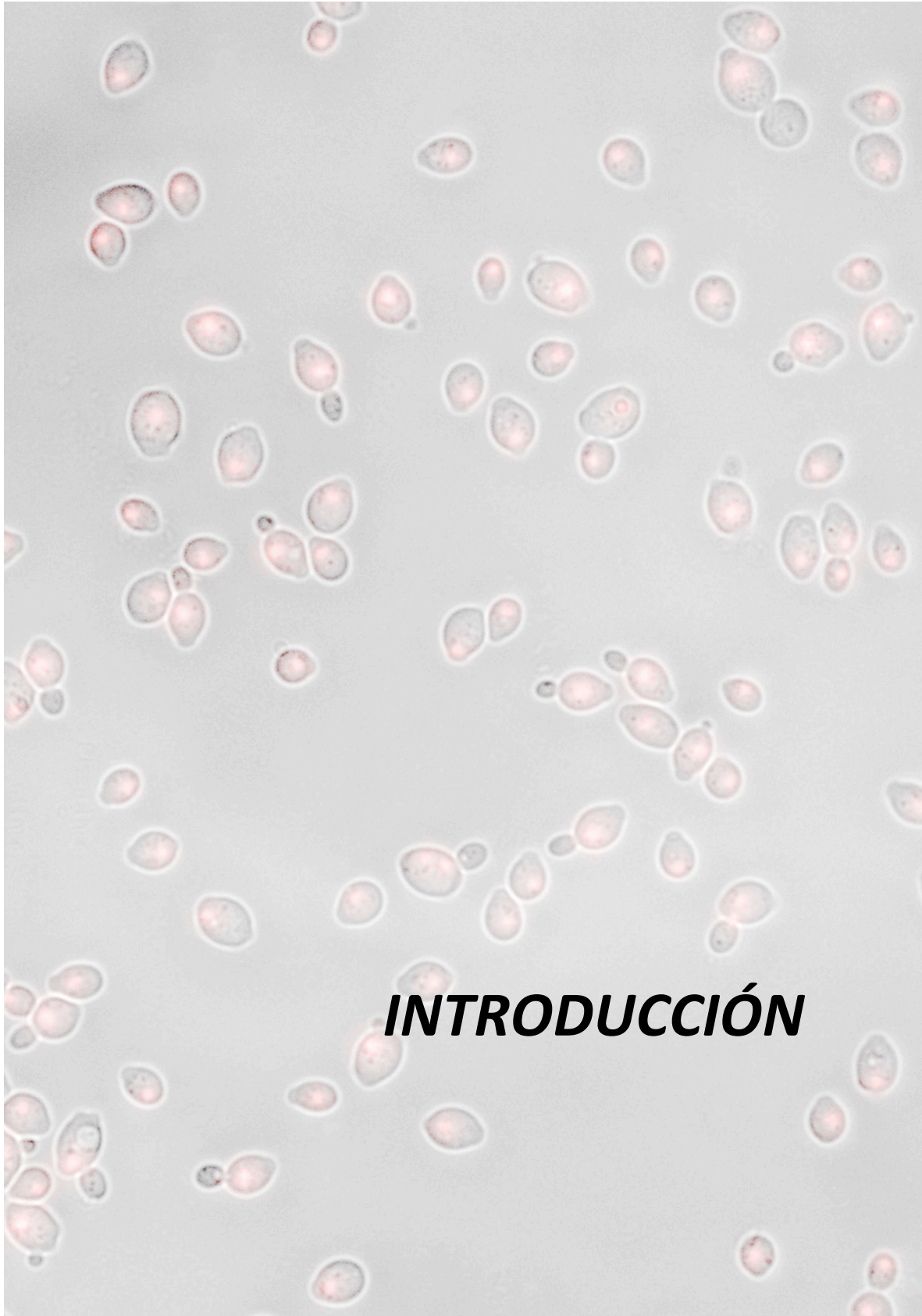
NHEJ	Unión de extremos no homólogos (<i>Non-Homologous End Joining</i>)
pb	Pares de bases
PCI	Solución de fenol/cloroformo/isoamiloalcohol (<i>Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PFGE	Electroforesis en gel de campo pulsado (<i>Pulsed-Field Electrophoresis Gel</i>)
ROS	Especies reactivas del oxígeno (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RpoS	Subunidad sigma de la ARN polimeras (<i>RNA polymerase sigma S</i>)
SGD	Base de datos del genoma de <i>Saccharomyce cerevisiae</i> (<i>Saccharomyces Genome Database</i>)
SIH	Septicemia IntraHospitalaria
SLAM	Mutagénesis activada por estrés (<i>Stressful Lifestyle Associated Mutation</i>)
SC	Medio mínimo o sintético completo (<i>Synthetic Complete</i>)
SOD	Superóxido dismutasa
TBARS	Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (<i>ThioBarbituric Acid Reactive Substances</i>)
YPD	Medio completo de crecimiento de levaduras (<i>Yeast Peptone Dextrose</i>)

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48



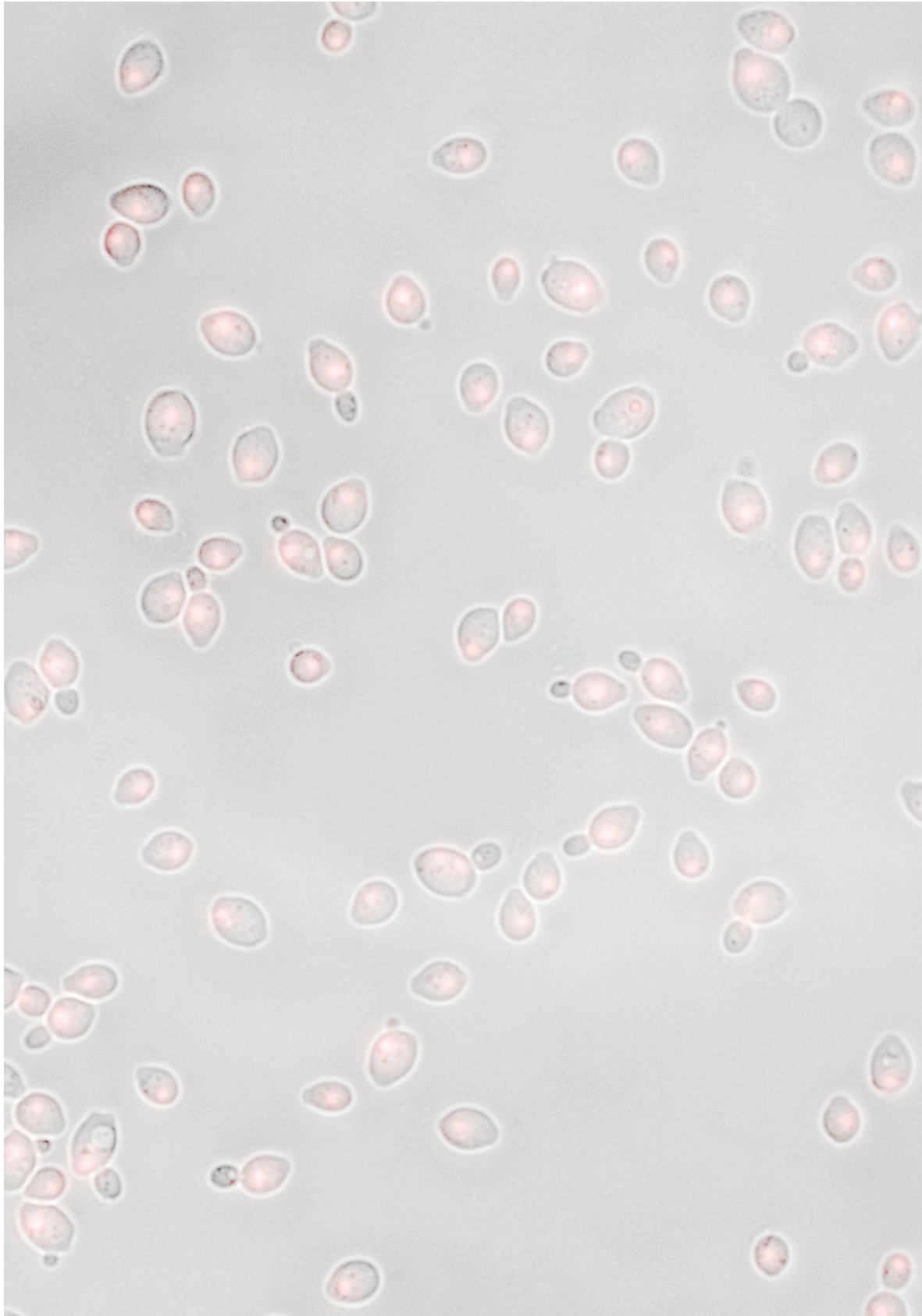
INTRODUCCIÓN

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

INTRODUCCIÓN

1. La mutagénesis adaptativa

La adquisición de resistencia a fármacos ha surgido y se ha reconocido en los últimos años como un serio problema de salud pública. Además de darse en infecciones bacterianas tratadas con antibióticos y también frente a quimioterapia en cáncer, el fenómeno es con frecuencia la causa del fracaso de los tratamientos con antifúngicos ante micosis invasivas. Esto sucede por un incremento en el porcentaje de patógenos intrínsecamente resistentes (resistencia primaria) o por adquisición de resistencia tras la exposición al fármaco (resistencia secundaria). A menudo la resistencia primaria se debe a mutaciones espontáneas surgidas de forma azarosa previa exposición al agente, mientras que en el segundo caso la resistencia surge propiamente como consecuencia del tratamiento y puede ser debida a cambios metabólicos o genómicos. Cuando son genómicos, éstos ocurren mediante mutaciones que permiten la adaptación del organismo al medio, fenómeno conocido como **mutagénesis adaptativa**.

Los primeros estudios de mutagénesis adaptativa se llevaron a cabo en bacterias (revisados en Foster, 1999), surgiendo concretamente la primera definición del término en 1991: *“un proceso que produce mutaciones debidas a presión selectiva, pero que no produce mutaciones inútiles o deletéreas”* (Cairns y Foster, 1991). Desde entonces, diferentes autores han indicado que la adquisición de resistencia secundaria a antibióticos se lleva a cabo mediante mecanismos de mutagénesis adaptativa (Lewin y Amyes, 1991; Miller y col., 2004; Maiques y col., 2006; Cirz y col., 2007; Foster, 2007). Así, diversas especies bacterianas poseen varios de estos mecanismos, entre otros la respuesta SOS, las respuestas a estrés mediadas por el factor *sigma-38* (σ_{38} , o RpoS) y por guanosina pentafofato (5'-trifosfato 2'(3')-difosfato, (p)ppGpp), o la reducción en la expresión de proteínas de reparación de emparejamientos erróneos (*mismatch repair*, MMR) (Foster, 2007).

Una década después de surgido el término, cuando también se habían llevado a cabo estudios en levaduras pero aún no en otro modelo más allá de los

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

Introducción

microorganismos, P. L. Foster lo define como “un proceso que, durante una selección en condiciones no letales, produce mutaciones que mitigan la presión selectiva independientemente de si se producen o no otras mutaciones no seleccionadas” (Foster, 2000). Desde entonces, se han realizado investigaciones que apuntan hacia la existencia de mecanismos de mutagénesis adaptativa también en cáncer, y han surgido modelos de estudio en organismos unicelulares eucariotas que abordan el fenómeno de diferente manera. La mayoría de estos modelos están basados en estrés nutricional (Heidenreich, 2007; Heidenreich y Steinboeck, 2017), pero otros menos frecuentes lo hacen empleando sustancias tóxicas como la canavanina, un análogo tóxico de la arginina que causa estrés proteotóxico (Shor et al., 2013).

En los estudios realizados en células tumorales que apuntan hacia la existencia de mecanismos de mutagénesis adaptativa en cáncer se ha observado, por ejemplo, que en células LNCaP (derivadas de un cáncer de próstata humano) tratadas con bicalutamida (un antiandrógeno sintético) las células adquieren resistencia tras reducir la expresión de las polimerasas de alta fidelidad y de las proteínas de MMR, mientras que sobreexpresan las polimerasas de baja fidelidad y aumenta la frecuencia de mutación del gen del receptor de andrógeno (AR) (Hara y col., 2005). En células metastáticas de pacientes previamente tratados con antiandrógenos la frecuencia de mutaciones en el gen del AR también aumenta, resultando en una ganancia de función del AR, aumentando su estabilidad, cambiando su preferencia por otro promotor, alterando la cascada de transducción de señales o bien cambiando la especificidad de ligando dando lugar a un receptor promiscuo. Por tanto el tratamiento de por sí ejerce presión selectiva seleccionando mutaciones que confieren resistencia (Steinkamp y col., 2009).

Como ya se ha mencionado en levaduras, este tipo de mecanismos se han estudiado mayoritariamente en modelos de estrés nutricional en *Saccharomyces cerevisiae* (revisado en Heidenreich, 2007), y se ha encontrado la participación del mecanismo de reparación de roturas de ADN bicatenario mediante unión de extremos no homólogos (*non-homologous end joining*, NHEJ). No obstante, todos estos modelos se basan en el empleo de mutantes auxótrofos portadores de un cambio en la pauta de lectura (*frameshift*) en la región codificante de un gen, de modo que la única

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

manera de adquirir una mutación adaptativa es generando otro *frameshift*. Así, la introducción de mutaciones puntuales, la delección de todo o parte del gen, la recombinación ectópica y cualquier otro mecanismo de mutagénesis pasan desapercibidos en estos modelos. Existen otros estudios con *Candida albicans* que sugieren que este organismo posee mecanismos de mutagénesis adaptativa, como es el hecho de que adquiera resistencia a metales pesados a lo largo del tiempo con una frecuencia mayor a la esperada por mutación espontánea (Malavasic y Cihlar, 1992), o que diversos tipos de estrés naturales aumenten la tasa y tipo de pérdidas de heterocigosidad (*loss of heterozygosity*, LOH) en estas levaduras (Forche y col., 2011).

Así, la inestabilidad genómica inducida por estrés se ha estudiado hasta ahora en diferentes modelos: bacterias, levaduras y células tumorales humanas, y en diferentes condiciones y circunstancias (Galhardo et al., 2007). Actualmente, podemos entender la mutagénesis adaptativa como todos aquellos “*procesos que permiten a células individuales de poblaciones no proliferantes adquirir mutaciones ventajosas gracias a las cuales superan la fuerte presión selectiva de las condiciones del medio que están limitando la proliferación*”, es decir, adaptándose a un medio inicialmente hostil (Heidenreich, 2007).

2. Infecciones por hongos

Los hongos son actualmente una de las causas más importantes de infección en humanos. Desde los años 80, la incidencia de las infecciones fúngicas oportunistas ha ido en aumento, afectando especialmente a pacientes inmunodeprimidos, transplantados, enfermos de cáncer, hospitalizados por otras patologías subyacentes, e incluso a neonatos prematuros y a ancianos (Lamagni y col., 2001; McNeil y col., 2001; Martin y col., 2003; Pfaller y Diekema, 2004; Nucci y Marr, 2005; Pfaller y Diekema, 2010; Pierce y Lopez-Ribot 2013).

Entre las especies de hongos causantes de infecciones invasivas encontramos a levaduras y hongos filamentosos como causa principal. Las levaduras del género *Candida* son las más comunes y, aunque forman parte de la flora microbiana natural

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511 Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

Introducción

de humanos (flora orofaríngea e intestinal, vagina y pueden estar presentes en la piel), este género comprende un número importante de especies patógenas. Una alteración debida a causas de origen tanto externo como interno, como por ejemplo la desregulación del sistema inmunológico o el uso de antibióticos de amplio espectro, puede ocasionar una infección.

Aunque las infecciones de piel o mucosas son las más comunes, especies como *Candida albicans* y *Candida glabrata*, representan la cuarta causa de septicemia intrahospitalaria (SIH) y son responsables de entre un 8 y un 10% del total de las infecciones sistémicas nosocomiales (intrahospitalarias) (Gafer-Gvili y col., 2008; Concia y col., 2009), y de entre un 70 y un 90% de las infecciones diseminadas e invasivas por hongos (Leroy y col., 2009). Las candidiasis invasivas están asociadas a una alta tasa de mortalidad que puede incluso alcanzar el 40-50% dependiendo del grupo poblacional y la especie de levadura (Leroy y col., 2009; Pfaller y Diekema, 2010; Pierce y Lopez-Ribot, 2013), y el tratamiento para este tipo de infecciones puede llegar a ser complejo, debiendo identificarse la especie del patógeno para elegir el antifúngico adecuado (Kett y Cubillos., 2008).

De estas especies, *C. albicans* es la que se aísla con mayor frecuencia en casos de candidiasis (45-50%) (Del Palacio y col., 2009), seguida de *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* (Falagas y col., 2010). Su patogenicidad está relacionada con la capacidad que posee de generar hifas y pseudohifas, morfologías que pueden ser inducidas por altas temperaturas, pH básico y contacto con suero sanguíneo (Brown y Gow, 1999), y por su capacidad para lidiar eficazmente con las defensas del organismo como puede ser el ataque oxidativo por células fagocíticas (Enjalbert y col. 2007). *Candida glabrata*, a pesar de su nombre, es una levadura filogenéticamente más cercana a *S. cerevisiae* que a *C. albicans* (Dujon y col., 2004; Gabaldon y col., 2013). Es un patógeno emergente que ha llegado a convertirse en la segunda causa de candidiasis en E.E.U.U. y la tercera en Europa y otros países (Pfaller y Diekema, 2007; Achkar y Fries, 2010; Gupta y col., 2015; Enkler y col., 2016)

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 974511		Código de verificación: nnAZcF1T
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

3. Antifúngicos

Durante los últimos 50 años, se han descubierto de forma progresiva agentes farmacológicos para tratar las infecciones por hongos: los antifúngicos (Figura 1). De estos fármacos, aún escasos en comparación con la cantidad de antibióticos existentes para tratar las infecciones bacterianas, se emplean básicamente cuatro grupos para tratar las micosis:

- Polienos: como la anfotericina B y la nistatina, que permeabilizan las membranas celulares de los hongos formando canales iónicos no selectivos en la membrana plasmática tras unirse al ergosterol, y también inducen estrés oxidativo en el caso de la anfotericina B como se ha descrito más recientemente (Belenky y col., 2013).
- Metabolitos con actividad antifúngica como la 5-Fluorocitosina (o flucitosina), que inhibe la síntesis de ácidos nucleicos tras la conversión dentro de la célula en 5-fluorouracilo por una citosina deaminasa específica de hongos.
- Azoles: como el fluconazol, voriconazol o el ketoconazol, que inhiben a enzimas dependientes de citocromo P450, principalmente a la 14 α -demetilasa interfiriendo la conversión de lanosterol a ergosterol, un componente esencial de la membrana citoplasmática.
- Equinocandinas: antifúngicos de nueva generación como la caspofungina, micafungina o anidulafungina, que afectan a la pared celular inhibiendo la síntesis de 1,3- β -D-glucano, un componente fundamental de la pared en levaduras.

Aun siendo algunos de estos agentes bastante recientes, ya se ha registrado adquisición de resistencia a equinocandinas (Pfaller y col., 2006; 2008a; 2008b), lo que conjuntamente al aumento de infecciones por hongos agrava el problema de adquisición de resistencia a fármacos antifúngicos, y hace que las infecciones noscomiales sigan presentando altos índices de mortalidad a pesar de los nuevos fármacos antifúngicos introducidos en el mercado (Leroy y col. 2016; Pappas y col., 2016).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAINERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

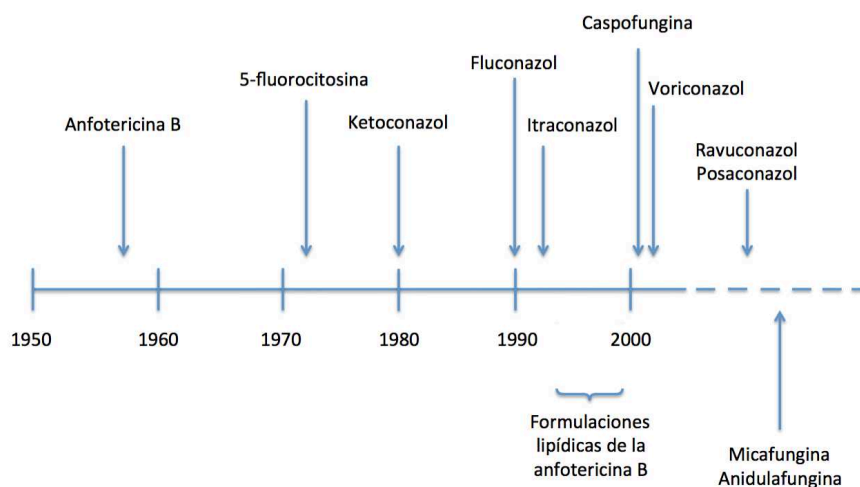


Figura 1. Desarrollo cronológico de los antifúngicos. Adaptado de Bidart H. (2004).

En este trabajo emplearemos los antifúngicos 5-Fluorocitosina (5-FC), fluconazol (FLU) y caspofungina (CSP), centrándonos en ellos a partir de ahora.

3.1 5-fluorocitosina

El análogo fluorado de citosina 5-FC (Figura 2) fue sintetizado por primera vez en 1957 como un agente potencialmente anticancerígeno, pero mostró no ser lo suficientemente eficiente para este uso. No obstante, sí demostró posteriormente su utilidad frente a micosis invasivas. La 5-FC no tiene actividad antifúngica intrínseca pero tras entrar en células susceptibles se transforma en 5-fluorouracilo (5-FU), un compuesto tóxico que se metaboliza a su vez a otros compuestos inhibidores de la síntesis de ADN, ARN, y proteínas. Este compuesto es idóneo para estudios de mutagénesis adaptativa por varias razones técnicas. La resistencia a 5-FC puede ser metabólica, debida a un aumento en la síntesis de pirimidinas o, más frecuentemente, genética por mutaciones en genes del metabolismo de 5-FC (y 5-FU) (Whelan, 1987). Concretamente, la entrada de 5-FC en la célula se lleva a cabo por una purina-citosina permeasa codificada por el gen *FCY2*. Una vez dentro de la célula se convierte en 5-FU

Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

mediante una citosina deaminasa específica de hongos codificada por *FCY1*. Entonces es transformado a 5-fluorouridina-5'-monofosfato (5-FUMP) mediante la uracil fosforribosil transferasa codificada por *FUR1*. La 5-FUMP puede ser fosforilada hasta 5-fluorouridina trifosfato (5-FUTP) que se incorpora al ARN, lo que altera la aminoacilación del ARNt, perturbando el equilibrio de aminoácidos e inhibiendo la síntesis de proteínas (Waldorf y Polak, 1983; Malet-Marino y col., 1986; Vermes y col., 2000). Alternativamente, el intermedio 5-fluorouridina difosfato (5-FUDP) puede ser transformado en 5-fluorodesoxiuridina difosfato (5-FdUDP), que inhibe la timidilato sintasa (codificada por *CDC21*) y a su vez la síntesis de ADN (Malet-Marino y col., 1986). En principio, un aumento en la expresión del gen *CDC21* podría disminuir la sensibilidad a 5-FC (Vandeputte y col., 2011), y una mutación no silenciosa en cualquiera del resto de genes de la ruta de entrada descritos (*FCY2*, *FCY1* y *FUR1*) daría lugar a resistencia al evitar la entrada o el procesamiento metabólico del antifúngico. Debido a la alta frecuencia de adquisición de resistencia que genera se suele administrar en combinación con anfotericina B.

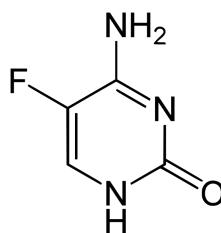


Figura 2. 5-fluorocitosina o flucitosina.

3.2 Caspofungina

La caspofungina (CSP) pertenece a las equinocandinas, una nueva clase de fármacos antifúngicos que poseen un amplio espectro de actividad. Su desarrollo supuso un avance importante en el tratamiento de las micosis invasivas, resultando en una alternativa efectiva y con menor toxicidad que azoles y polienos (Gafer-Gvili y col., 2008; Pappas y col., 2009), y que habitualmente se emplea como terapia inicial frente a candidiasis invasivas (Pappas y col., 2009; Castanheira y col., 2010). Estos

Identificador del documento: 974511	Código de verificación: nnAZcF1T	Fecha:
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

Introducción

agentes antifúngicos son lipopéptidos (Figura 3) que inhiben la síntesis de la pared celular de levaduras actuando sobre el complejo de la 1,3-β-D-glucano sintasa (Castanheira y col., 2010).

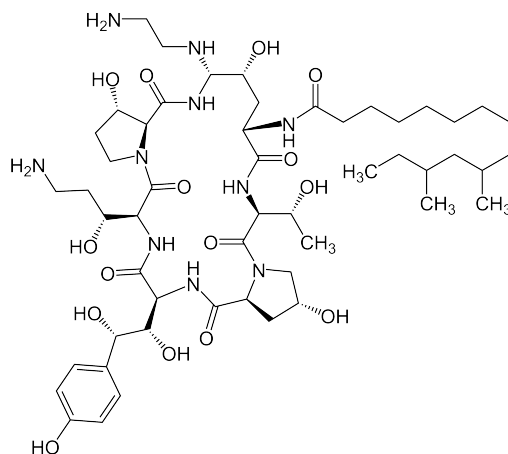


Figura 3. Caspofungina.

Con el paso de los años se han ido describiendo casos de aislamiento de cepas resistentes a las equinocandinas así como de micosis asociado a su uso preventivo (Sun y Singh, 2010). La baja susceptibilidad y la resistencia a estos compuestos se ha asociado (pero no restringido) a mutaciones dentro de dos regiones altamente conservadas de los genes *FKS1* y *FKS2* que, junto con *FKS3*, codifican para las 3 subunidades del complejo de la 1,3-β-D-glucano sintasa; y a sustituciones aminoácidas en las proteínas codificadas por estos genes, lo que puede ocurrir en dos regiones concretas con alta frecuencia de mutación, regiones de hipermutabilidad (*hotspot*, HS), en cada gen (Desnos-Ollivier y col., 2008; Thompson y col., 2008; Garcia-Effron y col., 2009; Martí-Carrizosa y col., 2015).

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAINERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

3.3 Fluconazol

Hasta la aparición de los azoles en los años 80 del s. XX, los únicos antifúngicos disponibles para tratar infecciones sistémicas por hongos eran la anfotericina B y la 5-FC. Desde entonces han ido surgiendo nuevos antifúngicos de esta familia que se subdivide a su vez en dos grupos: los imidazoles y los triazoles. El fluconazol (FLU) (figura 4) pertenece al segundo subgrupo, los triazoles, y su acción, como la del resto de azoles, afecta a la composición y estabilidad de la membrana. Es un inhibidor altamente selectivo para las enzimas fúngicas dependientes del citocromo P450, bloqueando la síntesis de ergosterol y provocando acumulación de 14- α -metil-esteroles, como el 14- α -metil-3-6-diol, lo que perturba la estabilidad de la membrana ya que el ergosterol es componente principal de la membrana celular en levaduras (Kelly y col., 1997).

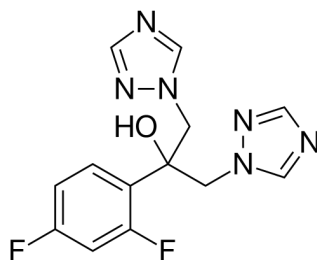


Figura 4. Fluconazol.

Candida glabrata, concretamente, es una especie que suele presentar sensibilidad reducida a los azoles y fácilmente desarrolla resistencia al antifúngico fluconazol (FLU) (Bennett y col., 2004; Noble y col., 2013). Se han descrito tres mecanismos de resistencia a azoles en especies del género *Candida* (Kanafani y Perfect, 2008), que incluyen la inducción de bombas de flujo (*efflux pumps*) que reducen la concentración intracelular del antifúngico (Pourakbari y col., 2017); mutaciones o sobreexpresión del gen *ERG11* que codifica para la enzima diana de los azoles, la 14- α esterol demetilasa, cuya inhibición induce acumulación de esteroides

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

metilados como el lanosterol y el 14- α metil-3-6-diol, que son tóxicos para la célula y afectan a la integridad de la membrana (Lupetti y col., 2002); o por mutaciones en el gen *ERG3* que codifica para la $\Delta^{5,6}$ - esterol desaturasa, enzima esencial para la biosíntesis de ergosterol, confiriéndole al microorganismo resistencia al fluconazol sin afectar a su virulencia (Sanglard y col., 2003; Vale-Silva y col., 2012). Además, se ha descrito que el fluconazol puede inducir estrés oxidativo en especies del género *Candida*, lo que a su vez induce una respuesta adaptativa que resulta en un aumento de actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) (Linares y col., 2013).

4. Uso de levaduras como organismos modelo

Hace casi 30 años Botstein y Fink (1988) ya anticiparon la importancia que tendría en la biología de los eucariotas las contribuciones de los estudios usando levaduras como organismo modelo. En los años siguientes, las levaduras se han establecido como el principal modelo en el conocimiento de la biología de las células eucariotas, lo que ha facilitado el establecimiento de nuevos campos de estudio como la “genómica funcional” o la “biología de sistemas”, que han permitido abordar el estudio las funciones de genes y proteínas de forma individual, y su interacción y papel en el metabolismo y fisiología celular (Botstein y Fink, 2011).

Tradicionalmente, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha sido uno de los microorganismos más estudiados. Conocida como *baker's* o *budding yeast* (levadura de panadería o gemante), *S. cerevisiae* se ha empleado como modelo para estudiar la genética y biología celular de los eucariotas, adquiriendo recientemente relevancia en otras áreas tan variadas como la ecotoxicología, la farmacología, la oncología e incluso las enfermedades neurodegenerativas (Bharadwaj y col., 2010; Leeuwen y col., 2012; Pimentel y col., 2012; Teixeira, 2013; Braconi y col., 2016; Kalimutho y col., 2017). Ello es debido a que es un organismo de crecimiento rápido (pudiendo, en condiciones óptimas, completar un ciclo de vida en menos de 2 horas), que su cultivo se puede realizar de forma económica, y que las rutas bioquímicas necesarias para el correcto funcionamiento de los organismos están altamente conservadas en los eucariotas,

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

desde levaduras hasta seres humanos (Menacho-Márquez y Murguía, 2007). Los genes de *S. cerevisiae* muestran no solo una alta homología de secuencia, sino también funciones proteicas enormemente conservadas entre las especies (Foury, 1997; Botstein y Fink, 2011). De esta forma, el uso de *S. cerevisiae* como organismo modelo permite averiguar el papel de las proteínas en el contexto del metabolismo celular e incluso identificar posibles dianas terapéuticas (Menacho-Márquez y Murguía, 2007).

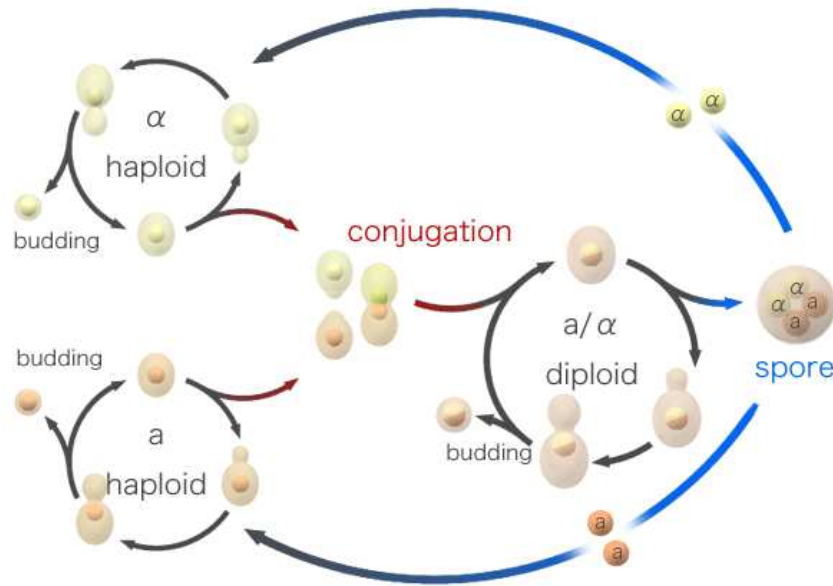


Figura 5. Ciclo de vida de levaduras gemantes (*budding yeast*) como *Saccharomyces cerevisiae*. Las levaduras se reproducen de forma vegetativa tanto en la forma haploide como diploide. El paso de la forma haploide a la diploide sucede mediante conjugación de los dos tipos sexuales: **a** y **α**. El paso de la forma diploide a haploide sucede a través de meiosis. Tomado de: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Budding_yeast_Lifecycle.png.

S. cerevisiae puede ser haploide o diploide, siendo ambos tipos celulares estables en las cepas comunes de laboratorio y pudiéndose reproducir en ambos casos de forma asexual mediante mitosis, ocurriendo la división por gemación. En el caso de ser del tipo haploide, pueden encontrarse dos tipos sexuales: **a** y **α**, determinados por un par de alelos heterocigotos: *MATa* y *MATα*. Ambos tipos pueden conjugarse entre sí para dar lugar a células diploides *MATa/MATα*, que en condiciones desfavorables,

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 974511	Código de verificación: nnAZcF1T	
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

Introducción

como puede ser la ausencia de nutrientes, entran en meiosis y producen cuatro esporas haploides: dos de tipo sexual **a** y dos de tipo **α** (figura 5). El trabajar con la forma haploide presenta grandes ventajas en cuanto a lo que manipulación genética se refiere, ya que sólo está presente una copia de cada gen (Hartwell y col., 1974).

El genoma de *S. cerevisiae* ha sido secuenciado y está disponible desde abril de 1996. Posee un tamaño de 12,1 millones de pares de bases (pb) con casi 6.600 genes distribuidos en 16 cromosomas. Actualmente se tiene un profundo conocimiento del mismo y existen fuentes de recursos como librerías de delección de genes a disposición de la comunidad científica (Winzeler y col., 1999; Cherry y col., 2012).

Éste, nuestro organismo modelo de partida, es el utilizado principalmente en modelos de estudio de mutagénesis adaptativa en eucariotas (Babudri y col., 2006; Heidenreich, 2007), mayoritariamente bajo condiciones de estrés nutricional (Heidenreich y Steinboeck, 2017). En dichos modelos los resultados indican que las mutaciones se acumulan de forma más frecuente cuando confieren una ventaja selectiva, lo que es consistente con que ocurran mutaciones adaptativas en levaduras.

Además de *S. cerevisiae* se han venido empleando otras levaduras como modelos de estudio tales como *Schizosaccharomyces pombe* o la ya mencionada e infecciosa ***Candida albicans***. Esta última, la especie del género *Candida* aislada con mayor frecuencia en casos de candidiasis (45-50%) (Del Palacio y col., 2009), incluye cepas de laboratorio obtenidas a partir de aislados clínicos que han sido empleadas en el estudio de la biología molecular el organismo (Odds y col., 2004). Como levadura, *C. albicans* comparte características con *S. cerevisiae* que la sitúan como buen organismo modelo: crecimiento rápido, cultivo de forma económica, y conservación de las rutas bioquímicas.

A diferencia de *S. cerevisiae*, *C. albicans* es generalmente diploide y posee una gran plasticidad genómica, pudiendo sufrir reordenamientos cromosómicos con el consecuente incremento en la diversidad genética (Selmecki y col., 2010). Su reproducción se había considerado exclusivamente asexual hasta que Hull y col., (2000) describieron por primera vez un ciclo parasexual en el que la conjugación de células de distinto o incluso del mismo sexo da lugar a tetraploides que pueden

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

retornar a un estadio diploide a través de una pérdida concertada de cromosomas, sin mediar meiosis (figura 6).

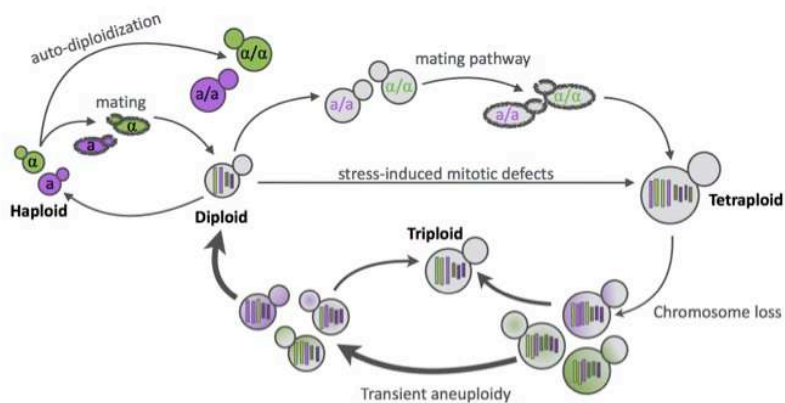


Figura 6. Ciclo de vida de *Candida albicans*. Esta levadura presenta un ciclo de vida complejo, presentando diferentes ploidías, y pudiendo reproducirse de forma vegetativa o conjugándose células de distinto o incluso mismo sexo, dando lugar a tetraploides que pueden retornar a un estadio diploide de forma parasexual mediante pérdida de cromosomas. Tomado de: <https://meleahhickman.wordpress.com>.

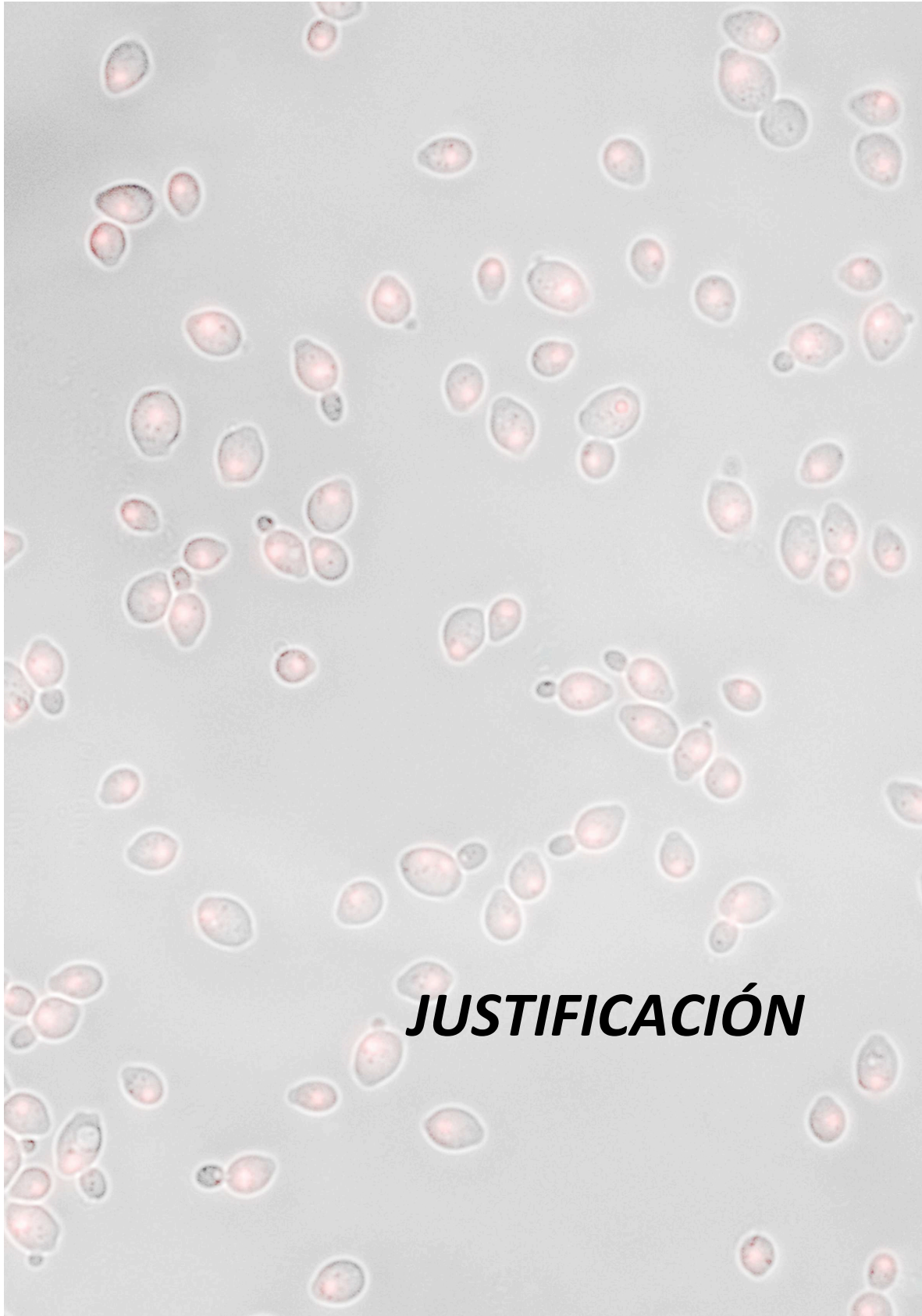
Con un genoma de aproximadamente 32 millones de pares de bases (16 x 2) repartido en 8 pares de cromosomas (Chu y col., 1993), se está profundizando en el conocimiento del mismo y, por ejemplo, se ha logrado la secuenciación de la cepa de laboratorio: SC5314 (Jones y col., 2004), de la cual proceden la mayoría de cepas de estudio.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 974511	Código de verificación: nnAZcF1T	
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511		Código de verificación: nnAZcF1T
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48



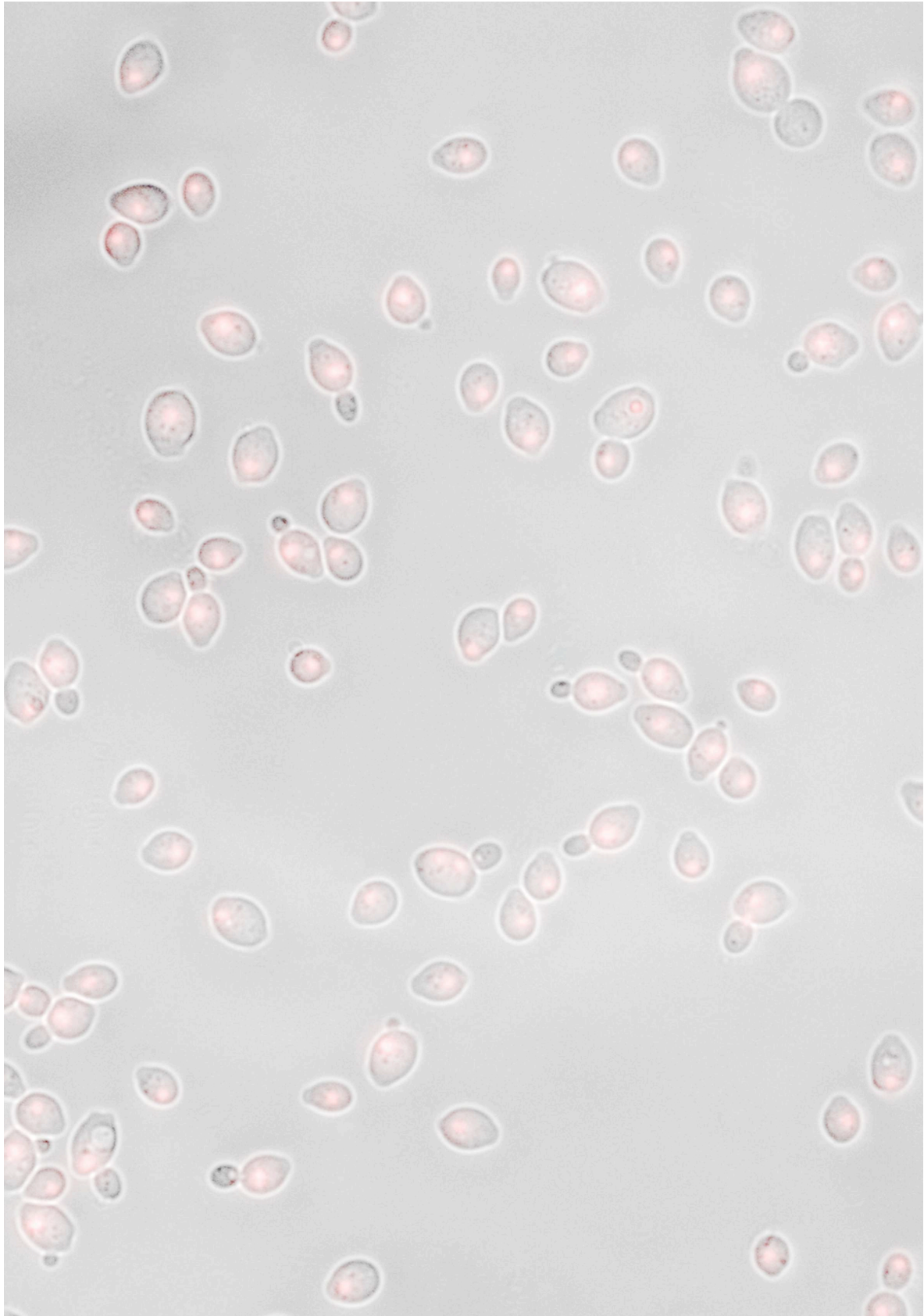
JUSTIFICACIÓN

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

JUSTIFICACIÓN

El tratamiento empírico y preventivo con antifúngicos está teniendo como consecuencia indeseada un aumento en la resistencia a los mismos, bien por un incremento en el porcentaje de patógenos intrínsecamente resistentes, bien por la adquisición de resistencia secundaria.

En levaduras, el fenómeno conocido como mutagénesis adaptativa da lugar a la adquisición de resistencia secundaria a fármacos antifúngicos. Esta resistencia adquirida se debe a mutaciones que permiten a células individuales superar la fuerte presión selectiva ejercida por el antifúngico.

Experimentos preliminares, de puesta a punto de la metodología y el modelo experimental desarrollado en la tesis, ya mostraron diferencias en cuanto al espectro de mutaciones al exponer de forma prolongada a *S. Cerevisiae* a 5-FC. La mayoría de las levaduras con fenotipo de resistencia adquirida presentaban mutaciones en el gen *FCY2*.

El modelo de estudio permitiría investigar el fenómeno en *S. cerevisiae* frente a 5-fluorocitosina y otros antifúngicos, como la equinocandina caspofungina, así como en otras especies de levadura de mayor relevancia clínica como *C. albicans* o *C. Glabrata*. También permitiría realizar una colección de clones con fenotipo de resistencia a partir de las cepas empleadas en el estudio, que podrían ser empleados en diversos análisis microbiológicos o genéticos para estudiar el fenómeno de adquisición de resistencia.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAINERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

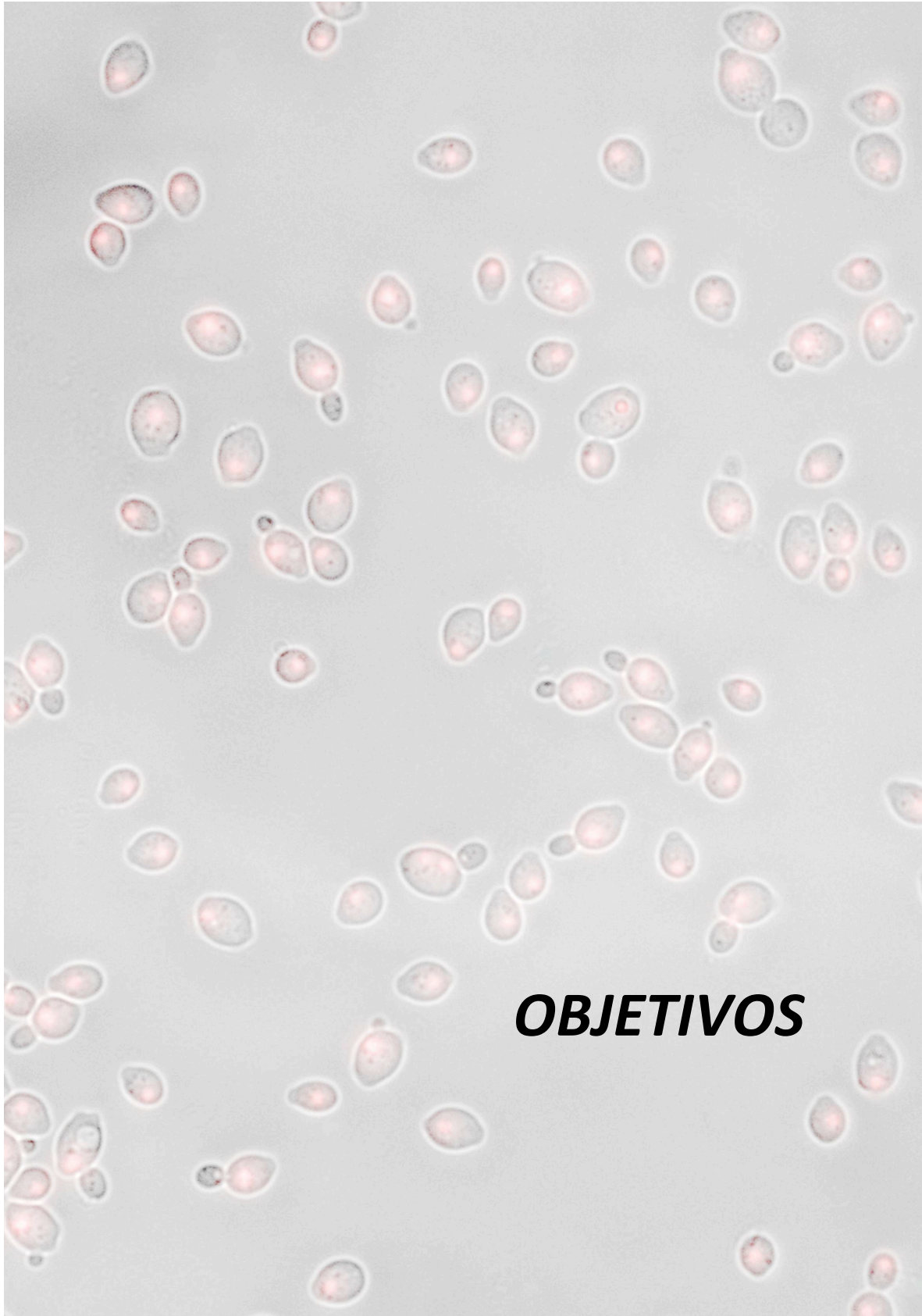


Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48



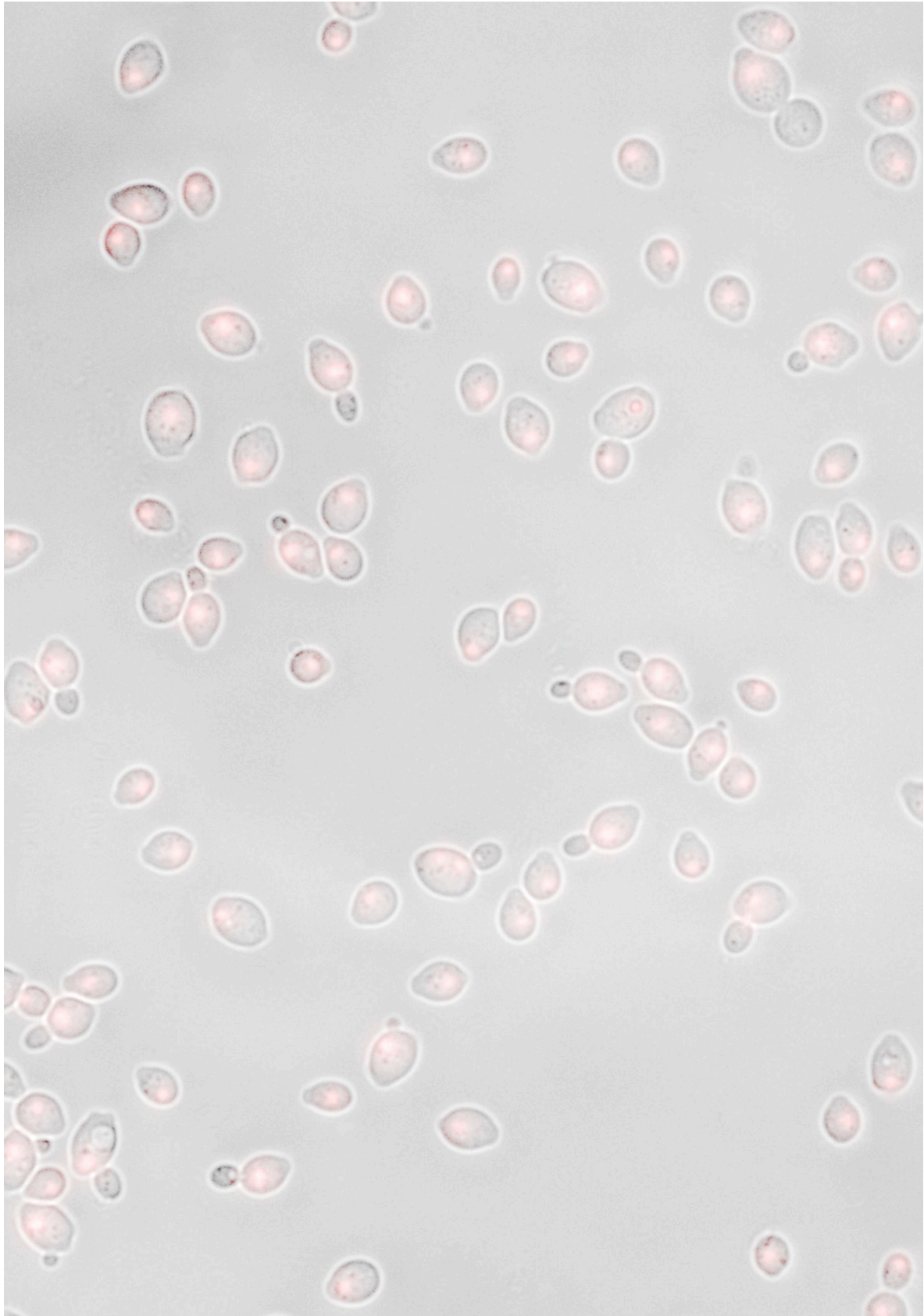
OBJETIVOS

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

OBJETIVOS

Para la consecución de esta tesis se plantean los siguientes objetivos generales:

1. Confirmar en *S. cerevisiae* la implicación del gen *FCY2* en la adquisición de resistencia a 5-FC.
2. Evaluar si, en *S. cerevisiae*, la adquisición de resistencia a 5-FC es específica para este antifúngico o si ocurre con otros como la equinocandina caspofungina (CSP).
3. Trasladar el modelo desarrollado en *S. cerevisiae* a otro organismo modelo, y de mayor relevancia clínica, como *C. albicans*.
4. Analizar la adquisición de resistencia secundaria a antifúngicos en aislados clínicos de especies del género *Candida*, así como identificar mutaciones en los genes *FKS1* y *FKS2*.
5. Determinar en los diferentes organismos modelo empleados la posible generación de estrés oxidativo por la exposición a antifúngicos, a través de la actividad de enzimas antioxidantes.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

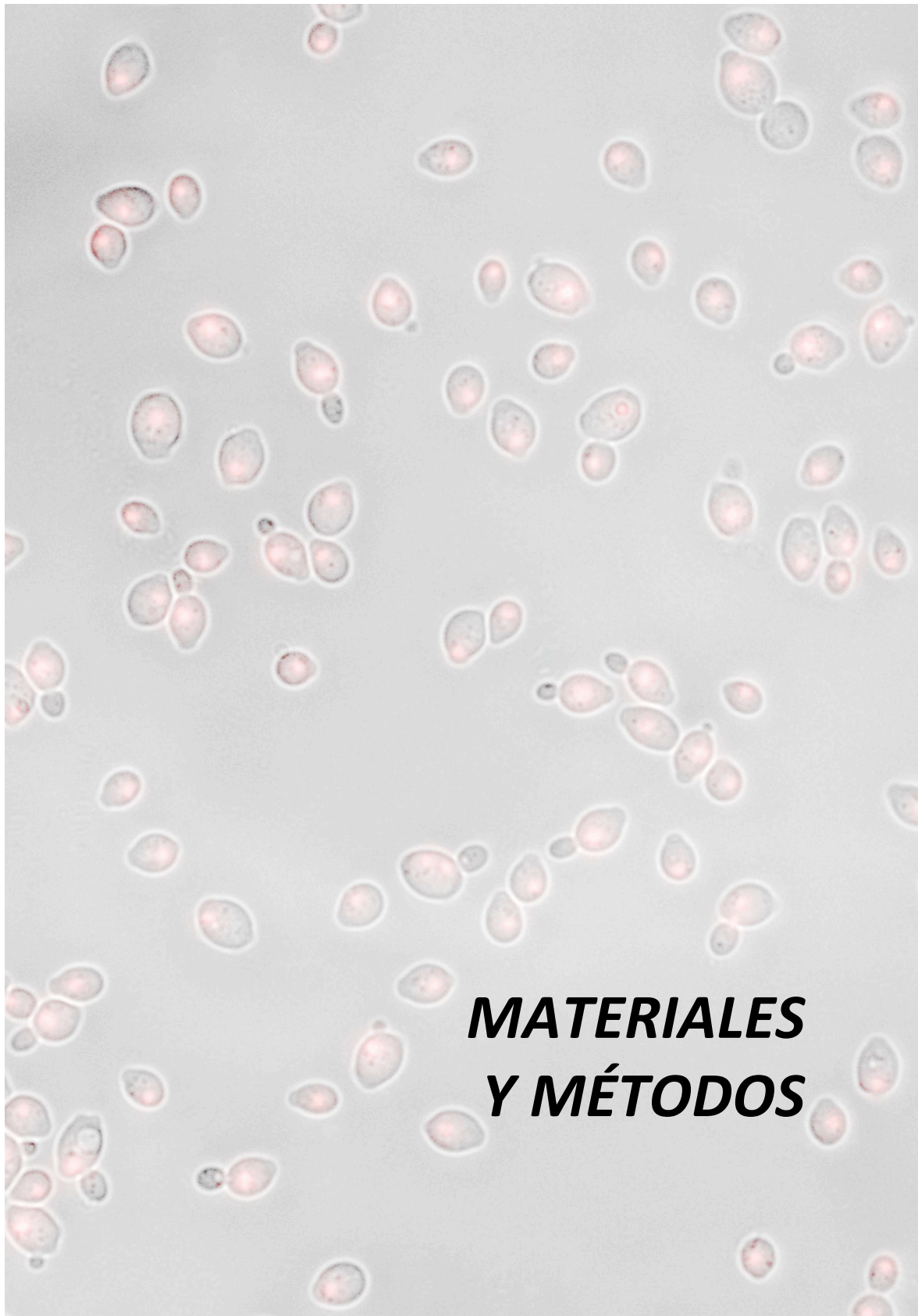


Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Identificador del documento:	Código de verificación:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	974511	nnAZcF1T	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			11/07/2017 18:00:48



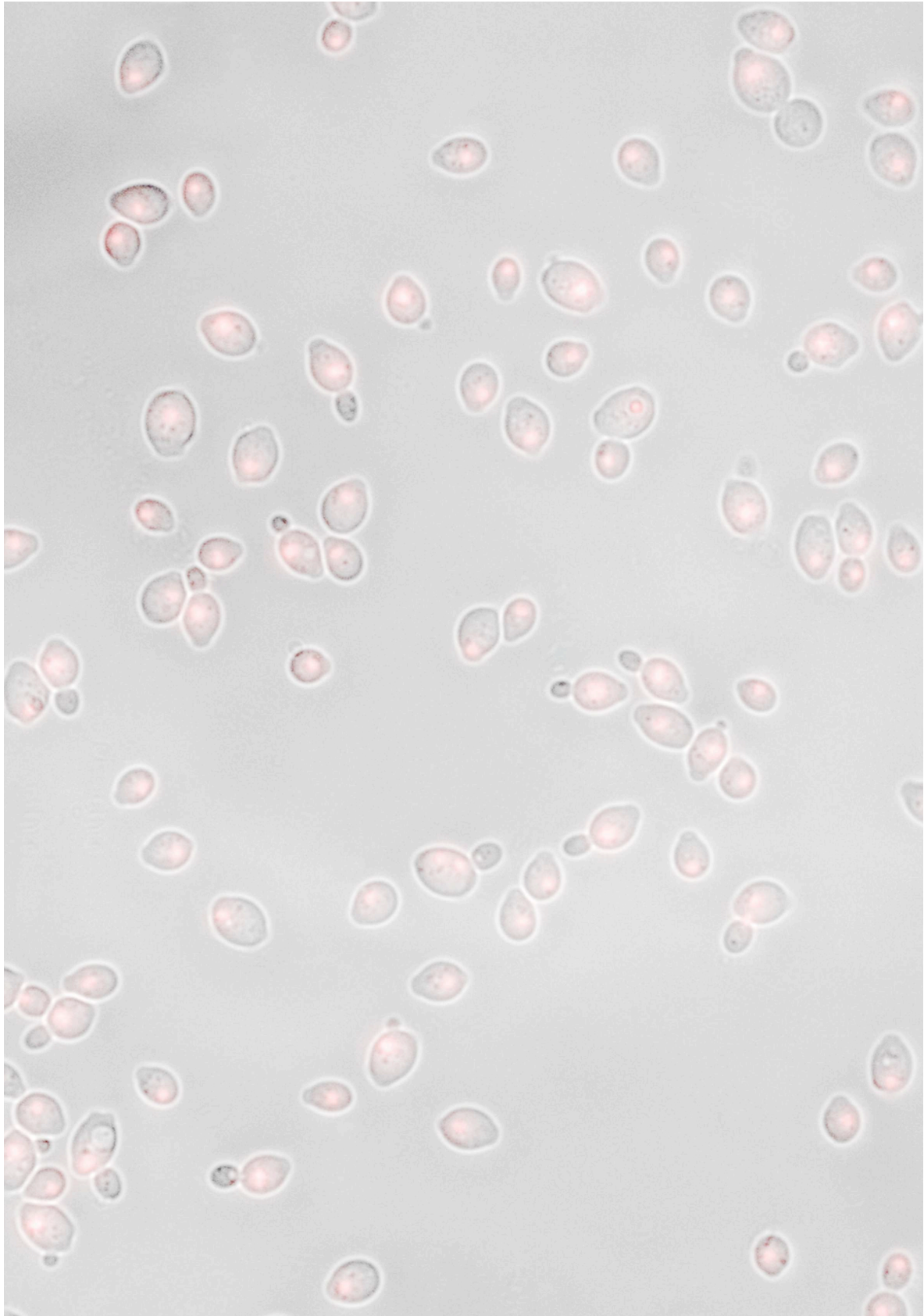
MATERIALES Y MÉTODOS

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas de levadura

Las levaduras utilizadas en este trabajo (tabla 1) incluyen dos cepas de laboratorio: una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* y una cepa de *Candida albicans*; y dos aislados clínicos de las especies *Candida albicans* y *Candida glabrata*, cedidas por el Servicio de Microbiología y Parasitología Clínica del Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Tenerife, España.

La cepa de laboratorio *Saccharomyces cerevisiae* BY4741, con genotipo: *MATa his3Δ0 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*, fue la empleada como cepa parental en el *International Systematic Saccharomyces cerevisiae Gene Disruption Project*, y la secuencia completa de su genoma se encuentra disponible en la base de datos *Saccharomyces Genome Database* (SGD, <http://www.yeastgenome.org>).

La cepa de laboratorio *Candida albicans* SC5314 fue la cepa de referencia empleada para el proyecto de secuenciación sistemática de *C. albicans*. La secuencia está disponible en la base de datos *Candida Genome Database* (CGD, <http://www.candidagenome.org>). De ella derivan la mayoría de cepas de laboratorio de esta especie, es virulenta en modelos murinos de infección sistémica y se emplea frecuentemente en investigación como control *wild-type*.

Tabla 1. Cepas de levadura utilizadas en el estudio.

Cepa	Genotipo
<i>S. cerevisiae</i> BY4741	<i>MATa his3Δ0 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>
<i>C. albicans</i> SC5314	wild-type
<i>C. albicans</i> CA48	Aislado clínico
<i>C. glabrata</i> CG57	Aislado clínico

Identificador del documento: 974511	Código de verificación: nnAZcF1T	Fecha:
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAINERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

2. Medios de cultivo microbiológico y antifúngicos

Para todos los experimentos y preparativos de los mismos, las células fueron crecidas a 30°C (*S. cerevisiae*) o a 37°C (*C. albicans* y *C. glabrata*), en los medios YPD (*Yeast Peptone Dextrose*): extracto de levadura 1%, peptona 2%, dextrosa 2%; o en medio mínimo SC (*Synthetic complete medium*): base nitrogenada de levadura 0,67%, glucosa 2%) suplementado con aminoácidos como se describe en Burke y col., (2000). Para los medios sólidos se añadió agar 2%.

Los fármacos antifúngicos empleados en los experimentos fueron: 5-fluorocitosina (*Alfa Aesar GmbH*, Alemania), caspofungina (*Merck Sharp & Dohme Ltd.*, Reino Unido) y fluconazol (*Alfa Aesar GmbH*, Alemania), pertenecientes a tres grupos distintos de antifúngicos y con diferente mecanismo de acción.

3. Estimaciones de concentración mínima inhibitoria (CMI)

Para preparar los medios de cara a los experimentos de mutagénesis activada por estrés (SLAM, *stressful lifestyle activated mutagenesis*) descritos en el apartado siguiente, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) en BY4741 y SC5314 a 5-FC y CSP, y en CA48 y CG57 a CSP. Definimos la CMI como la concentración mínima de fármaco que inhibe por completo el crecimiento, y se determinó como la menor concentración de antifúngico que permitía el crecimiento de 3 colonias o menos en el agar, considerándose esas colonias provenientes de células con resistencia espontánea.

Los ensayos se realizaron en placas de cultivo celular de 24 pocillos con 1,0 ml de medio solidificado por pocillo, conteniendo concentraciones crecientes del antifúngico correspondiente. En las determinaciones con 5-FC se sembraron $1,7 \cdot 10^4$ células por pocillo, de cara a tener la misma densidad que en los experimentos de SLAM: $5 \cdot 10^5$ células por placa de petri de 90 mm. Para CSP se sembraron $1,7 \cdot 10^5$ células/pocillo, correspondiente a la densidad de levaduras por placa empleada en los SLAMs con CSP: $5 \cdot 10^6$ células por placa de petri de 90 mm. El aumento número de

Identificador del documento: 974511	Código de verificación: nnAZcF1T	Fecha:
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAINERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

células sembrado en medio con CSP se debe al potente efecto fungicida del fármaco. El crecimiento de colonias se evaluaba entre las 48 y 72 horas después de la siembra.

Para que la concentración de antifúngico en medio sólido no fuera limitada a lo largo de la duración de los experimentos de SLAMs, se seleccionaron concentraciones de fármaco lo más aproximadas a una concentración 4 veces superior a la CMI observada. Éstas fueron de 100 µg/ml de 5-FC tanto para *S. cerevisiae* (CMI = 24 µg/ml) como para *C. albicans* (CMI = 24 µg/ml), y 0,72 µg/ml de CSP para *S. cerevisiae* (CMI = 0,18 µg/ml), y 0,75 µg/ml para *C. albicans* y *C. glabrata* (CMI = 0,18 µg/ml y 0,20 µg/ml respectivamente)

4. Determinación de viabilidad y frecuencias de adquisición de resistencia: experimentos de SLAM.

El modelo de estudio desarrollado se basa en experimentos de mutagénesis activada por estrés (*stressful lifestyle activated mutagenesis*, SLAM). Éstos permiten determinar la viabilidad en el tiempo (desde el inicio del experimento hasta 7-9 días) de poblaciones de levaduras tras la exposición al antifúngico y calcular la frecuencia de aparición de resistentes en ese tiempo. Dichos resistentes se seleccionan a partir de las colonias aparecidas en las placas de medio SC con los distintos antifúngicos.

Los experimentos de SLAM se desarrollaron de la siguiente manera (figura 7): se resuspendieron colonias individuales, resultado de sucesivas divisiones de una única célula o unidad formadora de colonia (UFC), en medio YPD líquido y los inóculos resultantes eran incubados en un agitador orbital a 30°C (*S. cerevisiae*) ó 37°C (*C. albicans* y *C. glabrata*) para obtener diferentes subpoblaciones. Cuando estos cultivos alcanzaban una densidad aproximada de 10^8 células/ml, se recuperaba 1,0 ml del inóculo y, empleando el método de conteo en cámara de Neubauer, la concentración era ajustada a $5 \cdot 10^6$ (para 5-FC) ó $5 \cdot 10^7$ (para CSP) células/ml en una solución 0,9% de cloruro sódico (NaCl) estéril. Entonces cada subpoblación se sembró, empleando perlas de vidrio, en 2 placas de petri de 90 mm con medio sólido SC y el antifúngico correspondiente, a razón de $5 \cdot 10^5$ (para 5-FC) ó $5 \cdot 10^6$ (para CSP) células por placa, y las

Identificador del documento: 974511	Código de verificación: nnAZcF1T
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

placas se conservaban durante el tiempo de duración del experimento en incubadores a la temperatura correspondiente para cada especie. Una de las placas de cada subpoblación se destinaba a determinar el número de colonias según aparecían con el paso de los días de experimento (hasta 9), mientras que con la segunda placa se hacía un seguimiento de la viabilidad tras la siembra durante 7 días.

Inicialmente, tras el momento de la siembra, sólo aquellas células que portaran mutaciones que les confiriesen resistencia al antifúngico podrían proliferar y formar colonias. Éstas serían visibles pasadas 24-60 h y, así, las colonias aparecidas en los 3 primeros días de experimento se consideraron resultado de la proliferación de mutantes pre-existentes. Además de esas colonias, pasados los 3 días de incubación aparecían nuevas colonias que fueron marcadas y registradas cada dos días hasta 9 días después de realizada la siembra. Así, en total, se registraron los marcajes de colonias aparecidas a días 3, 5, 7 y 9 de experimento.

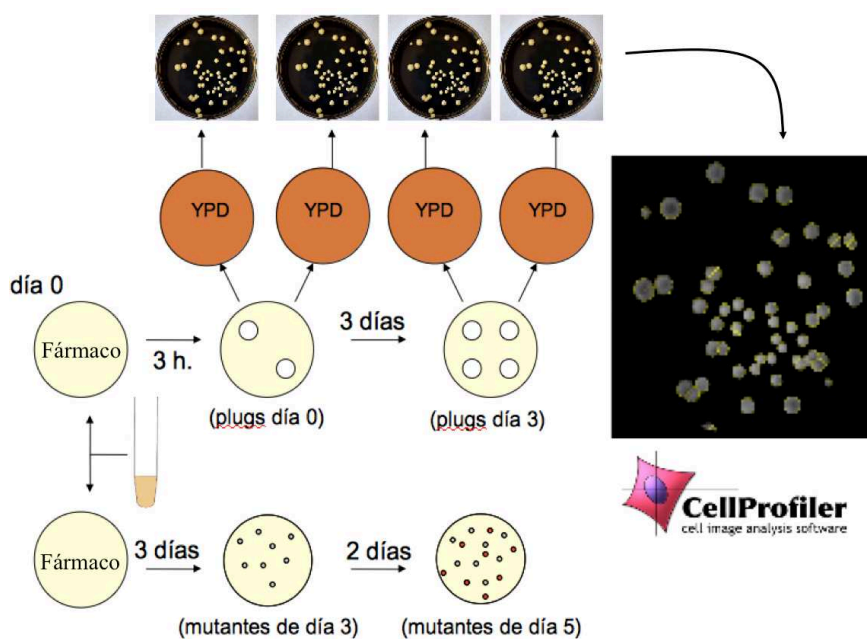


Figura 7. Desarrollo esquemático de la evolución de los experimentos de SLAM (*Stressful Lifestyle Adaptive Mutagenesis*).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 974511	Código de verificación: nnAZcF1T	
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAINERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

El número de células viables existentes durante el transcurso de los ensayos se determinó a partir de la segunda placa sembrada para cada subpoblación, extrayendo discos de agar de tamaño conocido (*plugs*). Tras resuspender las células presentes en el *plug* en solución NaCl 0,9% estéril, un volumen determinado (tabla 2) de la suspensión celular resultante era resembrado en placas de YPD para, pasados 5 días, hacer un recuento del número de UFCs existentes. A partir del número de UFC hallado y conociendo los volúmenes y relación de áreas, extrapolamos el número de células viables presentes en la placa. La determinación de UFCs se hizo tomando fotografías de las placas con una cámara NIKON D3000. Las imágenes obtenidas fueron analizadas posteriormente con el programa informático *CellProfiler cell image analysis software* (*Broad Institute of MIT and Harvard, E.E.U.U.*). Este procedimiento para determinar la viabilidad se llevó a cabo generalmente a las 3 h del día 0 de experimento, y también en los días 3, 5 y 7.

Tabla 2. Volúmenes de dilución de los *plugs*, y volúmenes de siembra en placa de YPD respecto a cada condición de organismo-antifúngico.

Día	Cepa	Fármaco	µl NaCl 0,9%/Pocillo	µl a Placa
0	todas	todos	1000	80
3	BY4741	5-FC	500	100
	SC5314	5-FC	500	50
	BY4741, CA48, CG57	CSP	300	150
5	BY4741	5-FC	500	100
	SC5314	5-FC	500	50
	BY4741, CA48, CG57	CSP	200	150
7	BY4741	5-FC	400	100
	SC5314	5-FC	400	50
	BY4741, CA48, CG57	CSP	(2 <i>plugs</i>) 200	150

El primer cómputo de viabilidad se realiza a las 3 horas de haber sembrado y existen dos motivos para ello. El primero es dar a las células suficiente tiempo de

Identificador del documento: 974511	Código de verificación: nnAZcF1T	Fecha: 30/06/2017 19:28:19
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

Materiales y Métodos

finalizar su ciclo celular asegurándonos de saber con exactitud el número de células de partida, el cual normalmente es ligeramente superior al número de células sembradas (aproximadamente un 20% superior). El segundo es dar tiempo a que el fármaco se incorpore a la célula y comience a ejercer su efecto.

De acuerdo al modelo de Luria y Delbrück (1943), si las células sufren una mutación espontánea que les confiere resistencia mientras están dividiéndose en medio líquido previo al experimento y esta mutación ocurre de forma temprana (en los primeros ciclos de división) tras preparar el inóculo, el número de células que portarían el cambio sería elevado, dando como resultado un número anormalmente alto de colonias que crecería inicialmente en las placas con el antifúngico (*jackpot*). Las subpoblaciones sembradas que dieran como resultado un *jackpot* a día 3 del experimento serían eliminadas del mismo debido a la alteración que producirían en la varianza estadística, además de plantear problemas metodológicos al dificultar en días tardíos de experimento la toma de *plugs* libres de células resistentes para calcular el número de células viables presentes en las placas.

Para hacer el cálculo de la frecuencia de mutación espontánea, el número de colonias aparecidas a día 3 se dividió por el número de células viables a las 3 h del día 0 de experimento. Para calcular las frecuencias de adquisición de resistencia secundaria (mutación adaptativa), el número de colonias aparecidas en los días posteriores al día 3 fue dividido por el número de células aún viables 2 días antes. Es decir, el número de colonias aparecidas a días 5, 7 y 9, fue dividido respectivamente por el número de células viables de los días 3, 5 y 7. Los dos días de diferencia entre cada registro se deben a que una colonia crecida a partir de las células viables que queden en la placa tarda entre 24 - 48 h en ser visible.

Como control para asegurar la estabilidad de los antifúngicos en las placas durante el tiempo de transcurso de los experimentos, se prepararon 6 placas adicionales de medio SC con cada antifúngico y 3 placas de cada uno de ellos se mantuvieron en los incubadores a 30 y 37°C durante 14 días. Paralelamente al inicio de uno de los SLAMs de cada combinación de cepa-antifúngico, fueron sembradas de la misma forma que en los experimentos. A lo largo del tiempo del experimento, se hizo

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

el seguimiento del comportamiento de las células en las placas para comprobar que no existían diferencias y por tanto el antifúngico mantenía su estabilidad.

5. Recolección de resistentes y experimentos de reconstrucción.

A partir de las colonias aparecidas en las placas de medio SC con los distintos antifúngicos se procedió a realizar una recolección de clones resistentes. Esto permitió generar una colección de clones que además de ser sometidos a los experimentos de reconstrucción descritos en este apartado, se emplearon en los análisis genéticos posteriores.

El origen mutacional o metabólico de éstos fue verificado subcultivando cada colonia recolectada en nuevas placas con medio sólido SC con antifúngico, luego en placas con medio YPD sin antifúngico (para desactivar los posibles mecanismos metabólicos que le hayan permitido proliferar) y de nuevo en medio sólido SC con antifúngico. De esta manera, una colonia aparecida a días tardíos del experimento que haya adquirido alguna mutación ventajosa no volverá a tardar en crecer en el medio con el antifúngico.

6. Análisis genético

El análisis del ADN genómico de colonias resistentes se realizó a partir de los clones coleccionados en los experimentos de SLAM, extrayendo el material genético y amplificando las secuencias de interés por PCR (reacción en cadena de la polimerasa, *Polymerase Chain Reaction*) para su posterior secuenciación, y llevando a cabo electroforesis en gel de campo pulsado para visualizar el estado de los cromosomas y evaluar la posibilidad de que se hubieran producido grandes reordenamientos cromosómicos.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. <i>Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/</i>		
Identificador del documento: 974511		Código de verificación: nnAZcF1T
Firmado por:	DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 30/06/2017 19:28:19
	CRISTINA GIL LAMAINERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
	FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
	MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
	ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

6.1 Extracción de ADN

Para la extracción del ADN se empleó una metodología de fractura mecánica de las células mediante vortex empleando microperlas de vidrio con una solución de fenol/cloroformo/isoamiloalcohol (PCI) y posterior precipitación en etanol. Para obtener suficiente material de partida para la extracción, se inocularon los clones el día previo a la extracción en medio YPD líquido y se incubaron a la temperatura correspondiente para cada cepa en un incubador orbital.

El ADN extraído resultante se purificó en columnas de Sephadex G-50, obteniéndose volúmenes de 50 µl/muestra, y las muestras de material genético se almacenaron congeladas a -80°C hasta su posterior uso para amplificar las secuencias de interés. Para comprobar la integridad del ADN extraído se procedió a correr las muestras en electroforesis en gel de agarosa 0,9%, y se midió la cantidad y calidad del ADN con un *NANODROP 2000* (*Thermo Scientific*, E.E.U.U.).

6.2 Amplificación por PCR

A partir del ADN genómico extraído y purificado se procedió a la amplificación por PCR de los genes o secuencias de interés, para su posterior secuenciación.

Tras haber comprobado la integridad del material genómico en electroforesis en gel de agarosa, se midió la concentración usando un *NANODROP 2000* para ajustarla a un intervalo óptimo para la reacción de PCR de 160-200 ng/µl. Las amplificaciones se realizaron a partir de 0,9 µl de muestra empleando el *VWR Taq DNA Polymerase Kit* (*VWR, Dinamarca*) con los cebadores descritos en la tabla 3. Los productos de esta reacción se purificaron en columna de Sephadex G-50 y su concentración se midió de nuevo usando un *NANODROP 2000*. El diseño de los cebadores se realizó con el programa informático *Vector NTI Advance™ 11* (*Invitrogen*, E.E.U.U.).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 974511		Código de verificación: nnAZcF1T
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

Tabla 3. Cebadores empleados en las reacciones de amplificación por PCR (Polymerase Chain Reaction).

Gen	Nombre cebador	Secuencias cebadores
<i>S. cerevisiae</i> FCY2	<i>Fcy2_f</i>	ATGGAACGGCCTCAAGGAACT
	<i>Fcy2_r</i>	TGATACATGACGTGAAATGTGC
<i>S. cerevisiae</i> FCY1	<i>FCY1_af</i>	GTTTTCTATTGCCATTTTTATCG
	<i>FCY1_ar</i>	ACCTGAACACCGACGAAGAC
<i>S. cerevisiae</i> FUR1	<i>Fur1_af</i>	GAGGAACCGATTGGCAGAGC
	<i>Fur1_ar</i>	TCAAGATGGTGTTCGGGTGTG
<i>S. cerevisiae</i> CDC21	<i>CDC21_af</i>	GCTTCTTTCCCTCTCGTC
	<i>CDC21_ar</i>	TCTTTTGGCCCTGGTGTCC
Región	Nombre cebador	Secuencias cebadores
<i>C. albicans</i> FKS1 HS1	<i>FKS1-CSP-HS1_F</i>	AATGGGCTGGTGCTCAACAT
	<i>FKS1-CSP-HS1_R</i>	CCTTCAATTCAGATGGAACCTGATG
<i>C. albicans</i> FKS1 HS2	<i>FKS1-CSP-HS2_F</i>	AAGATTGGTGCTGGTATGGG
	<i>FKS1-CSP-HS2_R</i>	TAATGGTGCTTGCCAATGAG
<i>C. glabrata</i> FKS1 HS1	<i>CGL_FKS1_HS1_F</i>	CCATTGGGTGGTCTGTTCACG
	<i>CGL_FKS1_HS1_R</i>	GATTGGGCAAAGAAAGAAATACGAC
<i>C. glabrata</i> FKS1 HS2	<i>CGL_FKS1_HS1_F</i>	GGTATTTCAAAGGCTCAAAGGG
	<i>CGL_FKS1_HS1_R</i>	ATGGAGAGAACAGCAGGGCG
<i>C. glabrata</i> FKS2 HS1	<i>CGL_FKS1_HS1_F</i>	GCTTCTCAGACTTTCACCG
	<i>CGL_FKS1_HS1_R</i>	CAGAATAGTGTGGAGTCAAGACG
<i>C. glabrata</i> FKS2 HS2	<i>CGL_FKS1_HS1_F</i>	TCTTGACTTTTACTATGCG
	<i>CGL_FKS1_HS1_R</i>	CTTGCCAATGTGCCACTG

Se muestran los cebadores empleados tanto para amplificar los genes *FCY2*, *FCY1*, *FUR1* y *CDC21* de *S. cerevisiae*, como los cebadores utilizados en la amplificación de las regiones de hipermutabilidad HS (*HotSpots*) de los genes *FKS1* de *C. albicans* CA48, y *FKS1* y *FKS2* de *C. glabrata* CG57.

6.3 Electroforesis en gel de agarosa

Tanto para determinar la integridad del ADN genómico extraído como para confirmar las amplificaciones por PCR, para todas las muestras se realizó electroforesis en gel de agarosa 0,9% (peso/volumen) en tampón TAE 1x (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM). Los pocillos se cargaron con 3 - 5 µl de muestra y 5 µl de tampón de carga (*Promega*, E.E.U.U.), y como marcador de peso molecular se empleó 1 µl de los marcadores de peso molecular *marker II* para las muestras de ADN genómico de las extracciones, y *marker XIV 100 bp ladder* (ambos de *Roche*, Suiza) para los amplicones producto de PCR.

Para observar las bandas de ADN, al polimerizar el gel se añadió el agente intercalante bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µl/ml. Al finalizar la carrera

Identificador del documento: 974511	Código de verificación: nnAZcF1T
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

de electroforesis, los geles se visualizaron directamente bajo luz UV en un *Gel Doc system* (Bio-Rad, E.E.U.U.).

6.4 Secuenciación de genes

Para la secuenciación de los genes o secuencias de interés se empleó un secuenciador ABI 3500 Genetic Analyzer (*Thermo Scientific*, E.E.U.U.) con tecnología de electroforesis capilar, utilizando el método de Sanger (Sanger y col., 1977). La concentración de ADN se ajustó a un intervalo óptimo de 30-50 ng/μl, midiendo de nuevo en un *NANODROP 2000*.

El diseño de los cebadores para la reacción de secuenciación (se muestran las secuencias en las tablas 4 y 5) se realizó con el programa informático *Vector NTI Advance™ 11* (*Invitrogen*, E.E.U.U.). Se secuenciaron las regiones previamente amplificadas, correspondientes a los genes *FCY2*, *FCY1*, *FUR1* y *CDC21* de *S. cerevisiae*, y de los genes *FKS1* de *C. albicans* CA48, y *FKS1* y *FKS2* de *C. glabrata* CG57, conteniendo las regiones de hipermutabilidad (HS, *hotspots*).

Tabla 4. Cebadores empleados en la reacción de secuenciación de los genes de *S. cerevisiae*.

Gen	Nombre cebador	Secuencias cebadores
<i>S. cerevisiae</i> FCY2	<i>Fcy2_F0</i>	GCATATAAAACATCCTATCC
	<i>Fcy2_F1</i>	TTTGGGTGCCTTAGGAC
	<i>Fcy2_F2</i>	AAGGTGGTGAATGGGTAG
	<i>Fcy2_R0</i>	CCCAACCGACACAAGC
	<i>Fcy2_R1</i>	TAGGAACCAGGATAGCAT
	<i>Fcy2_R2</i>	GAAATGTGCACGGGGAAATGA
<i>S. cerevisiae</i> FCY1	<i>FCY1_ars</i>	TTTCAAGTCTCCCTAGTAGTG
	<i>FCY1_sf</i>	TAGTGACCTATGGTGTG
<i>S. cerevisiae</i> FUR1	<i>Fur1_sf</i>	AAGCTGCCTCAAAGAG
<i>S. cerevisiae</i> CDC21	<i>CDC21_sf</i>	AGTATCAAGGAGAGAGC
	<i>CDC21_sr</i>	TTTCTCCTCGTGCTGC

Se muestran los cebadores empleados para la secuenciación de los genes *FCY2*, *FCY1*, *FUR1* y *CDC21* de *S. cerevisiae*.

Identificador del documento: 974511	Código de verificación: nnAZcF1T	Fecha: 30/06/2017 19:28:19
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

Tabla 5. Cebadores empleados en las reacciones de secuenciación de los genes de *C. albicans* CA48 y *C. glabrata* CG57.

Gen	Nombre cebador	Secuencias cebadores
<i>C. albicans</i> FKS1	Ca_FKS1_amp_seq_Fw0	CAACACCCAACTGATATACTAAC
	Ca_FKS1_amp_seq_Rv19	AATAAACCACTTCGCTCCC
	Ca_FKS1_seq_Fw1	GTATGTCACCAGCTCAGGCC
	Ca_FKS1_seq_Fw2	TACCCAGAAGGTATTCCAG
	Ca_FKS1_seq_Fw3	GGTTTAGATATGTGGATGTC
	Ca_FKS1_seq_Fw4	GTTTTCACTCCTCATTATTC
	Ca_FKS1_seq_Fw5	AGACGTCGTCTAAATTCAG
	Ca_FKS1_seq_Fw6	ACTCAACTTCCATTGGATAG
	Ca_FKS1_seq_Fw7	TCCTTGATTACAGAGATTTC
	Ca_FKS1_seq_Rv12	TCTTACTCTTTCTTGGAG
	Ca_FKS1_seq_Rv13	GCAAGAACCACCAATGGC
	Ca_FKS1_seq_Rv14	ATTTGATTCCATTCCGTGG
	Ca_FKS1_seq_Rv15	GCCCAAATCTTGTCTTAAAG
	Ca_FKS1_seq_Rv16	TACCAGCAGCAACATCACCC
	Ca_FKS1_seq_Rv17	CACCAACGGTCAAATCAGTG
	Ca_FKS1_seq_Rv18	TGAACAATGACGGCAACACC
	Cgl_FKS1_amp_seq_Fw0	CTTGCTATTAATCCCTATCGC
	Cgl_FKS1_amp_seq_Rv17	TGCTAGTTGAAGGACGATCAG
<i>C. glabrata</i> FKS1	Cgl_FKS1_seq_Fw1	CAAGAAATGGTACTTCGCC
	Cgl_FKS1_seq_Fw2	GCTACAATCTGTGAATGGTC
	Cgl_FKS1_seq_Fw3	AAGAGAACTTTGAGAGCCC
	Cgl_FKS1_seq_Fw4	CTGATAACCAGAACCATGC
	Cgl_FKS1_seq_Fw5	TCATTGTTTTCTGGATTGCC
	Cgl_FKS1_seq_Fw6	GAAGTGGTTCAGTTATGGC
	Cgl_FKS1_seq_Rv11	TCACGCTTAACGTAACGAC
	Cgl_FKS1_seq_Rv12	TCTCATGGTAGTGGTAGAC
	Cgl_FKS1_seq_Rv13	GAGTATATTCAGGAGCAGC
	Cgl_FKS1_seq_Rv14	TACGACCACCACGTAATAG
	Cgl_FKS1_seq_Rv15	TAGTCTCTGTAATCCAAGAAG
	Cgl_FKS1_seq_Rv16	AGGTATCTTTGACCACTTCTC
	Cgl_FKS2_amp_seq_Fw0	GCCTAACTCCCACTTGTGC
	Cgl_FKS2_amp_seq_Rv17	ATTAGGGGATTATCTATTGCCTC
	Cgl_FKS2_seq_Fw1	TGGTGGTTATGAGAACGAC
	Cgl_FKS2_seq_Fw2	TTATGCCAACAGAGAACAG
	Cgl_FKS2_seq_Fw3	CTTATTTAGTTTGGGTTAC
	Cgl_FKS2_seq_Fw4	ATCCAGAGAAATCTGACGC
Cgl_FKS2_seq_Fw5	AACTGCATTATGGTCACCC	
Cgl_FKS2_seq_Fw6	TACTATGGTCTGGGCATC	
Cgl_FKS2_seq_Fw7	CTGTGCTTTGTATTCTGC	
Cgl_FKS2_seq_Rv10	TGGTGGTTATGAGAACGAC	
Cgl_FKS2_seq_Rv11	GGTTAGATCGATGAAGACG	
Cgl_FKS2_seq_Rv12	TACGATTGAAATGGTCAC	
Cgl_FKS2_seq_Rv13	ATCTCCATATCAGTTGTGG	
Cgl_FKS2_seq_Rv14	GCTCTTAACAAGAATTGAG	
Cgl_FKS2_seq_Rv15	GAACAAGTTATCAAATGG	
Cgl_FKS2_seq_Rv16	TTGACTCTGCATCATCGG	

Se muestran los cebadores empleados para la secuenciación de los genes *FKS1* de *C. albicans* CA48, y los empleados para la secuenciación de los genes *FKS1* y *FKS2* de *C. glabrata* CG57.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

Materiales y Métodos

En vista de los resultados de secuenciación preliminares, el diseño de los cebadores para el gen *FCY2* de *S. cerevisiae* y los genes *FKS1* y *FKS2* de *C. albicans* CA48 y CG57, se hizo tal forma que las secuencias resultantes fueran solapantes, de modo que siempre se tuvieran al menos dos secuenciaciones de cada región de interés, y así poder tener confirmación de los posibles cambios de bases (mutaciones) advertidos en las secuencias. En las figuras 8 y 9 se muestran ejemplos del diseño de cebadores para secuencias solapantes y del análisis de secuencias solapadas correspondientes al gen *FCY2* de *S. cerevisiae*.

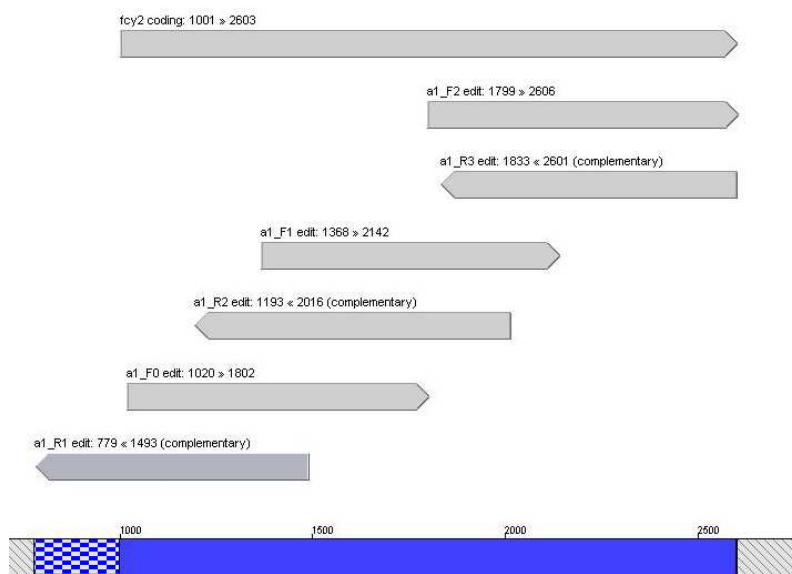


Figura 8. Representación de las secuencias solapantes previstas en el diseño de los cebadores para amplificar por partes el gen *FCY2*. Se muestra la representación de la secuencia codificante del gen (*fcy2 coding*) y las representaciones de los tamaños estimados de las elongaciones a partir de los 6 cebadores diseñados.

El posterior análisis y alineamiento de las secuencias se llevó a cabo con la herramienta *ContigExpress*TM del mismo programa, utilizando como secuencias de referencia secuenciaciones propias de los mismos fragmentos de controles *wild-type* y las secuencias recogidas en las bases de datos de *Saccharomyces Genome Database*

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento:	Código de verificación:	
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	974511	nnAZcF1T
		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

(SGD, <http://www.yeastgenome.org>) y *Candida Genome Database* (CGD, <http://www.candidagenome.org>).

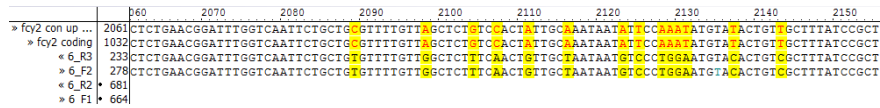


Figura 9. Visualización de la alineación de secuencias de un fragmento del gen *FCY2* de *S. cerevisiae*. Ejemplo de visualización de alineación de secuencias en la herramienta *ContigExpress*TM del programa informático *Vector NTI Advance*TM. Se muestran dos secuencias superiores de referencia del gen *FCY2*, y dos secuencias producto de la secuenciación del gen en un clon resistente utilizando los cebadores *FCY2_R3* y *FCY2_F2*.

6.5 Electroforesis en gel de campo pulsado

Para visualizar el estado de los cromosomas y evaluar la posibilidad de que se hubieran producido grandes reordenamientos cromosómicos se empleó electroforesis de campo eléctrico homogéneo restringido al contorno (CHEF, *Contour-clamped Homogeneous Electric Field*), una variante de la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE, *Pulsed-Field Electrophoresis Gel*). Las muestras se prepararon con un protocolo que mantiene la integridad de los cromosomas evitando su fraccionamiento. Inicialmente se descartó el medio líquido y el *pellet* con las levaduras y se resuspendió en 10 µl de EDTA 50 mM en frío. La suspensión resultante se mezcló con 20 µl de solución SB1 (sorbitol 1M, citrato de trisodio 0,1 M, EDTA 60 mM, β-mercaptoetanol 5 µl/ml, zimoliasa 100T 1 mg/ml) y 60 µl de LMPA (agarosa de bajo punto de fusión 1% (p/v), EDTA 0,125 M) precalentado a 50°C. Rápidamente la mezcla se vertió sobre moldes de *plugs* y se mantuvo sobre hielo hasta solidificar. Los *plugs* resultantes se lavaron en solución SB2 (EDTA 0,45 M, Tris/HCl 0,01 M pH 7,5, β-mercaptoetanol 7,5% (v/v), RNasa A 10 µg/ml) y se mantuvieron hasta el día siguiente a 37°C. Al día siguiente se sustituyó la solución SB2 por solución SB3 (EDTA 0,25 M, Tris/HCl 0,01 M pH 7,5, laurilsarcosina 1% (p/v), proteinasa K 1 mg/ml) y los *plugs* se mantuvieron de nuevo hasta el día siguiente a 37°C. Entonces, se retiró la solución SB3 y los *plugs* se mantuvieron a 20° en una solución de glicerol al 50% (v/v) y EDTA 50 mM.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 974511	Código de verificación: nnAZcF1T	
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAINERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

Las electroforesis se realizaron con un *CHEF DR-III system* (Bio-Rad, E.E.U.U.) en gel de agarosa 1% en tampón TBE 0,5X en condiciones de carrera electroforética de 14°C de temperatura durante 24 h a 6 V/cm con un intervalo de cambio de orientación inicial de 60 segundos, un intervalo final de 120 segundos, y un ángulo de 120°. Para visualizar las bandas se tiñeron los geles con bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml en agua milliQ durante 30-40 minutos, y previamente a la visualización bajo luz ultravioleta se mantuvieron durante 20 minutos en agua milliQ para eliminar el exceso de bromuro de etidio.

7. Análisis del ciclo celular por FACS

Los análisis por citometría de flujo se llevaron a cabo como se describe en Torres-Rosell y col., (2005).

Para *S. cerevisiae* expuesta a 5-FC, se hizo un seguimiento del ciclo celular de las células que no mostraban adquisición de resistencia a diferentes tiempos (de 0 a 10 días de exposición). Se retiraron las colonias resistentes en placas de medio SC con antifúngico y para recuperar las células restantes se lavó la superficie del agar con etanol al 70%, conservándose entonces a 4°C durante un periodo de 1 a 15 días. Tras un tratamiento con RNasa y proteinasa K, se empleó yoduro de propidio 50 µl/ml (*Sigma-Aldrich Chemie*, Alemania) para teñir las muestras y éstas se procesaron en un citómetro de flujo *BD FACScalibur* (*Becton, Dickinson and Company*, E.E.U.U.) ajustado con un cultivo asincrónico a 1 N (haploide) y 2 N (diploide) previamente a la lectura de las muestras.

En el caso de los aislados clínicos del género *Candida*, CA48 y CG57, se determinó la posible existencia de cambios en la ploidía tras la exposición prolongada a CSP en diferentes clones resistentes recolectados a diferentes días respecto a células *wild-type*.

Identificador del documento: 974511	Código de verificación: nnAZcF1T	Fecha:
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAINERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

8. Análisis microscópico

Se realizó un análisis microscópico de *S. cerevisiae* en el tiempo (*time-lapse*) para evaluar los efectos de la 5-FC en la morfología celular. También se examinó la división nuclear en *S. cerevisiae* expuesta a 5-FC y *C. albicans* CA48 y *C. glabrata* CG57 expuestas a CSP usando el marcador fluorescente DAPI.

8.1 Seguimiento microscópico de *S. cerevisiae* expuesta a 5-FC

Para el seguimiento microscópico se escogieron 2 colonias de *S. cerevisiae* BY4741 con fenotipo de resistencia a 5-FC (5-FC^r) como control de crecimiento, y 3 subpoblaciones de la cepa de referencia (sensibles a 5-FC) se sembraron en placas con antifúngico de la misma manera que en los experimentos de SLAM. De estas placas se tomaron cortes de agar en forma de láminas de 2x3 cm, y cada uno se depositó en un portaobjetos de vidrio para microscopía. Se localizaron 7 campos por corte, suficientes para contabilizar un número de entre 300 y 500 células a tiempo 0 con un objetivo 20X, que serían exactamente los mismos campos a examinar a los tiempos y días posteriores. Para ello se empleó un microdisector láser *LMD 6000* (*Leica*, Alemania), con capacidad de almacenar las coordenadas de los campos con el fin de poder localizarlos posteriormente de forma precisa. Los portaobjetos se mantuvieron en cámaras de humectación, fabricadas en placas de petri de 90 mm, a 30°C durante 12 días. Para evaluar el porcentaje de células que iniciaban la división por gemación, se monitorizó un total de 182 células sin gema (fase G1 del ciclo celular) de 3 campos distintos a partir de las 3 horas de exposición. El porcentaje se calculó como el número de células que iniciaron la gemación $\times 100/182$ durante 7 días.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511		Código de verificación: nnAZcF1T
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

8.2 Análisis microscópico de la división nuclear

En este caso 3 subpoblaciones de *C. albicans* CA48 y *C. glabrata* CG57 se sembraron adicionalmente en 3 placas de medio SC con CSP como se describe en los experimentos SLAM, además de 3 subpoblaciones de *S. cerevisiae* BY4741 en placas de medio SC con 5-FC.

Para *S. cerevisiae*, las colonias resistentes aparecidas se retiraron y las levaduras restantes de la placa se recolectaron, lavando con H₂O estéril, en el momento inmediato tras la siembra, a 3 horas y 1, 5 y 7 días. Para CA48 y CG57 este proceso se realizó a las 0 y 3 horas y a los 7 días tras sembrar las placas. En todos los casos las células recolectadas se mantuvieron a -20°C hasta su posterior visualización. Ésta se realizó descongelando las células y tiñendo el ADN con 1 µg/ml de DAPI (*Sigma-Aldrich Chemie*, Alemania) para ser observadas y fotografiadas en un microscopio de fluorescencia. Para una óptima visualización y presentación de los datos, el campo fluorescente se coloreó en rojo.

9. Determinación de actividades enzimáticas antioxidantes

En el transcurso de los experimentos de SLAM las levaduras parecen entrar en un arresto transitorio del ciclo celular. Durante este periodo podría inducirse la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) como sucede en el tratamiento con sustancias antifúngicas como azoles o fenilpropanoides (Thevissen y col., 2007; Khan y col., 2011). Si bien la muerte durante este periodo puede no ser dependiente del estrés oxidativo (Wysocki y Kron, 2004), las células sí serían sensibles a acumular múltiples daños en el ADN debido al aumento inducido de la producción de ROS. La célula trataría de reparar esos daños, siendo algunas de estas reparaciones "erróneas", dando lugar a mutaciones. Si alguna de estas mutaciones promueve la adaptación a la condición de estrés, al finalizar el ciclo la célula podría crecer normalmente, habiendo así adquirido resistencia. Si ninguna de las mutaciones provoca la adquisición de resistencia, la célula seguiría acumulando nuevos daños en el ADN hasta que logra adquirirla o muere por lisis celular tras un arresto prolongado del ciclo (Wysocki y Kron, 2004).

Identificador del documento: 974511	Código de verificación: nnAZcF1T	Fecha:
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAINERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

Para contrarrestar el daño oxidativo que, entre otros, pueden inducir los antifúngicos, las células contienen un sistema antioxidante genérico capaz de procesar las especies reactivas del oxígeno. En este sistema intervienen las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). La SOD dismuta la especie anión superóxido (O_2^-) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2) (McCord y Fridovich, 1969), mientras que la CAT descompone H_2O_2 en agua y O_2 (Chance et al., 1979; Claiborne, 1985).

Las actividades de estas enzimas antioxidantes se determinaron preparando extractos del contenido celular de las levaduras a diferentes tiempos de exposición al antifúngico, y las mediciones de las actividades resultantes de las enzimas se realizaron empleando un espectrofotómetro *Beckman Coulter DU800* (Beckman Coulter Inc., E.E.U.U.) y normalizando a la cantidad de proteína en las muestras.

9.1 Tratamiento con antifúngicos y obtención de extractos celulares

Previo al tratamiento con antifúngicos se precultivaron las levaduras en medio YPD líquido con agitación a 30°C (*S. cerevisiae*) ó 37°C (*C. albicans* y *C. glabrata*), se ajustó la densidad a 2×10^8 células/ml para tomar 1,0 ml del inóculo y, tras lavar el medio YPD, se resuspendió el pellet de células en 3 ml de medio SC líquido con antifúngico (figura 10). Como control se llevó a cabo el mismo proceso resuspendiendo en este caso las células en medio SC líquido sin antifúngico.

Las concentraciones de antifúngicos empleadas fueron de 100 µg/ml para 5-FC, 0,75 µg/ml para CSP, y de 16 µg/ml de FLU, esta última correspondiente a 4 veces la CMI para cepas de *C. glabrata* no resistentes a FLU según Mahl *et al.* (2015).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 974511		Código de verificación: nnAZcF1T
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

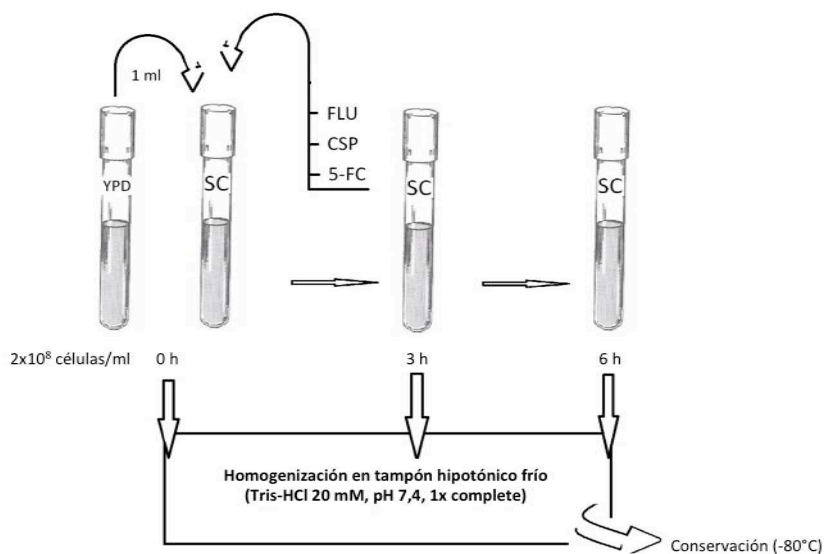


Figura 10. Ensayo de exposición de levaduras a antifúngicos en medio líquido y obtención de muestras.

Se tomaron muestras de 1,0 ml del inóculo inicial de YPD a tiempo 0 h y posteriormente de cada tubo con cada tratamiento a 3 y 6 horas. Tras retirar el medio, la obtención del contenido celular se realizó por ruptura mecánica con microperlas de vidrio en tampón de homogenización hipotónico (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4) en frío, conteniendo 1X del cocktail inhibitor de proteasas *Complete* (Roche Diagnostics, España). Las muestras de extractos celulares se conservaron a -80°C hasta la posterior determinación de las actividades enzimáticas.

9.2 Determinación de la actividad superóxido dismutasa

La determinación de la actividad SOD se realizó empleando una adaptación del ensayo descrito por Marklund y Marklund (1974). Se eligió este método debido a su rapidez, alto grado de reproducibilidad, y que además presenta la ventaja de requerir poca cantidad de muestra para la cuantificación de la actividad enzimática. La técnica

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 974511	Código de verificación: nnAZcF1T	
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

aprovecha la capacidad de la enzima para dismutar O_2^- en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2) y su fundamento se basa en la autooxidación del pirogalol (1,2,3-bencenotriol o ácido pirogálico), un compuesto que en soluciones alcalinas se autooxida rápidamente generando radicales superóxido en el medio, los cuales aceleran la autooxidación de éste y se produce la formación de purpurogalina, un compuesto amarillo-marrón con un pico máximo de absorbancia a 420 nm de longitud de onda (λ) y coeficiente de extinción molar $2,640 M^{-1}cm^{-1}$. Cuando hay SOD presente en el medio, la enzima compite con el pirogalol por el radical superóxido, inhibiéndose en parte la reacción de autooxidación, y formándose menos purpurogalina. La formación de purpurogalina es susceptible de ser medida espectrofotométricamente en el tiempo, con lo que se puede aprovechar el fenómeno para cuantificar la actividad SOD de una muestra problema midiendo la inhibición de la autooxidación del pirogalol respecto de un control.

Los ensayos se realizaron utilizando las siguientes condiciones: tampón Tris-Cacodílico 50 mM, DTPA 1mM, pH 8,2, 0,3 mM de pirogalol y 30 o 37°C de temperatura dependiendo de la especie de levadura. En todos los ensayos, para un volumen total de reacción de 1,0 ml, se utilizaron 100 μ l de muestra añadidos al tampón de reacción, sustituidos en el blanco y en el control por 100 μ l de tampón de homogenización.

La reacción se inició mediante la adición de pirogalol y los cambios de absorbancia se midieron a una λ de 420 nm. La actividad específica de SOD se expresó en unidades/mg (U/mg) de proteína, entendiéndose una unidad como la cantidad de enzima necesaria para obtener el 50% de la autooxidación de pirogalol.

9.3 Determinación de la actividad catalasa

Para la determinación de la actividad CAT se adaptó el método descrito por Clairborne (1985), basado en la capacidad de la propia enzima de descomponer $2H_2O_2$ en $2H_2O + O_2$. La desaparición del H_2O_2 es susceptible de ser medida espectrofotométricamente, determinándose la actividad CAT como cambios

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 974511	Código de verificación: nnAZcF1T	
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAINERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

proporcionales de las absorbancias en el tiempo a una λ de 240 nm.

Los ensayos de actividad CAT se realizaron en un volumen total de reacción de 2,0 ml, conteniendo la mezcla de reacción tampón fosfato potásico (KH_2PO_4 10 mM - K_2HPO_4 10 mM) pH 7,0 y 100 μl de muestra, iniciándose la reacción al añadir 20,6 μl de H_2O_2 para una concentración final en cubeta de 5 mM, y sustituyendo la muestra por 100 μl de buffer de homogenización en el caso de las cubetas del blanco y el control. Además en la cubeta del blanco se sustituyó el volumen de H_2O_2 por agua milliQ. Se utilizó un coeficiente de extinción molar para el H_2O_2 de $42,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y la actividad específica de la enzima se expresó en $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ proteína.

9.4 Cuantificación de la cantidad de proteína de las muestras

Para normalizar las actividades enzimáticas a la cantidad de proteína presente en cada una de las muestras se utilizó el método descrito por Bradford (1976), en formato de placas de 96 pocillos y usando albúmina de suero bovino (BSA) como proteína estándar para la recta patrón. Las mediciones se realizaron a una λ de 595 nm en un lector de placas *Appliskan multiplate reader* (Thermo Scientific, E.E.U.U.).

10. Análisis estadístico de los datos

Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media (SEM). Los datos de los experimentos de SLAM se analizaron mediante análisis de la varianza de un factor (ANOVA-I) con la corrección de *Bonferroni*. En el caso de los ensayos de actividades enzimáticas antioxidantes, éstos fueron analizados mediante ANOVA-I, seguido de los tests de la de *t-Student* o test de *Mann-Whitney* en función de si los datos eran normales y homocedásticos, cuando se examinaban diferencias de medias, o de un test de *Tuckey*, cuando se realizaron comparaciones múltiples. La normalidad y homocedasticidad de los datos fueron examinados mediante el test de *Kolmogorov-Smirnov* y el test de *Levene*, respectivamente. En todos los casos las diferencias se

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

consideraron significativas si $p < 0,05$. El programa informático empleado para llevar a cabo estos análisis fue el paquete estadístico IBM SPSS Statistics versión 20.0.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

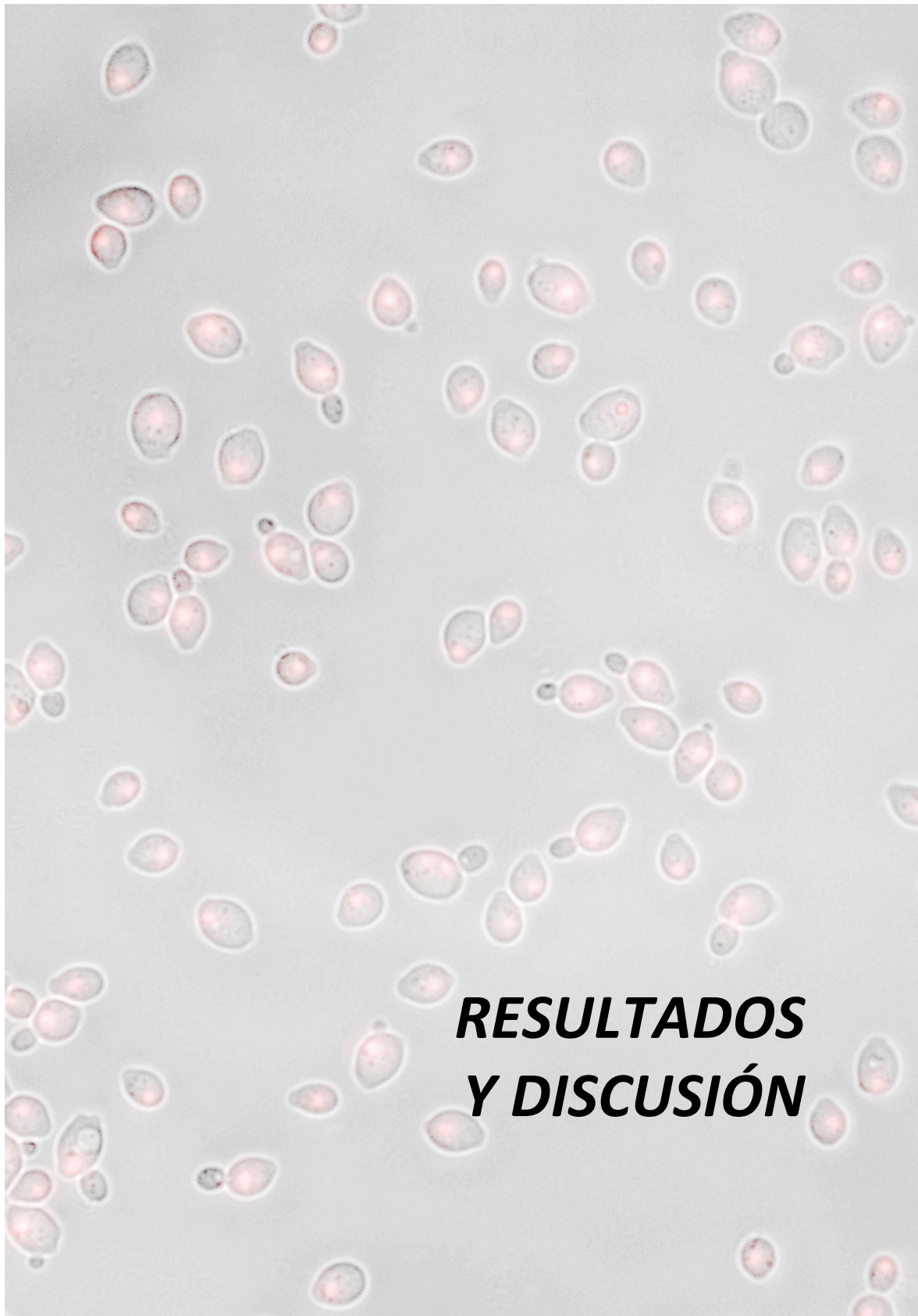


Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48



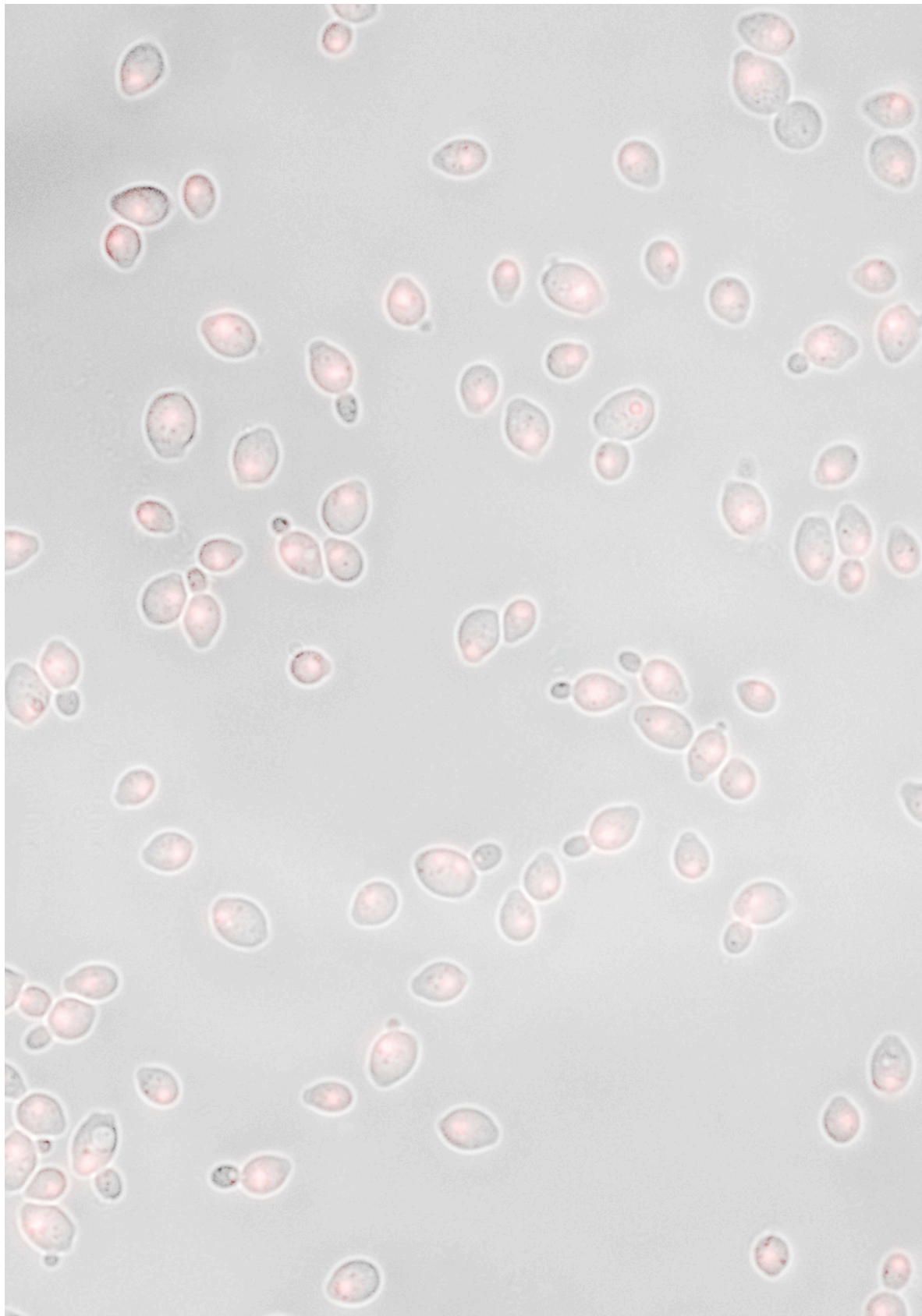
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

CAPÍTULO 1. Implicación del gen *FCY2* en la adquisición de resistencia a 5-FC en *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae se ha utilizado como modelo para estudiar la genética y biología celular de los eucariotas, y sus genes muestran no solo una alta homología de secuencia, sino también funciones proteicas enormemente conservadas entre las especies (Foury, 1997; Botstein y Fink, 2011). En modelos de privación de nutrientes los resultados previos descritos en la literatura indican que las mutaciones se acumulan de forma más frecuente cuando confieren una ventaja selectiva (Heidenreich, 2007), lo que es consistente con la ocurrencia de mutaciones adaptativas en levaduras.

El análogo fluorado de citosina 5-FC es de utilidad frente a micosis invasivas. La 5-FC no tiene actividad antifúngica intrínseca pero tras entrar en células susceptibles se transforma en 5-fluorouracilo (5-FU), un compuesto tóxico que se metaboliza a su vez a otros compuestos inhibidores de la síntesis de ADN, ARN, y proteínas.

1.1 Efectos de a exposición prolongada a 5-FC en la frecuencia de mutación en *S. cerevisiae*

Se llevaron a cabo un total 6 experimentos de SLAM, en los que se utilizaron 29 subpoblaciones de *S. cerevisiae*, y en los que sólo se tuvo que eliminar una de las subpoblaciones sembradas por aparición de un número anormal de colonias (*jackpot*). Al evaluar la cinética de adquisición de resistencia a 5-FC, y como en teoría cabía esperar, unas pocas colonias fueron ya visibles entre los días 1 y 3 de experimento (consideradas mutantes pre-existentes o espontáneos), muy probablemente debidas a alguna mutación ocurrida en el periodo de crecimiento en medio YPD líquido previo al experimento. Este crecimiento de colonias resultantes de la división celular de levaduras mutantes espontáneas se dio con una frecuencia de $3 \cdot 10^{-6} \pm 3,9 \cdot 10^{-7}$ resistentes/célula (figura 11).

Identificador del documento: 974511	Código de verificación: nnAZcF1T	Fecha:
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

La exposición prolongada de *S. cerevisiae* a la concentración de 100 µg/ml de 5-FC dio como resultado la aparición de colonias en los días posteriores, llegando incluso a observarse nuevas colonias 16 días después de iniciado el experimento, aunque los mismos se daban por finalizados a los 9 días de haber comenzado, principalmente debido a la dificultad de continuar el seguimiento de la viabilidad de las células sembradas a partir del día 7. La frecuencia de adquisición de resistencia calculada a partir de las colonias contabilizadas el día 9 de experimento fue de $6,9 \cdot 10^{-5} \pm 9,8 \cdot 10^{-6}$ resistentes/célula, siendo significativamente mayor que la frecuencia espontánea calculada a día 3 (figura 11), lo que refleja las diferentes condiciones en las que las mutaciones ocurren, y sugiere además que en cada caso han de operar mecanismos subyacentes distintos.

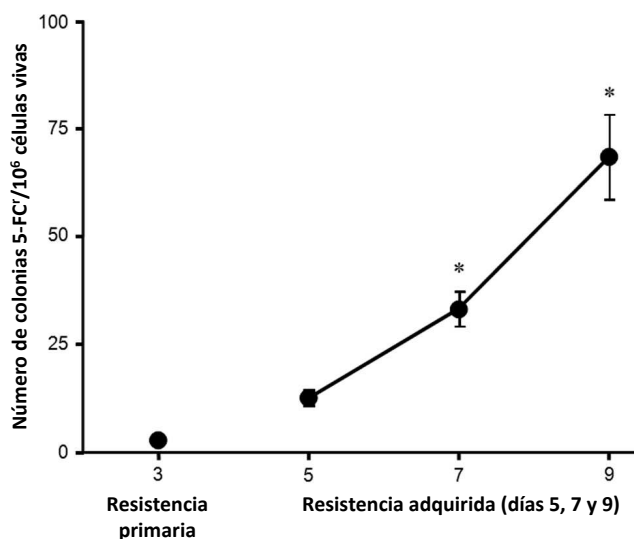


Figura 11. Cinética de la aparición de colonias resistentes de *S. cerevisiae* expuestas de forma prolongada a 5-FC. Los datos se expresan como la media ± error estándar para 28 subpoblaciones de *S. Cerevisiae* BY4741. * $p < 0,05$.

Para evaluar la posibilidad de que las colonias aparecidas a días tardíos fueran simplemente resultado de un crecimiento lento de las UFCs sembradas a día 0 del SLAM, se llevaron a cabo los experimentos de reconstrucción. Se examinaron 192

Identificador del documento: 974511		Código de verificación: nnAZcF1T
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

colonias con fenotipo de resistencia a 5-FC (5-FC^r) y, tras sembrar en medio YPD sin antifúngico y resembrar en placas con medio SC + 5-FC, un 98% de ellas volvió a crecer en presencia de antifúngico en un periodo comprendido entre 48-60 h, siendo muchas de ellas visibles incluso antes de las 48 h. Estos resultados nos permiten descartar la hipótesis de que aparezcan colonias a días tardíos del experimento (5 - 9) por crecimiento lento de las UFCs, así como aceptar que la resistencia adquirida observada por crecimiento tardío se debe a cambios genéticos.

1.2 Analisis del espectro de posibles mutaciones que causan la resistencia

La entrada de 5-FC en la célula se lleva a cabo por una purina-citosina permeasa codificada por el gen *FCY2*, y el procesamiento dentro de la célula incluye las proteínas expresadas por los genes *FCY1*, *FUR1* y *CDC21*, tal como se describe en el capítulo introductorio. Por tanto, nos centramos en el análisis mutacional de estos genes candidatos. Aún así, antes de dicho estudio, y para obtener más información acerca de la naturaleza hereditaria de la resistencia adquirida y de los posibles mecanismos subyacentes, se analizó en 50 de las colonias 5-FC^r la posibilidad de que se hubieran producido grandes reordenamientos cromosómicos. Empleando electroforesis en gel de campo pulsado, sólo en una de las muestras se halló diferencia respecto al control *wild-type* de *S. cerevisiae* BY4741 (Figura 12).

En vista de este resultado, se decidió llevar a cabo un análisis de las secuencias de los 4 genes que podrían estar implicados en la adquisición de resistencia dada su participación en la ruta de entrada y procesamiento intracelular de la 5-FC: el gen *FCY2* codificante de la purina-citosina permeasa de membrana, *FCY1* de la citosina deaminasa, *FUR1* de la uracil fosforribosil transferasa, y *CDC21* de la timidilato sintasa.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

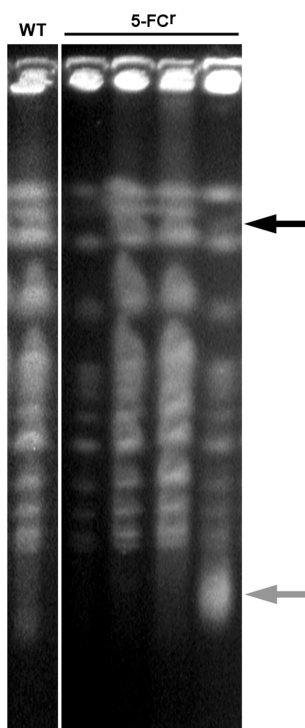


Figura 12. Análisis de reordenamientos cromosómicos en clones de *S. cerevisiae* 5-FC^r por PFGE. Se muestran los resultados de un control *wild-type* (WT) y 4 clones 5-FC^r aparecidos a días tardíos. La flecha negra indica el único reordenamiento hallado, una aparente delección en el cromosoma IV concomitante con una banda difusa de bajo peso molecular (flecha gris). Condiciones de la electroforesis: gel de agarosa 1% en tampón TBE 0,5x, 14°C durante 24 h a 6 V/cm con un intervalo de cambio de orientación inicial de 60 segundos, un intervalo final de 120 segundos, y un ángulo de 120°

Experimentos preliminares, en los que se pretendía poner a punto la metodología y el modelo desarrollado, ya mostraron que los resistentes primarios (colonias recolectadas a partir de las aparecidas a día 3) presentaban alguna mutación puntual en el gen *FCY1*. Sin embargo, de las colonias aparecidas a días tardíos de experimento, consideradas resultantes de adquisición de resistencia secundaria, la mayoría mostró mutaciones en *FCY2*. De aquellos clones que no mostraron cambios en el gen *FCY2*, sólo un 5% mostraron mutaciones puntuales en *FCY1*, sin mostrar ninguna mutación en el resto de genes analizados: *FUR1* y *CDC21*.

Identificador del documento: 974511		Código de verificación: nnAZcF1T
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

Las mutaciones registradas de los 6 SLAMs contabilizados para este estudio se muestran en la (Tabla 6). Se observó que en el caso de las colonias recolectadas de día 3, con resistencia previa a la exposición al fármaco, existía una diferencia entre los clones que habían resultado en crecimiento visible a día 2 respecto a los que habían aparecido a día 3. De éstos, los 6 clones analizados correspondientes a las colonias de día 2 mostraron una mutación puntual en el gen de la deaminasa *FCY1*, 4 de ellas fueron mutaciones sin sentido y las otras 2 con cambio de sentido. De las 4 mutaciones sin sentido, 3 de ellas coincidieron en ser la misma transversión en la posición 58: C:G →A:T. En cambio, el espectro de mutaciones de las colonias aparecidas a día 3 fue diferente al de las colonias ya visibles a día 2, no hayándose cambios en el gen *FCY1* sino en el gen *FCY2*. Se encontraron 5 mutaciones, de las cuales 4 fueron sin sentido y debidas a transversiones: 3 fueron T:A→A:T (coincidiendo 2 en la misma posición, 1475) y 1 fue T:A→G:C, sin observarse ninguna transición.

Respecto a la búsqueda de mutaciones en los clones de las colonias surgidas a partir del día 3, no se halló ninguna alteración en los 4 genes estudiados para 5 de las muestras (9,1%) del total de 55 clones 5-FC^r estudiados. De esos 5 casos, 1 presentó una mutación silenciosa en el gen *FCY1*, mientras que la búsqueda resultó completamente negativa en los 4 restantes. En el resto de muestras secuenciadas se halló un total de 59 mutaciones, de las cuales la práctica totalidad ocurrieron en el gen *FCY2*. En concreto, de las 59 mutaciones, 54 (91%) ocurrieron en *FCY2*, correspondiéndose a 49 clones (89,1% del total analizado). Aparte de éstas, se encontraron 4 mutaciones puntuales en *FCY1*, y también una transición en el gen *FUR1*, concomitante con una mutación en *FCY2*, y ninguna mutación en el gen *CDC21* (gen en el que tampoco se halló mutación alguna a partir de los SLAMs preliminares).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511		Código de verificación: nnAZcF1T
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

Tabla 6: Efecto de 5-FC en el espectro de mutaciones en cuatro genes que podrían estar implicados en la resistencia al fármaco.

Día	Gen	Mutación	Tipo	Efecto	Día	Gen	Mutación	Tipo	Efecto
2	FCY1	190 GC→AT (V233→K)	TI	M	7	FCY2	410 CG→TA (A136→V)	TI	M
2	FCY1	107 GC→AT (C205→STOP)	TI	N	7	FCY2	843 GC→CG (W281→STOP)	TI	N
2	FCY1	179 GC→AT T229→K	TV	M	7	FCY2	1594 GC→CG (G532→R)	TV	M
2	FCY1	58 GC→AT E189→STOP	TV	N	7	FCY2	410 CG→AT (A137→E)	TV	M
2	FCY1	58 GC→AT E189→STOP	TV	N	7	FCY2	1311 CG→AT YY437→STOP	TV	N
2	FCY1	58 GC→AT E189→STOP	TV	N	7	FCY2	308 CG→AT (S102→STOP)	TV	N
3	FCY2	FCY22 986-1470	R		7	N.E.			
3	FCY2	1226 TA→AT (L657→STOP)	TV	N	9	FCY2	Δ657	D	F
3	FCY2	1475 TA→AT (Y493→STOP)	TV	N	9	FCY2	Δ155-157	D	F
3	FCY2	1475 TA→AT (Y493→STOP)	TV	N	9	FCY2	FCY22 1098-1143	R	
3	FCY2	1586 TA→GC (L522→STOP)	TV	N	9	FCY2	FCY22 1098-1143	R	
5	FCY1	41 GC→CG (G14→A)	TV	M	9	FCY2	FCY22 1098-1143	R	
5	FCY2	Fcy2Δ	D		9	FCY2	FCY22 968-1143	R	
5	FCY2	FCY22 1053-1143	R		9	FCY2	453 GC→AT (M151→I)	TI	M
5	FCY2	FCY22 968-1143	R		9	FCY2	680 AT→GC (Y227→C)	TI	M
5	FCY2	FCY22 909-1143	R		9	FCY2	1136 AT→GC (Y378→C)	TI	M
5	FCY2	FCY22 1065-1143	R		9	FCY2	1025 TA→GC (M401→R)	TV	M
5	FCY2	FCY22 1014-1143	R		9	FCY2	1344 CG→AT (Y448→STOP)	TV	N
5	FCY2	FCY22 1089-1143	R		9	N.E.			
5	FCY2	FCY22 1103-1143	R		9	N.E.			
5	FCY2	448 CG→TA (Q150→STOP)	TI	N	Dobles Mutantes				
5	FCY2	1594 GC→CG (G532→R)	TV	M	7	FCY2	FCY22 978-1143	R	
5	FCY2	842 GG→TA (W280→L)	TV	M		FCY1	316 TA→CG (C106→R)	TI	M
5	N.E.				7	FCY2	FCY22 884-1074	R	
7	FCY2	Δ469-472	D	F		FUR1	518AT→GC (E173→G)	TI	M
7	FCY2	Δfcy2	D		7	FCY2	Δ1222-1602	D	
7	FCY2	1020 inserción A ₂	I	F	7	FCY2	1214 AT→CG (N404→T)	TV	M
7	FCY2	FCY22 1053-1143	R		7	FCY2	FCY22 913-1143	R	
7	FCY2	FCY22 1053-1143	R			FCY2	Δ909	D	F
7	FCY2	FCY22 1065-1143	R		9	FCY1	258 GC→AT (Sin)	TI	S
7	FCY2	FCY22 263-565	R			N.E.			
7	FCY2	FCY22 378-693; 1443-1512	R		9	FCY2	FCY22 1053-1143	R	
7	FCY2	FCY22 844-1143	R			FCY1	437 TA→CG (L146→P)	TV	M
7	FCY2	FCY22 968-1143	R		9	FCY2	392 TA→GC (Sin)	TV	S
7	FCY2	FCY22 968-1143	R			FCY1	173 GC→AT (S58→Y)	TV	M
7	FCY2	FCY22 1089-1137	R		9	FCY2	FCY22 300-315	R	
7	FCY2	FCY22 1123-1137	R			FCY2	753 GC→AT (Sin)	TI	S
7	FCY2	FCY22 1104-1143	R		9	FCY2	945 inserción T _n	I	F
7	FCY2	FCY22 921-1143	R			FCY2	937 GC→AT (L913→I)	TV	M
7	FCY2	832 GC→AT (A278→T)	TI	M	9	FCY2	453 GC→AT (M151→I)	TI	M
7	FCY2	914 TA→CG (L305→F)	TI	M		FCY2	445 AT→CG (Sin)	TV	S

N.E.: mutación no encontrada; Sin: Mutación sinónima; D: deleción; I: Inserción; R: recombinación, TI: transición; TV: transversión; M: mutación con cambio de sentido (*Missense*); N: mutación sin sentido (*Nonsense*); S: mutación silenciosa; F: cambio en la pauta de lectura (*Frameshift*).

Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAINERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

Así el espectro general de mutaciones quedó distribuido de la siguiente manera: 2 inserciones (3,4%), 7 deleciones (11,9%), 11 transiciones (18,6%) y el mismo número de transversiones. El resto de los 28 cambios ocurridos (47,5%) se correspondieron con recombinaciones homólogas intracromosomales (la cepa BY4741 es haploide) del gen *FCY2* con *FCY22* (Figura 13), un gen de 1592 pares de bases situado 8459 bases corriente abajo respecto de *FCY2*, en el cromosoma V, con un 87% de homología de secuencia entre ambos.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511		Código de verificación: nnAZcF1T
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

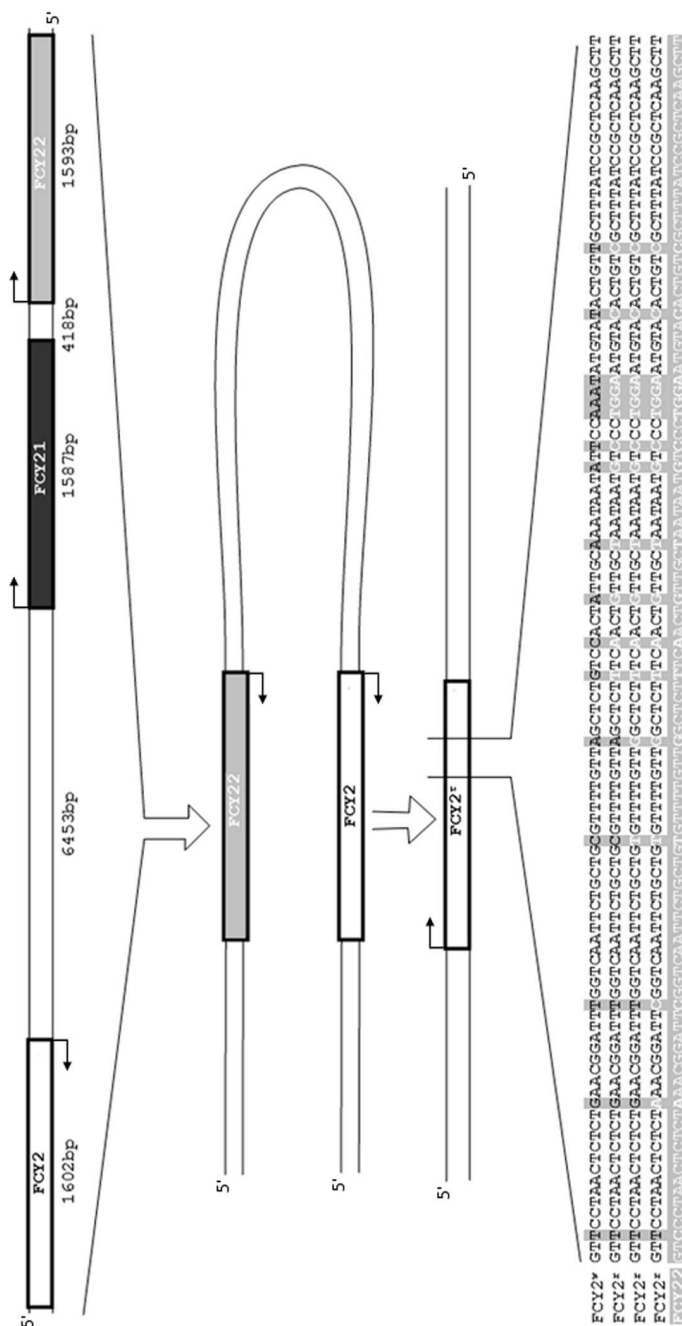


Figura 13. Recombinación intracromosómica de FCY2 con FCY22. Los genes FCY2, FCY21 y FCY22 se encuentran en el cromosoma V de *S. cerevisiae* a la distancia en pares de bases (bp, base pairs) especificadas en la figura. La recombinación ectópica ha de ocurrir tras el plegamiento de la doble hebra de ADN. Las flechas ← señalan los codones de inicio ya sea en la hebra de Watson o Crick. FCY2^w se corresponde con la secuencia wild-type de FCY2; FCY2' son las secuencias de 3 clones que han sufrido la recombinación.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511	Código de verificación: nnAZcF1T	Fecha: 30/06/2017 19:28:19
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		
CRISTINA GIL LAMAINERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

1.3 Análisis del Ciclo Celular y seguimiento microscópico

En vista de las diferencias encontradas al analizar los datos de secuenciación, se valoró la posibilidad de que las levaduras no resistentes que permanecían vivas en las placas de medio SC con antifúngico pudieran estar tratando de replicar su ADN y que las mutaciones aparecidas, especialmente las debidas a la recombinación ectópica, fueran producto de la propia replicación o errores de reparación. Se observó que ya a las 3 horas las levaduras no resistentes que permanecían vivas en las placas de SC con 5-FC parecían entrar en arresto celular en la fase G1/S, durando este arresto al menos 6 días (Figura 14). Sin embargo, un pequeño número de células que podrían estar avanzando en su ciclo celular (como sucede en tumores) o haciéndolo de forma muy lenta podrían ser indetectables por el FACS. Para determinar si esto pudiera estar sucediendo se realizó un seguimiento microscópico a modo de *time-lapse*.

Las levaduras, tras haber sido incubadas para su crecimiento en medio líquido YPD sin antifúngico, al ser sembradas en las placas de medio sólido SC con 5-FC finalizan su ciclo celular, doblando aproximadamente su número al cabo de 3 horas. A partir de este momento, las divisiones celulares disminuyen o se ralentizan, pasando varias horas o incluso días para que las levaduras continúen gemando (Figura 15). El seguimiento se realizó durante 9 días sobre 182 células individuales sembradas en las placas con fármaco, registrándose que el 56% de ellas llegaban a producir gemas después de pasadas las 3 primeras horas de exposición, lo que supone un número considerablemente mayor a lo que se podría considerar una pequeña subpoblación de células respecto del total. En estas observaciones a lo largo del tiempo de seguimiento, el ciclo celular transcurría de forma extremadamente lenta y las pequeñas gemas podían tardar varias horas o incluso días en crecer. Con ello podemos concluir que no es una pequeña población de células la que avanza en su ciclo celular, sino que, sumado a la información obtenida con el FACS, se sugiere que el ciclo es ralentizado en gran medida en fase G1/S.

En el transcurso de este ensayo de observación, llamaba la atención como las levaduras adquirían formas que se podrían definir como aberrantes e incluso algunas gemas se desarrollaban con forma aparente de pseudohifas. Con el fin de averiguar si

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAINERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

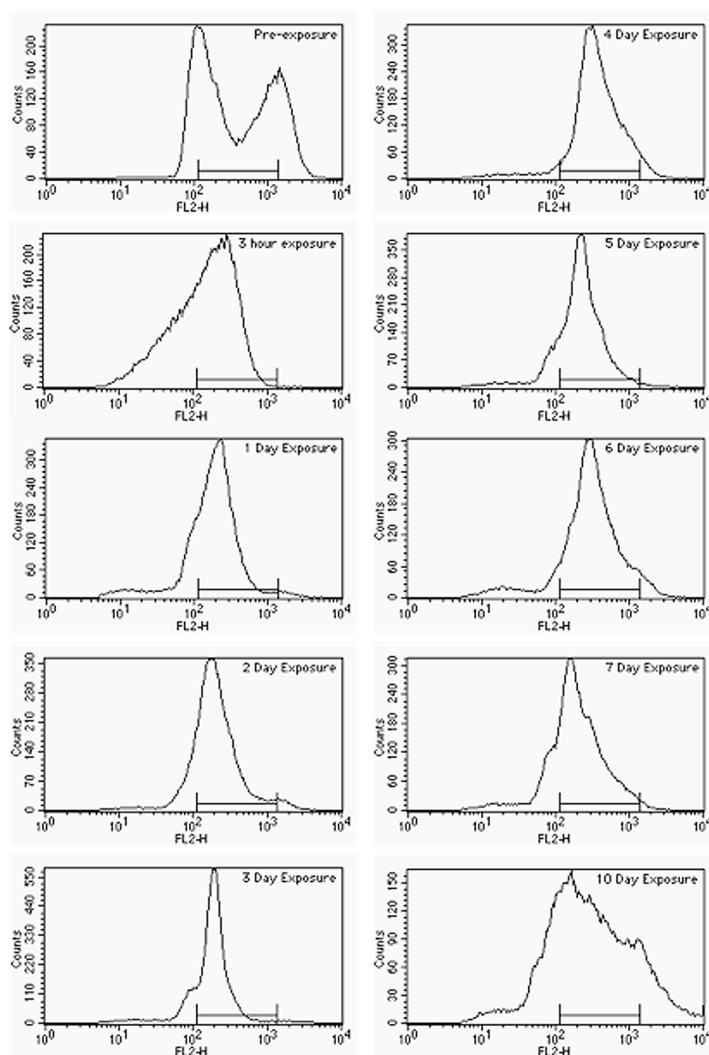


Figura 14. Efecto de la exposición prolongada a 5-FC en la progresión del ciclo celular. Para cada tiempo de análisis, las colonias resistentes se retiraron de las placas y las células restantes se recuperaron con etanol 70%. Los ejes X representan el contenido en ADN (intensidad debido a incorporación de Ioduro de Propidio) y los ejes Y representan el número de células contabilizadas por el FACS.

estas estructuras celulares poseían núcleo o eran el resultado de intentos de división fallidos, se empleó microscopía de fluorescencia (Figura 16). Se comprobó que eran células con núcleo e incluso en plena división aunque tuvieran esta morfología

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 974511	Código de verificación: nnAZcF1T	
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAINERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

diferente y fueran anormalmente grandes, observándose algunas de ellas en anafase (flechas en la figura 16), lo que confirmaba la existencia de células transitando en mitosis.

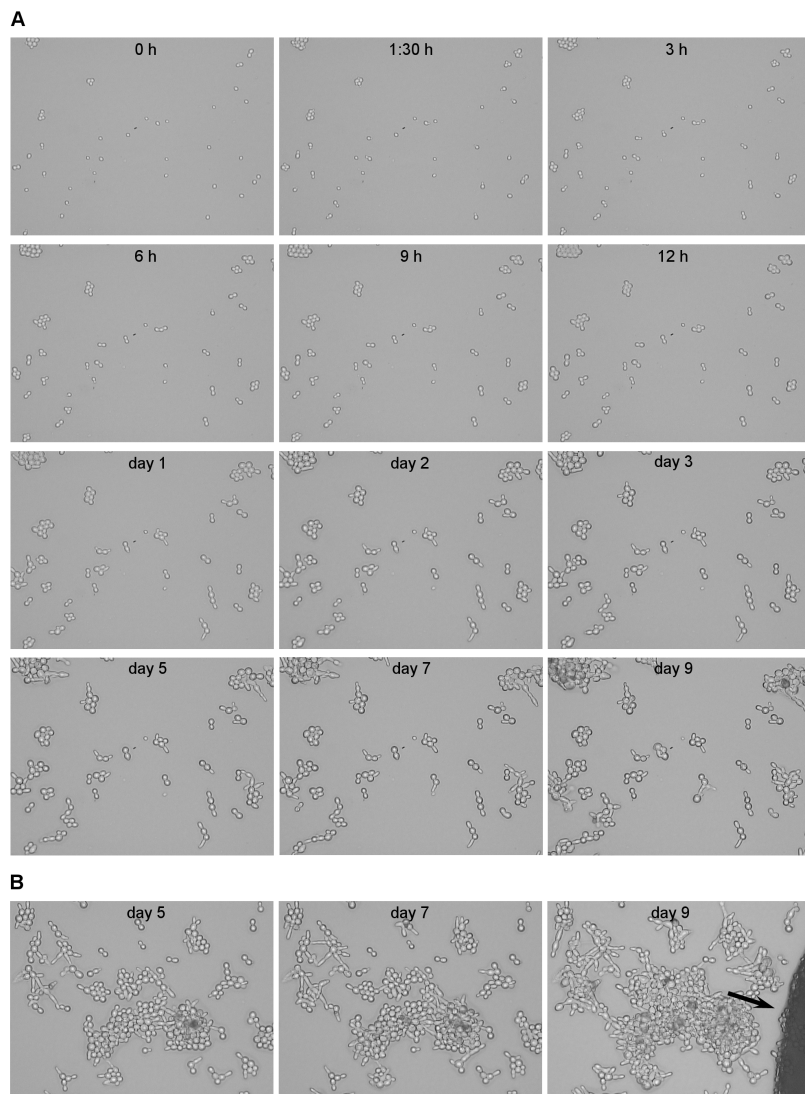


Figura 15. Seguimiento microscópico del crecimiento en placa de *S. cerevisiae* en exposición prolongada a 5-FC. (A) Imágenes del crecimiento de las células a diferentes tiempos durante el seguimiento de uno de los campos. (B) En otro campo se observó a día 9 la aparición de una colonia con fenotipo de resistencia.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 974511	Código de verificación: nnAZcF1T	
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

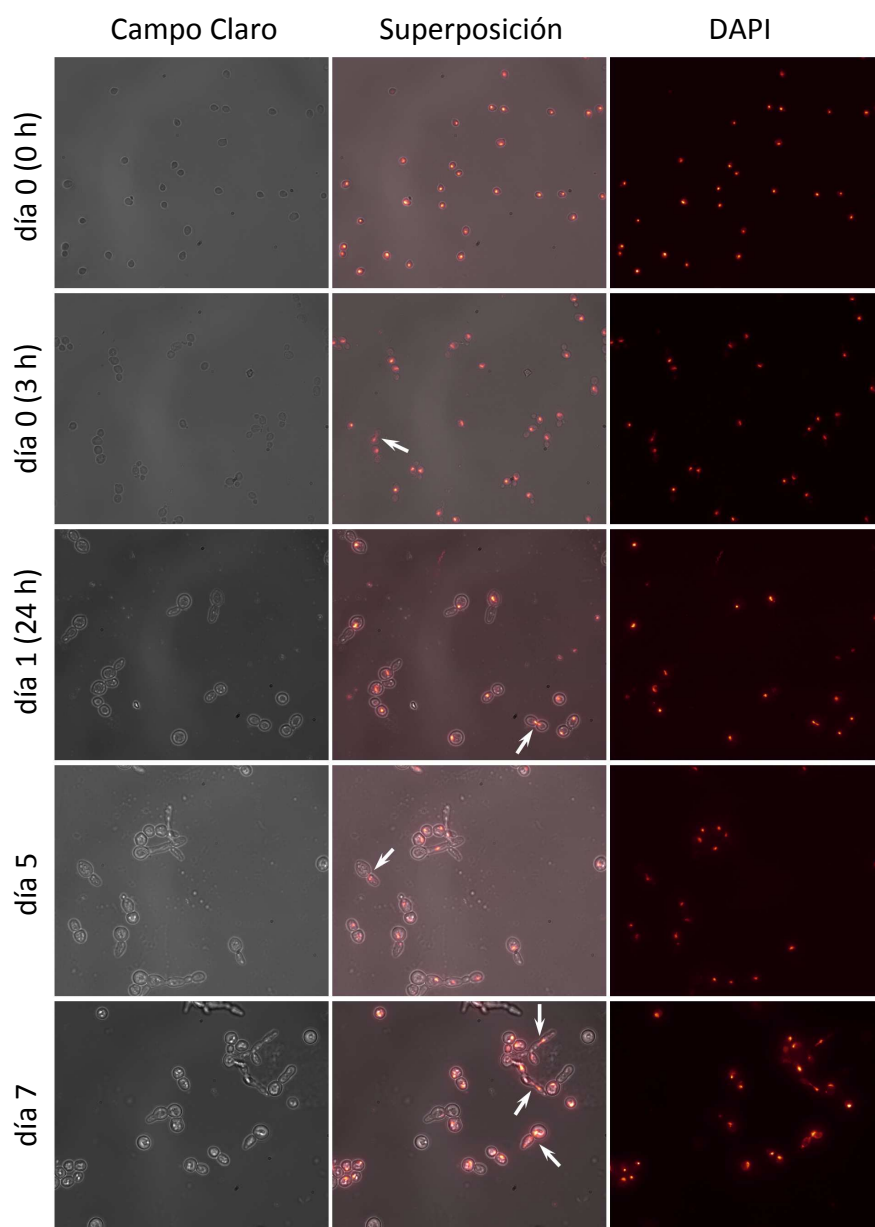


Figura 16. Microscopía de fluorescencia de las células expuestas a 5-FC. Efecto de 5-FC en la segregación de los núcleos de *S. cerevisiae* a diferentes tiempos de exposición al antifúngico. La columna de la izquierda fue obtenida por microscopía de transmisión - campo claro; la columna de la derecha se obtuvo por iluminación fluorescente (canal del DAPI); y la columna central es resultado de la superposición digital de ambas. Las flechas señalan eventos de anafase.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 974511	Código de verificación: nnAZcF1T	
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

La adquisición de resistencia secundaria al tratamiento con fármacos es en la actualidad un problema grave en la clínica, dándose tanto en respuesta al tratamiento con agentes quimioterapéuticos como en infecciones bacterianas y fúngicas (Miller y col., 2004; Huff y col., 2006; Vandeputte y col., 2012). Una de las maneras a través de la cual células expuestas a un agente farmacológico pueden adquirir resistencia es introducir cambios, mutaciones, en alguno de los genes relacionados con el mecanismo de acción del compuesto. Si esto sucede, y la célula prolifera superando las condiciones estresantes del medio que limitan la proliferación, consideramos que ha sufrido una mutación adaptativa (Heindreich, 2007). Un modelo de estudio de mutagénesis adaptativa ha de cumplir dos requisitos fundamentales (Heidenreich, 2007). El primero de ellos es que *“una población de células ha de ser mantenida en un estado prolongado de crecimiento limitado mediante la exposición a condiciones de estrés no letales”*, lo que sería de forma ideal mantenerlas en un estado de completo arresto del ciclo celular. El segundo sostiene que *“ha de existir la posibilidad de que, el arresto sea superado gracias a mutaciones... La resultante aparición de un clon mutante entre la población de células”* con proliferación limitada *“permita la detección de eventos de mutación adaptativa”*. El modelo en el que se basa esta tesis reúne ambos criterios:

1. Las células de *S. cerevisiae* que permanecen vivas en presencia de 5-FC, (aproximadamente la mitad de las levaduras sembradas pasados los 3 primeros días de experimento) han ralentizado su ciclo celular de tal forma tardan muchas horas e incluso días en completar un ciclo y gemar.
2. En los clones secuenciados a partir de las colonias aparecidas a días tardíos de experimento, colonias que son resultado de que una UFC hubiera superado el arresto, se han hallado mutaciones en los genes de la ruta de entrada de 5-FC, principalmente en *FCY2* y con elevada frecuencia.

Al comparar nuestro modelo a los ya existentes encontramos algunas similitudes, por ejemplo, las colonias que aparecen a días tardíos son resultado de mutaciones que ocurren tras sembrar las levaduras y quedar éstas expuestas al antifúngico. Los resultados de los experimentos de reconstrucción, y sobretodo que las

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

mutaciones encontradas en la mayoría de los clones obtenidos a partir de las colonias recolectadas a días tardíos no se hallaran en los mutantes espontáneos de la misma subpoblación de origen, ni en las otras colonias aparecidas en la misma placa, permite concluir que dichas mutaciones ocurren tras la siembra en placas de medio sólido SC con 5-FC.

El análisis del espectro de mutaciones muestra como existe una clara diferencia entre las colonias aparecidas de forma temprana (día 3) y las aparecidas posteriormente, ya que mientras los mutantes espontáneos portan mutaciones puntuales en los genes *FCY1* y *FCY2*, los que consiguen crecer a días tardíos presentan de forma predominante una recombinación de *FCY2* con *FCY22*, que recordemos es el gen situado 8,459 kilobases corriente abajo, y con el que *FCY2* posee un 87% de homología de secuencia. El gen *FCY22* es un gen putativo que codifica para una purina-citosina permeasa, cuya expresión no es capaz de suplir la función de la permeasa codificada por *FCY2* (Wagner y col., 2001).

Además, dependiendo del momento en el que haya aparecido la colonia de la que se recuperan los clones, se observan diferencias entre los tipos de mutaciones puntuales, e incluso entre los genes que mutan. Mientras que en las colonias ya visibles a día 2 se encontraron mutaciones puntuales en el gen *FCY1*, y en los mutantes espontáneos de día 3 se encontraron transversiones en *FCY2*, en los mutantes de resistencia adquirida encontramos predominantemente las ya mencionadas recombinaciones y un número similar de transversiones y transiciones en *FCY2*. Además, de los 50 clones que analizamos mediante CHEF, sólo se observó un aparente gran reordenamiento cromosómico, aunque podrían haber ocurrido reordenamientos menores que la técnica no nos permitió detectar.

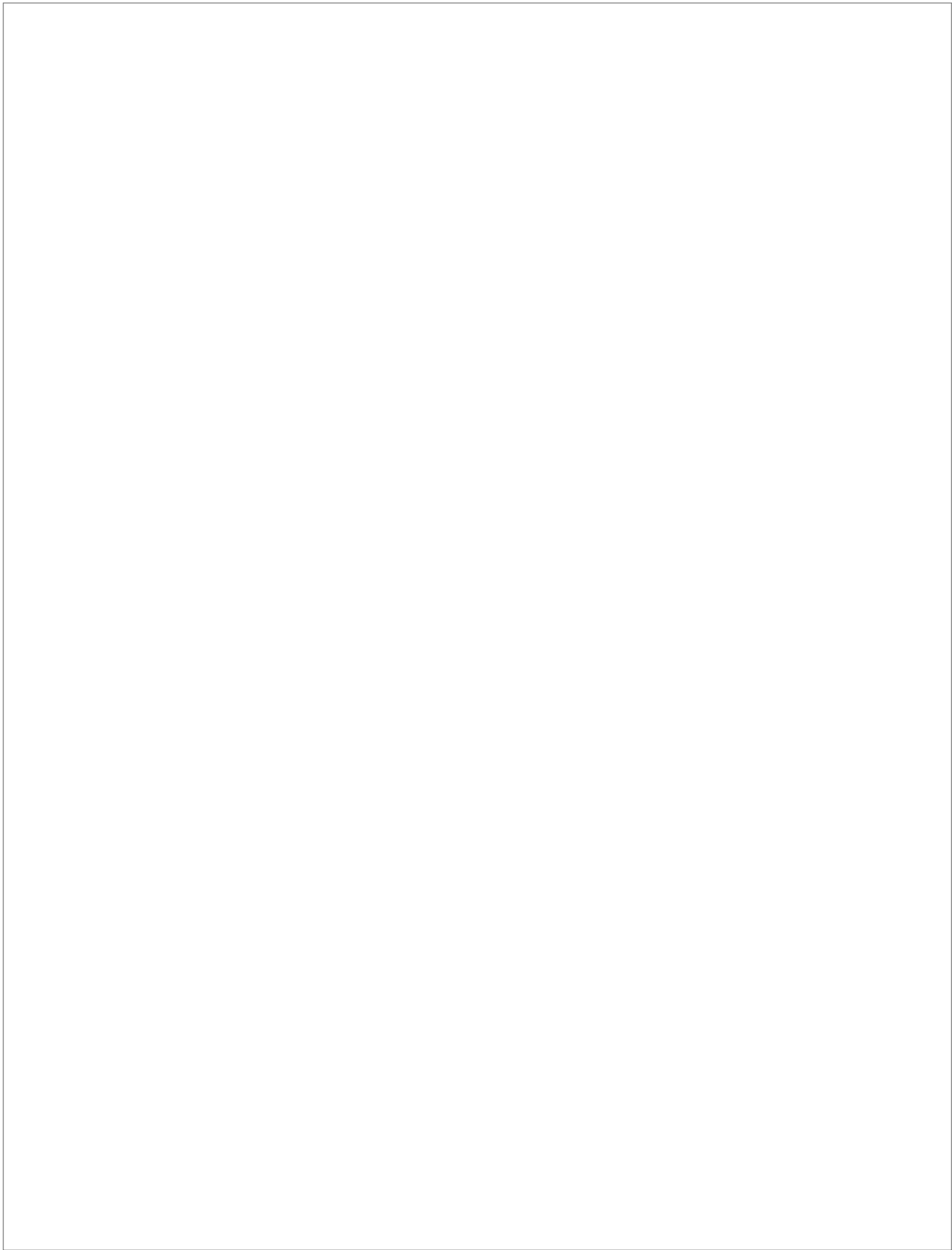
Tampoco se encontró ninguna mutación en el gen *CDC21* (codificante de la timidilato sintasa que es inhibida por 5-FdUDP) lo que contrasta con lo propuesto por Vermes y col. (2000). Ello subraya la importancia metabólica de la proteína codificada por el gen y la dificultad de que una posible mutación puntual diera como resultado una enzima funcional pero que no se viera afectada por el antifúngico.

Identificador del documento: 974511		Código de verificación: nnAZcF1T
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

Aunque *S. cerevisiae* carece de muchos aspectos relativos al cáncer u otro tipo de enfermedades, en eucariotas tanto las rutas bioquímicas como muchos de los genes presentan una alta secuencia de homología y las funciones proteicas están enormemente conservadas entre las diferentes especies (Menacho-Márquez y Murguía, 2007). Ello unido a la circunstancia de que el análogo fluorado de citosina 5-FC provoca una elevada frecuencia de eventos de adquisición de resistencia al tratar infecciones fúngicas (30%) (Vermes y col., 2000), que actualmente incluso ya no se administra en solitario, y que este antifúngico sigue siendo estudiado en nuevas aproximaciones a las terapias anticancerígenas (Kang y Choi, 2007; Lee y col., 2012), hace que el modelo de experimentación desarrollado presente ventajas respecto a los basados en estrés nutricional. Además de ejercer una presión selectiva mayor sin ser letal para toda la población de células, permite aproximarnos en mayor medida a la realidad de la situación clínica y en sí posee mayor relevancia en el campo de aplicación de búsqueda de posibles formas de inhibir o desactivar los mecanismos de adquisición de resistencia en células eucariotas.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511		Código de verificación: nnAZcF1T
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Identificador del documento:	Código de verificación:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	974511	nnAZcF1T	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			11/07/2017 18:00:48

CAPÍTULO 2. Extensión del modelo de SLAM de adquisición de resistencia a otro antifúngico y otra especie.

En vista de los resultados obtenidos con el modelo desarrollado, se pretendió evaluar la posibilidad de trasladarlo a otro antifúngico y otros organismos. Para ello se eligió por un lado un fármaco con mayor relevancia clínica, CSP, y por otro una especie de levadura infecciosa, *Candida albicans*, empleando en este último caso la cepa SC5314.

Al examinar la adquisición de resistencia a lo largo del tiempo de *S. cerevisiae* expuesta a CSP, aparecían más colonias a días tardíos de experimento (5-9 días) respecto a lo observado frente a 5-FC (figura 17A). Se analizaron 11 subpoblaciones, y mientras que la frecuencia de mutación espontánea era similar a la de 5-FC ($6,4 \cdot 10^{-6} \pm 1,2 \cdot 10^{-6}$ colonias/células viables), la frecuencia de resistencia adquirida era considerablemente mayor: $4,7 \cdot 10^{-2} \pm 2,7 \cdot 10^{-2}$ colonias/células viables ($p < 0,05$).

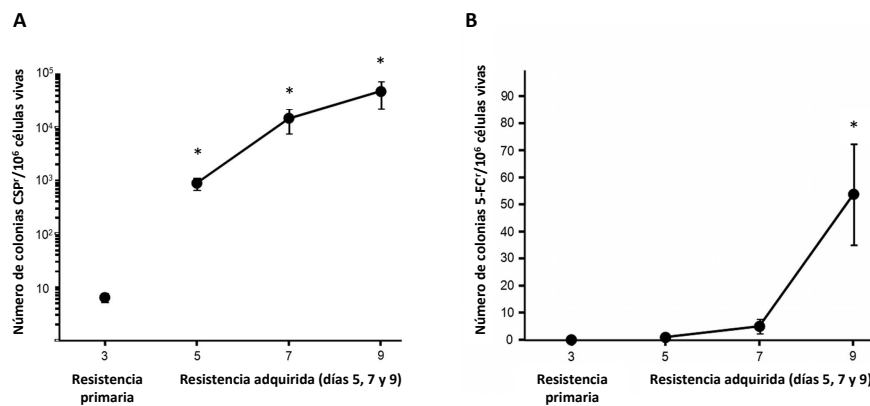


Figura 17. Cinética de la adquisición de resistencia durante exposición prolongada a antifúngicos. (A) Frecuencia de aparición de colonias resistentes de *S. cerevisiae* en medio líquido SC con CSP. Se sembraron $5 \cdot 10^6$ células ($n=11$). (B) Frecuencia de aparición de resistentes de *C. albicans* en medio líquido SC con 5-FC. Se sembraron $5 \cdot 10^5$ células ($n=21$). Los datos se expresan como media \pm error estándar de la media. * $p < 0,05$.

Respecto a la frecuencia de mutación espontánea de *C. albicans* frente a 5-FC, y para un total de 21 subpoblaciones, ésta resultó en un valor de $8,4 \cdot 10^{-8} \pm 8,4 \cdot 10^{-8}$

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

colonias/células viables, correspondiéndose con el rango esperado (Malavasic y Cihlar, 1992) (figura 17B). En cambio, a día 9 la frecuencia de adquisición de resistencia adquirida aumentó hasta $5,4 \cdot 10^{-5} \pm 1,9 \cdot 10^{-5}$ colonias/células viables.

En ambos casos se llevaron a cabo experimentos de reconstrucción para evaluar la estabilidad del fenotipo de resistencia adquirido, dando resultados similares a los de *S. cerevisiae* expuesta a 5-FC.

El estudio de la viabilidad celular en estos casos mostró que, a pesar de la alta frecuencia de adquisición de resistencia de *S. cerevisiae* frente a CSP, el antifúngico ejerce un potente efecto fungicida (Figura 18), lo que supuso una dificultad metodológica añadida a la hora de determinar el número de células no resistentes aún vivas en las placas a día 7, y marcando el límite de detección de éstas no pudiendo ya determinarse la viabilidad a día 9.

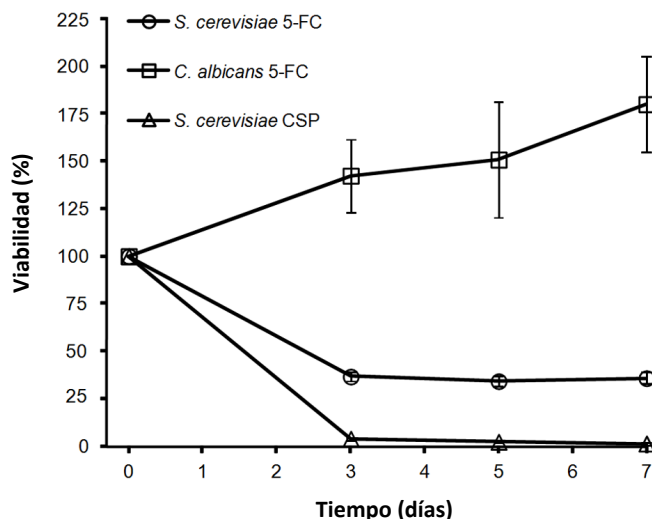


Figura 18. Efecto de los antifúngicos en la viabilidad celular. Se sembraron $5 \cdot 10^5$ células para *S. cerevisiae* (círculos, n = 39) y *C. albicans* (cuadrados, n = 21) en medio líquido SC con 100 $\mu\text{g/ml}$ de 5-FC. Para *S. cerevisiae* en exposición a 0,72 $\mu\text{g/ml}$ CSP se sembraron $5 \cdot 10^6$ células por placa (triángulos, n = 11). Los datos a partir de día 3 se representan como el porcentaje de células vivas respecto a las que se contabilizaron a las 3 h de iniciar los experimentos. Los datos se expresan como media \pm error estándar de la media.

Identificador del documento: 974511		Código de verificación: nnAZcF1T
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

El efecto en la viabilidad de la exposición de *C. albicans* a 5-FC fue fungistático en vez de fungicida, resultando en un crecimiento de células vivas hasta casi doblar su número a día 7 ($180,0 \pm 25,3\%$) respecto a las sembradas en las placas al inicio de los experimentos.

En base a estos resultados, otra de las ventajas del modelo, además de su relevancia clínica dado el uso de fármacos antifúngicos, es que las frecuencias de adquisición de resistencia presentan características similares a las observadas incluso en los primeros estudios acerca del fenómeno (Hall, 1992; Steele y Jinks-Robertson, 1992), y su orden de magnitud es mayor, lo que facilita la detección de eventos de mutación adaptativa por aparición de mayor número de clones mutantes entre la población de células, que es uno de los requisitos propuestos por Heidenreich (2007) que ha de cumplir un modelo de estudio de mutagénesis adaptativa.

Para descartar que los resultados y características observados pudieran ser debidos exclusivamente a 5-FC dado su efecto mutagénico, y para evaluar por tanto que pudiera ocurrir también en otros organismos y frente a otros antifúngicos, se exploraron dos variantes: un abordaje empleando la cepa de laboratorio SC5314 de *C. albicans*, y experimentos de SLAM en *S. cerevisiae* sustituyendo la 5-FC por CSP.

En el primero de los casos, con el uso de *C. albicans*, se halló que la frecuencia de mutación espontánea de este microorganismo diploide fue de unos dos órdenes de magnitud menor, en el rango de 10^{-8} mutantes/células viables, pero la frecuencia de mutantes secundarios llegó a valores similares a los de *S. cerevisiae* expuesta de forma prolongada a 5-FC, en el rango de 10^{-5} mutantes por célula. En cambio, respecto a la viabilidad se observó que la población de células de *C. albicans* en placa de medio SC con el antifúngico llegaba casi a doblarse al cabo de 7 días ($180,0 \pm 25,3\%$), esta diferencia muestra un efecto distinto de 5-FC en ambos organismos, siendo fungicida en *S. cerevisiae* y fungistático en *C. albicans*. En ambos casos las levaduras se reproducen de forma lenta, pero mientras en el caso de *S. cerevisiae* muchas células mueren, en el caso de *C. albicans* si esto sucede ha de ser en menor medida, permaneciendo en un estado quiescente o de ralentización del ciclo celular, lo que provoca el aumento de la población según pasan los días del experimento. El que la

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAINERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

división celular ocurra de forma tan lenta podría ser indicativo de que las frecuencias de mutación adaptativas son, al menos en parte, producidas por errores de replicación de las polimerasas, aunque deben operar otros mecanismos subyacentes.

La segunda variación consistió en hacer ensayos de SLAM para *S. cerevisiae* BY4741 con otro antifúngico, empleándose la equinocandina CSP como agente estresor en las placas de medio sólido SC. Aunque los valores de frecuencia de aparición de mutantes espontáneos no diferían mucho de los valores para *S. cerevisiae* frente a 5-FC, sí que la frecuencia de colonias consideradas producto de resistencia secundaria fue bastante mayor, llegando a alcanzar un orden de 10^{-2} CSP^f/célula viable.

Así, conjuntamente con lo observado en los resultados del capítulo anterior, con el modelo empleado las levaduras pueden adquirir resistencia de carácter hereditario (por lo observado en los experimentos de reconstrucción) tras la exposición prolongada a antifúngicos ya tengan éstos un efecto fungicida o fungistático, y que mientras más fungicida sea el efecto, más aumenta la frecuencia de adquisición de resistencia secundaria respecto a la espontánea. Por ello, deben existir factores que lleven a que se den mecanismos de mutagénesis adaptativa y esos factores aumentan en condiciones de estrés celular, de tal forma que cuanto mayor el estrés mayor el aumento de esos factores. Ya sea porque entre esos factores se encuentren metabolitos (como por ejemplo las ERO que pueden producir daños en ADN) o sean mecanismos bioquímicos (de forma análoga a los mecanismos de adaptación en bacterias como la respuesta SOS, o un aumento de daño en el ADN por endonucleasas, entre otros), lo que se ha observado en el modelo empleando *S. cerevisiae* frente a 5-FC es que las mutaciones halladas en los clones considerados mutantes espontáneos son diferentes respecto a las registradas en los clones de resistencia adquirida. Además, uno de los mecanismos se produce a través de eventos de recombinación entre el gen de la permeasa, *FCY2*, con un gen que presenta un 87% de homología, *FCY22*. Ello plantea un número de cuestiones interesantes como cual es el factor o los factores que dan lugar al aumento de las frecuencias de mutación observadas (metabolitos o proteínas), o por qué no se hallaron recombinaciones con el gen *FCY21*, con el cual *FCY2* posee un 77% de homología de secuencia, situado entre éste y *FCY22*,

Identificador del documento: 974511	Código de verificación: nnAZcF1T	Fecha:
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

a una distancia de 6 kilobases corriente abajo (2 kilobases más próximo a *FCY2* que el propio *FCY22*), e incluso si, dada la alta frecuencia encontrada, este tipo de recombinaciones son habituales en el transcurso evolutivo.

Por tanto, se propone que:

una exposición al antifúngico (y quizás ante otros tipos de estrés) las células tras completar su ciclo mitótico llegan a la fase G1 y entran en un periodo de latencia (Correia y col., 2010). En el curso de este retardo, ya sea en fase G1, S temprana o en ambas, las levaduras irían acumulando daños en el ADN y produciéndose roturas de cadena simple (SSB, *single strand break*) o de doble cadena (DSB, *double strand break*). Algunas de las roturas de doble cadena serían reparadas mediante la recombinación ectópica intracromosomal observada, probablemente interviniendo el grupo de epistasis de *RAD52* (Symington, 2002), mientras que otros daños se resolverían por otros sistemas de reparación del ADN (Boiteux y Jinks-Robertson, 2013), y algunas reparaciones quizá no serían viables conduciendo a la muerte celular. En el caso de completar las reparaciones necesarias la célula completaría su ciclo, pero si no hubieran reparaciones incorrectas que dieran como resultado alguna mutación que confiriese resistencia, las células hijas entrarían de nuevo en la ralentización del ciclo celular en G1, y el proceso comenzaría de nuevo. Con el tiempo, todos los recursos celulares se focalizarían en avanzar en el ciclo celular y la célula entraría en la situación caótica de “replicarse y mutar, o morir” (según se observa en los análisis por FACS a día 10 de exposición sumado al seguimiento por microscopía).

Así, en resumen, el modelo cumple con los requerimientos de Heidenreich (2007) de arresto/ralentización del ciclo celular y de que los eventos de mutación puedan ser detectados. Es susceptible de ser utilizado en estudios genéticos, permitiendo la caracterización de las proteínas implicadas empleando cepas KO (*knock-out*) de levaduras, o también en estudios de transcripción. Es un modelo clínicamente relevante, que podría tener aplicaciones tanto en el campo de las micosis invasivas como en cáncer, y de utilidad en el estudio de la adquisición de resistencia a fármacos.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAINERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Identificador del documento:	Código de verificación:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	974511	nnAZcF1T	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			11/07/2017 18:00:48

CAPÍTULO 3. Aplicación del modelo de SLAM en aislados clínicos de *C. albicans* y *C. glabrata*

Las especies del género *Candida* son la causa más común de infecciones fúngicas invasivas en pacientes hospitalizados, y las candidiasis invasivas están asociadas con altas tasas de mortalidad. A pesar de la aparición progresiva de fármacos antifúngicos como los azoles o las más recientes equinocandinas, que supusieron un importante avance en el tratamiento de estas infecciones y se emplean (las equinocandinas) habitualmente como terapia inicial en candidiasis invasivas, los casos de micosis emergentes por el tratamiento o de aparición de cepas resistentes van en aumento.

En vista de los resultados obtenidos con el modelo *in vitro* desarrollado, se ha pretendido adaptarlo al estudio de la adquisición de resistencia secundaria al tratamiento con caspofungina en las dos especies más patógenas del género *Candida*: *C. albicans* y *C. glabrata*, usando 2 aislados clínicos de dichas especies, CA48 y CG57 respectivamente.

3.1 Viabilidad de *Candida spp.* expuestas de forma prolongada a CSP

Se realizaron 3 ensayos de SLAM para cada especie en los que se sembró un total de 15 subpoblaciones independientes de cada uno de los aislados clínicos en placas de medio sólido SC con CSP, siguiendo la metodología descrita anteriormente. Inicialmente se evaluó la viabilidad celular y, debido al fuerte efecto fungicida esperado, se realizó un cálculo de viabilidad adicional a las 24 h para ambas especies, además de a las 3 h de sembrar las células. Tal como se esperaba, CSP mostró inicialmente un fuerte efecto fungicida tanto para CA48 como para CG57, pero sin embargo hubo diferencias al final del experimento (figura 19). Así, los resultados porcentuales calculados respecto al número de células viables contabilizadas tras 3 h de exposición al antifúngico reflejaron que la viabilidad de *C. albicans* CA48 disminuyó a $7,1 \pm 1,6\%$ después de pasadas 24 h, y cayó a $0,9 \pm 0,5\%$ pasados 3 días de exposición a CSP. El efecto inicial en *C. glabrata* CG57 fue similar, resultando valores de viabilidad

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

de $7,3 \pm 1,1\%$ a las 24 h y de $1,3 \pm 0,3\%$ después de 3 días. La diferencia mencionada se observó posteriormente, cuando el porcentaje de células viables de *C. albicans* bajó hasta los límites de detección, alcanzando a día 7 un valor de $0,2 \pm 0,1\%$, pero sin embargo la viabilidad de *C. glabrata* aumentó drásticamente, hasta un $44,3 \pm 6,6\%$ a día 7 de los experimentos de SLAM. Estos resultados sugieren que el antifúngico ejerce un potente efecto fungicida que algunas células de *C. glabrata* CG57 son capaces de superar sin llegar a crecer como colonias con fenotipo de resistencia.

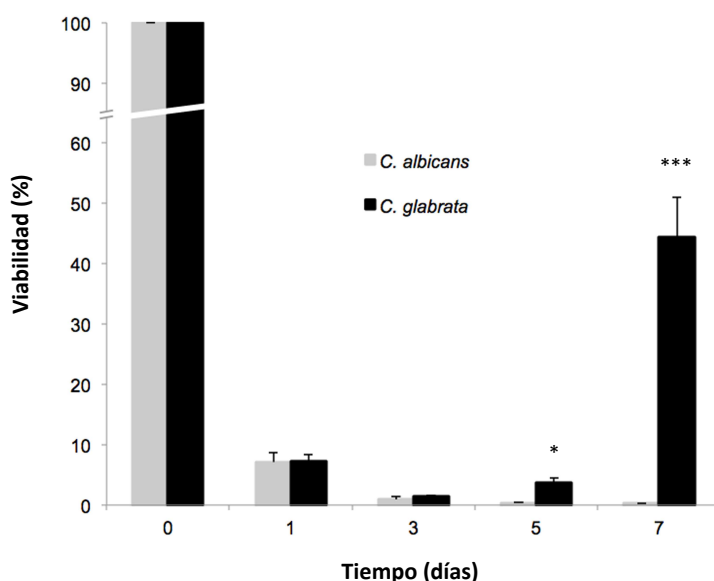


Figura 19. Efecto de CSP sobre la viabilidad celular en *C. albicans* CA48 y *C. glabrata* CG57. Se muestran los porcentajes de células viables de CA48 (gris) y CG57 (negro) respecto al número de células viables presentes a las 3 h de realizar la siembra en las placas con antifúngico. Los datos se expresan como la media \pm error estándar para 7 subpoblaciones independientes de cada aislado clínico. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,005$ al comparar respecto a la viabilidad de *C. glabrata* a día 3.

3.2 Adquisición de resistencia al tratamiento con CSP en *Candida* spp.

En base a las colonias aparecidas, la frecuencia de resistentes espontáneos (resistencia primaria), determinada por las colonias contabilizadas a día 3, fue baja para ambas especies, obteniéndose valores de $8,1 \cdot 10^{-6} \pm 2,0 \cdot 10^{-6}$ CSP^r/células viables

Identificador del documento: 974511		Código de verificación: nnAZcF1T
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

para *C. albicans* y de $2,0 \cdot 10^{-6} \pm 6,3 \cdot 10^{-7}$ CSP^r/células viables para *C. glabrata*, a los 3 días de exposición a CSP en placa de medio sólido SC. Sin embargo, según avanzó el experimento, estas frecuencias fueron aumentando hasta llegar a día 9 a alcanzar valores unas 3.000 veces superiores en el caso de *C. albicans* ($3,0 \cdot 10^{-2} \pm 1,2 \cdot 10^{-2}$ CSP^r / célula viable), siendo estos valores equivalentes a la cepa de laboratorio SC5314, y de 2.000 veces para *C. glabrata* ($4,8 \cdot 10^{-3} \pm 1,0 \cdot 10^{-3}$ CSP^r / célula viable), siendo estas diferencias entre frecuencias de adquisición de resistencia espontánea y adquirida estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para ambos aislados clínicos (figura 20).

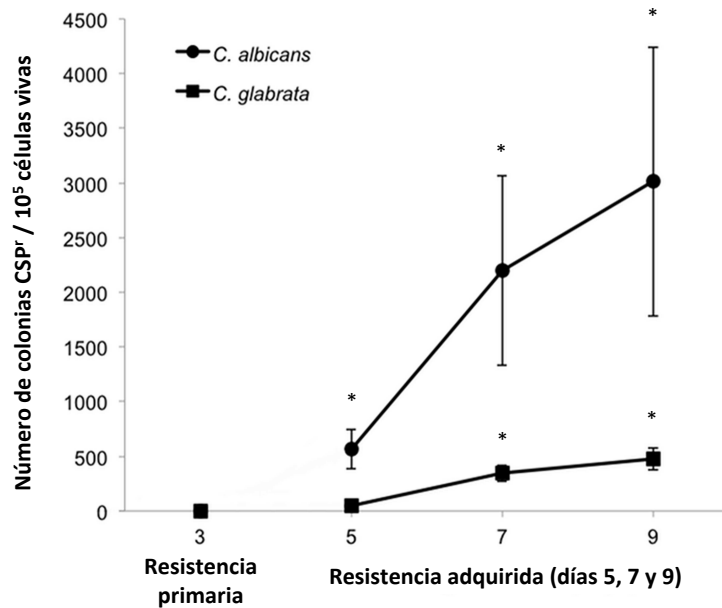


Figura 20. Cinética de la aparición de colonias resistentes de CA48 y CG57 expuestas de forma prolongada a CSP. Los datos se expresan como la media \pm error estándar para 7 subpoblaciones independientes de cada especie: *C. albicans* (círculos) y *C. glabrata* (cuadrados). * $p < 0,05$.

Siguiendo el procedimiento complementario a los ensayos de SLAM, se evaluó la estabilidad del fenotipo de resistencia mediante los experimentos de reconstrucción, subcultivando en una nueva placa con CSP, luego en medio sólido YPD sin antifúngico y de nuevo en medio SC con antifúngico. Se observó que de 57 colonias (20 de CA48 y 37

de CG57), 55 colonias, el 96,49% de las mismas, creció de nuevo en un periodo de 24-48 h en placas de medio SC con CSP. Estos clones subcultivados se seleccionaron aleatoriamente de las colonias aparecidas cada día tras el día 5 de experimento o posteriores. Si hubieran activado algún mecanismo metabólico de resistencia, se esperaba que, tras su paso por las placas de YPD, las células volvieran a tardar en crecer en forma de colonia en presencia del fármaco, por lo que se interpreta que los clones recolectados han adquirido resistencia al antifúngico con base genética (o epigenética).

Tal como se describe en la literatura (Desnos-Ollivier y col., 2008; Thompson y col., 2008; Garcia-Effron y col., 2009; Martí-Carrizosa y col., 2015), existen dos regiones de hipermutabilidad (*hotspots* HS1 y HS2) en los genes *FKS1* y *FKS2* que se han relacionado con la adquisición de resistencia a equinocandinas, y por ello se llevó a cabo la amplificación y secuenciación de dichas regiones en los clones sometidos al ensayo de reconstrucción, de cara a obtener más información acerca de la naturaleza de la resistencia adquirida. Sin embargo, si bien cabría esperar algún tipo de modificación de las bases de las secuencias, los análisis no mostraron ninguna mutación que pudiese justificar dicha resistencia en ninguna de las 55 colonias CSP^r analizadas, hallándose sólo algún cambio de base sin efecto (mutaciones silenciosas) en la secuencia de aminoácidos resultante. Por ello, se decidió explorar los genes de forma completa, siendo el resultado hasta la fecha igualmente negativo en cuanto a la existencia de mutaciones.

Con el fin de averiguar si el aumento en la viabilidad de *C. glabrata* CG57 se correspondía con ciclos de división celular y no se trataba de alguna clase de artefacto metodológico, y que a pesar de la caída de viabilidad de *C. albicans* CA48 aún quedaran células capaces de replicar su ADN y completar mitosis, se examinó por microscopía de fluorescencia con DAPI células recuperadas de 3 placas de medio SC con antifúngico para cada especie, de la misma forma que con *S. cerevisiae* expuesta de forma prolongada a 5-FC (figura 21). Para ambos casos, a los 7 días de exposición a CSP, se observaban células en anafase o intentos de replicación, lo que demostraba que las levaduras viables existentes en la placa de medio SC con CSP eran capaces de llevar a cabo divisiones celulares.

Identificador del documento: 974511	Código de verificación: nnAZcF1T	Fecha:
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAINERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

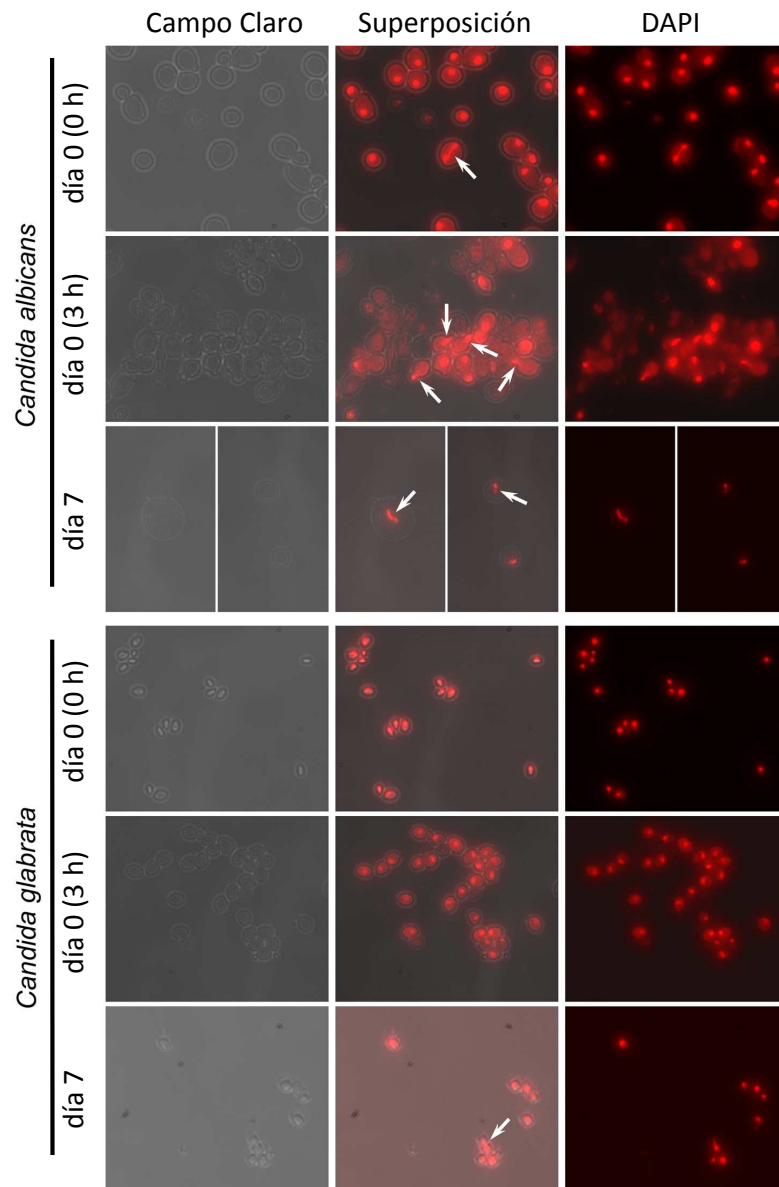


Figura 21. Microscopía de fluorescencia de las células expuestas a CSP. Efecto de CSP en la segregación de los núcleos de *C. albicans* (panel superior) y *C. glabrata* (panel inferior) a diferentes tiempos de exposición al antifúngico. La columna de la izquierda fue obtenida por microscopía de transmisión-campo claro; la columna de la derecha se obtuvo por iluminación fluorescente; y la columna central es resultado de la superposición digital de ambas. Las flechas señalan eventos de anafase o intentos de replicación.

Dado que no se encontraron mutaciones que alteraran la secuencia de aminoácidos resultante de la transcripción de los genes *FKS1* y *FKS2*, se evaluó la posibilidad de que estuvieran ocurriendo grandes reordenamientos cromosómicos tras la exposición al agente antifúngico mediante PFGE-CHEF. Como control para comprobar las posibles diferencias se usaron la cepa de laboratorio SC5314 y el aislado clínico CA48 para *C. albicans*, y el aislado clínico CG57 para *C. glabrata*. Para el ensayo se tomaron 7 de los clones CA48 CSP^r y 6 CG57 CSP^r de forma aleatoria pero tomando con al menos un representante de cada día de recolección de clones de las colonias aparecidas (Figura 22).

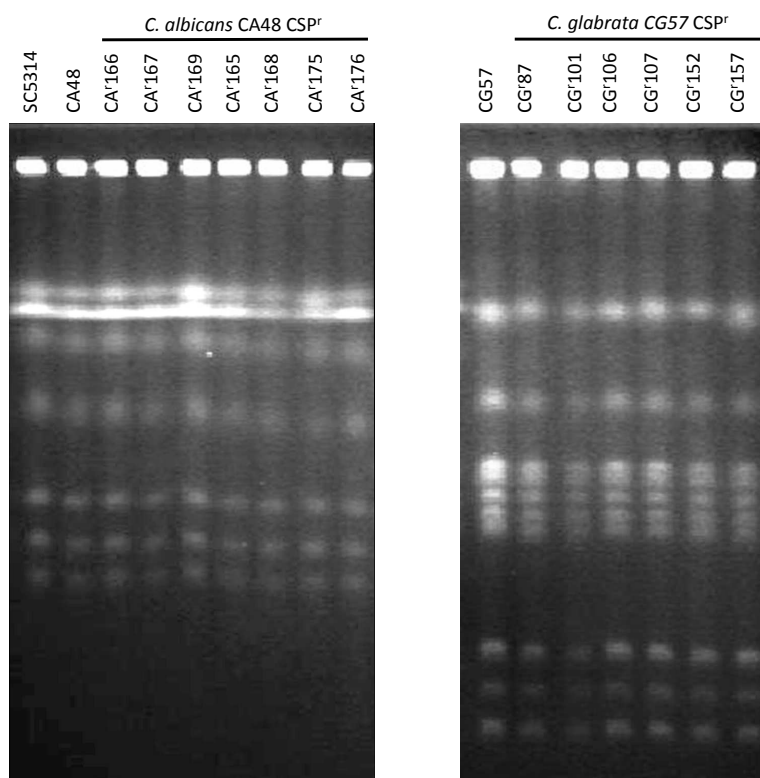


Figura 22. Análisis de reordenamientos cromosómicos en aislados clínicos de *C. albicans* y *C. glabrata* CSP^r por PFGE. Para *C. albicans* (izquierda) se muestran los resultados de la cepa de laboratorio SC5314 y el aislado clínico CA48 empleados como controles *wild-type* (WT) y de 7 clones CSP^r aparecidos a días tardíos. Para *C. glabrata* (derecha) se muestran los resultados del aislado clínico CG57 (como WT), y de 6 clones CSP^r aparecidos a días tardíos.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 974511	Código de verificación: nnAZcF1T	
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

De nuevo en este caso no localizamos variaciones en forma de grandes reordenamientos cromosómicos. Tampoco se observaron cambios en la ploidía de diferentes clones CSP^f respecto de los aislados clínicos originales previa exposición prolongada al antifúngico (Figura 23), a pesar de la gran plasticidad genómica de *Candida albicans* (Forche y col., 2008; Selmecki y col., 2010).

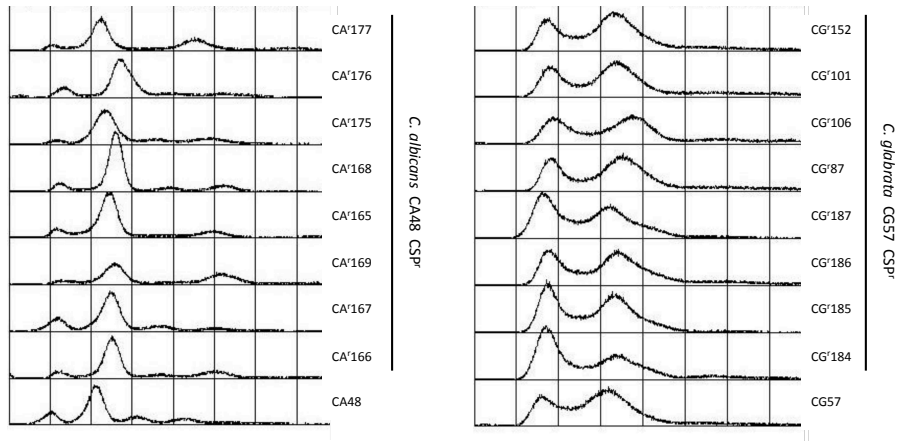


Figura 23. Análisis de la ploidía mediante FACS en clones CSP^f de *C. albicans* CA48 y *C. glabrata* CG57. Se representan los resultados para 8 clones CSP^f de CA48 (izquierda) y 8 clones CSP^f de CG57 (derecha), empleando los propios aislados clínicos como control de referencia.

Así, empleando el modelo desarrollado, y como se observó previamente en los experimentos de SLAM con *S. cerevisiae* en exposición prolongada a CSP, la equinocandina ejerce un efecto fungicida inicial muy fuerte sobre *C. albicans* y *C. glabrata*, pero un minúsculo número de células permanece vivo después de 3 días, algunos de los cuales son capaces de continuar el ciclo celular, y en la línea de la observado previamente con la metodología desarrollada, algunas de esas células adquieren resistencia. Con el uso del modelo mencionado, *S. cerevisiae* adquirió resistencia a 5-FC por mutaciones en el gen *FCY2* de la permeasa que permite al fármaco entrar en la célula. Sin embargo, en los aislados clínicos expuestos de forma prolongada a CSP se han secuenciado hasta el momento las regiones HS de los genes

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

FKS1 (en clones de CSP^r de CA48 y CG57) y *FKS2* (en clones de CG57 CSP^r), encontrando sólo alguna mutación silenciosa aislada, y posteriormente se ha procedido a evaluar variaciones en el resto de la secuencia de los genes mencionados sin encontrar aún mutación alguna. Tampoco se han observado grandes reordenamientos cromosómicos ni cambios en la ploidía que pudieran dar pie a encontrar alguna explicación de los resultados obtenidos hasta el momento.

Aún siendo estos resultados negativos, es posible que otras mutaciones pudieran permitir la resistencia, al menos hipotéticamente, y puesto que el fenotipo observado de CSP^r se muestra heredable, es de especial interés completar el análisis de la secuencia completa de todos los genes que codifican para las 3 subunidades de la 1,3-β-D-glucano sintasa, *FKS1*, *FKS2*, *FKS3*. Otra aproximación sería el análisis de la composición de la pared celular de clones CSP^r, ya que se ha descrito que cepas de *C. albicans* resistentes a CSP o con valores elevados de CMI presentan valores altos de quitina en la pared celular (Drakulovski y col., 2011; Lee y col., 2012). También se han observado casos de sensibilidad reducida a CSP en *C. glabrata* independientes de mutaciones en los genes *FKS1*, *FKS2* y *FKS3*, pero con sensibilidad aumentada a otras equinocandinas (Healey y col., 2011). El estudio de los genes involucrados en la síntesis de quitina sería otra de las vías a explorar en el análisis de los clones recolectados. La ruta de síntesis de este componente de pared es compleja e involucra la expresión de varios genes codificantes de quitina sintasas (*CHS1*, *CHS2*, *CHS3* y *CHS8*) (Munro y Gow, 2001; Munro y col., 2003) y de 4 genes correspondientes a quitinasas (*CHT1*, *CHT2*, *CHT3* y *CHT4*) (McCreath y col., 1995; McCreath y col., 1996), cuya expresión puede verse alterada e incluso pueden presentar mutaciones (Drakulovski y col., 2011)

Los datos resultantes permiten considerar el modelo *in vitro* validado para obtener clones con fenotipo de resistencia en aislados clínicos, cuyo estudio puede abordarse desde diferentes perspectivas y profundidad, confirmando la conclusión relacionada en el estudio de *S. cerevisiae* expuesta a 5-FC y CSP y la cepa de laboratorio *C. albicans* SC5314 expuesta a 5-FC en los resultados presentados en los capítulos 1 y 2.

Identificador del documento: 974511		Código de verificación: nnAZcF1T
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

CAPÍTULO 4. Actividad del sistema antioxidante genérico en la respuesta fisiológica celular a ROS inducidas por la exposición a antifúngicos

En el transcurso de los experimentos de SLAM las levaduras parecen entrar en un arresto transitorio del ciclo celular. Durante este periodo podría inducirse la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) como sucede en el tratamiento con sustancias antifúngicas como azoles, fenilpropanoides o polienos (Thevissen y col., 2007; Khan y col., 2011; Belenky y col., 2013). Si bien la muerte durante este periodo puede no ser dependiente del estrés oxidativo (Wysocki y Kron, 2004), las células sí serían sensibles a acumular múltiples daños en el ADN debido al aumento inducido de la producción de ROS, así como a sufrir peroxidación lipídica y oxidación de proteínas (figura 24).

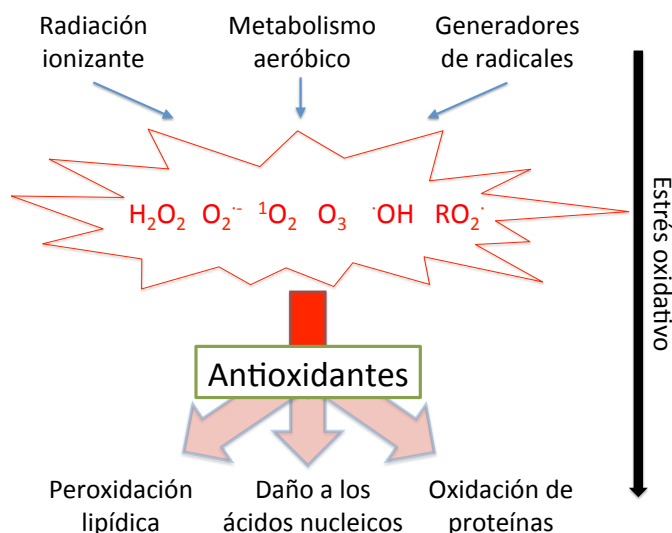


Figura 24. Estrés oxidativo. Todos los organismos pueden exponerse a ROS debido al propio metabolismo aeróbico, a las radiaciones ionizantes o a compuestos generadores o inductores de especies radicales. Los sistemas de defensa antioxidante participan en la protección frente a las ROS para controlar el estrés oxidativo. Dicho estrés oxidativo puede dañar los componentes celulares produciendo peroxidación lipídica, oxidación de las proteínas, dañando el ADN pudiendo provocar mutaciones, y en última instancia provocar la muerte celular. Adaptado de Morano y col., (2012).

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

La célula trataría de reparar los daños ocasionados al ADN, siendo algunas de estas reparaciones "erróneas", dando lugar a mutaciones. Si alguna de estas mutaciones promueve la adaptación a la condición de estrés, al finalizar el ciclo la célula podría crecer normalmente, habiendo así adquirido resistencia. Si ninguna de las mutaciones provoca la adquisición de resistencia, la célula seguiría acumulando nuevos daños en el ADN hasta que logra adquirirla o muere por lisis celular tras un arresto prolongado del ciclo (Wyssocki y Kron, 2004).

Las levaduras que de forma habitual infectan a mamíferos o forman parte de su flora han evolucionado desarrollando mecanismos para protegerse de estrés de tipo oxidativo o por especies reactivas del nitrógeno (Missall y col., 2004). En las infecciones por *Candida*, las enzimas antioxidantes juegan un papel importante en los mecanismos de defensa que tienen los microorganismos frente al ataque de células fagocíticas del huésped (Vázquez y col., 1999; Enjalbert y col., 2007), y han de actuar de forma sinérgica para que la protección frente al daño oxidativo sea eficiente (Michiels y col., 1994). Entre las enzimas antioxidantes se encuentran la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT), cuya actividad coordinada y secuencial se considera esencial para la correcta defensa celular (Lortz y Tiedge, 2003). El resultado de la reacción de dismutación de aniones superóxido ($O_2^{\cdot -}$) por la SOD es la generación de oxígeno molecular (O_2) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), siendo aún éste último una especie reactiva, por lo que ha de ser eliminado por la acción de la CAT que lo procesa a O_2 y H_2O (figura 25).

Recientemente se ha relacionado la resistencia al azol fluconazol y a la anfotericina B con el aumento de las actividades SOD y CAT. Estos antifúngicos inducen estrés oxidativo y se ha observado que en cepas resistentes de *C. albicans* y *C. dubliniensis* la actividad de estas enzimas se encuentra significativamente aumentada (Linares y col., 2013).

Para evaluar la posibilidad de que esta respuesta se esté dando en las levaduras estudiadas, se procedió a preparar extractos del contenido celular de las levaduras a diferentes tiempos de exposición al antifúngico (0, 3 y 6 h) para determinar las actividades SOD y CAT ante la eventual inducción de ROS.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 974511		Código de verificación: nnAZcF1T
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

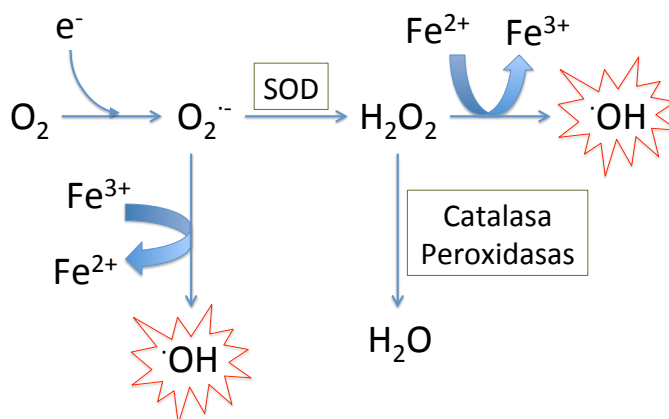


Figura 25. Acción coordinada de las enzimas antioxidantes. La actividad SOD lleva a cabo la dismutación del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) dando lugar a la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que bien puede ser reducido a través de la reacción de Fenton a radical hidroxilo, altamente reactivo, o puede ser detoxificado por la acción de catalasas y peroxidasas. En el caso de acumulación de $O_2^{\cdot-}$, éste puede donar un electrón al Fe^{3+} en la reacción de Haber-Weiss, lo que generaría radicales hidroxilo y Fe^{2+} , que además podría participar en la reacción de Fenton habiendo H_2O_2 en el medio. Adaptado de Morano y col. (2012).

En estos ensayos se incluyó el azol fluconazol, además de los antifúngicos ya empleados en los experimentos de SLAM, 5-FC y CSP, para poder establecer comparaciones dadas las evidencias de inducción de respuesta antioxidante al mismo (Arana y col., 2009; Linares y col., 2013; Mahl y col., 2015).

4.1 Actividades SOD y CAT en *S. cerevisiae*

Inicialmente, para descartar artefactos metodológicos, se evaluó si el propio cambio de medio líquido YPD al medio líquido SC podría estar generando un estrés que aumentara las actividades de las enzimas antioxidantes. Para ello se midieron las actividades SOD y CAT de células crecidas en los tubos control de medio SC sin antifúngico. Los valores obtenidos permiten descartar que inicialmente el cambio de medio en sí mismo provoque estrés oxidativo, observándose que para SOD la actividad

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

media de las células a tiempo 0 h, tomadas del precultivo en medio líquido YPD justo antes de ser inoculadas en el medio líquido SC, fue de $1,70 \pm 0,11$ U/mg de proteína, y de $1,73 \pm 0,06$ U/mg de proteína a las 3 h de cultivo en el nuevo medio. A las 6 h de haberse iniciado el cultivo sí se registró un aumento en la actividad SOD que resultó ser significativo ($2,05 \pm 0,10$ U/mg de proteína) (Figura 26.A). En el caso de la actividad CAT, los valores obtenidos no sólo no aumentaron respecto al control ($4,16 \pm 0,78$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) sino que disminuyeron tanto a las 3 h ($2,29 \pm 0,5$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) como incluso de forma significativa a las 6 h ($1,36 \pm 0,28$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) (Figura 26.B).

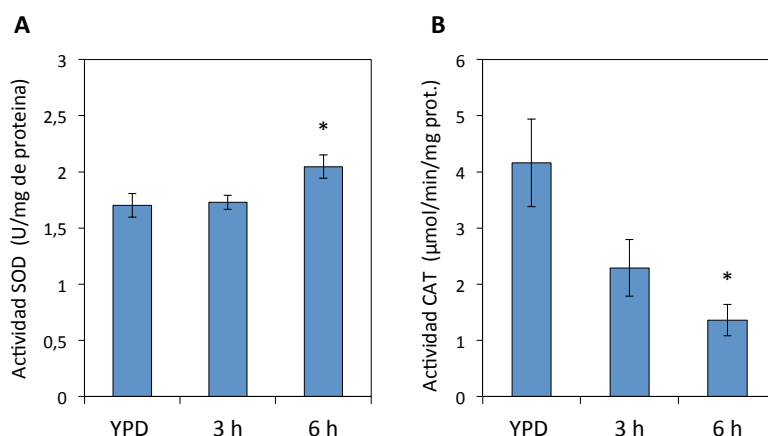


Figura 26. Cuantificación de las actividades SOD (A) y CAT (B) al cambiar las células de *S. cerevisiae* de medio. YPD: se corresponde con el cultivo en medio líquido antes de inocular las células en el medio SC. Los datos se expresan como media \pm error estándar de la media de un tamaño muestral $n \geq 4$ para cada caso. * $p < 0,05$.

A pesar de no existir diferencia inicial a causa del cambio de medio respecto a las actividades enzimáticas, el aumento del 17,07 % de actividad SOD y el descenso del 67,31% de actividad CAT a las 6 h obligó a hacer las posteriores comparaciones a cada tiempo respecto a los tubos control sin antifúngico introducidos en los ensayos.

A las 3 h de exposición de *S. cerevisiae* BY4741 a los diferentes antifúngicos, se registró un aumento significativo en la actividad SOD respecto del control sin antifúngico ($1,73 \pm 0,06$ U/mg de proteína) en el caso de 5-FC ($4,59 \pm 0,61$ U/mg de

Identificador del documento:	Código de verificación:	Fecha:
974511	nnAZcF1T	30/06/2017 19:28:19
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		
CRISTINA GIL LAMAGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

proteína) y CSP ($9,79 \pm 1,73$ U/mg de proteína), pero no para FLU ($2,20 \pm 0,27$ U/mg de proteína), aunque los valores registrados indican una tendencia al aumento de actividad. (Figura 27.A). Las diferencias se mantuvieron a las 6 h, resultando valores de actividad SOD en exposición a 5-FC de $3,28 \pm 0,22$ U/mg de proteína, y registrando un aumento drástico, unas 50 veces mayor, de actividad SOD en exposición a CSP ($102,61 \pm 65,51$ U/mg de proteína) respecto al control sin fármaco ($2,04 \pm 0,10$ U/mg de proteína). La respuesta al FLU siguió sin ser estadísticamente significativa ($2,19 \pm 0,06$ U/mg de proteína), aunque volvió a resultar ligeramente superior al control (Figura 27.B).

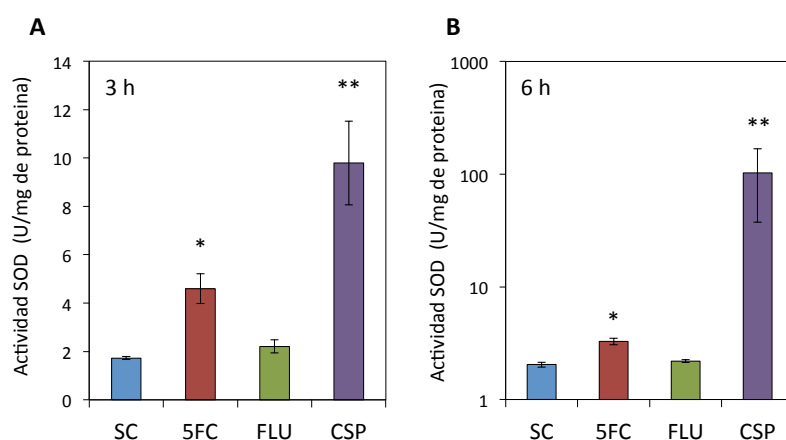


Figura 27. Cuantificación de las actividades SOD de *S. cerevisiae* expuesta a los diferentes antifúngicos a 3 h (A) y 6 h (B). Los datos se expresan como media \pm error estándar de la media de un tamaño muestral $n \geq 4$ para cada caso. SC: control en medio líquido sin antifúngico. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Los resultados de las actividades CAT resultaron similares dentro de cada tiempo de estudio. A las 3 h de exposición aumentaron de forma significativa las actividades en respuesta a los tratamientos con 5-FC ($7,97 \pm 1,35$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) y CSP ($27,19 \pm 8,85$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) respecto al control ($2,29 \pm 0,5$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) (figura 28.A). A las 6 h se mantuvieron las diferencias significativas de 5-FC y CSP, aumentando en ambos casos hasta valores de $21,68 \pm 0,11$ y $97,83 \pm 63,67$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína respectivamente. De nuevo la respuesta de

la actividad CAT a FLU ($3,84 \pm 0,42 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) no presentó diferencias respecto al control ($1,36 \pm 0,28 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) (figura 28.B).

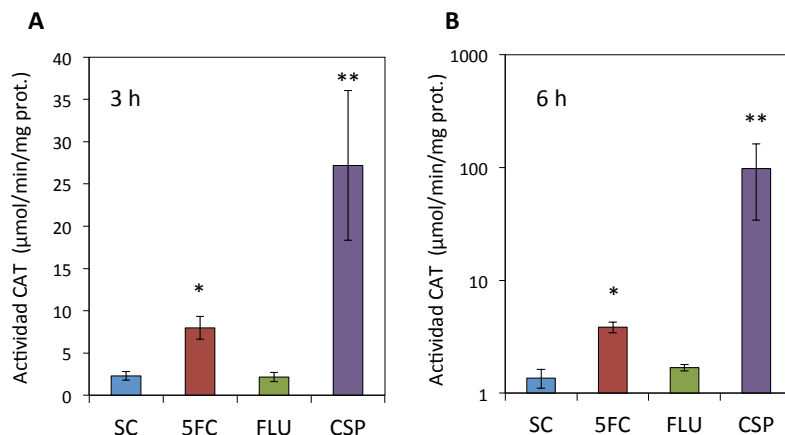


Figura 28. Cuantificación de las actividades CAT de *S. cerevisiae* expuesta a los diferentes antifúngicos a 3 h (A) y 6 h (B). Los datos se expresan como media \pm error estándar de la media de un tamaño muestral $n \geq 4$ para cada caso. SC: control en medio líquido sin antifúngico. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Este aumento inducido de las actividades SOD y CAT de forma coordinada sugiere la generación de ROS, al menos durante las 6 primeras horas de exposición a 5-FC y CSP. Durante este tiempo las células podrían ya haber sufrido mutaciones que habrán de reparar para continuar con su ciclo celular. El que los resultados anteriores muestren una ralentización del ciclo celular indica que la levaduras se encuentran sometidas a un fuerte estrés ejercido por el antifúngico y dado que en los experimentos de SLAM empleamos concentraciones de 5-FC 4 veces superior a la CMI (y hemos comprobado que en el transcurso de los mismos éste no se degrada), la exposición al agente estresor es continua, con lo que la célula podría seguir acumulando nuevas mutaciones hasta que logra adquirir resistencia o muere tras un arresto prolongado del ciclo (Wysocki y Kron, 2004). Los resultados de las actividades enzimáticas a CSP explican el fuerte estrés al que se ven sometidas las células, no pudiendo hacer muchas de ellas frente al antifúngico, lo que concuerda con el

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 974511	Código de verificación: nnAZcF1T	
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

poderoso efecto fungicida observado al estimar la viabilidad celular en los experimentos de SLAM.

4.2 Actividades SOD y CAT en los aislados clínicos *C. albicans* y *C. glabrata*

A pesar de no encontrar mutaciones en las regiones *hotspot* ni en las secuencias completas analizadas hasta el momento de *C. albicans* CA48 y *C. glabrata* CG57, éstas podrían estar sucediendo en otros genes. En ambos aislados clínicos se procedió a repetir el análisis de actividades SOD y CAT tras exposición a los antifúngicos en medio líquido SC. En vista de los resultados obtenidos y dado el volumen de combinaciones cepa-antifúngico y cantidad de datos, éstos se presentarán sólo respecto a la exposición de CSP y FLU de forma simplificada reseñando las diferencias significativas para una mejor comprensión de lo observado.

Inicialmente, se llevó a cabo el mismo procedimiento que con *S. cerevisiae* evaluando si el propio cambio de medio líquido YPD al medio líquido SC podría estar generando un estrés que aumentara las actividades de las enzimas antioxidantes. No se registraron aumentos de actividad significativos y sólo se observó una disminución de actividad CAT a las 3 horas tras el cambio de medio. Las comparaciones se hicieron a cada tiempo respecto a los tubos control sin antifúngico introducidos en los ensayos, de la misma forma que con *S. cerevisiae*.

4.2.1 Actividades SOD y CAT en *C. albicans* CA48

Respecto a las actividades enzimáticas de CA48 expuesta a los antifúngicos, la actividad SOD se vio aumentada a 3 h de forma significativa en respuesta a FLU ($1,24 \pm 0,39$ U/mg de proteína) respecto al control ($0,43 \pm 0,07$ U/mg de proteína), de la misma manera que sucedió con CSP ($1,00 \pm 0,25$ U/mg de proteína) (Figura 29.A). A las 6 h no se hallaron diferencias de actividad SOD frente a los antifúngicos respecto al control sin fármaco, pero sí en respuesta a CSP ($0,38 \pm 0,05$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de

Identificador del documento: 974511		Código de verificación: nnAZcF1T
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

proteína), siendo significativamente menor que ante FLU ($0,54 \pm 0,07 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) (Figura 29.B).

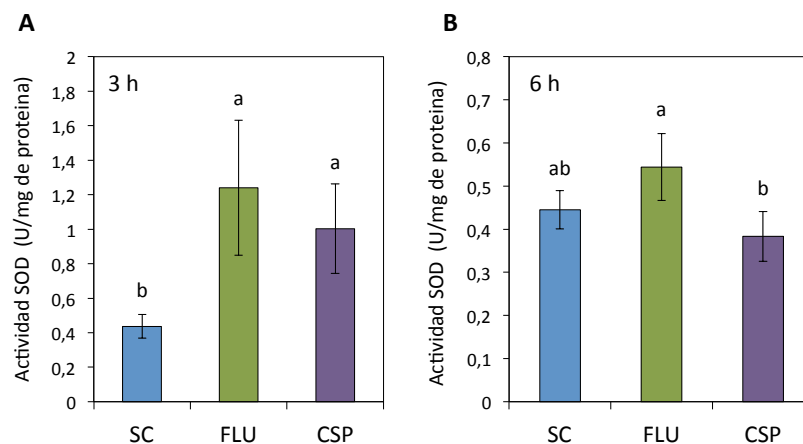


Figura 29. Cuantificación de las actividades SOD de *C. albicans* CA48 expuesta a FLU y CSP a 3 h (A) y 6 h (B). Los datos se expresan como media \pm error estándar de la media. SC: control en medio líquido sin antifúngico de un tamaño muestral $n \geq 4$ para cada caso. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Los resultados de la actividad CAT tras el tratamiento con FLU y CSP no mostraron diferencias significativas, excepto a las 3 h donde la actividad CAT en respuesta a CSP ($9,17 \pm 1,23 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) se vio aumentada aproximadamente el doble respecto al control sin antifúngico ($4,00 \pm 0,99 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) (Figura 30).

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

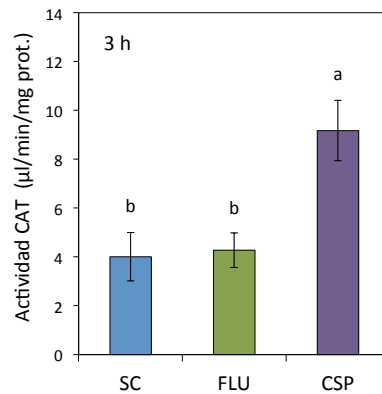


Figura 30. Cuantificación de la actividad CAT de *C. albicans* CA48 expuesta a FLU y CSP a 3 h. Los datos se expresan como media \pm error estándar de la media de un tamaño muestral $n \geq 4$ para cada caso. SC: control en medio líquido sin antifúngico. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Estos resultados indican que inicialmente las células se ven sometidas a un estrés oxidativo. Tanto la actividad SOD para ambos fármacos como la actividad CAT frente a CSP se ven aumentadas de forma significativa a las 3 h., retornando a las 6 horas a valores que no difieren del control. Es posible que en los tiempos de exposición medidos, este aislado clínico, CA48, sea capaz de tamponar el efecto inicial de estrés y por ello a 6 h las actividades regresan a niveles no diferentes al control.

Las levaduras patógenas han evolucionado para adaptarse al bombardeo oxidativo por parte de células fagocíticas del huésped (Vázquez y col., 1999; Enjalbert y col., 2007), y esta respuesta denota la acción sinérgica de ambas enzimas para hacer frente al estrés oxidativo inducido. La respuesta en cuanto a actividad CAT frente a FLU podría darse, y es probable que por los tiempos escogidos no se haya detectado, pero sí que el aumento de actividad SOD refleja la inducción de ROS por parte del antifúngico. La CSP ejerce un fuerte efecto inicial inhibiendo la síntesis de pared celular actuando sobre el complejo de la 1,3- β -D glucano sintasa (Castanheira y col., 2010). Las células que sean capaces de responder podrán avanzar en el ciclo celular,

Identificador del documento: 974511	Código de verificación: nnAZcF1T	Fecha:
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

muriendo el resto y siendo las actividades posteriores debidas a las levaduras supervivientes. Concentraciones menores de fármaco podrían permitir una mejor determinación de estas enzimáticas actividades antioxidantes observadas en medio líquido para las mismas concentraciones que en placas de medio sólido SC con CSP.

4.2.2 Actividades SOD y CAT en *C. glabrata* CG57

El aislado clínico de *C. glabrata* CG57 apenas mostro variaciones en cuanto a actividades SOD y CAT en respuesta a los tratamientos con FLU y CSP, sólo a las 3 horas de exposición se vio aumentada alguna de las actividades de forma significativa.

En el caso de la SOD, frente a la exposición a CSP se observó un aumento de actividad ($3,73 \pm 1,43$ U/mg de proteína) a 3 h respecto al control ($1,42 \pm 0,10$ U/mg de proteína), sin verse las células influidas en por la exposición a FLU ($1,29 \pm 0,19$ U/mg de proteína) (Figura 31.A). A 6 h no se registraron variaciones significativas, si bien la actividad SOD frente a CSP descendió hasta niveles de no diferentes al control ($1,41 \pm 0,26$ U/mg de proteína).

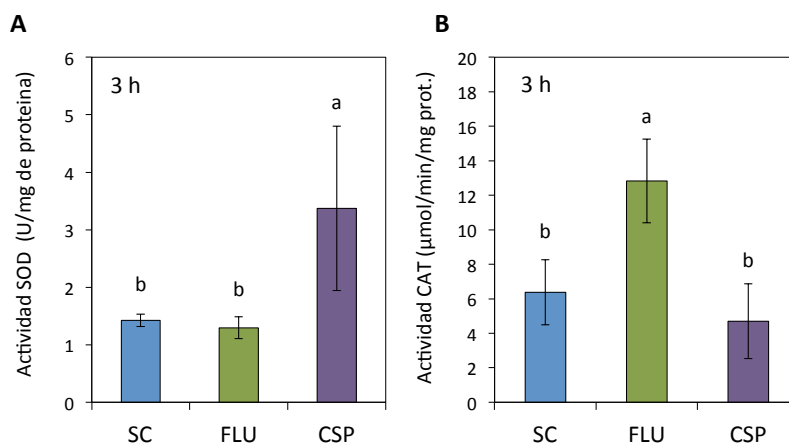


Figura 31. Cuantificación de las actividades SOD (A) y CAT (B) de *C. glabrata* CG57 expuesta a FLU y CSP a 3 h. Los datos se expresan como media \pm error estándar de la media de un tamaño muestral $n \geq 4$ para cada caso. SC: control en medio líquido sin antifúngico. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAINERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

La actividad CAT presentó un comportamiento similar, viéndose sólo aumentada a 3 h en respuesta a FLU ($12,82 \pm 2,43 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) respecto al control ($6,37 \pm 1,89 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína), sin registrarse cambios significativos en exposición a CSP ($4,69 \pm 2,16 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína).

Existen pocos estudios que hayan determinado el efecto de antifúngicos en la activación de las actividades SOD y CAT de levaduras del género *Candida*. Así, a pesar de haber observado aumentos significativos de actividad sólo a 3 h en respuesta a uno de los antifúngicos para cada enzima, estos resultados toman especial interés, y tanto CSP como FLU podrían provocar estrés oxidativo en esta cepa CG57.

Inicialmente hay un aumento de la actividad SOD frente a CSP que se ve reducida a las 6 h, pero CAT no muestra variaciones a ninguno de los tiempos. La célula se ve en la necesidad de aumentar la actividad inicial de SOD para tamponar la generación inducida de anión superóxido, y la CAT existente en el medio intracelular es capaz de procesar el H_2O_2 generado por la dismutación del $\text{O}_2^{\cdot -}$ por la SOD.

Para el FLU, en cambio, no se registraron aumentos en las actividades SOD a ninguno de los tiempos, pero sí de CAT a 3 h. Ello indica que se ha de estar generando H_2O_2 en cantidad tal que CG57 habrá de producir más CAT para controlar los niveles de esta especie reactiva producto de la reacción de la SOD. Dada la naturaleza propia de *C. glabrata*, que como patógeno ha evolucionado para hacer frente al ataque oxidativo por parte de células fagocíticas, es probable que este aislado dispusiera de SOD suficiente como para responder a la generación inicial de aniones superóxido, pero no de suficiente CAT para procesar el H_2O_2 generado. Las diferencias entre FLU y CSP en cuanto a respuesta celular pueden deberse a que ambos antifúngicos poseen diferentes dianas de acción, FLU interfiere en la síntesis de membrana y CSP en la pared, con lo que las levaduras han de enfrentarse a diferentes situaciones.

El no haber encontrado mutaciones en los genes *FKS1* y *FKS2* en los clones con fenotipo de resistencia coleccionados a partir de los experimentos de SLAM, no excluye que este aislado clínico pueda explotar otras soluciones para presentar sensibilidad reducida a CSP. Este hecho se ha observado previamente en mutantes seleccionados *in vitro* y, aunque mutaciones en el gen *FKS1* puedan proporcionar

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

sensibilidad reducida a *C. glabrata* en procesos infecciosos (Cleary y col., 2008), la sensibilidad reducida al antifúngico puede darse sin haber sufrido mutaciones en ninguno de los genes que codifican para la 1,3-β-D glucano sintasa: *FKS1*, *FKS2* y *FKS3* (Healey y col., 2011).

Si bien en aislados clínicos de *C. albicans* y otras especies del género se ha descrito que en cepas resistentes a CSP se observan valores elevados de contenido de quitina en la pared (Drakulovski y col., 2011; Lee y col., 2012; Walker y col., 2013), ésta respuesta puede no darse en *C. glabrata* (Walker y col., 2013). Aún así, el sistema antioxidante celular podría estar implicado en los mecanismos de resistencia, como se ha determinado recientemente para *C. albicans* y *C. dubliniensis* frente a FLU y anfotericina B (Linares y col., 2013). Una eficiente actividad coordinada y sinérgica de enzimas antioxidantes, como son la superóxido dismutasa y la catalasa, formaría parte de una respuesta eficiente que al menos proporcionaría más tiempo al microorganismo para desarrollar una respuesta adaptativa.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 974511		Código de verificación: nnAZcF1T
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48



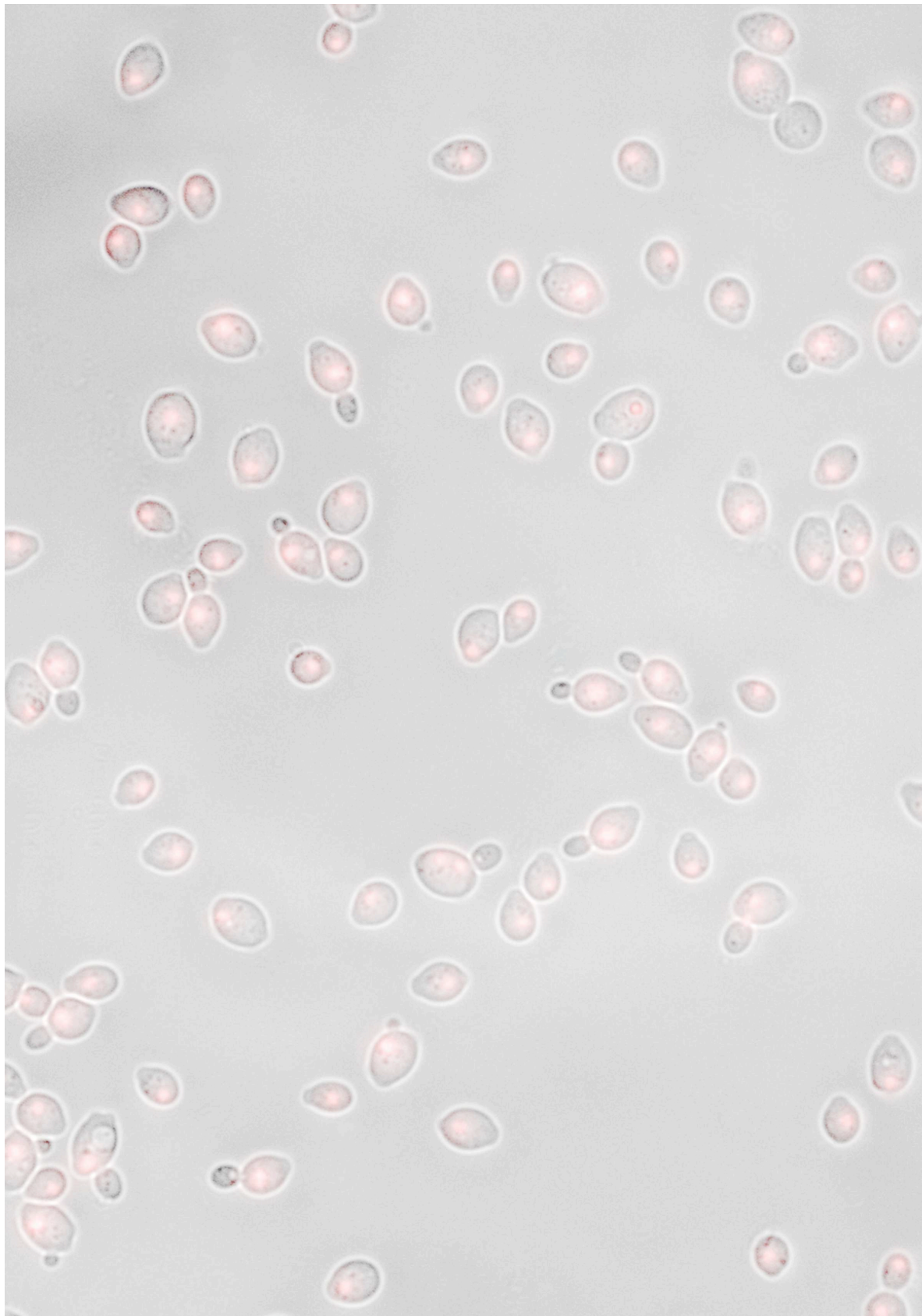
REFLEXIÓN FINAL

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

REFLEXIÓN FINAL

El tratamiento empírico y preventivo con antifúngicos está teniendo como consecuencia indeseada un aumento en la resistencia a los mismos, ya sea por el aumento de los patógenos intrínsecamente resistentes, o bien por la adquisición de resistencia secundaria. Este trabajo de tesis pretendía abordar una nueva aproximación al fenómeno y recabar nueva información acerca de cómo las eucariotas levaduras adquieren la resistencia. Además de poder ser una información útil de cara a encontrar nuevos métodos de interferir en la adquisición de resistencia, no deja de tener implicaciones evolutivas interesantes.

Como novedad respecto a otros estudios en el tema, se ha empleado una metodología que presenta diversas ventajas, entre ellas, y quizá la que considero más importante, es la capacidad de poder seleccionar clones aislados con fenotipo de resistencia a partir de una subpoblación que ha estado sometida a una fuerte presión selectiva: el tratamiento con fármacos antifúngicos. Aunque globalmente no se haya realizado un avance definitivo en los mecanismos que permiten a las levaduras adquirir resistencia, sí que han sentado las bases de futuros ensayos que van más allá de los modelos de estrés nutricional que mayoritariamente se han descrito hasta la fecha (Heidenreich, 2007; Heidenreich y Steinboeck, 2017). A pesar de que la hipótesis de mutagénesis adaptativa, bajo la cual se desarrolla el trabajo, es relativamente reciente, las bases y términos de partida parecen estar bien definidos, salvo en la disyuntiva de si las condiciones de presión selectiva han de ser fuertes o si en cambio los microorganismos han de ser preferiblemente mantenidos en condiciones de arresto no letales. Los modelos de estrés nutricional se enfocan hacia la segunda opción, e incluso, con el paso del tiempo, se han llegado a establecer críticas hacia los modelos de estudios que aplican un estrés selectivo demasiado fuerte por permitir sólo una pequeña ventana de oportunidad para la mutagénesis adaptativa (Heidenreich y Steinboeck, 2017).

En esta tesis queda plasmado que a pesar de poder existir un fuerte efecto fungicida inicial, hay células que son capaces de avanzar en su ciclo celular y terminar proliferando hasta formar colonias, lo que se considera como la expresión del fenotipo

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

Reflexión final

de resistencia adquirida. En algunos casos, como en el de *S. cerevisiae* expuesta de forma prolongada a 5-fluorocitosina (5-FC), ha sido posible incluso determinar frecuencias de mutación elevadas, ya sea por mutaciones puntuales o por la recombinación ectópica observada entre los genes *FCY2* y *FCY22* que poseen una homología del 87%. El cómo sucede esta recombinación aún no se ha determinado, así como las proteínas que intervienen, pero dado que los marcos de lectura abierta (ORF, *open reading frame*) de estos genes se encuentran dispuestos en sentidos contrarios, un simple plegamiento del ADN que dejara enfrentados a ambos genes en el momento de la transcripción generaría la situación ideal para que una recombinación pudiera tener lugar. La conexión entre niveles elevados de transcripción y mutación se ha observado desde hace ya al menos dos décadas, tanto en levaduras (Datta y Jinks-Robertson, 1995), como en bacterias (Beletskii y Bhagwat, 1996), y desde entonces varios trabajos reflejan esta relación directa (Ercan y col., 2005; Kim y Jinks-Robertson, 2009; Lippert y col., 2011; Takahashi y col., 2011), llegando a calificar incluso el proceso de transcripción como fuente de inestabilidad genómica (Kim y Jinks-Robertson, 2012).

El estrés que supone a la célula la entrada de 5-FC y su posterior conversión a 5-fluorouracilo (5-FU), que al metabolizarse inhibe en última instancia la síntesis de ADN, ARN y proteínas, empujando a la levadura a sobreexpresar el gen *FCY2*, tratando inútilmente de compensar la entrada de 5-FC en el citosol fabricando más purina-citosina permeasa, con el consecuente aumento de posibilidades para el antifúngico de entrar en la célula. Así, en un estado de elevada tasa de transcripción de *FCY2*, la secuencia quedará expuesta y existirían muchas probabilidades de que la propia transcripción pudiera provocar roturas de cadena simple o doble que serían reparadas mediante procesos de recombinación (Aguilera y Gaillard, 2014). Un plegamiento como el que se muestra en la figura 13 dispondría de una secuencia cercana con una alta homología (87%) la secuencia del gen *FCY22*. Tras reparar de esta manera los daños, el resultado sería un gen que codificaría para una proteína de membrana muy probablemente truncada, cesando la entrada de 5-FC en la célula.

Así, un estrés mayor que el empleado en un modelo de privación nutricional empujaría a la célula a mutar o morir, pero esto en poblaciones de organismos

Identificador del documento: 974511	Código de verificación: nnAZcF1T	Fecha:
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

unicelulares es un problema mucho menor para la especie que en organismos pluricelulares, cuyas mutaciones han de ocurrir en la línea germinal. Podríamos decir que, al menos a partir de este ejemplo y con este modelo, la evolución en microorganismos se vería favorecida por procesos de selección natural severos.

La vida se abre camino.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

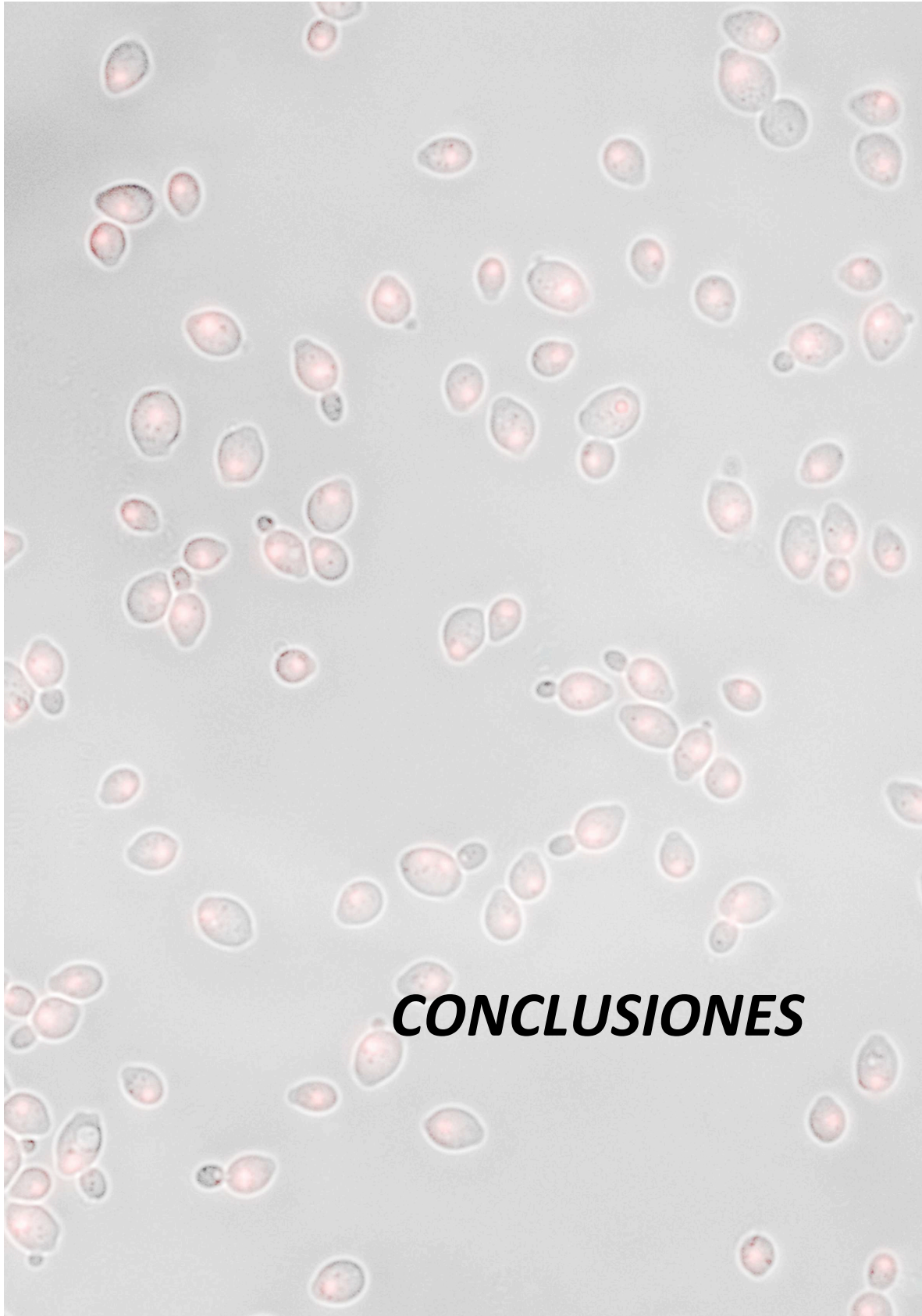


Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48



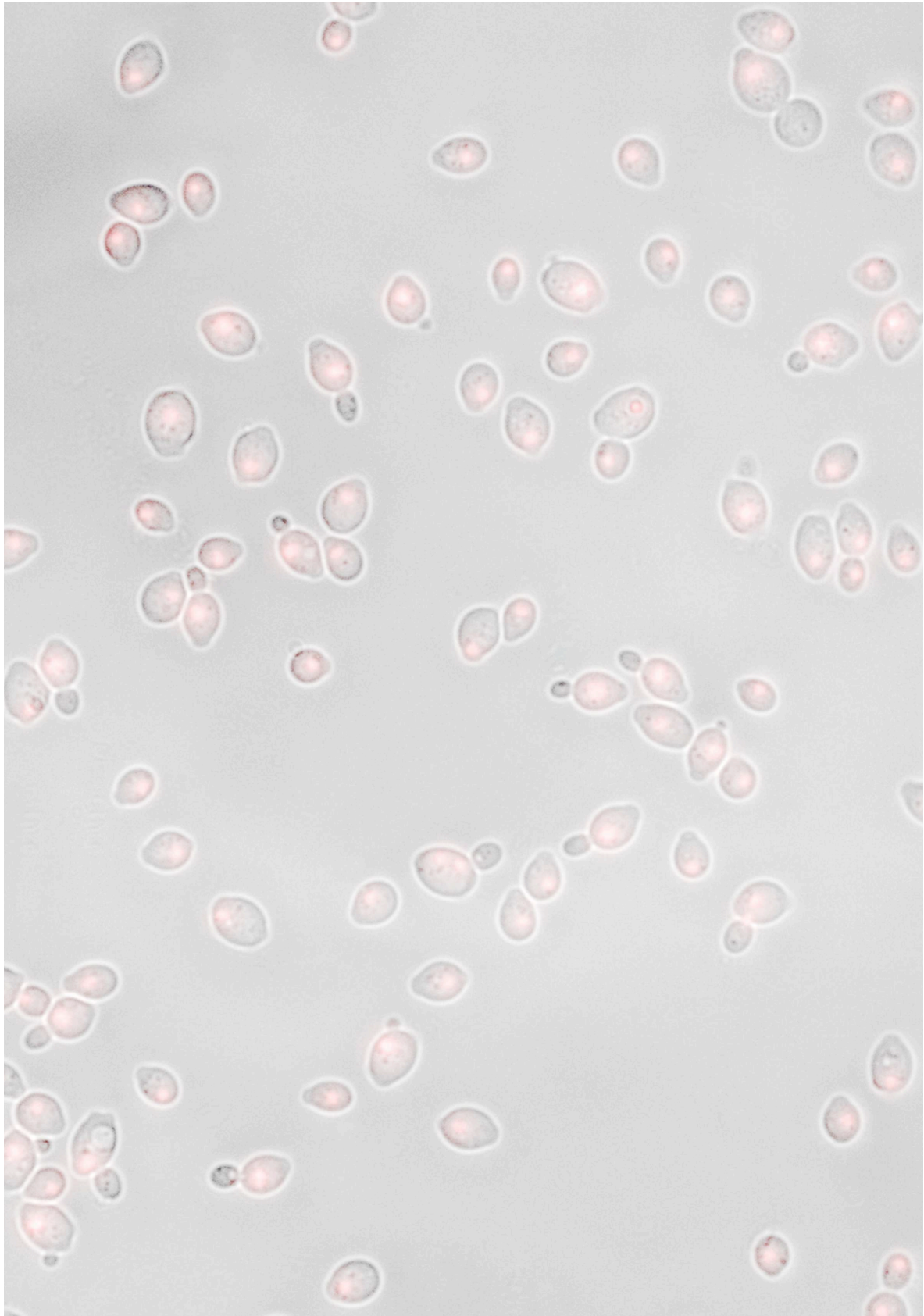
CONCLUSIONES

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

CONCLUSIONES

1. El ciclo celular de una población de *Saccharomyces cerevisiae* expuestas de forma prolongada a 5-fluorocitosina transcurre de forma ralentizada, hasta que las células son capaces de adquirir resistencia o mueren.
2. Los clones coleccionados de *Saccharomyces cerevisiae* con fenotipo de resistencia adquirida a 5-fluorocitosina son resultado de mutaciones que ocurren tras sufrir exposición prolongada al antifúngico.
3. Las colonias con resistencia primaria (aquellas aparecidas a día 3 de experimento) poseen un espectro de mutaciones que difiere del de los clones coleccionados a partir de las colonias aparecidas a partir de día 5 de experimento, siendo más frecuente en estos encontrar mutaciones en el gen *FCY2*.
4. Uno de los mecanismos mutagénicos subyacentes a la adquisición de resistencia de *Saccharomyces cerevisiae* a 5-fluorocitosina es una recombinación ectópica que ocurre con elevada frecuencia entre los genes *FCY2* y *FCY22*.
5. El modelo experimental desarrollado de mutagénesis activada por estrés (SLAM, *stressful lifestyle activated mutagenesis*), cumple con los requerimientos de un modelo de estudio de mutagénesis adaptativa, y posee similitudes con modelos ya existentes basados principalmente en estrés nutricional.
6. La metodología desarrollada es extrapolable para la misma especie de levadura a otro antifúngico (caspofungina), y a otra cepa de laboratorio de otra especie (*Candida albicans* SC5314).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511		Código de verificación: nnAZcF1T
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

Conclusiones

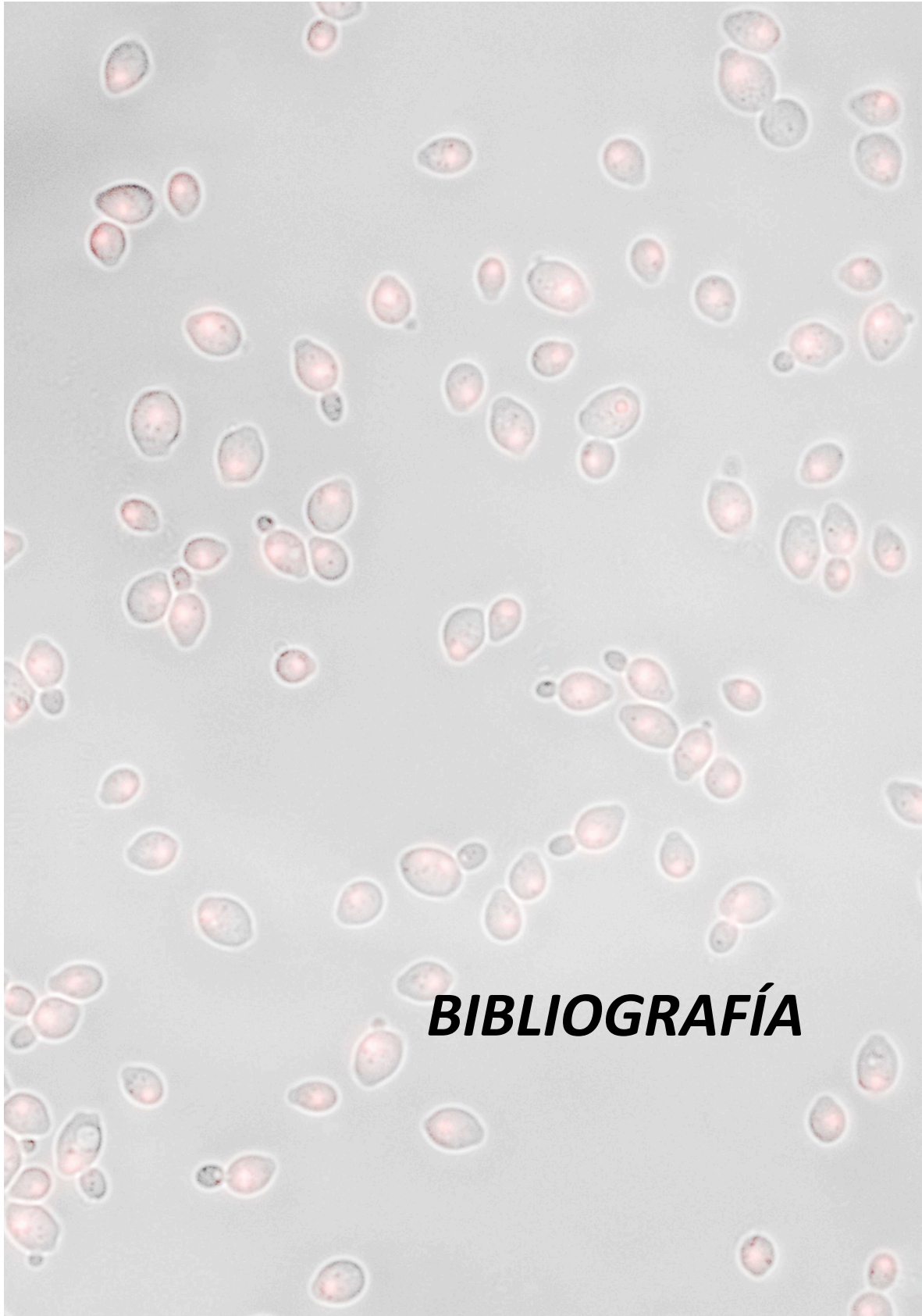
7. Los resultados obtenidos con los ensayos en *Candida albicans* CA48 y *Candida glabrata* CG57 en exposición a caspofungina permiten considerar el modelo in vitro validado para obtener clones con fenotipo de resistencia en aislados clínicos además de en cepas de laboratorio.
8. Poblaciones celulares de las especies *Candida albicans* y *Candida glabrata* pueden superar el estrés ejercido por la caspofungina, mostrando algunas células fenotipo de resistencia que es independiente de mutaciones en los genes *FKS1* y *FKS2* que codifican para la enzima 1,3- β -D-glucano sintasa, reordenamientos cromosómicos o cambios en la ploidía.
9. La cepa de laboratorio BY4741 de *S. cerevisiae* aumenta de forma sinérgica la actividad de las enzimas antioxidante superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) en respuesta a la exposición a los antifúngicos 5-fluorocitosina y caspofungina, siendo mayor en el segundo caso.
10. El aislado clínico de *Candida albicans* CA48 responde a la exposición a caspofungina aumentando inicialmente las actividades de las enzimas SOD y CAT, mientras que el fluconazol sólo induce la respuesta de la SOD. Los antifúngicos caspofungina y fluconazol inducen una leve respuesta antioxidante en el aislado clínico de *Candida glabrata* CG57, aumentando inicialmente sólo la actividad CAT en exposición a caspofungina y la actividad SOD frente a fluconazol.
11. El estudio de la respuesta antioxidante en todas las cepas analizadas requiere un análisis más profundo, tanto enzimático como de identificación de las propias especies reactivas del oxígeno (ROS) que se puedan estar induciendo, para poder establecer una relación entre respuesta antioxidante y generación de ROS por la exposición a los antifúngicos.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAINERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48



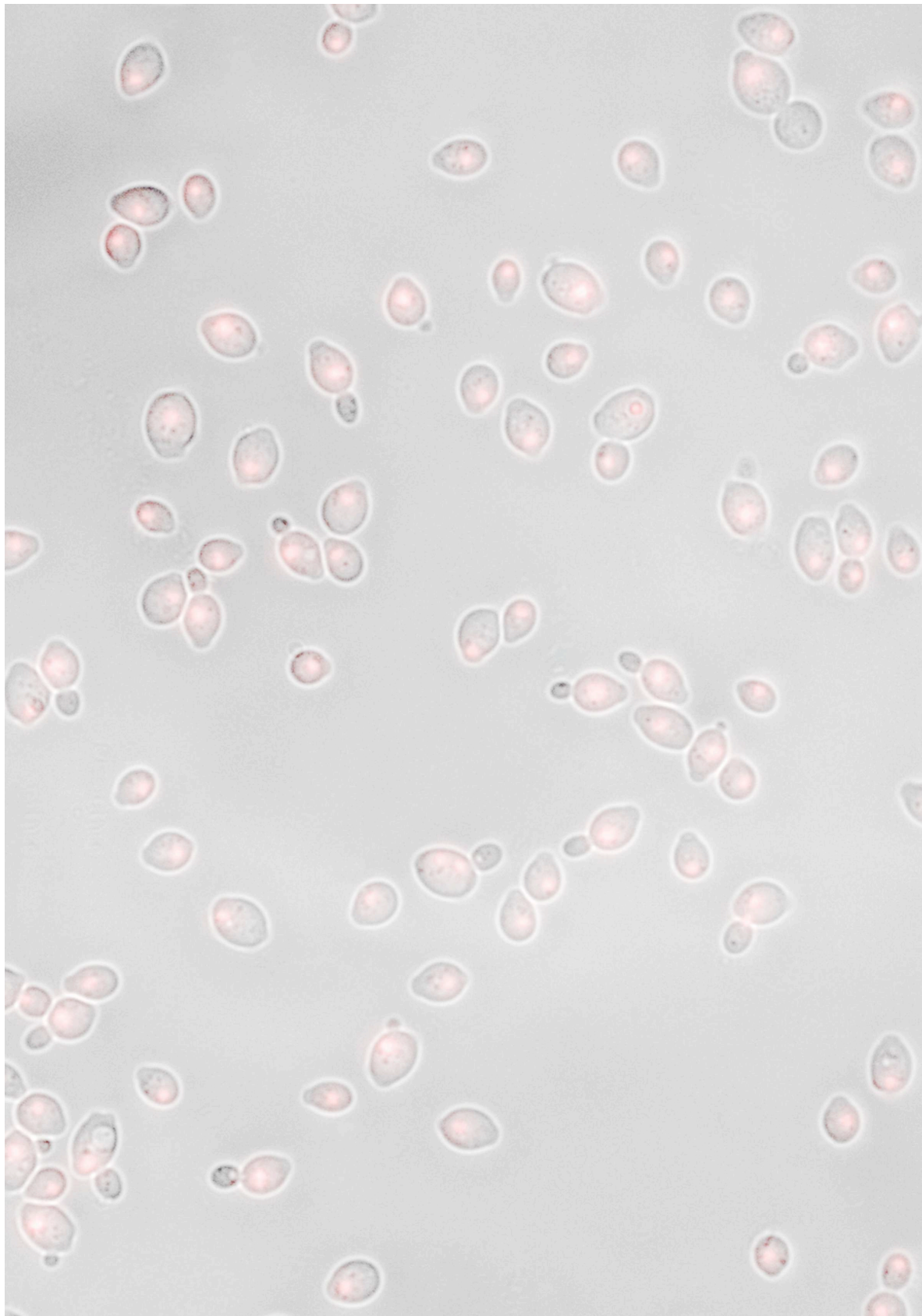
BIBLIOGRAFÍA

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

BIBLIOGRAFÍA

- Achkar, J. M., and Fries, B. C. (2010). Candida infections of the genitourinary tract. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2), 253–273. doi: 10.1128/CMR.00076-09
- Arana, D. M., Nombela, C., and Pla, J. (2009). Fluconazole at subinhibitory concentrations induces the oxidative- and nitrosative-responsive genes TRR1, GRE2 and YHB1, and enhances the resistance of *Candida albicans* to phagocytes. *J Antimicrob Chemother.* 65: 54-62. doi: 10.1093/jac/dkp407
- Aguilera, A., and Gaillard, H. (2014). Transcription and Recombination: When RNA Meets DNA. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 6: a016543 doi: 10.1101/cshperspect.a016543
- Babudri, N., Lucaccioni, A., and Achilli, A., (2006). Adaptive mutagenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Ecol Genet.* 4: 20-28. doi: 10.17816/ecogen4320-28
- Belenky, P., Camacho, D., and Collins, J. J. (2013). Fungicidal drugs induce a common oxidative damage cellular death pathway. *Cell Rep* 3: 350-358. doi: 10.1016/j.celrep.2012.12.021
- Beletskii, A., and Bhagwat, A. S. (1996). Transcription-induced mutations: Increase in C to T mutations in the nontranscribed strand during transcription in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 13919-13924. doi: 10.1073/pnas.93.24.13919
- Bennett, J. E., Izumikawa, K., and Marr, K. A. (2004). Mechanism of increased fluconazole resistance in *Candida glabrata* during prophylaxis. *Antimicrob Agents Chemother.* 48: 1773-1777. doi: 10.1128/AAC.48.5.1773-1777.2004
- Bharadwaj, P., Martins, R., and Macreadie, I. (2010). Yeast as a model for studying Alzheimer's disease. *FEMS Yeast Res.* 10: 961-969. doi: 10.1111/j.1567-1364.2010.00658.x
- Bidart H., T. (2004). Rol de voriconazol y caspofungina en terapia antifúngica. *Rev Chil Infect.* 21: S13-S19. doi: 10.4067/S0716-10182004021100002
- Boiteux, S., and Jinks-Robertson S. (2013). DNA repair mechanisms and the bypass of DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 193: 1025-1064. doi: 10.1534/genetics.112.145219
- Botstein, D., and Fink G. R. (2011). Yeast: An Experimental Organism for 21st Century Biology. *Genetics.* 189: 695-704. doi: 10.1534/genetics.111.130765
- Braconi, D., Bernardini, G., and Santucci, A. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* as a model in ecotoxicological studies: A post-genomics perspective. *J Proteomics.* 137: 19-34. doi: 10.1016/j.jprot.2015.09.001

Identificador del documento: 974511		Código de verificación: nnAZcF1T
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

Bibliografía

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Brown, A. J. P., and Gow, N. A. R. (1999). Regular networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol.* 7: 333-338. doi: 10.1016/S0966-842X(99)01556-5
- Burke, D., Dawson, D., and Stearns, T. (2000). *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory course manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA.
- Castanheira, M., Woosley, L. N., Diekema, D. J., Messer, S. A., Jones, R. N., and Pfaller, M. A. (2010). Low prevalence of *fks1* hot spot 1 mutations in a worldwide collection of *Candida* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 54: 2655-2659. doi: 10.1128/AAC.01711-09
- Cairns, J., and Foster, P. L. (1991). Adaptive reversion of a frameshift mutation in *Escherichia coli*. *Genetics.* 128: 695-701.
- Chance, B., Sies, H., and Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 59: 527-605.
- Cherry, J. M., Hong, E. L., Amundsen, C., Balakrishnan, R., Binkley, G., Chan, E. T., Christie, K. R., Costanzo, M. C., Dwight, S. S., Engel, S. R., Fisk, D. G., Hirschman, J. E., Hitz, B. C., Karra, K., Krieger, C. J., Miyasato, S. R., Nash, R. S., Park, J., Skrzypek, M. S., Simison, M., Weng, S., and Wong, E. D. (2012). *Saccharomyces Genome Database: The genomics resource of budding yeast.* *Nucleic Acids Res.* 40: D700-5. doi: 10.1093/nar/gkr1029
- Chu, W. S., Magee, B. B., and Magee, P. T. (1993). Construction of an *SfiI* macrorestriction map of the *Candida albicans* genome. *J Bacteriol.* 175: 6637-6651. doi: 10.1128/jb.175.20.6637-6651.1993
- Cirz, R. T., Jones, M. B., Gingles, N. A., Minogue, T. D., Jarrahi, B., Peterson, S. N., and Romesberg, F. E. (2007). Complete and SOS-mediated response of *Staphylococcus aureus* to the antibiotic ciprofloxacin. *J Bacteriol.* 189: 531-539. doi: 10.1128/JB.01464-06
- Claiborne, A. (1985). Catalase activity. *Handbook of methods for oxygen radical research.* Ed. Greenwald, R.A. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA. 283-284.
- Cleary, J. D., Garcia-Effron, G., Chapman, S. W., and Perlin, D. S. (2008). Reduced *Candida glabrata* susceptibility secondary to an *FKS1* mutation developed during candidemia treatment. *Antimicrob Agents Chemother.* 52: 2263-2265. doi: 10.1128/AAC.01568-07

Identificador del documento: 974511	Código de verificación: nnAZcF1T	Fecha:
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

- Concia, E., Azzini, A., and Conti, M. (2009). Epidemiology, incidence and risk Factors for Invasive candidiasis in high-risk patients. *Drugs*. 69: 5-14. doi: 10.2165/11315500-000000000-00000
- Correia, I., Alonso-Monge, R., and Pla, J. (2010). MAPK cell-cycle regulation in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Future Microbiol.* 5: 1125-1141. doi: 10.2217/fmb.10.72
- Datta, A., and Jinks-Robertson, S. (1995). Association of increased spontaneous mutation rates with high levels of transcription in yeast. *Science*. 268: 1616-1619. doi: 10.1126/science.7777859
- Del Palacio, A., Villar, J., and Alhambra, A. (2009). Epidemiology of invasive candidiasis in pediatric and adult populations. *Rev Iberoam Micol.* 26: 2-7. doi: 10.1016/S1130-1406(09)70002-6
- Desnos-Ollivier, M., Bretagne, S., Raoux, D., Hoinard, D., Dromer, F. and E. Dannaoui, E. (2008). Mutations in the *fks1* gene in *Candida albicans*, *C. tropicalis*, and *C. krusei* correlate with elevated caspofungin MICs uncovered in AM3 medium using the method of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing. *Antimicrob Agents Chemother.* 52: 3092-3098. doi: 10.1128/AAC.00088-08
- Drakulovski, P., Dunyach, C., Bertout, S., Reynes, J., and Mallié, M. (2011). A *Candida albicans* strain with high MIC for caspofungin and no FKS1 mutations exhibits a high chitin content and mutations in two chitinase genes. *Med Mycol.* 49: 467-474. doi: 10.3109/13693786.2010.538732
- Dujon, B., D. Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., De Montigny, J., Marck, C., Neuvéglise, C., Talla, E., Goffard, N., Frangeul, L., Aigle, M., Anthouard, V., Babour, A., Barbe, V., Barnay, S., Blanchin, S., Beckerich, J. M., Beyne, E., Bleykasten, C., Boisramé, A., Boyer, J., Cattolico, L., Confaniolieri, F., De Daruvar, A., Despons, L., Fabre, E., Fairhead, C., Ferry-Dumazet, H., Groppi, A., Hantraye, F., Hennequin, C., Jauniaux, N., Joyet, P., Kachouri, R., Kerrest, A., Koszul, R., Lemaire, M., Lesur, I., Ma, L., Muller, H., Nicaud, J. M., Nikolski, M., Oztas, S., Ozier-Kalogeropoulos, O., Pellenz, S., Potier, S., Richard, G. F., Straub, M. L., Suleau, A., Swennen, D., Tekaia, F., Wésolowski-Louvel, M., Westhof, E., Wirth, B., Zeniou-Meyer, M., Zivanovic, I., Bolotin-Fukuhara, M., Thierry, A., Bouchier, C., Caudron, B., Scarpelli, C., Gaillardin, C., Weissenbach, J., Wincker, P., Souciet, J. L. (2004). Genome evolution in yeasts. *Nature*. 430: 35-44. doi: 10.1038/nature02579
- Enkler, L., Richer, D., Marchand, A. L., Ferrandon, D., and Jossinet, F. (2016). Genome engineering in the yeast pathogen *Candida glabrata* using the CRISPR-Cas9 system. *Sci Rep.* 6: 35766. doi: 10.1038/srep35766
- Enjalbert, B., MacCallum, D. M., Odds, F. C., and Brown, A. J. P. (2007). Niche-specific activation of oxidative stress response by the pathogenic fungus *Candida*

Identificador del documento: 974511		Código de verificación: nnAZcF1T
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

Bibliografía

- albicans*. *Infect Immun*. 75: 2143-2151. doi: 10.1128/IAI.01680-06
- Ercan, S., Reese, J. C., Workman, J. L., and Simpson, R. T. (2005). Yeast Recombination Enhancer Is Stimulated by Transcription Activation. *Mol Cell Biol*. 25: 7976-7987. doi: 10.1128/MCB.25.18.7976-7987.2005
- Falagas, M. E., Roussos, N., Vardakas, K. Z. (2010). Relative frequency of *albicans* and the various non-*albicans* *Candida spp* among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. *Int J Infect Dis*. 14: e954–e966. doi: 10.1016/j.ijid.2010.04.006
- Forche, A., Abbey, D., Pisithkul, T., Weinzierl, M. A., Ringstrom, T., Bruck, D., Petersen, K., and Berman, J. (2011). Stress alters rates and types of loss of heterozygosity in *Candida albicans*. *mBio*. 2: e00129-11. doi: 10.1128/mBio.00129-11
- Forche, A., Alby, K., Schaefer, D., Johnson, A. D., Berman, J., and Bennett, R. J. (2008). The parasexual cycle in *Candida albicans* provides an alternative pathway to meiosis for the formation of recombinant strains. *PLoS Biol*. 6: 1084-1097. doi: 10.1371/journal.pbio.0060110
- Foster, P. L. (1999). Mechanisms of Stationary Phase Mutation: A Decade of Adaptive Mutation. *Annu Rev Genet*. 33: 57-88. doi: 10.1146/annurev.genet.33.1.57
- Foster, P. L. (2000). Adaptive mutation: implications for evolution. *Bioessays*. 22: 1067-1074. doi: 10.1002/1521-1878(200012)22:12<1067::AID-BIES4>3.0.CO;2-Q
- Foster, P. L. (2007). Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 42: 373-397. doi: 10.1080/10409230701648494
- Foury, F. (1997). Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast. *Gene*. 195: 1-10. doi: 10.1016/S0378-1119(97)00140-6
- 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., Cruz, J. A., Devillers, H., Enache-Angoulvant, A., Guitard, J., Jaouen, L., Ma, L., Marck, C., Neuvéglise, C., Pelletier, E., Pinard, A., Poulain, J., Recoquilly, J., Westhof, E., Wincker, P., Dujon, B., Hennequin, C. and Fairhead, C. (2013). Comparative genomics of emerging pathogens in the *Candida glabrata* clade. *BMC Genomics*. 14: 623. doi: 10.1186/1471-2164-14-623
- Gafter-Gvili, A., Vidal, L., Goldberg, E., Leibovici, L., and Paul, M. (2008). Treatment of invasive candidal infections: systematic review and meta-analysis. *Mayo Clin Proc*. 83: 1011-1021. doi: 10.4065/83.9.1011
- Galhardo, R. S., Hastings, P. J., and Rosenberg, S. M. (2007). Mutation as a Stress Response and the Regulation of Evolvability. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 42: 399-435. doi: 10.1080/10409230701648502

Identificador del documento: 974511	Código de verificación: nnAZcF1T	Fecha:
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

- García-Effron, G., Lee, S., Park, S., Cleary, J. D., and Perlin, D. S. (2009). Effect of *Candida glabrata* FKS1 and FKS2 mutations on echinocandin sensitivity and kinetics of 1,3-β-D-glucan synthase: Implication for the existing susceptibility breakpoint. *Antimicrob Agents Chemother.* 53: 3690-3699. doi: 10.1128/AAC.00443-09
- Gupta, A., Gupta, A., and Varma, A. (2015). *Candida glabrata* candidemia: an emerging threat in critically ill patients. *Indian J Crit Care Med.* 19: 151-154. doi: 10.4103/0972-5229.152757
- Hall, B. G. (1992). Selection-induced mutations occur in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 4300-4303. doi: 10.1073/pnas.89.10.4300
- Hara, T., Kouno, J., Nakamura, K., Kusaka, M., and Yamaoka, M. (2005). Possible role of adaptive mutation in resistance to antiandrogen in prostate cancer cells. *Prostate.* 2005. 65: 268-275. doi: 10.1002/pros.20282
- Hartwell, L. H., Culotti, J., Pringle, J. R., and Reid, B. J. (1974). Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science.* 183: 46-51.
- Healey, K. R., Katiyar, S. K., Castanheira, M., Pfaller, M. A., and Edlind, T. D. (2011). *Candida glabrata* mutants demonstrating paradoxical reduced caspofungin susceptibility but increased micafungin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 55: 3947-3949. doi: 10.1128/AAC.00044-11
- Heidenreich, E. (2007). Adaptive mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 42: 285-311. doi: 10.1080/10409230701507773
- Heidenreich, E., and Steinboeck, F. (2017). Glucose starvation as a selective tool for the study of adaptive mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Microbiol Methods.* 132: 4–8. doi: 10.1016/j.mimet.2016.11.007
- Hull, C. M., Raisner, R. M., and Johnson, A. D. (2000). Evidence for Mating of the "Asexual" Yeast *Candida albicans* in a Mammalian Host. *Science.* 289, 307-310. doi: 10.1126/science.
- Huff, C. A., Matsui, W., Smith, B. D., and Jones, R. J. (2006). The paradox of response and survival in cancer therapeutics. *Blood:* 107: 431434. doi: 10.1182/blood-2005-06-2517289.5477.307
- Jones, T., Federspiel, N. A., Chibana, H., Dungan, J., Kalman, S., Magee, B. B., Newport, G., Thorstenson, Y. R., Agabian, N., Magee, P. T., Davis, R. W., and Scherer, S. (2004). The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101: 7329--7334. doi: 10.1073/pnas.0401648101
- Kalimutho, M., Bain, A. L., Mukherjee, B., Nag, P., Nanayakkara, D. M., Harten, S. K., Harris, J. L., Subramanian, G. N., Sinha, D., Shirasawa, S., Srihari, S., Burma, S., and Khanna, K. K. (2017). Enhanced dependency of KRAS mutant colorectal

Identificador del documento: 974511		Código de verificación: nnAZcF1T
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

Bibliografía

- cancer cells on *RAD51*-dependent homologous recombination repair identified from genetic interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Oncol*. 38: 42–49. doi: 10.1002/1878-0261.12040
- Kanafani, Z. A., and Perfect, J. R. (2008). Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin Infect Dis*. 46: 120-128. doi: 10.1086/524071
- Kang, N. H., and Choi, K. C. (2011) 207 engineered human amniotic fluid-derived stem cells by expressing Cytosine deaminase (cd) and thymidine kinase (hsv-tk) mediate targeting killing effect in breast cancer cells. *Reprod Fertil Dev*. 24: 216.
- Kelly, S. L., Lamb, D. C., Kelly, D. E., Manning, N. J., Loeffler, J., Hebart, H., Schumacher, U., and Einsele, H. (1997). Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol $\Delta 5,6$ -desaturation. *FEBS Letters*. 400: 80-82. doi: 10.1016/S0014-5793(96)01360-9
- Kett, D. H., and Cubillos, G. F. (2008). Anidulafungin in the treatment of patients with invasive candidiasis. *Int J Antimicrob Agents*. 32 Suppl 2: S99-S102. doi: 10.1016/S0924-8579(08)70008-6
- Khan, A., Ahmad, A., Akhtar, F., Yousuf, S., Xess, I., Khan, L. A., and Manzoor, N. (2011). Induction of oxidative stress as a possible mechanism of the antifungal action of three phenylpropanoids. *FEMS Yeast Res*. 11: 114-122. doi: 10.1111/j.1567-1364.2010.00697.x
- Kim, N., and Jinks-Robertson, S. (2009). dUTP incorporation into genomic DNA is linked to transcription in yeast. *Nature*. 459: 1150-1153. doi: 10.1038/nature08033
- Kim, N., and Jinks-Robertson, S. (2012). Transcription as a source of genome instability. *Nat Rev Genet*. 13: 204-214. doi: 10.1038/nrg3152
- Lamagni, T. L., Evans, B. G., Shigematsu, M., and Johnson, E. M. (2001). Emerging trends in the epidemiology of invasive mycoses in England and Wales (1990-9). *Epidemiol Infect*. 126: 397-414. doi: 10.1017/S0950268801005507
- Lee, K. K., Maccallum, D. M., Jacobsen, M. D., Walker, L. A., Odds, F. C., Gow, N. A., and Munro, C. A. (2012). Elevated cell wall chitin in *Candida albicans* confers echinocandin resistance in vivo. *Antimicrob Agents Chemother*. 56: 208-217. doi: 10.1128/AAC.00683-11
- Leeuwen, J. S. V., Vermeulen, N. P. E., and Vos, J. C. (2012). Yeast as a humanized model organism for biotransformation-related toxicity. *Curr Drug Metab*. 13: 1464-1475. doi: 10.2174/138920012803762783
- Leroy, O., Gangneux, J. P., Montravers, P., Mira, J. P., Gouin, F., Sollet, J. P., Carlet, J., Reynes, J., Rosenheim, M., Regnier, B., and Lortholary, O. (2009). Epidemiology,

Identificador del documento: 974511	Código de verificación: nnAZcF1T	Fecha:
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). *Crit Care Med.* 37: 1612-1618. doi: 10.1097/CCM.0b013e31819efac0

Leroy, O., Bailly, S., Gangneux, J.-P., Mira, J.-P., Devos, P., Dupont, H., Montravers, P., Perrigault, P.-F., Constantin, J.-M., Guillemot, D., Azoulay, E., Lortholary, O., Bensoussan, C., and Timsit, J.-F. (2016). Systemic antifungal therapy for proven or suspected invasive candidiasis: the AmarCAND 2 study. *Ann Intensive Care.* 6: 1-11. doi: 10.1186/s13613-015-0103-7

Lewin, C. S., and Amyes, S. G. (1991). The role of the SOS response in bacteria exposed to zidovudine or trimethoprim. *J Med Microbiol.* 34: 329-332. doi: 10.1099/00222615-34-6-329. doi: 10.1099/00222615-34-6-329

Linares, C. E. B., Giacomelli, S. R., Altenhofen, D., Alves, S. H., Morsch, V. M., and Schetinger, M. R. C. (2013). Fluconazole and amphotericin-B resistance are associated with increased catalase and superoxide dismutase activity in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Rev Soc Bras de Med Trop.* 46: 752-758. doi: 10.1590/0037-8682-0190-2013

Lippert, M. J., Kim, N., Cho, J.-E., Larson, R. P., Schoenly, N. E., O'Shea, S. H., and Jinks-Robertson, S. (2011). Role for topoisomerase 1 in transcription-associated mutagenesis in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108: 698-703. doi: 10.1073/pnas.1012363108

Lortz, S., and Tiedge, M. (2003). Sequential inactivation of reactive oxygen species by combined overexpression of SOD isoforms and catalase in insulin-producing cells. *Free Radic Biol Med.* 34: 683-688. doi: 10.1016/S0891-5849(02)01371-0

Lupetti, A., Danesi, R., Campa, M., Tacca, M. D., and Kelly, S. (2002). Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol Med.* doi: 10.1016/S1471-4914(02)02280-3

Luria, S. E., and Delbrück, M. (1943). Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance. *Genetics.* 28: 491-511.

Mahl, C. D., Behling, C. S., Hackenhaar, F. S., de Carvalho e Silva, M. N., Putti, J., Salomon, T. B., Alves, S. H., Fuentesfria, A., and Benfato, M. S. (2015). Induction of ROS generation by fluconazole in *Candida glabrata*: Activation of antioxidant enzymes and oxidative DNA damage. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 82: 203-208. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.03.019

Maiques, E., Ubeda, C., Campoy, S., Salvador, N., Lasa, I., Novick, R. P., Barbé, J., and Penadés, J.R. (2006). beta-lactam antibiotics induce the SOS response and horizontal transfer of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 188: 2726-2729. doi: 10.1128/JB.188.7.2726-2729.2006

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

Bibliografía

- Malavasic, M. J., and Cihlar, R. L. (1992). Growth response of several *Candida albicans* strains to inhibitory concentrations of heavy metals. *J Med Vet Mycol.* 30: 421-432. doi: 10.1080/02681219280000581
- Malet-Martino, M. C., Armand, J. P., Lopez, A., Bernadou, J., Béteille, J. P., Bon, M., Martino R. (1986). Evidence for the importance of 5'-deoxy-5-fluorouridine catabolism in humans from 19F nuclear magnetic resonance spectrometry. *Cancer Res.* 46: 2105-2012.
- Marklund, S. and Marklund, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem.* 47: 469-474. doi: 10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x
- Martí-Carrizosa, M., Sánchez-Reus, F., March, F., Cantón, E., and Coll, P. (2015). Implication of *Candida parapsilosis* *FKS1* and *FKS2* mutations in reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 59: 3570-3573. doi: 10.1128/AAC.04922-14
- Martin, G. S., Mannino, D. M., Eaton, S., and Moss, M. (2003). The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med.* 348: 1546-1554. doi: 10.1056/NEJMoa022139
- McCord, J. M., and Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J Biol Chem.* 244: 6049-6055.
- McCreath, K. J., Specht, C. A., Liu, Y., and Robbins, P. W. (1996). Molecular cloning of a third chitinase gene (CHT1) from *Candida albicans*. *Yeast.* 12: 501-504. doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(199604)12:5<501::AID-YEA931>3.0.CO;2-U
- McCreath, K. J., Specht, C. A., and Robbins, P. W. (1995). Molecular cloning and characterization of chitinase genes from *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92: 2544-2548. doi: 10.1073/pnas.92.7.2544
- McNeil, M. M., Nash, S. L., Hajjeh, R. A., Phelan, M. A., Conn, L. A., Plikaytis, B. D., and Warnock, D. W. (2001). Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980-1997. *Clin Infect Dis.* 33: 641-647. doi: 10.1086/322606
- Menacho-Márquez, M., and Murguía J. R. (2007). Yeast on drugs: *Saccharomyces cerevisiae* as a tool for anticancer drug research. *Clin Transl Oncol.* 9: 221-228. doi: 10.1007/s12094-007-0043-2
- Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O., and Remacle, J. (1994). Importance of se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* doi: 10.1016/0891-5849(94)90079-5
- Miller, C., Thomsen, L. E., Gaggero, C., Mosseri, R., Ingmer, H., and Cohen, S. N. (2004). SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science.* 305: 1629-1631. doi: 10.1126/science.1101630

Identificador del documento:	Código de verificación:	Fecha:
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	974511	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

- Missall, T. A., Lodge, J. K., and McEwen, J. E. (2004). Mechanisms of resistance to oxidative and nitrosative stress: implications for fungal survival in mammalian hosts. *Eukaryot Cell*. 3: 835-846. doi: 10.1128/EC.3.4.835
- Morano, A. K., Grant, C. M., and Moye-Rowley, W. S. (2012). The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 190: 1157-1195. doi: 10.1534/genetics.111.128033
- Munro, C. A, and Gow, N. A. (2001). Chitin synthesis in human pathogenic fungi. *Med Mycol*. 39 Suppl 1: 41-53. doi: 10.1080/mmy.39.1.41.53
- Munro, C. A., Whitton, R. K., Hughes, H. B., Rella, M., Selvaggini, S., and Gow, N. A. R. (2003). CHS8 - A fourth chitin synthase gene of *Candida albicans* contributes to in vitro chitin synthase activity, but is dispensable for growth. *Fungal Genet Biol*. 40: 146-158. doi: 10.1016/S1087-1845(03)00083-5
- Noble, J. A., Tsai, H. F., Suffis, S. D., Su, Q., Myers, T. G., and Bennett, J. E. (2013). *STB5* is a negative regulator of azole resistance in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother*. 57: 959-967. doi: 10.1128/AAC.01278-12
- Nucci, M., and Marr, K. A. (2005). Emerging fungal diseases. *Clin Infect Dis*. 41: 521-526. doi: 10.1086/432060
- Odds, F. C., Brown, A. J. P., and Gow, N. A. R. (2004). *Candida albicans* genome sequence: a platform for genomics in the absence of genetics. *Genome Biol*. 5: 230. doi: 10.1186/gb-2004-5-7-230
- Pappas, P. G., Kauffman, C. A., Andes, D., Benjamin, D. K. Jr., Calandra, T. F., Edwards, J. E. Jr., Filler, S. G., Fisher, J. F., Kullberg, B. J., Ostrosky-Zeichner, L., Reboli, A. C., Rex, J. H., Walsh, T. J., Sobel, J. D. (2009). Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 48: 503-535. doi: 10.1086/596757
- Pappas, P. G., Kauffman, C. A., Andes, D. R., Clancy, C. J., Marr, K. A., Ostrosky-Zeichner, L., Reboli, A. C., Schuster, M. G., Vazquez, J. A., Walsh, T. J., Zaoutis, T. E., and Sobel, J. D. (2016). Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 62: e1-e50. doi: 10.1093/cid/civ933
- Pfaller, M. A., and Diekema, D. J. (2004). Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol*. 42: 4419-4431. doi: 10.1128/JCM.42.10.4419-4431.2004
- Pfaller, M. A., and Diekema, D. J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*. 20: 133-163. doi: 10.1128/CMR.00029-06

Identificador del documento:	Código de verificación:	Fecha:
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	974511	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

Bibliografía

- Pfaller, M. A., and Diekema, D. J. (2010). Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol.* 36: 1-53. doi: 10.3109/10408410903241444
- Pfaller, M. A., Boyken, L., Hollis, R. J., Kroeger, J., Messer, S. A., Tendolkar, S., and Diekema, D. J. (2008a). In vitro susceptibility of invasive isolates of *Candida spp.* to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. *J Clin Microbiol.* 46: 150-156. doi: 10.1128/JCM.01901-07
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Ostrosky-Zeichner, L., Rex, J. H., Alexander, B. D., Andes, D., Brown, S. D., Chaturvedi, V., Ghannoum, M. A., Knapp, C. C., Sheehan, D. J., and Walsh, T. J. (2008b). Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against caspofungin, anidulafungin, and micafungin: analysis and proposal for interpretive MIC breakpoints. *J Clin Microbiol.* 46: 2620-2629. doi: 10.1128/JCM.00566-08
- Pfaller, M. A., Boyken, L., Hollis, R. J., Messer, S. A., Tendolkar, S., and Diekema, D. J. (2006). In vitro susceptibilities of *Candida spp.* to caspofungin: four years of global surveillance. *J Clin Microbiol.* 44: 760-763. doi: 10.1128/JCM.44.3.760-763.2006
- Pierce, C. G., and Lopez-Ribot J. L. (2013). Candidiasis drug discovery and development: new approaches targeting virulence for discovering and identifying new drugs. *Expert Opin Drug Discov.* 8: 1117-1126. doi: 10.1517/17460441.2013.807245
- Pimentel, C., Batista-Nascimento, L., Rodrigues-Pousada, C., and Menezes, R. A. (2012). Oxidative stress in Alzheimer's and Parkinson's diseases: insights from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Oxid Med Cell Longev.* 2012: 132146. doi: 10.1155/2012/132146
- Pourakbari, B., Teymuri, M., Mahmoudi, S., Valian, S. K., Movahedi, Z., Eshaghi, H., and Mamishi, S. (2017). Expression of Major Efflux Pumps in Fluconazole-Resistant *Candida albicans*. *Infect Disord Drug Targets.* [Epub ahead of print]. doi: 10.2174/1871526517666170531114335.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74: 5463-5467. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463
- Sanglard, D., Ischer, F., Parkinson, T., Bille, J., and Falconer, D. (2003). *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemoter.* 47: 2404-2412. doi: 10.1128/AAC.47.8.2404
- Selmecki, A., Forche, A., and Berman, J. (2010). Genomic plasticity of the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 9: 991-1008. doi: 10.1128/EC.00060-10

Identificador del documento: 974511	Código de verificación: nnAZcF1T	Fecha:
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

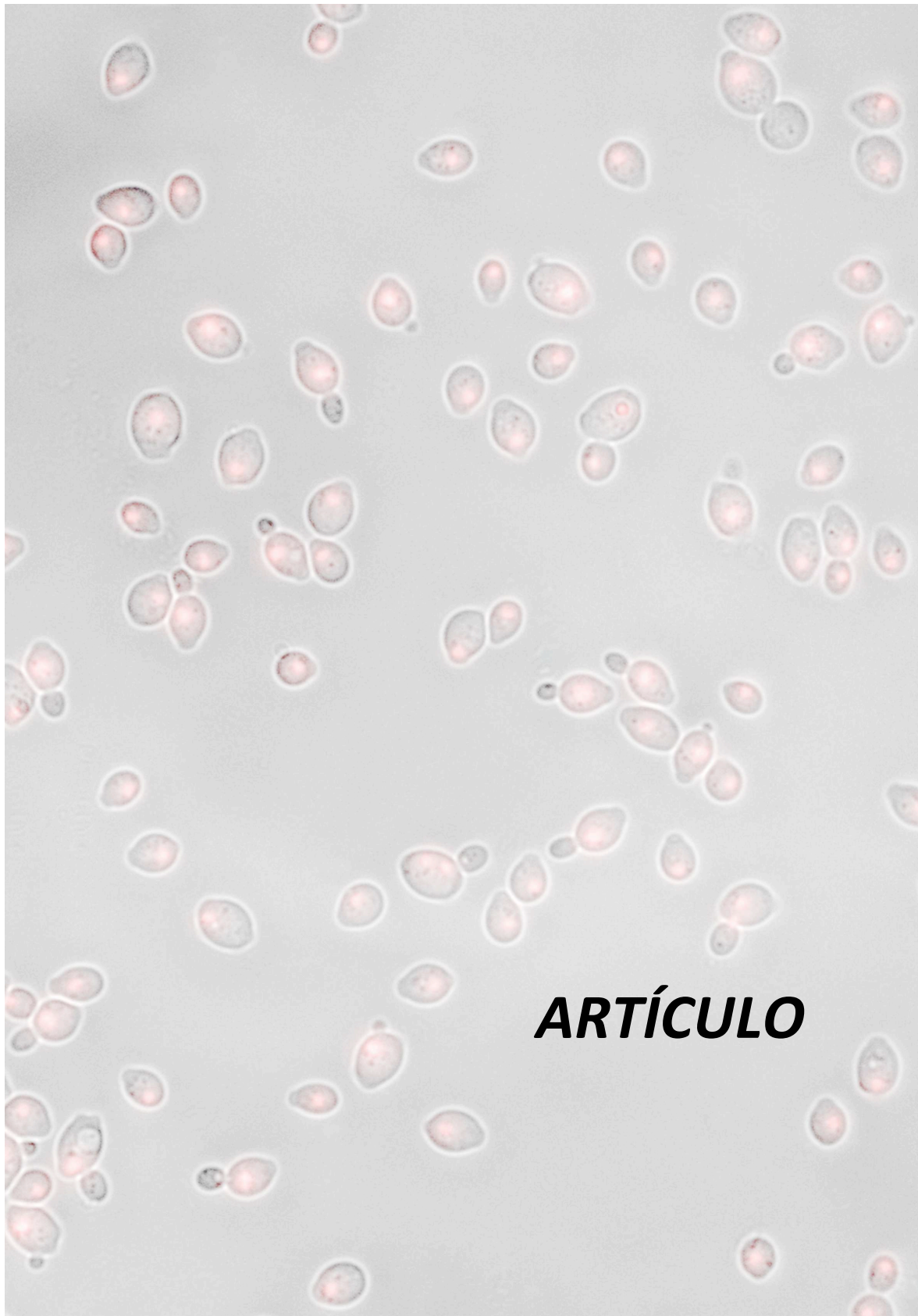
- Shor, E., Fox, C. A., Broach, J. R. (2013). The yeast environmental stress response regulates mutagenesis induced by proteotoxic stress. *PLoS Genet.* 9: e1003680. doi: 10.1371/journal.pgen.1003680
- Steele, D. F., and Jinks-Robertson, S. (1992). An examination of adaptive reversion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 132: 9-21.
- Steinkamp, M. P., O'Mahony, O. A., Brogley, M., Rehman, H., Lapensee, E. W., Dhanasekaran, S., Hofer, M. D., Kuefer, R., Chinnaiyan, A., Rubin, M. A., Pienta, K. J., and Robins, D. M. (2009) Treatment-dependent androgen receptor mutations in prostate cancer exploit multiple mechanisms to evade therapy. *Cancer Res.* 69: 4434-4442. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3605
- Sun, H. Y., Singh, N. (2010). Characterisation of breakthrough invasive mycoses in echinocandin recipients: an evidence-based review. *Int J Antimicrob Agents.* 35: 211-218. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.09.020
- Symington, L. S. (2002). Role of RAD52 Epistasis Group Genes in Homologous Recombination and Double-Strand Break Repair. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66: 630-670. doi: 10.1128/MMBR.66.4.630-670.2002
- Takahashi, T., Burguiere-Slezak, G., Van der Kemp, P. A., and Boiteux, S. (2011). Topoisomerase 1 provokes the formation of short deletions in repeated sequences upon high transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci.* 108: 692-697. doi: 10.1073/pnas.1012582108
- Teixeira, M. T. (2013). *Saccharomyces cerevisiae* as a model to study replicative senescence triggered by telomere shortening. *Front Oncol.* 3: 101. doi: 10.3389/fonc.2013.00101
- Thevissen, K., Ayscough, K. R., Aerts, A. M., Du, W., De Brucker, K., Meert, E. M., Ausma, J., Borgers, M., Cammue, B. P., and François, I. E. (2007). Miconazole induces changes in actin cytoskeleton prior to reactive oxygen species induction in yeast. *J Biol Chem.* 282: 21592-21597. doi: 10.1074/jbc.M608505200
- Thompson, G. R., Wiederhold, N. P., Vallor, A. C., Villareal, N. C., Lewis, J. S., and Patterson, T. F. (2008). Development of caspofungin resistance following prolonged therapy for invasive candidiasis secondary to *Candida glabrata* infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 52: 3783-3785. doi: 10.1128/AAC.00473-08
- Torres-Rosell, J., Machín, F., Farmer, S., Jarmuz, A., Eydmann, T., Dalgaard, J. Z., and Aragón, L. (2005). *SMC5* and *SMC6* genes are required for the segregation of repetitive chromosome regions. *Nat Cell Biol.* 7: 412-419. doi: 10.1038/ncb1239
- Vale-Silva, L. A., Coste, A. T., Ischer, F., Parker, J. E., Kelly, S. L., Pinto, E., and Sanglard, D. (2012). Azole resistance by loss of function of the sterol $\Delta^{5,6}$ - desaturase gene (*ERG3*) in *Candida albicans* does not necessarily decrease virulence.

Identificador del documento:	Código de verificación:	Fecha:
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	974511	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAINERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48

Bibliografía

- Antimicrob Agents Chemother.* 56: 1960-1968. doi: 10.1128/AAC.05720-11
- Vandeputte, P., Ferrari, S., and Coste, A. T. (2012). Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *Int J Microbiol.* 2012: 713687. doi: 10.1155/2012/713687
- Vandeputte, P., Pineau, L., Larcher, G., Noel, T., Brèthes, D., Chabasse, D., and Bouchara, J. P. (2011). Molecular mechanisms of resistance to 5-fluorocytosine in laboratory mutants of *Candida glabrata*. *Genetics.* 171: 11-21. doi: 10.1007/s11046-010-9342-1
- Vázquez, N., Walsh, T. J., Friedman, D., Chanock, S. J., and Lyman, C. A. (1999). Interleukin-15 augments superoxide production and microbicidal activity of human monocytes against *Candida albicans*. *Infect Immun.* 66: 145-150.
- Vermes, A., Guchelaar, H. J., and Dankert, J. (2000). Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J Antimicrob Chemother.* 46: 171-179. doi: 10.1093/jac/46.2.171
- Wagner, R., Straub, M. L., Souciet, J. L., Potier, S., and De Montigny, J. (2001). New plasmid system to select for *Saccharomyces cerevisiae* purine-cytosine permease affinity mutants. *J Bacteriol.* 183: 4386-4388. doi: 10.1128/JB.183.14.4386-4388.2001
- Waldorf, A. R., and Polak, A. (1983). Mechanisms of action of 5-fluorocytosine. *Antimicrob Agents Chemoter.* 23: 79-85. doi: 10.1128/AAC.23.1.79
- Walker, L. A., Gow, N. A. R., and Munro, C. A. (2013). Elevated chitin content reduces the susceptibility of *Candida* species to caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother.* 57: 146-154. doi: 10.1128/AAC.01486-12
- Whelan, W. L. (1987). The genetics basis of resistance to 5-fluorocytosine in *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. *Crit Rev Microbiol.* 15: 45-46. doi: 10.3109/10408418709104447
- Winzeler, E. A., Lee, B., McCusker, J. H., and Davis, R. W. (1999). Whole genome genetic-typing in yeast using high-density oligonucleotide arrays. *Parasitology.* 118: S73-80. doi: 10.1017/S0031182099004047
- Wysocki, R., and Kron, S. J. (2004). Yeast cell death during DNA damage arrest is independent of caspase or reactive oxygen species. *J Cell Biol.* 166: 311-316. doi: 10.1083/jcb.200405016

Identificador del documento: 974511	Código de verificación: nnAZcF1T	Fecha:
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAINERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48



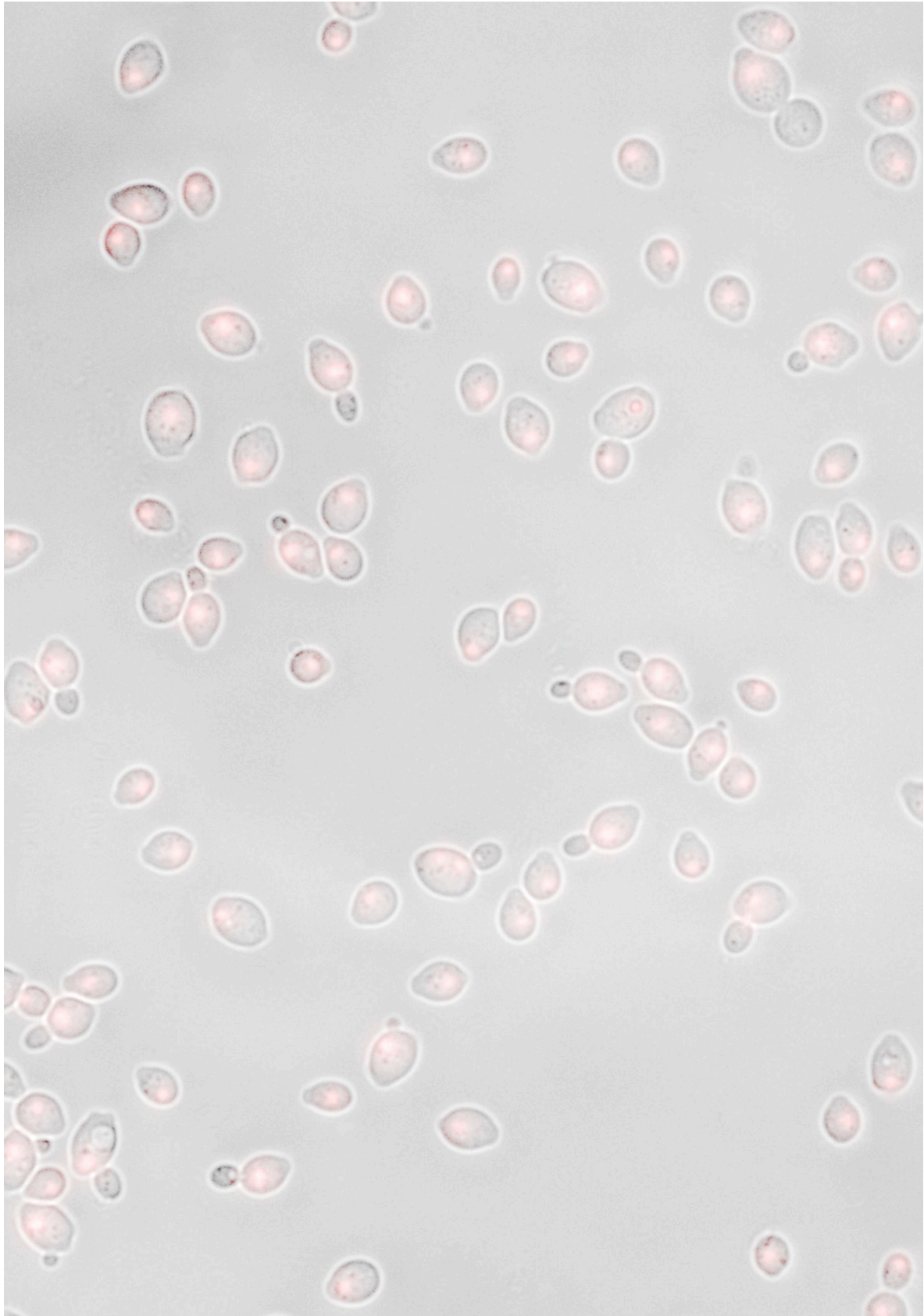
ARTÍCULO

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

Yeasts Acquire Resistance Secondary to Antifungal Drug Treatment by Adaptive Mutagenesis

David Quinto-Aleman¹, Ana Canerina-Amaro¹, Luís G. Hernández-Abad¹, Félix Machín¹, Floyd E. Romesberg², Cristina Gil-Lamaignere^{1*}

1 Unidad de Investigación, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, Spain, **2** Chemistry Department, The Scripps Research Institute, La Jolla, California, United States of America

Abstract

Acquisition of resistance secondary to treatment both by microorganisms and by tumor cells is a major public health concern. Several species of bacteria acquire resistance to various antibiotics through stress-induced responses that have an adaptive mutagenesis effect. So far, adaptive mutagenesis in yeast has only been described when the stress is nutrient deprivation. Here, we hypothesized that adaptive mutagenesis in yeast (*Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* as model organisms) would also take place in response to antifungal agents (5-fluorocytosine or flucytosine, 5-FC, and caspofungin, CSP), giving rise to resistance secondary to treatment with these agents. We have developed a clinically relevant model where both yeasts acquire resistance when exposed to these agents. Stressful lifestyle associated mutation (SLAM) experiments show that the adaptive mutation frequencies are 20 (*S. cerevisiae*–5-FC), 600 (*C. albicans*–5-FC) or 1000 (*S. cerevisiae*–CSP) fold higher than the spontaneous mutation frequency, the experimental data for *C. albicans*–5-FC being in agreement with the clinical data of acquisition of resistance secondary to treatment. The spectrum of mutations in the *S. cerevisiae*–5-FC model differs between spontaneous and acquired, indicating that the molecular mechanisms that generate them are different. Remarkably, in the acquired mutations, an ectopic intrachromosomal recombination with an 87% homologous gene takes place with a high frequency. In conclusion, we present here a clinically relevant adaptive mutation model that fulfils the conditions reported previously.

Citation: Quinto-Aleman D, Canerina-Amaro A, Hernández-Abad LG, Machín F, Romesberg FE, et al. (2012) Yeasts Acquire Resistance Secondary to Antifungal Drug Treatment by Adaptive Mutagenesis. PLoS ONE 7(7): e42279. doi:10.1371/journal.pone.0042279

Editor: Joy Sturtevant, Louisiana State University, United States of America

Received: April 11, 2012; **Accepted:** July 2, 2012; **Published:** July 31, 2012

Copyright: © 2012 Quinto-Aleman et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: CGL was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation through a MEC/Fulbright postdoctoral grant (EX2004-1241), the “Ramón y Cajal” tenure track programs (RYC07/1263 to CGL and RYC05/1354 to FM) and by the Research Project Funding by the Instituto de Salud Carlos III (FIS PI08/1624 to CGL and FIS PI09/00106 to FM). All financial support was co-financed by the European Regional Development Funds (ERDF). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: eukares@yahoo.com

Introduction

Acquisition of resistance secondary to treatment both by microorganisms and by tumor cells is a major public health concern. This resistance can have a metabolic (eg. overexpression of efflux pumps) or genetic origin (through mutations). Several species of bacteria acquire resistance to various antibiotics (e.g. rifamycins, trimethoprim and β -lactams [1–4]) through stressful lifestyle-associated mutations (SLAM, [5]) using stress-induced responses (eg. SOS, RpoS, etc) that have an adaptive mutagenic effect. “Adaptive mutagenesis” has been defined as “a generic term for processes that allow **individual cells** of **nonproliferating** cell populations to acquire advantageous mutations and thereby to **overcome** the strong **selective pressure** of proliferation limiting environmental conditions” i.e. adapt to the environment [6].

Very little is known about the mechanisms that yeasts use to adapt to environmental stress. So far, adaptive mutagenesis in yeast has only been described when the stress is nutrient deprivation (for a review, see [6]). The aim of this work was to develop a broader adaptive mutation model with clinical relevance. We used *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* as model organisms, and as environmental stress the antifungal

agents 5-fluorocytosine (flucytosine, 5-FC) and caspofungin (CSP). We selected 5-FC because of the very high occurrence of secondary resistance in patients that creates the need for its administration in combination with another drug (typically amphotericin B or fluconazole) [7,8], and CSP because of its relevance as one of the newest antifungal agents.

In *S. cerevisiae*, cellular uptake of 5-FC relies on a purine-cytosine permease encoded by FCY2. Once inside the cell, 5-FC is converted to 5-fluorouracil (5-FU) through the action of a cytosine deaminase, encoded by FCY1. The uracil phosphoribosyltransferase (UPRTase) encoded by FUR1 then converts 5-FU into 5-fluorouridine-5'-monophosphate (5-FUMP), which is then further phosphorylated by kinases to yield the uracil di- and triphosphate analogs, 5-fluorouridine diphosphate (5-FUDP) and triphosphate (5-FUTP). 5-FUTP is incorporated into fungal RNA in place of uridylic acid, altering the aminoacylation of tRNA, disturbing the amino acid pool and inhibiting protein synthesis [8,9]. Alternatively, 5-FUDP may be converted to 5-fluorodeoxyuridine diphosphate (5-FdUDP) through the action of RNR. 5-FdUMP inhibits DNA synthesis through the inhibition of thymidylate synthase (encoded by CDC21). Resistance to 5-FC has been proposed to occur through mutations in the afore-mentioned genes, FCY2, FCY1, FUR1, CDC21, or even through mutations

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

that lead to the up-regulation of the pyrimidine synthesis [8,10]. Nevertheless, since 5-FC interferes with DNA and RNA synthesis [8] and one might argue that it has a mutagenic effect per se (albeit not described in the literature), we have validated our results with a drug that has a completely different mode of action, CSP. This is an echinocandin that inhibits cell-wall synthesis (by non-competitive inhibition of the $\beta(1-3)$ glucane synthase) and does not penetrate the cell membrane, and thus would not directly interfere with nucleotide metabolism [10]. Mutations in the coding subunits of the $\beta(1-3)$ glucane synthase, FKS1 and FKS2, have been shown to cause resistance in patient-derived strains. In this work we describe how the acquisition of resistance secondary to treatment with either drug takes place in vitro and we show how this acquisition fulfills the previously described requirements for an adaptive mutagenesis model in yeasts [6].

Materials and Methods

Yeast Strains and Media

Strains used in this study are *S. cerevisiae* BY4741 and *C. albicans* SC5314. *S. cerevisiae* and *C. albicans* were grown at 30 or 37°C respectively, in YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose) or synthetic complete medium (SC; 0.67% yeast nitrogen base, 2% glucose) supplemented with aminoacids as described in Burke, et al. [11]. Solid media contained 2% agar. 5-FC-resistant mutants (5-FC^r) were selected on SC containing 100 μ g/ml 5-FC. CSP-resistant mutants (CSP^r) were selected on SC containing 0.72 μ g/ml CSP.

Table 1. Primers used for amplification and sequencing of the genes causing 5-FC resistance.

Name	Oligo sequence	Annealing (°C)
Gene amplification primers and conditions		
Fcy2_f	ATGGAAACGGCCTCAAGGAAC	57
Fcy2_r	TGATACATGACGTGAAATGTG C	57
FCY1_af	GTTTTCTATTGCCATTTTATCG	55
FCY1_ar	ACCTGAACACCCAGCAGAAC	55
Fur1_af	GAGGAACCGATTGGCAGAGC	59
Fur1_ar	TCAAGATGGTGTCCGGGTGTG	59
CDC21_af	GCTTCTTCCCTCTCGTC	57
CDC21_ar	TCTTTTCCCTCGGTGTCC	57
Gene sequencing primers and conditions		
Fcy2_F0	GCAATATAAACATCCTATCC	50
Fcy2_F1	TTTGGGTGCCTTAGGAC	50
Fcy2_F2	AAGGTGGTGAATGGGTAG	50
Fcy2_R1	CCCAACCGACACAAGC	50
Fcy2_R2	TAGGAACCGGATAGCAT	50
Fcy2_R3	GAAATGTGCACGGGAAATGA	50
FCY1_ars	TTTCAAGTCTTCCCTAGTAGTG	50
FCY1_sf	TAGTGACCTATGGTGTG	50
Fur1_sf	AAGCTGCCTCAAAGAG	50
CDC21_sf	AGTATCAAGGAGAGAC	50
CDC21_sr	TTTCTCTCGTGTGTC	50

doi:10.1371/journal.pone.0042279.t001

Reagents

Caspofungin acetate was purchased from Merck Sharp & Dohme Ltd., UK, 5-Fluorocytosine from Alfa Aesar GmbH, Germany, Taq DNA polymerase kit from VWR, Denmark, low melting agarose for CHEF from Promega Corp, Madison, WI and agarose D1 low EEO from Pronadisa, Spain. Sequencing was performed using Big Dye 3.1 (Applied Biosystems, Foster City).

Minimum Inhibitory Concentration

The minimum inhibitory concentration (MIC) of drugs in solid SC media was determined by pouring 1 ml SC medium containing several dilutions of either 5-FC or CSP on each well of a 24-well plate. For 5-FC, $1.7 \cdot 10^4$ cells were inoculated on each well (to have the same cell density on the agar surface as $5 \cdot 10^5$ cells on 90 mm petri dishes, used in SLAM experiments described below). For CSP, $1.7 \cdot 10^5$ cells were inoculated on each well (same cell density as $5 \cdot 10^6$ cells on 90 mm petri dishes). After 48 and 72 hours, growth on the surface of the agar was evaluated. The MIC was determined as the smallest drug concentration where the cells formed less than 3 colonies on the surface (spontaneous resistant cells).

Determination of Adaptive Mutation Frequencies: SLAM Experiments

Stressful-lifestyle-associated mutation (SLAM) experiments were performed as follows: Individual colonies (originally descended from a single cell) were suspended in YPD and incubated at 30°C (*S. cerevisiae*) or 37°C (*C. albicans*) to obtain different subpopulations. When these cultures reached a density of approximately 10^8 cells/ml the cell concentration was adjusted to $5 \cdot 10^6$ (5-FC) or $5 \cdot 10^7$ (CSP) cells/ml with 0.9% sterile NaCl solution. Each subpopulation was then plated on 2 solid SC medium plates with antifungal drug at a density of $5 \cdot 10^5$ (5-FC) or $5 \cdot 10^6$ (CSP) cells per 90-mm-diameter dish. A moisturized chamber at either temperature was used to avoid desiccation of the plates. Only those cells already harboring mutations that confer resistance at the time of plating were able to continue proliferation and form colonies on the drug containing medium right after plating. Based on the growth of the 5-FC^r strains *fcy1Δ* and *fcy2Δ*, visible colonies of resistant mutants are visible within 24–60 h. Following the appearance of colonies formed by the pre-existing mutants (*i.e.* after the first 3 days of selection for drug resistance), additional resistant mutants continued to appear during prolonged incubation of the plates. These newly arising colonies were scored bidaily for 9 days post plating. The number of viable cells during the course of the experiment was determined by excising identical pieces of surface (plugs) on drug-containing SC plates. Cells from the agar plugs were plated at an appropriate dilution on YPD plates, and colony forming units were counted after 5 days to ensure that any living cell present would form a visible colony. To calculate spontaneous mutation frequencies (referred to as “day 3”), colonies appeared on or before day 3 were divided by the number of viable cells counted 3 hours post-exposure, providing the cells ample time to finish whatever cycle they had started during YPD incubation and to incorporate 5-FC into the cell and start its action. To calculate adaptive mutation frequencies the number of mutant colonies was normalized by the number of viable cells present on the plate when the mutation took place (two days before). Therefore, the number of mutant colonies visible on days 5, 7 or 9 was divided by the number of viable cells on days 3, 5 or 7. Frequencies presented are cumulative starting on day 5 as customary in the pertinent literature.

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

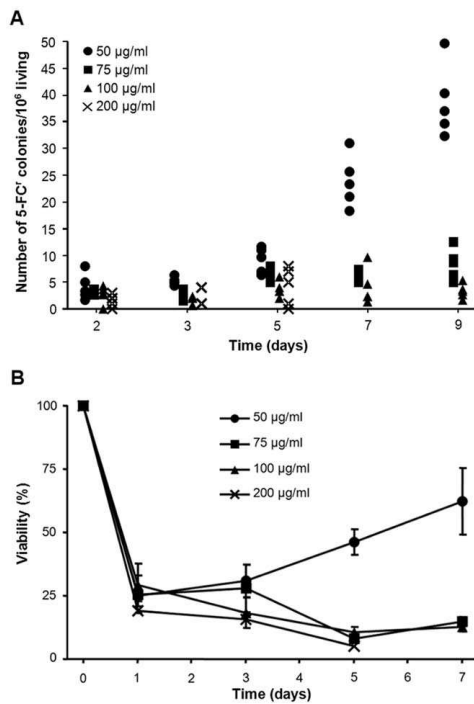


Figure 1. Effect of various concentrations of 5-FC in *S. cerevisiae*. Behaviour of *S. cerevisiae* during prolonged incubation on media containing 50 µg/ml (circles), 75 µg/ml (squares), 100 µg/ml (triangles) or 200 µg/ml (cross) 5-FC. (A) Kinetics of the appearance of *S. cerevisiae* resistant to 5-FC. Cells ($5 \cdot 10^5$) were used to inoculate 5-FC supplemented SC agar medium. Plates were incubated in a moisture chamber at 30°C and scored bidaily for the appearance of 5-FC^r colonies. The frequency of 5-FC^r cells was calculated as the number of drug resistant colonies observed each day for a given clone divided by the number of cells present on the plates two days earlier (moment when one cell mutated and began giving rise to the visible colony counted). (B) 5-FC leads to some cell death in a concentration dependent manner. Viable colony forming units were determined by recovering cells from 5-FC-containing plates and replating on permissive medium. Survival is shown relative to the number of viable cells present 3 hours after plating on 5-FC (as explained in the Methods section) and is the mean and standard error for 5 independent subpopulations. doi:10.1371/journal.pone.0042279.g001

According to the Luria-Delbruck model [12], if the cells acquire a spontaneous mutation when growing in the liquid medium before being plated on stressful conditions, a mutation acquired early in the liquid culture will possibly take place, leading to an abnormal amount of colonies (Jackpot). Subpopulations that displayed a jackpot on day 3 were removed from the experiments because they provide a fortuitous deviation of the mean and due to the methodological problem posed, since an excessive number of resistant colonies on the agar surface prevent us from extracting resistant-cell free plugs to calculate the number of viable cells.

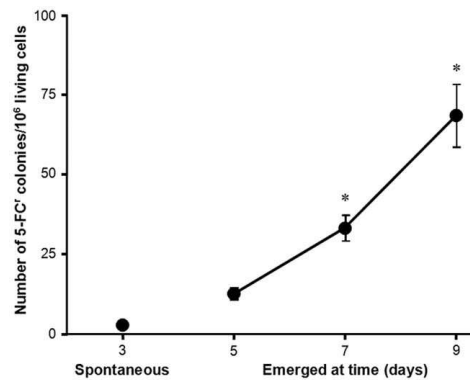


Figure 2. Kinetics of acquisition of resistance by *S. cerevisiae* to 5-FC. Kinetics of the acquisition of resistance by *S. cerevisiae* during prolonged incubation on medium containing 100 µg/ml 5-FC. Cells ($5 \cdot 10^5$) were used to inoculate 5-FC supplemented SC agar medium and SLAM experiments performed as described in the Methods section. Mean and standard error for 29 independent subpopulations. * indicates $p < 0.001$ as evaluated by ANOVA with Bonferroni post-hoc test. doi:10.1371/journal.pone.0042279.g002

Reconstruction Experiments

To verify the mutational origin of the late-arising colonies as opposed to a metabolic origin, 192 5-FC^r *S. cerevisiae* and 96 5-FC^r *C. albicans* colonies arising at days 5 or later were subcultured on SC+5-FC plates, then in liquid YPD and then again on SC+5-FC plates. In 98% of the cases, the colonies grew within 48–60 hours. Ninety six CSP^r *S. cerevisiae* colonies arising at day 5 or later were subcultured on SC+CSP plates, then in liquid YPD and then again on SC+CSP plates. In 97% of the cases, the colonies grew within 48–60 hours.

Sequence Analysis

Genomic DNA of randomly chosen late 5-FC^r colonies was prepared using glass beads, followed by phenol-chloroform-isoamylalcohol and ethanol precipitation. Fragments encompassing the complete genes were amplified and sequenced in-house using an ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City). Table 1 shows a list of primers and conditions used.

Cell Cycle Analysis by FACS

Flow cytometry analysis was carried out as described before [13]. Briefly, for each time point, resistant colonies were excised from one 90 mm diameter plate and the remaining non-resistant cells were washed off with 70% EtOH and stored at 4°C for 1 to 15 days. After RNase and proteinase K treatment, they were stained with 50 µg/ml propidium iodide (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany) in a BD FACScalibur flow cytometer, adjusting the peaks for 1 N and 2 N with an asynchronous culture at 30°C before reading the samples.

Microscopic Analysis

Time-lapse microscopy experiments were performed to evaluate the effect of 5-FC on cell morphology. For these experiments, one 5-FC^r (used as control for normal growth) and 2 WT subpopulations were plated on SC+5-FC medium as in SLAM assays, a 2×3 cm slice was cut out and placed on a glass slide. After

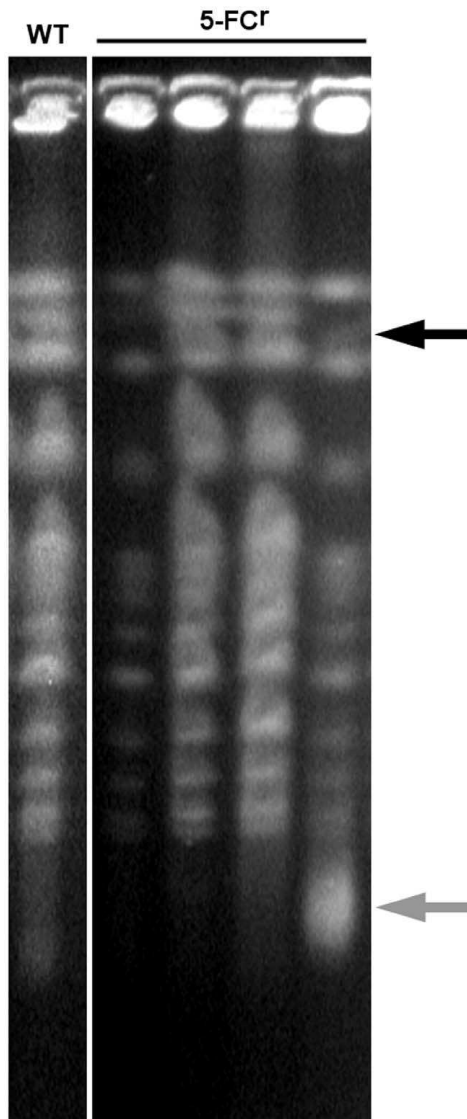


Figure 3. Analysis of gross chromosomal rearrangements in *S. cerevisiae* resistant to 5-FC by pulse-field gel electrophoresis. CHEF of the chromosomes of a wild-type (WT) and 4 of the secondary 5-FC^r strains. The black arrow indicates the only rearrangement found, an apparent deletion in chromosome IV concomitant with a new diffuse band of low molecular weight (grey arrow). Run conditions: 1% agarose gel in 0.5× TBE buffer and run at 14°C for 24 h at 6 V/cm with an initial switching time of 60 seconds, a final of 120 seconds, and an angle of 120°.

doi:10.1371/journal.pone.0042279.g003

microscopic examination of 7 fields (enough to count 300–500 cells at time 0), the slides were kept in a moisture chamber at 30°C for 12 days. Exactly the same fields were examined at specified times to observe cell division. To evaluate the percentage of cells that initiated cytokinesis (assessed as budding), 182 cells from 3 different fields at 3 hours post-exposure were followed through time. The percentage was calculated as the number of cells that initiated bud formation $\times 100/182$ within 7 days.

To examine nuclear division of the same subpopulations, for each time point, all the 5-FC^r colonies were excised from one 90 mm diameter plate and the remaining non-resistant cells were washed off with sterile H₂O, collected and kept at –24°C. On the day of the experiment, cells were thawed, stained with 1 µg/ml DAPI (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany) and examined under fluorescence. For optimal visualization and presentation of the data, the fluorescent field was colored in a gradient yellow – red – black from brightest toward darkest light intensities.

CHEF by Pulse-field gel Electrophoresis (PFGE)

PFGE to see all yeast chromosomes was performed using a CHEF DR-III system (Bio-Rad) in a 1% agarose gel in 0.5× TBE buffer and run at 14°C for 24 h at 6 V/cm with an initial switching time of 60 seconds, a final of 120 seconds, and an angle of 120°. Ethidium bromide was used to visualize the chromosome bands in the gel.

Statistical Analysis

Mean and Standard Error of the Mean were calculated using the statistics package Instat V 3.10 by GraphPad Software, Inc. The significance of the differences between mutants emerged by day 3 (spontaneous) and those emerged later (P values, two-tailed 95% confidence value) were calculated using ANOVA with Bonferroni post-hoc test.

Results

Prolonged Exposure to 5-FC Increases the Mutation Frequency in *S. cerevisiae*

We examined the behavior of 5 *S. cerevisiae* subpopulations during exposure to various concentrations of 5-FC through time (Fig. 1). *S. cerevisiae* colonies resistant to 5-FC (Fig. 1a) appeared after long-term incubation on drug-supplemented SC medium within a concentration window (e.g. too low, all cells survive; too high, invariably lethal, fig. 1b). The lowest concentration that inhibited growth (MIC) was 25 µg/ml, while the lowest concentration that was invariably lethal (MLC) was 400 µg/ml (16 fold the MIC). Thus, we selected 4 fold the MIC for the subsequent experiments.

Next, we evaluated the kinetics of the acquisition of resistance to 5-FC through time (Fig. 2). As expected, a few resistant colonies grew within 1 to 3 days (pre-existing or spontaneous), most likely due to spontaneous mutations that took place while growing on drug-free liquid medium. This occurred at a spontaneous mutation frequency of $3 \cdot 10^{-6} \pm 3.9 \cdot 10^{-7}$ mutants/cell. In these 6 SLAM experiments, comprising 29 subpopulations, we found a jackpot only once (see methods section).

Prolonged exposure of *S. cerevisiae* to fourfold 5-FC MIC resulted in the appearance of resistant colonies that continued to accumulate for longer than 16 days after initial exposure to the drug (long-term or acquired resistant). Experiments were terminated at day 9, when they reached a final frequency of $6.9 \cdot 10^{-5} \pm 9.8 \cdot 10^{-6}$ mutants/cell. These two frequencies (spontaneous vs. adaptive) were significantly different ($p < 0.001$), reflect-

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

Table 2. Effect of 5-FC on the spectrum of mutations in four genes that may be involved in drug resistance.

Day	Gene	Mutation	Type	Effect	Day	Gene	Mutation	Type	Effect
2	FCY1	190 GC→AT (V233→K)	TI	M	7	FCY2	410 CG→TA (A136→V)	TI	M
2	FCY1	107 GC→AT (C205→STOP)	TI	N	7	FCY2	843 GC→AT (W281→STOP)	TI	N
2	FCY1	179 CG→AT (T229→K)	TV	M	7	FCY2	1594 GC→CG (G532→R)	TV	M
2	FCY1	58 CG→AT (E189→STOP)	TV	N	7	FCY2	410 CG→AT (A137→E)	TV	M
2	FCY1	58 CG→AT (E189→STOP)	TV	N	7	FCY2	1311 CG→AT (Y437→STOP)	TV	N
2	FCY1	58 CG→AT (E189→STOP)	TV	N	7	FCY2	308 CG→AT (S102→STOP)	TV	N
3	FCY2	FCY22 968–1470	R		7	N.F.			
3	FCY2	1226 TA→AT (L657→STOP)	TV	N	9	FCY2	Δ657	D	F
3	FCY2	1475 TA→AT (Y493→STOP)	TV	N	9	FCY2	Δ155–157	D	F
3	FCY2	1475 TA→AT (Y493→STOP)	TV	N	9	FCY2	FCY22 1098–1143	R	
3	FCY2	1568 TA→GC (L522→STOP)	TV	N	9	FCY2	FCY22 1098–1143	R	
5	FCY1	41 GC→CG (G14→A)	TV	M	9	FCY2	FCY22 1098–1143	R	
5	FCY2	fcy2Δ	D		9	FCY2	FCY22 968–1143	R	
5	FCY2	FCY22 1053–1143	R		9	FCY2	453 GC→AT (M151→I)	TI	M
5	FCY2	FCY22 968–1143	R		9	FCY2	680 AT→GC (Y227→C)	TI	M
5	FCY2	FCY22 909–1143	R		9	FCY2	1136 AT→GC (Y378→C)	TI	M
5	FCY2	FCY22 1065–1143	R		9	FCY2	1205 TA→GC (M401→R)	TV	M
5	FCY2	FCY22 1014–1143	R		9	FCY2	1344 CG→AT (Y448→STOP)	TV	N
5	FCY2	FCY22 1089–1143	R		9	N.F.			
5	FCY2	FCY22 1103–1143	R		9	N.F.			
5	FCY2	448 CG→TA (Q150→STOP)	TI	N			Double Mutants		
5	FCY2	1594 GC→CG (G532→R)	TV	M	7	FCY2	FCY22 978–1143	R	
5	FCY2	842 GG→TA (W280→L)	TV	M		FCY1	316 TA→CG (C106→R)	TI	M
5	N.F.				7	FCY2	FCY22 884–1074	R	
7	FCY2	Δ469–472	D	F		FUR1	518 AT→GC (E173→G)	TI	M
7	FCY2	fcy2Δ	D		7	FCY2	Δ1222–1602	D	
7	FCY2	1020 insertion A ₂	I	F		FCY2	1214 AT→CG (N404→T)	TV	M
7	FCY2	FCY22 1053–1143	R		7	FCY2	FCY22 913–1143	R	
7	FCY2	FCY22 1053–1143	R			FCY2	Δ909	D	F
7	FCY2	FCY22 1065–1143	R		9	FCY1	258 GC→AT (Syn)	TI	S
7	FCY2	FCY22 263–565	R			N.F.			
7	FCY2	FCY22 378–693; 1443–1512	R		9	FCY2	FCY22 1053–1143	R	
7	FCY2	FCY22 844–1143	R			FCY1	437 TA→CG (L146→P)	TV	M
7	FCY2	FCY22 968–1143	R		9	FCY2	392 TA→GC (Syn)	TV	S
7	FCY2	FCY22 968–1143	R			FCY1	173 CG→AT (S58→Y)	TV	M
7	FCY2	FCY22 1089–1137	R		9	FCY2	FCY22 300–513	R	
7	FCY2	FCY22 1123–1137	R			FCY2	753 GC→AT (Syn)	TI	S
7	FCY2	FCY22 1104–1143	R		9	FCY2	945 insertion T _#	I	F
7	FCY2	FCY22 921–1143	R			FCY2	937 CG→AT (L913→I)	TV	M
7	FCY2	832 GC→AT (A278→T)	TI	M	9	FCY2	453 GC→AT (M151→I)	TI	M
7	FCY2	914 TA→CG (L305→F)	TI	M		FCY2	445 AT→CG (Syn)	TV	S

N.F.: No mutation found, Syn: Sinonymous mutation, D: deletion, I: Insertion, R: recombination, TI: transition, TV: transversion, M: missense, N: nonsense, S: silent, F: frameshift.

doi:10.1371/journal.pone.0042279.t002

ing the very different conditions in which mutations took place, and suggesting the possibility of different underlying mechanisms.

Reconstruction experiments were also performed to examine the stability of acquired resistant phenotypes and to evaluate the possibility that those colonies came from slow-growing individual cells. Ninety eight percent of the 192 5-FC^r colonies examined

grew within 48–60 hours (most of them were already visible before 48 hours). These experiments enabled us to rule out the hypotheses of slow-growing cells as origin of the late-arising colonies, and to establish the genetic (hereditary) source of the long-term (acquired) resistance.

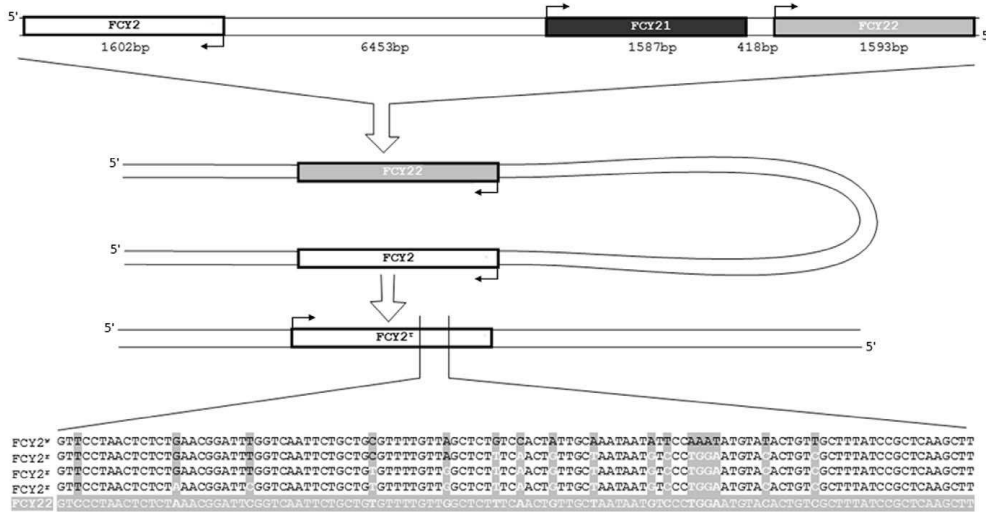


Figure 4. Intrachromosomal recombination of FCY2. Ectopic homologous recombination events found. FCY2, FCY21 and FCY22 are on chromosome V, at the specified distances. After folding, the recombination event takes place, yielding the FCY2' sequences. The arrows mark the start codon in either the Watson or the Crick strands. FCY2' is the wild-type FCY2 sequence; FCY2' are the sequences of three chosen recombinant mutants, and FCY22 is the pseudogen FCY2 has recombined with.
doi:10.1371/journal.pone.0042279.g004

Analysis of the Spectrum of Mutations that Causes Resistance

To gain further insight into the hereditary source of the acquired resistance and the possible mechanisms for it, we examined whether the resistant clones had experienced gross chromosomal rearrangements and we analyzed the sequences of the four genes that seemed more likely to be involved: the permease *FCY2*, the deaminase *FCY1*, the ribosyl transferase *FUR1* and the TMP synthase *CDC21*.

Only one gross chromosomal rearrangement was found among 50 5-FC^r clones examined by CHEF (Fig. 3). Instead, the origin of resistance was mostly found by sequencing the above mentioned genes. When examining the mutations in what we have counted as primarily resistant clones (pre-exposure resistance), we observed a marked difference between those that grew within 2 days and those that took 3 days to grow (Table 2). Indeed, all 6 resistant clones that appeared within 2 days showed a point mutation in the deaminase *FCY1*, 4 nonsense and 2 missense. Of note, 3 of the nonsense mutations were the same transversion 58 CG→AT. In contrast to what we expected, the spectrum of mutations of the clones that appeared at day 3 after drug exposure was drastically different from that at day 2. Indeed, all 5 mutations found were in the permease *FCY2* gene. Moreover, most (4 of 5) were nonsense transversions, 3 TA→AT and 1 TA→GC, and we found no transitions.

When searching for the origin of resistance in those clones emerged after day 3, we could not find the causative mutation in 5 (9.1%) of 55 5-FC^r clones (Table 2). Of these 5 clones, 1 presented a silent substitution in *FCY1*, while the remaining 4 presented no mutations in any of the 4 genes sequenced. Overall, in those 55 clones sequenced, we found a total of 59 mutations (2 concomitant mutations in 9 clones analysed). The vast majority of the mutations

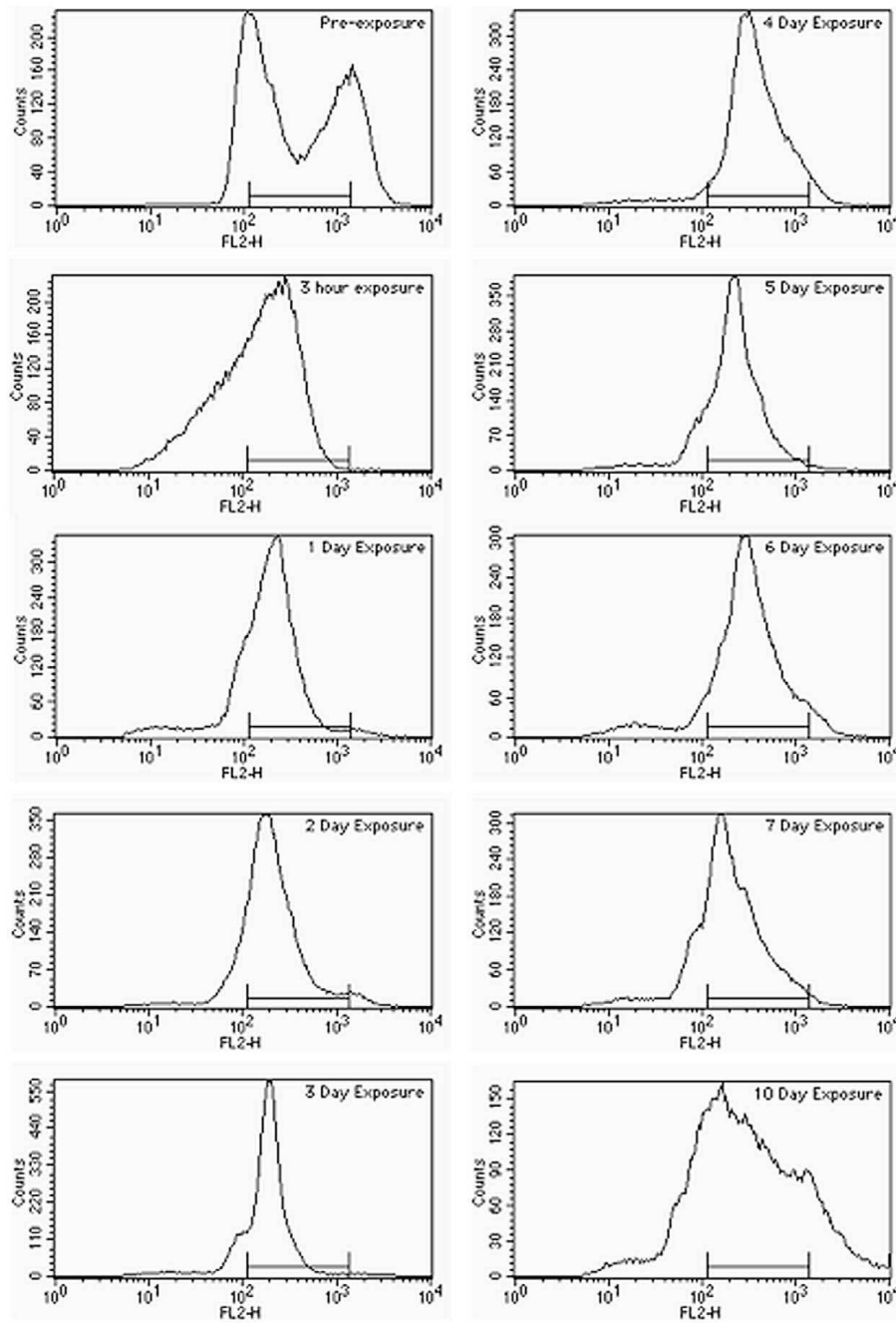
were found in the *FCY2* gene. Indeed, of 59 mutations, 54 (91%) were in the *FCY2* gene, belonging to 49 clones (89.1% of the analyzed clones). Aside from *FCY2*, we found 4 point mutations in the deaminase *FCY1* gene, belonging to those clones that displayed 2 concomitant mutations. We also found 1 transition in *FUR1* - concomitant with a mutation in *FCY2* -, and no mutation at all (silent or otherwise) in *CDC21*. The spectrum of the 59 mutations was distributed as follows: 2 (3.4%) insertions, 7 (11.9%) deletions, 11 (18.6%) transitions and an equal number of transversions. The remaining 28 (47.5%) mutations were produced by intrachromosomal (since our strain is haploid) homologous recombination with *FCY22* (Fig. 4), a 1592 bp gene located 8459 bases downstream of *FCY2*, in chromosome V, with 87% homology to *FCY2*. The mechanisms for this recombination warrant further research.

Analysis of the Cell Cycle

In view of the differences found in the sequencing data, we pondered over the possibility that the non-resistant living cells remaining on the plate are replicating their DNA and that the mutations are arising from replication or repair errors. As figure 5 shows, the vast majority of the non-resistant living cells remaining on the SC+5-FC plate seem to undergo an arrest in G1/S phase already after 3 hours exposure to the drug, lasting for at least, 6 days. Nevertheless, a small subpopulation of cells undergoing a regular cell cycle (as occurs in tumors) or cells undergoing a very slow cell cycle would be undetectable by FACS. Thus, we performed a time-lapse microscopic examination (Fig. 6).

As figure 6 shows, cells grown in drug-free liquid medium finish the already initiated cell cycles after they are plated in presence of drug, so they nearly double the population within the first 3 hours. After that, the cell division is quite slow, taking from several hours

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/		
Identificador del documento: 974511		Código de verificación: nnAZcF1T
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAINERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.

Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

Figure 5. Effects of prolonged exposure to 5-FC on cell cycle progression. For each panel, resistant colonies were excised from one 150 mm diameter plate and the remaining non-resistant cells were washed off with 80% EtOH to measure DNA contents by FACS as described in Materials and Methods. In each panel the X axis represents the DNA content and the Y axis represents the number of cells. The FACS histograms measured at various times as specified in each panel.
doi:10.1371/journal.pone.0042279.g005

to days for a cell to bud. During 7 days we followed up the budding events of 182 individual cells present in the culture after 3 hours (to avoid including previous cycles started in absence of drug), failing to observe any individual cell performing several cell cycles. Instead, we observed that 56% of those 182 cells present on the slide after 3 hours carried out further budding events at later times, definitely a larger number than just a small subpopulation of cells. When observed through time, it is apparent that the cycle is extremely slow and that a small bud can take from several hours up to days to grow. We can thus conclude that no small population is undergoing a regular cell cycle. Rather, this data together with that collected from FACS analysis suggests that the cell cycle is slowed down to a great extent at an early S phase, with or without transient arrest.

While performing this time-lapse microscopy we noticed a large number of aberrant shapes and apparent pseudohyphae. We wondered whether those aberrations possessed a nucleus or if they arose during failed attempts to divide. We used fluorescence microscopy to examine the cell nucleus (Fig. 7), observing that the aberrant cells do have a nucleus, so there is cell division, albeit abnormal. We also observed that mitosis is indeed progressing, since we found instances of anaphase (arrows).

Extension of the Model of Acquisition of Resistance through Adaptive Mutations

In order to evaluate whether our model is specific of drug or of organism we assayed a more relevant clinical drug, CSP, on the one hand, and an infectious yeast, *Candida albicans*, on the other hand.

When examining the acquisition of resistance (Fig. 8), we observed that upon prolonged exposure to CSP, many more resistant *S. cerevisiae* colonies emerged than upon exposure to 5-FC (Fig. 8a). Indeed, while in the 11 subpopulations analysed the spontaneous mutation frequency ($6.4 \cdot 10^{-6} \pm 1.2 \cdot 10^{-6}$ colonies/viable cell) was similar to that of 5-FC, the acquired resistance frequency rose to $4.7 \cdot 10^{-2} \pm 2.7 \cdot 10^{-2}$ colonies/viable cell ($p < 0.05$).

The spontaneous mutation frequency of *C. albicans* leading to 5-FC^r was within the expected range ($8.4 \cdot 10^{-8} \pm 8.4 \cdot 10^{-8}$ colonies/viable cell) [14] (Fig. 8b), but by day 9 the resistance frequency rose to $5.4 \cdot 10^{-5} \pm 1.9 \cdot 10^{-5}$ colonies/viable cell, more than 600 fold the spontaneous frequency ($p < 0.001$). A total of 21 subpopulations were evaluated in these experiments.

In both instances we performed reconstruction experiments to examine the stability of acquired resistant phenotypes, finding similar results to those with *S. cerevisiae* and 5-FC.

Analyzing these data, we queried what kind of effect, if any, these drugs were exerting on yeast viability (Fig. 9). In spite of the high mutation frequency found in *S. cerevisiae* when in presence of CSP, the drug had a severe fungicidal effect, so that we had great methodological difficulties in counting the non-resistant living cells remaining on the plate on day 7, a number that was beyond our limit of detection on day 9. In contrast, as described in the literature, the effect of 5-FC on *C. albicans* was fungistatic rather than fungicidal, cells nearly doubling ($180.0 \pm 25.3\%$) their original population after 7 days.

Discussion

Acquisition of resistance secondary to drug treatment is a major clinical problem in both bacterial and fungal infections as well as in cancer [4,10,15]. One way cells can acquire resistance is by changes in a gene of the route of action of the drug, i.e. mutation. Adaptive mutations are those that enable a cell to adapt to a growth-limiting (stressful) environment [6]. Several adaptive mutation mechanisms are used by bacteria to acquire resistance to various antibiotics [1,2,4], including the SOS or the RpoS-controlled stress responses.

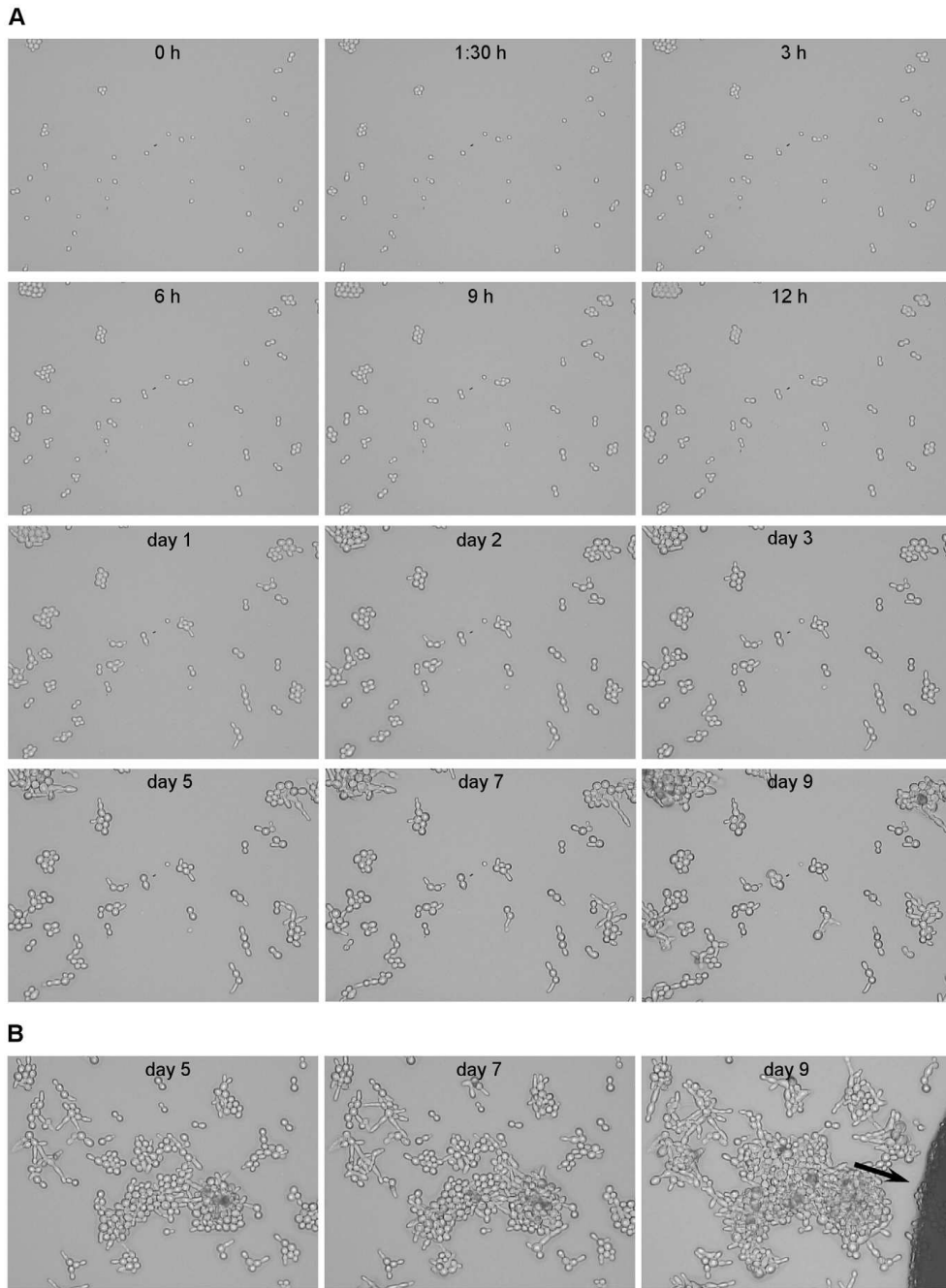
Data about adaptive mutation mechanisms in eukaryotes is rather scarce. A few reports suggest their existence in certain types of cancer (see, for instance, the works by Hara et al. [16] and Steinkamp et al. [17]) and most research about yeasts has been performed on *S. cerevisiae* (reviewed in [6]). The models available are based on nutrient deprivation, where one of these models has revealed the requirement of yKU70, a non-homologous end-joining protein [18]. Nevertheless, in addition to lacking clinical relevance, these models are rather limited, since they are based on an artificial yeast construction that can only adapt to starvation conditions by introducing a frameshift in a promoter region, preventing the researcher from detecting any other types of mutations that may be acquired by the cell. All these considerations suggest that adaptive mutation processes do take place in eukaryotic cells [19], but a broader model amenable to genetic studies is needed to describe them in depth. This need has prompted us to develop the presented model.

A model to study adaptive mutation has to meet two main criteria, as reviewed by Heidenreich [6]. First, "a population of cells has to be kept in a prolonged state of growth limitation by the application of nonlethal stress conditions", ideally arresting completely the cell cycle. "Second, the possibility should exist that, as a matter of principle, the proliferation arrest is abolished by mutations... The resulting emergence of a mutant clone amidst the majority of" non-growing "cells allows the detection of adaptive mutation events". The model we have developed meets both criteria:

1. *S. cerevisiae* cells have slowed down their cell cycle to such an extent that one single cell may take from several hours to days to complete one cycle and bud, as shown above. Thus, one would think that most of the mutations arisen seem to emerge not only due to errors by replicative DNA polymerases, but from other mutagenic mechanisms as well.
2. The proliferation arrest is abolished by a number of possible mutations, as already detailed in the introduction. Thus, as the second requirement states, mutations do exist that abolish the proliferation arrest.

When comparing our model to the available starvation models, we find some similarities. For instance, the late arising resistant colonies result from post-plating mutations. This can be concluded from the results of the reconstruction experiments and from the observation that each mutation found in the vast majority of the colonies analyzed was absent from both the spontaneous mutant colonies from the same subpopulation and from the other late arising colonies of the same plate, which clearly shows that the mutation occurred after plating. Analysis of the mutation spectrum

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAINERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

Figure 6. Follow up of *S. cerevisiae* microcolonies during prolonged exposure to 5-FC. Follow up of *S. cerevisiae* microcolonies during prolonged exposure to 5-FC for the specified time. After inoculating a 90 mm diameter Petri dish containing SC medium with 100 µg/ml 5-FC in the same fashion as performed for SLAM experiments, a 6 cm² slice was cut out and placed on a glass slide and kept in a moist chamber. Random fields were chosen at time 0 and followed through time as specified in the Methods section for the times indicated in each picture. Panel A shows detailed follow up of one field. Adjacent to the field shown in panel B, a cell acquired resistance and grew, eventually invading the followed up field (black arrow). A marked difference can be observed between the edge of microcolonies and the 5-FC colony.
doi:10.1371/journal.pone.0042279.g006

shows a clear distinction between the early and the late arising mutations, which proves that whatever mechanism is taking place, it is clearly different between the two phases. Whereas the early arising (spontaneous) clones show mostly point mutations in either FCY1 or FCY2, the late arising clones (adapted) predominantly have recombined FCY2 with the 8 kbase downstream 87% homologous gene FCY22. In regard to the point mutations, the types and genes found varied within the different phases. Whereas the vast majority of point mutations found in spontaneous clones were in FCY1 (day2) or transversions in FCY2, in adapted clones we found predominantly recombinations and a similar number of transitions than transversions in FCY2. Of 50 clones analyzed, we only found by CHEF 1 gross rearrangement, although smaller rearrangements would remain undetected by this method.

Comparing our mutation spectrum to that found in the already existing models we have found no similarities. We already expected that because of the different nature of the mutations necessary to escape the proliferation arrest. Whereas in starvation models only a frameshift in a specific gene (Lys2 or Hom3) would get selected and re-start growth, our model is very little stringent with the type of mutation that may become selected and fixed. Frameshifts, fragment or gene deletions, point mutations, recombinations, could all provide the mutation necessary to overcome the growth limitation, as we have seen.

Of note, we found not even one mutation in CDC21, even though it has been proposed that a change-of-function point mutation in this gene might confer resistance to 5-FC [8]. This underscores the metabolic need for this gene and the difficulties in finding a point mutation that would enable the enzyme to work without being affected by the drug.

Our model presents additional advantages over the starvation-based models. Firstly, it is a closer approach to the clinical situation and has more clinical relevance:

1. In recent years *S. cerevisiae* has acquired relevance as model organism in areas such as pharmacology and oncology. Although it lacks some aspects inherent to cancer, the biochemical routes for the organism functioning are highly conserved in eukaryotes, from yeast to human. Most genes present a high sequence homology, and protein functions are enormously conserved among species [20]. Therefore, using *S. cerevisiae* as model allows us to discover the role of proteins within the cell metabolism context and to identify therapeutic targets.
2. The cytosine analogue 5-FC, failed after its development as an antitumor drug, proved useful as an antifungal drug. However, it is no longer used as a single agent due to the high frequency of secondary resistance acquisition (30%) [8]. Still, 5-FC is currently being explored in new approaches to cancer therapy (see for instance [21,22]).

In addition to its clinical relevance, another advantage of our model is that the adaptive mutation frequency has similar characteristics to those obtained in other models [23,24], but is orders of magnitude higher, which facilitates the assays. Nevertheless, to rule out the existence of an intrinsic mutagenic effect of

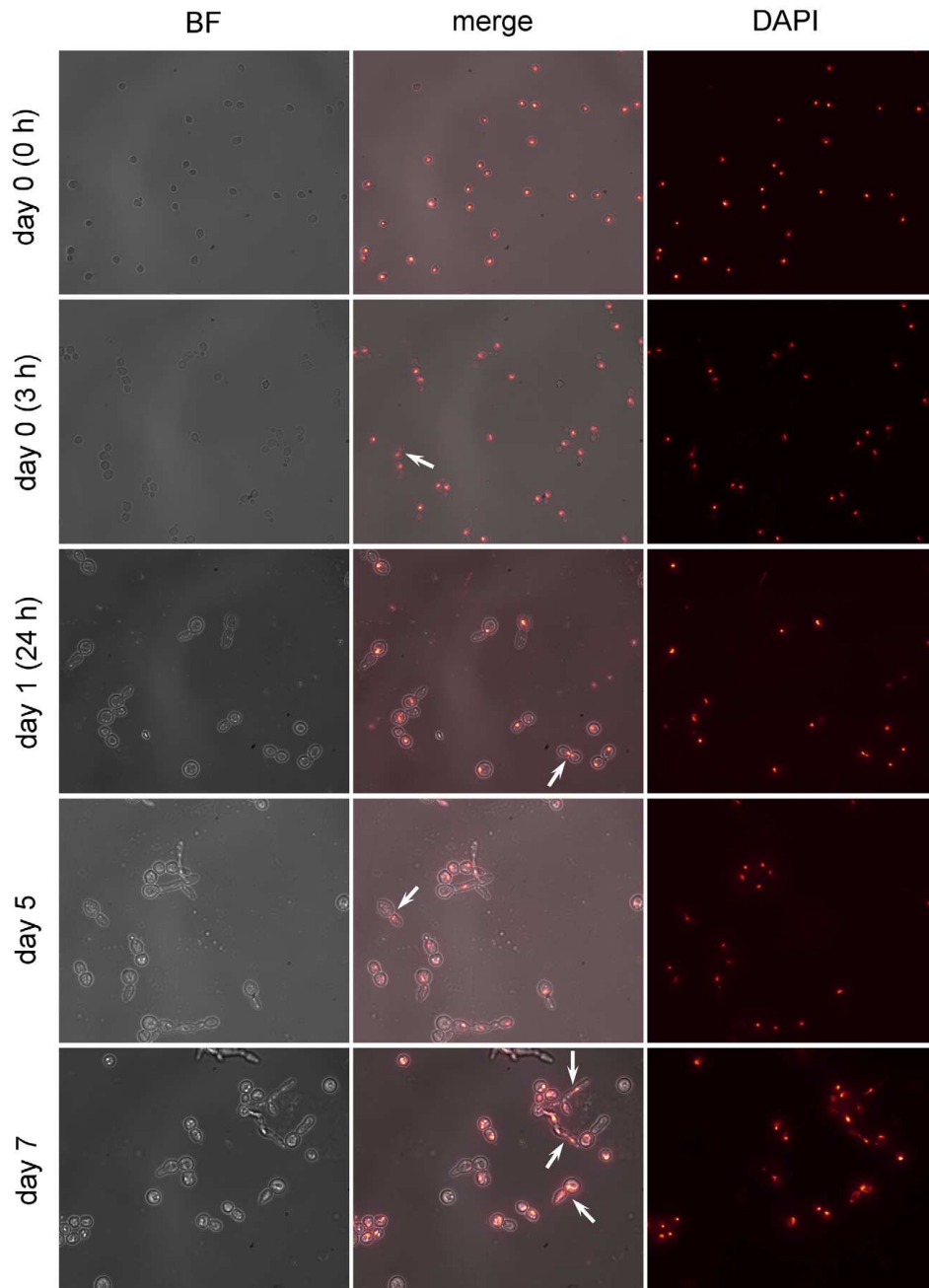
5-FC, and to evaluate its broadness and clinical relevance, we have validated it with two variants.

The first variant is using the infectious yeast, *C. albicans*, as model organism. This clinically important fungus can cause life-threatening systemic infections, especially in immunocompromised patients [25]. When compared to the haploid *S. cerevisiae* strain used, the spontaneous mutation frequency in this diploid organism was two orders of magnitude lower (in the range of 10⁻⁸ mutants/viable cell). But in agreement with the clinical situation, the adaptive mutation frequency increased greatly through time, becoming similar to that of *S. cerevisiae* (in the range of 10⁻⁵ mutants/viable cell). In contrast to *Saccharomyces*, viability data show that the *Candida* population is nearly doubled within 7 days. This difference is probably due to the different effect of 5-FC on either species (fungicidal for *S. cerevisiae* vs. fungistatic for *C. albicans*). Some cells of both species are slowly reproducing but, while some other *S. cerevisiae* cells die, the *C. albicans* ones don't die, remaining quiescent (static), so the overall number of viable cells increase. The slow replication during our assays imply that the adaptive mutation frequencies can be, at least in part, introduced by replicative polymerase errors, but since the extent of this replication is so small, some other mechanism(s) may possibly be underlying too.

The second variant of our model was using an echinocandin drug, CSP. This antifungal agent was approved for use barely 12 years ago, with a cost of over 500 USD per day per patient. Its target is completely different from that of 5-FC, since it is a noncompetitive inhibitor of β(1-3)-glucan synthase, an enzyme that catalyzes the extracellular synthesis of β(1-3)-glucan of the cell wall [10]. Although CSP elicited a spontaneous mutation frequency similar to 5-FC, the adaptive frequency was extremely higher, reaching a range of 10⁻² CSP^r/viable cell. There are some reports on the emergence of CSP resistant candidiasis upon preemptive therapy, as well as of isolates with reduced susceptibility to CSP during therapy, but as of yet, data on the frequency or the incidence of this secondary resistance is not yet available, although it will be very interesting to compare our in vitro data to it.

In this model, we have observed that yeasts acquire heritable resistance upon prolonged exposure to drugs with either fungistatic or fungicidal effect, and unexpectedly, the more fungicidal the effect, the more the adaptive mutation frequency is increased over the spontaneous. This suggests that a factor(s) may exist that leads to adaptive mutation and that this factor increases during cellular stress, and the stronger the stress, the higher the factor increases. Whether this factor is a metabolite (e.g. increased oxidants that may be damaging the DNA) or a biochemical mechanism (analogue to bacterial adaptive mechanisms like SOS response, or an increased DNA damage by an endonuclease, for instance) is currently under study. What we have observed is that spontaneous mutations in our *S. cerevisiae* -5-FC model are different from adaptive mutations, which implies different mutagenic mechanisms. We have shown here that one of the adaptive mechanisms is through recombination events of the permease FCY2 with an 87% homologous gene, FCY22. These observations pose a number of interesting queries, like what are the factor(s) leading

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAINERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

Figure 7. Fluorescence microscopy of cells exposed to 5-FC for long term. Effect of 5-FC on nuclear segregation of *S. cerevisiae* after exposure for the specified time. For each panel, resistant colonies were excised from one 90 mm diameter plate and the remaining non-resistant cells were washed off with sterile H₂O and kept at -24°C. On the day of the experiment they were dyed with DAPI and examined by fluorescence microscopy. Left column was obtained using bright field; right column was obtained using fluorescent illumination; central column was digitally obtained by merging the other two. Arrows point to observed anaphase events.
doi:10.1371/journal.pone.0042279.g007

to the observed increased mutagenesis (metabolites and/or proteins), or why we have not found recombinations with FCY21, another highly (77%) homologous gene 2 kb closer to FCY2 (6 kb downstream), or finally, whether these types of recombinations are of use during evolution.

The following model would fit our data and that available from other authors:

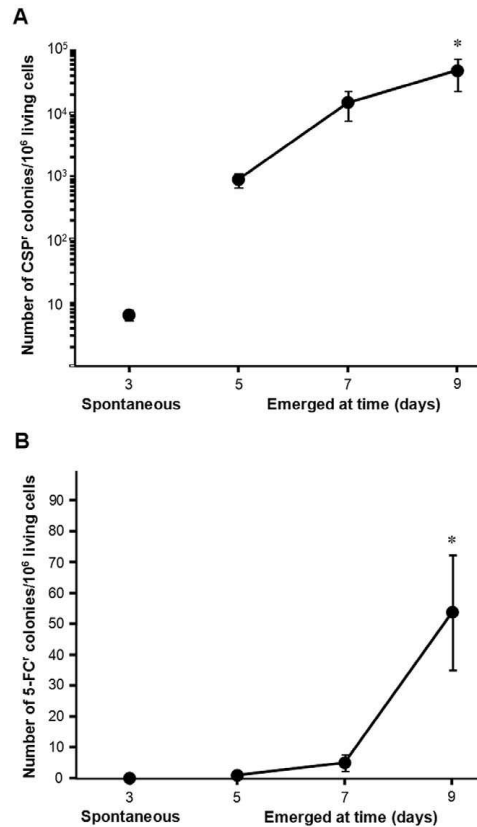


Figure 8. Kinetics of the acquisition of resistance by yeasts during prolonged incubation on drug-containing agar media. Panel A, 5·10⁵ *S. cerevisiae* cells (N=11) were inoculated on SC agar medium supplemented with 0.72 µg/ml CSP. Panel B, 5·10⁵ *C. albicans* cells (N=21) were inoculated on agar medium containing 100 µg/ml 5-FC. SLAM experiments were performed as described in Materials and Methods. Mean and standard error for N independent subpopulations (as specified). * indicates p<0.05 as evaluated by ANOVA with Bonferroni post-hoc test.
doi:10.1371/journal.pone.0042279.g008

Upon exposure to the drug, as to other stress types, cells become transiently arrested in G1 [26]. Very slowly, they would struggle to progress through G1 and start S phase. During this struggle, either in G1 or in early S (or in both) they would be accumulating DNA damage and breaks (SSB and/or DSB). Then, some of the DSBs would get repaired while others may persist through S-phase and the duplicated sister chromatids. Since both would be harboring a DSB at the same position, they could be jerry-rigged repaired in G2 [27]. Some of these repairs may lead to the ectopic intrachromosomal recombination observed (probably by the Rad52 epistasis group), some may be performed by the other DNA repair systems (MMR, etc), some may perhaps lead to cell death. Once all the breaks are repaired the cell finishes its cycle. If no incorrect repair leads to a resistance-conferring mutation the daughter cells struggle again through slow G1, and the process starts again. If one repair leads to a mutation that confers resistance, the daughter cells are no longer sensitive to the drug and thus can grow normally. Eventually all the cellular resources remaining are spent in this burdensome cell-cycling and the cell enters a chaotic situation of “duplicate and mutate, or die” that we can see by FACS analysis at day 10 of exposure or by morphologic analysis at day 9.

In summary, we have presented a model for adaptive mutagenesis with the following characteristics:

1. It fulfils the requirements of slowing cell cycle and detectable mutation events described by Heidenreich [6].
2. It is amenable to genetic studies, and will enable the characterization of proteins involved using knock-out yeast

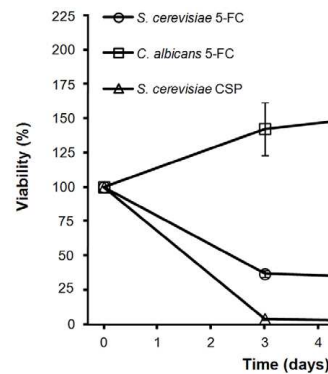


Figure 9. Effects of antifungal drugs on yeast viability. Five hundred thousand *S. cerevisiae* (circles, N=39) or *C. albicans* (squares, N=21) cells were inoculated on agar medium containing 100 µg/ml 5-FC. Five million *S. cerevisiae* (triangles (N=11)) cells were inoculated on SC agar medium supplemented with 0.72 µg/ml CSP. Viable colony forming units were determined as specified in figure 1B. Survival is shown relative to the number of viable cells present 3 hours after plating on drug (as explained in the Methods section) and is the mean and standard error for N independent subpopulations.
doi:10.1371/journal.pone.0042279.g009

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAINERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

strains, transcription studies, etc.

- It is a clinically relevant model, with applications both to cancer and to yeast invasive infections, and may be useful for studying acquisition of resistance to drugs as long as such resistance can be achieved by mutation.
- An ectopic recombination with a homologous gene takes place with a high frequency.

Further studies on the FCY2:FCY22 recombination mechanism, the spectrum of mutations that lead to CSP resistance, what proteins are involved in this adaptive mutation, and the possible accumulation of mutagenic metabolites are necessary in order to describe adaptive mutation in eukaryotes.

References

- Foster PL (2007) Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 42: 373–397.
- Lewin CS, Amey SG (1991) The role of the SOS response in bacteria exposed to zidovudine or trimethoprim. *J Med Microbiol* 34: 329–332.
- Maiques E, Ubeda C, Campoy S, Salvador N, Lasa I, et al. (2006) beta-lactam antibiotics induce the SOS response and horizontal transfer of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 188: 2726–2729.
- Miller C, Thomsen LE, Gaggero C, Mosseri R, Ingmer H, et al. (2004) SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science* 305: 1629–1631.
- Rosenberg SM, Thulin C, Harris RS (1998) Transient and heritable mutators in adaptive evolution in the lab and in nature. *Genetics* 148: 1559–1566.
- Heidenreich E (2007) Adaptive mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 42: 285–311.
- Hospenthal DR, Bennett JE (1998) Flucytosine monotherapy for cryptococcosis. *Clin Infect Dis* 27: 260–264.
- Vermes A, Guchelaar HJ, Dankert J (2000) Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J Antimicrob Chemother* 46: 171–179.
- Waldorf AR, Polak A (1983) Mechanisms of action of 5-fluorocytosine. *Antimicrob Agents Chemother* 23: 79–85.
- Vandeputte P, Ferrari S, Coste AT (2012) Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *Int J Microbiol* 2012: 713687.
- Burke D, Dawson D, Stearns T (2000) *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Luria SE, Delbruck M (1943) Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance. *Genetics* 28: 491–511.
- Torres-Rosell J, Machin F, Farmer S, Jarmuz A, Eydmann T, et al. (2005) SMC5 and SMC6 genes are required for the segregation of repetitive chromosome regions. *Nat Cell Biol* 7: 412–419.
- Malavasic MJ, Cihlar RL (1992) Growth response of several *Candida albicans* strains to inhibitory concentrations of heavy metals. *J Med Vet Mycol* 30: 421–432.
- Huff CA, Matsui W, Smith BD, Jones RJ (2006) The paradox of response and survival in cancer therapeutics. *Blood* 107: 431–434.
- Hara T, Koumo J, Nakamura K, Kusaka M, Yamaoka M (2005) Possible role of adaptive mutation in resistance to antiandrogen in prostate cancer cells. *Prostate* 65: 268–275.
- Steinkamp MP, O'Mahony OA, Brogley M, Rehman H, Lapensee EW, et al. (2009) Treatment-dependent androgen receptor mutations in prostate cancer exploit multiple mechanisms to evade therapy. *Cancer Res* 69: 4434–4442.
- Heidenreich E, Novotny R, Kneidinger B, Holzmann V, Wintersberger U (2003) Non-homologous end joining as an important mutagenic process in cell cycle-arrested cells. *EMBO J* 22: 2274–2283.
- Galhardo RS, Hastings PJ, Rosenberg SM (2007) Mutation as a stress response and the regulation of evolvability. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 42: 399–435.
- Menacho-Marquez M, Murguia JR (2007) Yeast on drugs: *Saccharomyces cerevisiae* as a tool for anticancer drug research. *Clin Transl Oncol* 9: 221–228.
- Kang NH, Choi KC (2011) 207 engineered human amniotic fluid-derived stem cells by expressing Cytosine deaminase (cd) and thymidine kinase (hsv-tk) mediate targeting killing effect in breast cancer cells. *Reprod Fertil Dev* 24: 216.
- Lee BF, Lee CH, Chiu NT, Hsia CC, Shen LH, et al. (2012) Hypoxia imaging predicts success of hypoxia-induced cytosine deaminase/5-fluorocytosine gene therapy in a murine lung tumor model. *Cancer Gene Ther* 19: 255–262.
- Hall BG (1992) Selection-induced mutations occur in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 4300–4303.
- Steele DF, Jinks-Robertson S (1992) An examination of adaptive reversion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 132: 9–21.
- Morschhauser J, Barker KS, Liu TT, Bla BWJ, Homayouni R, et al. (2007) The transcription factor Mrr1p controls expression of the MDR1 efflux pump and mediates multidrug resistance in *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 3: e164.
- Correia I, Alonso-Monge R, Pla J (2010) MAPK cell-cycle regulation in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Future Microbiol* 5: 1125–1141.
- Haber JE (1999) DNA recombination: the replication connection. *Trends Biochem Sci* 24: 271–275.

Acknowledgments

Dr. Jodie Chin (FSRI, La Jolla, CA) has greatly contributed to this manuscript with very fruitful discussions and careful review of this manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: DQA FM FER CGL. Performed the experiments: DQA ACA LGH. Analyzed the data: DQA FM CGL. Contributed reagents/materials/analysis tools: FM FER CGL. Wrote the paper: CGL. Thoroughly revised the manuscript and contributed to the design of figures and tables: DQA ACA LGH FM FER.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

	Identificador del documento: 974511	Código de verificación: nnAZcF1T	
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAINERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			11/07/2017 18:00:48



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Identificador del documento:	Código de verificación:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	974511	nnAZcF1T	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			11/07/2017 18:00:48



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Identificador del documento:	Código de verificación:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	974511	nnAZcF1T	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA			11/07/2017 18:00:48

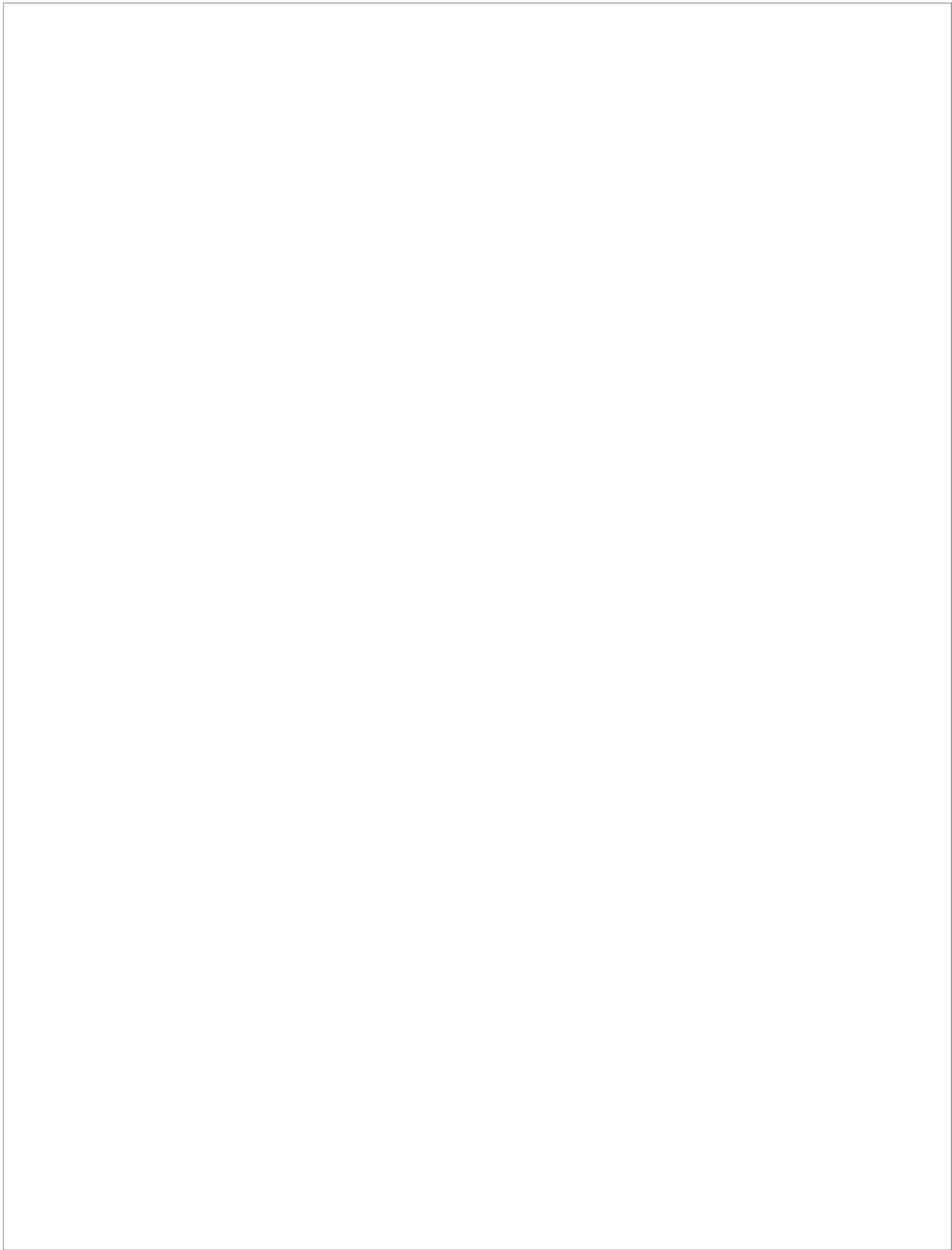


Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511		Código de verificación: nnAZcF1T
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511

Código de verificación: nnAZcF1T

Firmado por:	Fecha:
DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	11/07/2017 18:00:48

En los últimos años, diversas especies de microorganismos están adquiriendo resistencia a los tratamientos farmacológicos existentes. Esto sucede por un incremento en el porcentaje de patógenos intrínsecamente resistentes (resistencia primaria) o por adquisición de resistencia tras la exposición al fármaco (resistencia secundaria). A menudo la resistencia primaria se debe a mutaciones espontáneas surgidas de forma azarosa previa exposición al agente, mientras que en el segundo caso la resistencia surge propiamente como consecuencia del tratamiento y puede ser debida a cambios metabólicos o genómicos. Cuando son genómicos, éstos ocurren mediante mutaciones que permiten la adaptación del organismo al medio, fenómeno conocido como mutagénesis adaptativa.

Mutagénesis adaptativa: *“procesos que permiten a células individuales de poblaciones no proliferantes adquirir mutaciones ventajosas gracias a las cuales superan la fuerte presión selectiva de las condiciones del medio que están limitando la proliferación”* (Erich Heidenreich, 2007).



ULL | Universidad de La Laguna

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 974511		Código de verificación: nnAZcF1T
Firmado por: DAVID QUINTO ALEMANY UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		Fecha: 30/06/2017 19:28:19
CRISTINA GIL LAMAIGNERE UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:33:32
FELIX MANUEL MACHIN CONCEPCION UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:37:04
MARIO LORENZO DIAZ GONZALEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		30/06/2017 19:49:10
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA		11/07/2017 18:00:48