

Análisis de expresión de genes de beta-glucanasas en el hongo patógeno *Sporothrix schenckii*.

Expression Analysis of beta-glucanase genes of the Pathogenic Fungus *Sporothrix schenckii*.

Franyutti Castillo Guadalupe.¹, García Negrete Paola.², Hernández Guzmán Eva M.³, Madrigal Cerda Luis A.⁴,
Martínez Ajo Alondra⁵, Sandoval Ramírez Cynthia I.⁶, Razo Soria Tannia⁷, Niño-Vega Gustavo A.⁸

División de Ciencias Naturales y Exactas^{1,2,5,6,7,8}, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías^{3,4}, Universidad de Guanajuato

g.franyutticastillo@ugto.mx¹, p.garcianegrete@ugto.mx², em.hernandezguzman@ugto.mx³, la.madrigalcerda@ugto.mx⁴,
a.martinezajo@ugto.mx⁵, ci.sandovalramirez@ugto.mx⁶, trazo16@ugto.mx⁷, gustavo.nino@ugto.mx⁸.

Resumen

La pared celular es vital para la supervivencia de las células fúngicas y sus componentes estructurales, esenciales para la integridad del hongo, no están presentes en el hospedero humano. Esto convierte a los mecanismos de síntesis de la pared celular en un objetivo clave para el desarrollo de tratamientos antifúngicos específicos y efectivos. Esta propuesta se centra en evaluar la expresión diferencial de cuatro genes de glucanasas de la pared celular, producidas por *Sporothrix schenckii* en las fases de levadura y micelio.

Palabras clave: Pared Celular Fúngica, *Sporothrix schenckii*, β -glucanasas de Pared Celular.

Introducción

En hongos patógenos de humanos, la pared celular es la primera interfaz en la interacción hongo-hospedero, desempeñando un papel crucial en el desarrollo de la micosis [1]. La pared celular es vital para la supervivencia fúngica y sus componentes estructurales, indispensables para la integridad del hongo, no se encuentran en el hospedero humano. Esto ha dirigido la atención hacia sus mecanismos de síntesis en la búsqueda de tratamientos antifúngicos específicos y efectivos [1].

A diferencia de las estrategias clásicas que se centran en la síntesis de los componentes de la pared celular, esta propuesta se enfoca en las enzimas extracelulares involucradas en la remodelación de la pared celular fúngica. Estas enzimas podrían ser más accesibles para el desarrollo de compuestos dirigidos a modificar su actividad, lo que resultaría en cambios en la pared celular que podrían exponer componentes inmunogénicos, facilitando así la eliminación del hongo por parte del sistema inmune del hospedero [2].

El organismo modelo elegido para esta investigación es *Sporothrix schenckii*, uno de los agentes causantes de la esporotricosis, una micosis subcutánea en humanos y otros mamíferos. Contamos con información sobre la composición y mecanismos de síntesis de su pared celular, así como con herramientas de manipulación genética probadas en este organismo [2,3,4]. Además, desde 2014, se dispone de su genoma [5].

Esta propuesta se centrará en los mecanismos de remodelación de la pared celular, específicamente en la β -glucana, un componente estructural de la pared de *S. schenckii*. Como primer paso, se analizará la expresión de cinco genes involucrados en su remodelación in situ (Crf1, Eng2, Eng3 y EglC), según un análisis previo del proteoma de la pared celular de las células levaduriformes de *S. schenckii*.

Metodología

Obtención de conidios

Previamente se inocula la cepa en fase micelial en medio YPD sólido a un pH 4.5, para que este crezca con la morfología de micelio.

El medio de cultivo se prepara con las siguientes proporciones:

1% Extracto de levadura 2% Peptona de gelatina 3% Glucosa, y añadir un 2% de agar para solidificar.

Se usan cajas de 20-25mm de diámetro por lo que 500mL de medio son óptimos para 15 cajas aproximadamente, se busca que la placa sea gruesa para poder incubar entre 7 y 8 días.

1. Con una pipeta se agregan 5 mL de agua destilada fría en la placa sobre el micelio en esterilidad.
2. Frotar firmemente 1 minuto con un asa Drigalsky previamente flameada dos veces con etanol para esterilizarse.
3. Recuperar el agua con los conidios con ayuda de una micropipeta y recolectar en un tubo falcón de 50mL y repetir los pasos anteriores una vez más (pasos del 1 al 3).
4. Centrifugar a 6800g por 5 minutos a 4°C y decantar el sobrenadante.
5. Recolectar la pastilla de conidios y traspasarla a un tubo eppendorf de 1.5mL
6. Las pastillas se lavan con PBS (o agua destilada), se decanta y la pastilla se re suspende en una solución con proporción 1:1 en medio de cultivo y glicerol al 50%.
7. Se almacenan a -70 C para conservar por más de 6 meses y a -20°C para conservación corta.

Obtención de la fase micelial

Para obtener micelio, se inocularon conidios (1×10^7 cel/mL) en 10 mL de YPD a un pH de 4.5, incubándolos durante 1 a 2 días a una temperatura de 28°C y agitación de 200 rpm. Del preinóculo resultante, se tomaron 5 mL y se transfirieron a 50 mL de caldo YPD con el mismo pH, incubándose nuevamente a 28°C y 200 rpm por un periodo de 24 horas.

El micelio fue recolectado utilizando un sistema de filtración, en un embudo Büchner conectado a un matraz Kitasato, utilizando una membrana de Nylon Monodur con porosidad de 5 μ m. Después de la filtración, el micelio se lavó de 2 a 3 veces con agua helada estéril o hasta lograr al menos un 80% de pureza morfológica al observarse bajo el microscopio. Finalmente, se utilizó una espátula de metal estéril para recolectar el micelio en tubos Eppendorf, que posteriormente se congelaron con nitrógeno líquido para la extracción de RNA.

Extracción de ARN de ambas fases (levadura y micelio)

1. La extracción se realizó por el método Trizol.
2. Pulverizar pastilla agregando nitrógeno líquido en un mortero y para evitar que se descongele la pastilla
3. En un tubo eppendorf que contenga 1mL de Trizol agregar 300mg de pulverizado de pastilla
4. Agitar en vortex él tuvo con las células y el Trizol por 30seg hasta ver una suspensión homogénea color rosa
5. Inocular a temperatura ambiente por 5min
6. Añadir 200 microlitros de cloroformo frío, agitar vigorosamente en vortex hasta 3 min.
7. Incubar 3min a temperatura ambiente, pasado el tiempo centrifugar a alta velocidad 12000rpm x 10min
8. Agregar 500 microlitros de isopropanol frío, mezclar por inmersión y dejar en hielo por 15 min para volver a centrifugar a 12000rpm x 10min, retirar el sobrenadante
9. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo, aproximadamente entre 400 a 600 microlitros, tratando de no llevar interfase
10. Lavar la pastilla con 1ml de etanol 75% y centrifugar a 10000rpm x 10min y retirar el sobrenadante decantando y dejar secar de 3 a 5min a temperatura ambiente es importante quitar los residuos de etanol con una sanita
11. Re suspender con 50-100 microlitros de agua DEPC, agitando con el dedo hasta que se re suspenda la pastilla

Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se realiza partiendo de RNA intacto de alta calidad, oligonucleótidos y dNTPs. Posteriormente se realiza la PCR en un tubo separado utilizando oligonucleótidos específicos para los genes de interés.

La cuantificación de RNA se realizó mediante espectrofotometría, utilizando un NanoDrop2000 (ThermoScientific). La absorbancia de una muestra de RNA se mide a 260 y 280 nm. La concentración de ácido nucleico se calcula utilizando la ley de Beer-Lambert, que predice un cambio lineal en la absorbancia con la concentración. La relación A260/A280 se utiliza para evaluar la pureza del RNA. Una relación A260/A280 de 1.8 a 2.1 indica un RNA puro. Se hace para saber su concentración y que tan pura esta la muestra, con el fin de saber si son aptas para la síntesis de cDNA, dado que este método no discrimina entre RNA y DNA, se trata las muestras de RNA con DNasa libre de RNasa para eliminar el DNA contaminante, seguido de un gel de agarosa para corroborar que muestra es óptima.

El procedimiento está diseñado para convertir 1pg-5ug de RNA en cDNA de primera cadena, en un tubo Eppendorf de 0.2 mL se colocan los siguientes componentes.

Tabla 1. Cuantificación de RNA

Componente	Cantidad uL
Hasta 5 ug de RNA total	1-5 uL
50 uM oligo(dT) ₂₀	1 uL
10 mM dNTP mix	1 uL
Agua tratada con DEPC	completar a 10 uL

El agua tratada con DEPC (Dietilpirocarbonato), garantiza que las soluciones están libres de contaminación de RNasas; el DEPC reacciona con los residuos de histidina de las proteínas e inactiva las RNasas, también puede reaccionar con el RNA, por lo que es necesario eliminarlo mediante tratamiento térmico antes de utilizar la solución.

Incubar a 65° C por 5 minutos, después ponerlo en hielo durante al menos 1 minuto. Se prepara la mezcla de síntesis de cDNA, añadiendo cada componente con el siguiente orden:

Tabla 2. Síntesis de cDNA

Componente	1 RXN
10X RT buffer	2 uL
25 mM MgCl ₂	4 uL
0.1 M DTT	2 uL
RNaseOUT (40 U/uL)*	1 uL
SuperScript III RT (200 U/ uL)	1 uL

NOTA: Dependiendo el número de reacciones se ajusta el volumen final.

*El RNaseOUT, que es el inhibidor de RNasa recombinante para proteger el RNA contra la degradación del RNA diana debido a la contaminación por ribonucleasas en la preparación de RNA.

Se añaden 10 uL de la mezcla de síntesis de cDNA al primer tubo con el ARN/primer, mezclar suavemente y dar una pequeña centrifugada. Incubar a 50 °C por 50 minutos, se termina la reacción a 85° C durante 5 minutos, enfriar en hielo.

Centrifugar y agregar 1 uL de RNasa H al tubo e incubar por 20 minutos a 37 ° C. La ribonucleasa H (RNasa H) degrada específicamente la hebra de RNA en los híbridos RNA-DNA, no hidroliza los enlaces fosfodiéster en el DNA y RNA monocatenarios. Elimina el RNA después de la síntesis de cDNA de la primera cadena y la eliminación de las secuencias poli(A) del RNAm tras la hibridación con oligo(dT)

Las reacciones de cDNA pueden almacenarse entre -20°C y -70°C. Se tomó una alícuota de 2 uL para las reacciones de RT-qPCR, o de PCR punto final.

Análisis de expresión génica por RT-qPCR

Una de las principales técnicas utilizadas para el análisis de expresión génica es la RT-qPCR, la cual nos permite medir el nivel de expresión de genes en diferentes condiciones o momentos de desarrollo [6]. Esta técnica, también conocida como PCR cuantitativa con transcripción inversa combina estos dos procesos, es

utilizada para amplificar y cuantificar ácidos nucleicos a partir de una muestra biológica. La transcripción inversa convierte el ARN por medio de la enzima retrotranscriptasa inversa, en ADN complementario (cDNA) que luego se utiliza como plantilla para la amplificación por PCR.

El primer paso para la realización de la RT-qPCR es la obtención del RNA, para esto se debe de obtener una muestra purificada y óptima para su posterior uso en el proceso y de esta manera se puedan evitar contaminaciones por agentes externos a la muestra.

Retrotranscripción

Biológicamente, el camino seguido a partir de una cadena de RNA culminaría en una cadena de péptidos que darían origen a una proteína propia del organismo. Sin embargo, existe una manera de evitar el camino establecido por el dogma central de la biología molecular para que el RNA pueda dar origen a una cadena de DNA.

El proceso de la retrotranscripción hace uso de una muestra de RNA pura y la enzima retrotranscriptasa reversa, esta permite la obtención de un cDNA (DNA complementario) usando como molde la cadena de nucleótidos del RNA.

Diseño de cebadores

Tanto el diseño del cebador como la elección cuidadosa de la secuencia diana son esenciales para garantizar una amplificación específica y eficiente de los productos. Las secuencias diana deben ser únicas, de 75 a 150 pb de longitud con un contenido de GC de entre el 50 % y el 60 %, y no deben contener estructuras secundarias.

Los cebadores deben de ser complementarios a las secuencias de DNA sintetizados, por lo que deben de ser bisentido (Forward-Reverse), estos deberán de asociarse a la cadena sentido y la antisentido, para que ambas puedan ser amplificadas.

Diseño de controles:

Se realizaron cuatro controles distintos en la reacción en cadena de la polimerasa, controles positivos con el gen endógeno L6, el primero en presencia de ADN genómico a 500 ng, el segundo en presencia de ADN genómico a 1000 ng, un tercer control con ADN complementario en medio YP con el gen L6, y el último con ADN complementario en medio YPD y el gen L6. Se siguió la siguiente metodología para llevar a cabo la reacción:

Tabla 3. Diseño de controles para PCR

Componentes	1 Rx	4 Rx
10x Buffer	2.5 µl	10 µl
dNTPS (2mM)	0.5 µl	2 µl
MgCl ₂ [25 mM]	0.4 µl	1.6 µl
Fw primer [10 nM]	0.6 µl	2.4 µl
Rv primer [10 nM]	0.6 µl	2.4 µl
CDNA	(0.7; 1.0) µl	2.8 µl
Taq. Pol	0.2 µl	0.8 µl
H ₂ O DEPC	19.2 µl	76.8
Total	25 µl	100 µl

Nota: Dependiendo el número de reacciones se ajusta el volumen final

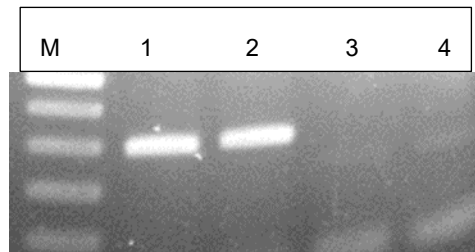


Figura 1. Controles positivos. 1) DNAg L6 dil 1:2 (1 mg), 2) DNAgL6 dil 1:4 (500ng), 3) cDNAL6 YPL6 500ng, 4) cDNAL6YPDL7 500ng

Estas reacciones fueron utilizadas como controles para las PCR's posteriores, en medio YP y YPD, en la fase levaduriforme y de micelio.

Resultados

Se realizaron técnicas de RT-PCR para evaluar la expresión de genes en ambas morfologías (levadura y micelio) y a diferentes condiciones del medio de cultivo.

Para la morfología de micelio, se realizaron los cálculos para una PCR de 5 reacciones, a una concentración de 500 ng de muestra. Teniendo varias reacciones en las que se evaluó con los genes L6, CrF1, EgLC, Eng 2 y Eng 3. Así mismo con dos controles positivos: DNAg + L6 y cDNA + L6.

Tabla 4. PCR punto final de micelio 500 ng

Componentes	1 Rx	6 Rx
10x Buffer	2.5 µl	15 µl
dNTPS (2mM)	0.5 µl	3 µl
MgCl2 [25 mM]	0.4 µl	2.4 µl
Fw primer [10 nM]	0.6 µl	3.6 µl
Rv primer [10 nM]	0.6 µl	3.6 µl
CDNA	(0.7; 1.0) µl	10.2 µl
Taq. Pol	0.2 µl	1.2 µl
H2O DEPC	19.2 µl	117 µl
Total	25 µl	1 µl

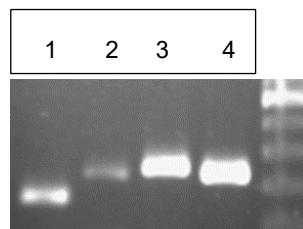


Figura 2. PCR micelio YP. 1) cDNA CrF1 2) cDNA EgLC, 3) cDNA Eng 2, 4) cDNA Eng 3

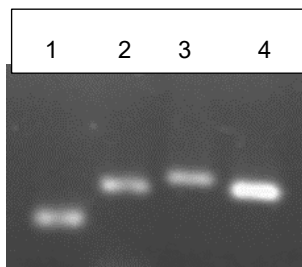


Figura 3. PCR micelio YPD. 1) cDNA CrF1 2) cDNA EgLC, 3) cDNA Eng 2, 4) cDNA Eng 3

PCR levadura 1000 ng

Para las PCR's evaluadas para la morfología levaduriforme, se optó por hacer uso de una concentración de muestra de 1000ng. Siguiendo el mismo procedimiento, en primera instancia, se realizó el cálculo de los volúmenes de las reacciones. Para tener certeza de la expresión de cada gene se evaluaron los mismos genes: L6, CrF1, EgLC, Eng 2 y Eng 3 en diferentes medios de cultivo: YP y YPD, siendo la principal variante la fuente de carbono disponible.

Tabla 5. PCR punto final de levadura

Componentes	1 Rx	6 Rx
10x Buffer	2.5 µl	15 µl
dNTPS (2mM)	0.5 µl	3 µl
MgCl2 [25 mM]	0.4 µl	2.4 µl
Fw primer [10 nM]	0.6 µl	3.6 µl
Rv primer [10 nM]	0.6 µl	3.6 µl
CDNA	(0.7; 1.0) µl	10.2 µl
Taq. Pol	0.2 µl	1.2 µl
H2O DEPC	19.2 µl	111 µl
Total	25 µl	150 µl

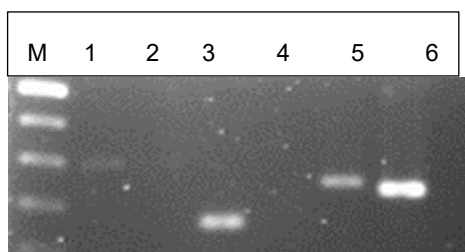


Figura 4. PCR levadura YP. M, marcadores de peso molecular, 1) DNAg L6, 2) cDNA L6, 3) cDNA CrF1, 4) cDNA EgLC, 5) cDNA Eng 2, 6) cDNA Eng 3

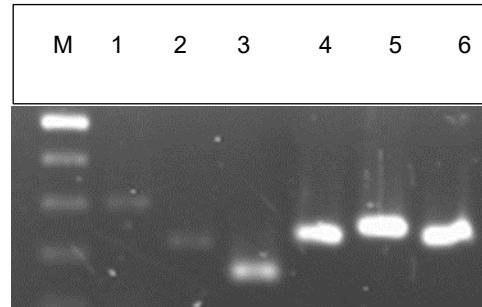


Figura 5. PCR levadura YPD. M, marcadores de peso molecular, 1) DNAg L6 2) cDNA L6 3) cDNA CrF1 4) cDNA EgLC, 5) cDNA Eng 2, 6) cDNA Eng 3

Discusión

En el presente estudio de Análisis de expresión de genes de beta-glucanasas en el hongo patógeno *Sporothrix schenckii* se investigó la expresión de algunos de los genes implicados en la síntesis y modificación de beta-glucanas, componentes esenciales de la pared celular fúngica que influyen en la virulencia y patogenicidad del hongo. Se analizaron los genes L6, CRF1, EGLC, ENG2 y ENG3 mediante la técnica de RT-qPCR en dos condiciones de cultivo diferentes: un medio rico en dextrosa como fuente de carbono (YPD) y un medio sin fuente de carbono (YP).

Expresión génica en medio YPD: En el medio con presencia de dextrosa (YPD) todos los genes tanto en su fase de micelio como levaduriforme se expresaron y amplificaron de manera efectiva, este resultado sugiere que la presencia de dextrosa como fuente de carbono es crucial para la expresión de estos genes en *Sporothrix schenckii*. Según Ene y col [7], la dextrosa proporciona los nutrientes necesarios para el crecimiento celular, actividad metabólica, así como la síntesis de algunas otras biomoléculas importantes para su crecimiento y cambios morfológicos, lo que probablemente influye en la transcripción de genes implicados en la formación de la pared celular, como las beta-glucanasas.

En contraste, en el medio YP, que carece de la dextrosa como fuente de carbono, en el caso de *Sporothrix schenckii* en su fase levaduriforme no se observó la expresión del gen “ENG2”, este resultado indica que la ausencia de dextrosa afecta significativamente en la expresión de ciertos genes. La falta de expresión de este gen en el medio YP de acuerdo con el estudio de Lozoya-Pérez y col. [8], podría estar relacionada con la necesidad de una fuente de carbono para activar su transcripción. ENG2 podría estar involucrada con la necesidad de algunos recursos derivados del metabolismo de los carbohidratos.

Estos resultados podrían indicar una dependencia en la expresión de ciertos genes de beta-glucanasas en *Sporothrix schenckii* a la disponibilidad de una fuente de carbono en el medio de cultivo. Los genes que se expresaron en ambos medios (CRF1, EGLC, ENG3) podrían estar bajo control de mecanismos reguladores que no dependen directamente de la presencia de carbohidratos.

Futuros estudios podrían explorar más a fondo los mecanismos reguladores que controlan la expresión de estos genes en respuesta a diferentes fuentes de nutrientes y cómo estos mecanismos contribuyen a la virulencia y supervivencia del hongo.

Conclusiones

Con la culminación de este proyecto, se obtuvieron los resultados esperados, haciendo uso de las técnicas y métodos que el proyecto requería. La técnica apropiada para este caso debía de ser una RT-qPCR con la cual se podría tener un mayor control de las copias de material genético obtenido, finalmente, para la obtención de resultados se hizo uso de una RT-PCR debido a problemas con el equipo original.

Los resultados obtenidos abren la perspectiva para futuras investigaciones que permitan entender el funcionamiento de este microorganismo y lo cual podría culminar con estudios que permitan desarrollar tratamientos efectivos contra estas enfermedades causadas por este organismo.

Referencias

1. Gow, N. A. R., Latge, J., and Munro, C. A. (2017). The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. *Microbiol. Spectr.* 5, 1–25. doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016
2. Villalobos-Duno HL, Barreto LA, Alvarez-Aular Á, Mora-Montes HM, Lozoya-Pérez NE, Franco B, Lopes-Bezerra LM and Niño-Vega GA (2021) Comparison of Cell Wall Polysaccharide Composition and Structure Between Strains of *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. *Front. Microbiol.* 12:726958. doi: 10.3389/fmicb.2021.726958
3. Clavijo-Giraldo, D. M., Matínez-Alvarez, J. A., Lopes-Bezerra, L. M., Ponce-Noyola, P., Franco, B., Almeida, R. S., et al. (2016). Analysis of *Sporothrix schenckii* sensu stricto and *Sporothrix brasiliensis* virulence in *Galleria mellonella*. *J. Microbiol. Methods* 122, 73–77. doi: 10.1016/j.mimet.2016.01.014
4. Lozoya-Pérez, N. E., Clavijo-Giraldo, D. M., Martínez-Duncker, I., García-Carnero, L. C., López-Ramírez, L. A., Niño-Vega, G. A., et al. (2020). Influences of the culturing media in the virulence and cell wall of *Sporothrix schenckii*, *Sporothrix brasiliensis*, and *Sporothrix globosa*. *J. Fungi* 6:323. doi: 10.3390/jof6040323
5. Teixeira, M.M.; de Almeida, L.G.; Kubitschek-Barreira, P.; Alves, F.L.; Kioshima, E.S.; Abadio, A.K.; Fernandes, L.; Derengowski, L.S.; Ferreira, K.S.; Souza, R.C.; et al. (2014) Comparative genomics of the major fungal agents of human and animal sporotrichosis: *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. *BMC Genom.*, 15, 943.
6. Rodríguez Rodríguez, G., Rodríguez, A., Ángel, M., & Zarain Herzberg, Á. (2021). Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. *Mens. Bioquim.* 45, 11-22. <http://biosensor.facmed.unam.mx/mensajebioquimico/wp-content/uploads/2021/06/5-Rodriguez-Rodriguez.pdf>
7. Ene, I. V., Brunke, S., Brown, A. J., & Hube, B. (2014). Metabolism in fungal pathogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 4(12), a019695. <http://m.perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/4/12/a019695.full>
8. Lozoya-Pérez, N. E., Clavijo-Giraldo, D. M., Martínez-Duncker, I., García-Carnero, L. C., López-Ramírez, L. A., Niño-Vega, G. A., & Mora-Montes, H. M. (2020). Influences of the culturing media in the virulence and cell wall of *Sporothrix schenckii*, *Sporothrix brasiliensis*, and *Sporothrix globosa*. *Journal of Fungi*, 6(4), 323. <https://www.mdpi.com/2309-608X/6/4/323>